

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

SARAH APARECIDA SIQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS
ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA
EM COMPRIMIDOS E EM AMOSTRA BIOLÓGICA**

Belo Horizonte

2019

SARAH APARECIDA SIQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS
ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA
EM COMPRIMIDOS E EM AMOSTRA BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Isabela da Costa César

Coorientador: Prof. Dr. Christian Fernandes

Belo Horizonte

2019

Siqueira, Sarah Aparecida.
S618d Desenvolvimento de novas estratégias analíticas para determinação de lumefantrina em comprimidos e em amostra biológica / Sarah Aparecida Siqueira. – 2019.

175 f.: il.

Orientadora: Isabela da Costa César.

Coorientador: Christian Fernandes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Malária – Teses. 2. Antimaláricos – Teses. 3. Lumefantrina – Teses. 4. Cromatografia quiral – Teses. 5. Validação de método – Teses. 6. Tecnologia farmacêutica – Teses. I. César, Isabela da Costa. II. Fernandes, Christian. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.19



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Desenvolvimento de novas estratégias analíticas para determinação de lumefantrina em comprimidos e em amostra biológica

SARAH APARECIDA SIQUEIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Isabela da Costa César - Orientadora
UFMG

Prof. Christian Fernandes - Coorientador
UFMG

Prof. Maria José Nunes de Paiva
UFMG

Dr. Leonardo de Souza Teixeira
Instituto de Ciências Farmacêuticas - ICF

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2019.

*Dedico esse trabalho a minha mãe e a
maninha Babi que sempre torceram por mim!*

*E a todos os alunos cotistas oriundos de escolas públicas de favelas e bairros
carentes que, assim como eu, lutaram bravamente para ter a educação que
mereciam.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ Gostaria de agradecer, primeiro, a essa energia poderosa que move o mundo e que faz a diferença na vida de muita gente, alguns chamam de Deus, outros de Maomé, uns de Deuses, outros de Buda, mas não importa o nome essa energia estará sempre guiando a vida de todos nós, ainda que alguns não acreditem!
- ❖ Gostaria de agradecer a minha família que esteve presente durante esses 9 anos de UFMG, entre graduação, intercâmbio e mestrado, eles nunca desistiram de mim e sempre estiveram na torcida para tudo dar certo, ainda que em alguns momentos eu não acreditasse em mim mesmo! Em especial a minha Maninha amada (Bárbara, carinhosamente Babi ou Piri) que descascou muito abacaxi por mim nesse período!!
- ❖ Aos meus amigos de escola, faculdade, estágio e trabalho que acompanharam muito de perto todo esse percurso e que passaram mais tempo comigo que a minha própria família em alguns momentos. Obrigada por aguentarem as loucuras de Sarah, eu sei não era fácil! Em especial agradeço a Luiza que acompanhou muito de perto todos os perengues que passei para concluir esse trabalho. E as minhas amigas de intercâmbio, Priscila, Denise e Carol, pelas viagens restauradoras que nós fizemos durante esse período.
- ❖ A minha orientadora, Isabela, que foi quase uma mãe durante todo o trabalho que com muita paciência, calma e carinho orientou essa aluna bem perdida que aqui vos escreve. Obrigada por confiar em mim e acreditar que o projeto seria concluído. Sem você a mágica jamais aconteceria!
- ❖ Ao meu co-orientador Christian que entrou nos 45 do segundo tempo para construirmos o segundo capítulo desse trabalho. Obrigada por ser nossa luz no fim do túnel.

- ❖ Ao professor Zé Eduardo pela simpatia e por me ensinar os passos de utilização do Shimadzu (carinhosamente chamado de “Meu Velhinho”, nem sonhava entrar na faculdade quando ele foi adquirido, mas ele esperou eu decidi fazer Mestrado todos esses anos e em fim nos encontramos!).
- ❖ Aos colegas de laboratório que contribuíram com conversas, com discussões, ensinamentos, descontentamentos e risadas, meu muito obrigada! Em especial a Iara que me ensinou os primeiros passos do equipamento de HPLC HP 1100 (carinhosamente chamado de “Meu Bebê”, tinha vida própria e funcionava quando queria!!), a Ingrid e o Derick que sempre me orientaram pelo laboratório me mostrando onde ficava os reagentes, vidrarias e que dividia bancada comigo. A Vanessa pelas muitas conversas, risadas e *WhatsApp* trocados. Ao André pelas conversas filosóficas sobre a vida. A Letícia pelas muitas conversas sobre o futuro que tivemos pelos corredores da FAFAR.
- ❖ Agradeço a Dr. Maria das Graças Carvalho, ao Laboratório de Hematologia, a Pós Doutoranda Rita e ao biomédico Luan pelo auxílio na coleta do sangue.
- ❖ A *Worldwide Antimalarial Resistance Network* pela doação dos padrões de lumefantrina e desbutil-lumefantrina. Ao Ministério da Saúde pela doação dos comprimidos de lumefantrina.
- ❖ Ao Colegiado de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas em especial ao Prof. Lucas Ferreira e ao Marton.
- ❖ Ao CNPq, Capes e UFMG por oferecerem o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho. Que os nossos governantes continuem olhando por esses órgãos e instituições e fomentando a pesquisa no país. Amém!

E por fim, eu gostaria de agradecer a mim, por nunca ter desistido...

Be thankful for what you have; you'll end up having more. If you concentrate on what you don't have, you will never, ever have enough.

Oprah Winfrey

A vida é cheia de obrigações que a gente cumpre por mais vontade que tenha de as infringir deslavadamente.

Machado de Assis

Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.

Cora Coralina

RESUMO

A malária é uma enfermidade parasitária que representa um grande problema de saúde pública em países na África, Ásia e América do Sul, apresentando uma elevada incidência mundial. O manejo da doença envolve a profilaxia e o tratamento medicamentoso com fármacos associados, sendo que a associação utilizada como primeira escolha para o tratamento da malária *falciparum* é composta por artemeter e lumefantrina. A lumefantrina é um fármaco quiral que apresenta dois enantiômeros, porém, é comercializada como um racemato. A enantiosseletividade dos antimaláricos é evidenciada na ocorrência de efeitos adversos e na susceptibilidade distinta do *Plasmodium* frente aos enantiômeros. Dessa maneira, avaliar a enantiosseletividade de lumefantrina e quantificar seus enantiômeros apropriadamente é essencial para um entendimento mais aprofundado do impacto da enantiosseletividade nas suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Para isso, um método cromatográfico quiral foi desenvolvido e validado para separação dos enantiômeros de lumefantrina em comprimidos, empregando coluna Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm, 5 µm), a 25 °C, fase móvel composta por hexano e isopropanol (97:3), fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 335 nm. O método foi validado segundo a RDC nº 166/2017 da ANVISA, para os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, seletividade e robustez. Dentro de outro escopo, a monitorização terapêutica de antimaláricos, por meio da quantificação das concentrações plasmáticas, utilizando métodos bioanalíticos sensíveis e inovadores, também é uma ferramenta importante para avaliação da eficácia clínica e do desenvolvimento de resistência a estes fármacos. Assim, desenvolveu-se e validou-se método bioanalítico para determinação da lumefantrina e de seu metabólito desbutil-lumefantrina em plasma humano. Como técnica de preparo de amostra, utilizou-se microextração em sorvente empacotado (MEPS), com seringa de 250 µL e sorvente C18. Os parâmetros de extração do fármaco foram otimizados por planejamento fatorial. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), a 35 °C, acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,05% (68:32) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 305 nm, com diazepam como padrão interno. O método foi validado segundo a RDC nº 27/2012 da ANVISA. Ambos os métodos desenvolvidos se mostraram adequados à separação e à quantificação de lumefantrina, de forma que novas abordagens analíticas foram disponibilizadas, podendo ser empregadas em futuros estudos para avaliação quiral ou monitorização terapêutica do fármaco.

Palavras chave: Malária. Lumefantrina. Cromatografia quiral. Microextração em sorvente empacotado. Desbutil-lumefantrina. Validação. Planejamento fatorial.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease that represents a major public health problem in Africa, Asia and South America, with a high incidence worldwide. The management of the disease involves prophylaxis and drug treatment with associated drugs, among which artemether-lumefantrine is the first line treatment for *falciparum* malaria. Lumefantrine is a chiral drug presenting two enantiomers; however, it is marketed as racemate. The enantioselectivity of antimalarial drugs is evidenced by the incidence of adverse effects and the distinct susceptibility of *Plasmodium* to the enantiomers. Thus, evaluating lumefantrine enantioselectivity and properly quantifying its enantiomers is essential for a deeper understanding of the impact of this enantioselectivity in its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. For this, a chiral chromatographic method was developed and validated for the separation of lumefantrine enantiomers, using a Chiralpack AD-H column (150 x 4.6 mm, 5 µm), at 25 °C, mobile phase composed of hexane and isopropanol (97:3), flow rate of 1.0 mL/min and detection at 335 nm. The method was validated according to RDC nº 166/2017 from ANVISA, for linearity, precision, accuracy, selectivity and robustness. Within other scope, therapeutic monitoring of antimalarials through the quantification of plasmatic concentrations by sensitive and innovative bioanalytical methods is also an important tool to evaluate clinical efficacy and development of resistance to these drugs. Thus, a bioanalytical method was developed and validated for determination of lumefantrine and its metabolite, desbutyl-lumefantrine, in human plasma. Microextraction by packed sorbent (MEPS) was employed for sample preparation, with 250 µL syringe and C18 sorbent. Parameters used in sample preparation were optimized by factorial design. Chromatographic separation was performed in a Luna C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), at 35 °C, acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid (68:32) as mobile phase, flow rate of 1.0 mL/min and detection at 305 nm, with diazepam as internal standard. The method was validated according to RDC nº 27/2012 from ANVISA. Both developed methods showed to be adequate for separation and quantitation of lumefantrine. Therefore, new analytical approaches were available, and may be used in future studies for chiral evaluation or therapeutic drug monitoring.

Key words: Malaria. Lumefantrine. Chiral chromatography. Microextraction by packed sorbent. Desbutyl-lumefantrine. Validation. Factorial design.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Regiões de transmissão da malária no Brasil..... | 28 |
| Figura 2 – Ciclo do <i>Plasmodium</i> em humanos e no vetor. Fonte: FRANÇA et al., 2008..... | 30 |
| Figura 3 – Estrutura de uma molécula quiral e seus enantiômeros. Fonte: FOGAÇA, 2018..... | 35 |
| Figura 4 – Estrutura química celulose (a) e amilose (b)..... | 39 |
| Figura 5 – Estrutura química do tris(3,5-dimetilfenilcarbamato)..... | 40 |
| Figura 6 – Fases estacionárias derivadas de carbamato de celulose e de amilose. Fonte: CHANKVETADZE, 2012..... | 42 |
| Figura 7 – Estrutura otimizada (esquerda) e possíveis sítios de interação (direita) em derivados de tris(fenilcarbamato) de celulose. Fonte: YASHIMA, 2001..... | 48 |
| Figura 8 – Estrutura tridimensional dos polímeros de celulose e amilose. Fonte: ALI, 2009..... | 49 |
| Figura 9 – Estrutura química da lumefantrina..... | 50 |
| Figura 10 – Estrutura química da desbutil-lumefantrina..... | 52 |
| Figura 11 – Cromatograma para os enantiômeros de lumefantrina e os espectros superpostos para avaliação da pureza espectral dos picos de cada enantiômero..... | 65 |
| Figura 12 – Cromatograma obtido para o método de padronização do insumo farmacêutico de lumefantrina na coluna LiChroCART CN (125 x 4,0 mm; 5 µm), fase móvel acetonitrila e TFA 0,05% (80:20), 1,0 mL/min, 335 nm..... | 65 |
| Figura 13 – Cromatograma obtido a partir do método desenvolvido para a separação e quantificação dos enantiômeros lumefantrina empregando coluna Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel hexano e isopropanol (97:3), 1,0 mL/min, 335 nm..... | 68 |
| Figura 14 – Cromatogramas obtidos para a avaliação da seletividade do método para o placebo, padrão e comprimido de lumefantrina..... | 69 |
| Figura 15 – Gráfico de quartis para os enantiômeros de lumefantrina..... | 70 |
| Figura 16 – Gráfico de resíduos de <i>Durbin-Watson</i> para os enantiômeros de lumefantrina..... | 71 |

| | |
|--|-----|
| Figura 17 – Curvas de calibração obtidas para o parâmetro de linearidade do método quiral para os enantiômeros de lumefantrina..... | 73 |
| Figura 18 – Gráfico de resíduos obtidos para os enantiômeros de lumefantrina durante o processo estatístico para avaliação da linearidade do método..... | 74 |
| Figura 19 – Gráfico intervalo de confiança 95% para os enantiômeros de lumefantrina em relação aos parâmetros temperatura e comprimento de onda, obtidos pelo teste de <i>Tukey</i> | 80 |
| Figura 20 – Estrutura química da halofantrina..... | 83 |
| Figura 21 – Seringa e cartucho utilizados para microextração em fase sólida por sorvente empacotado..... | 114 |
| Figura 22 – Etapas para execução da microextração em fase sólida por sorvente empacotado..... | 114 |
| Figura 23 – Estrutura química do padrão interno diazepam utilizado para o desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma..... | 120 |
| Figura 24 – Esquema de preparo de amostras para os testes determinados pelo planejamento fatorial para otimização da extração por MEPS..... | 126 |
| Figura 25 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a separação de lumefantrina e seu metabólito, empregando coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel composta por acetonitrila e TFA 0,05% (68:32); detecção em 305 nm; fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 25 µL. DL = debutil-lumefantrina, DZ = diazepam e LF = lumefantrina..... | 138 |
| Figura 26 – Curvas de calibração para a lumefantrina (LF) e a desbutil-lumefantrina (DL) para avaliação prévia da linearidade do método desenvolvido para a quantificação desses fármacos em plasma humano..... | 139 |
| Figura 27 – Gráfico de pareto obtidos pelo PFF 2 ³⁻¹ demonstrando a influência das variáveis (X ₁ , X ₂ e X ₃) na etapa de extração em meio aquoso da lumefantrina (esquerda) e desbutil-lumefantrina (direita)..... | 140 |
| Figura 28 – Gráfico de pareto obtidos pelo PFF 2 ⁴⁻¹ mostrando as variáveis (X ₁ , X ₂ , X ₃ e X ₄) que afetam a etapa de extração em plasma da lumefantrina (esquerda) e desbutil-lumefantrina (direita)..... | 142 |

| | |
|--|-----|
| Figura 29 – Curvas de nível obtidas pelos experimentos PFF 2 ⁴⁻¹ para avaliação da extração em plasma da lumefantrina e desbutil-lumefantrina, demonstrando a relação entre número de ciclos de aspiração e volume de amostra, e entre volume por aspiração e volume de amostra..... | 143 |
| Figura 30 – Procedimento otimizado de extração dos analitos por MEPS para o parâmetro de linearidade..... | 144 |
| Figura 31 – Cromatogramas para a amostra LIQ e as amostras branco para o parâmetro de seletividade demonstrando a sobreposição dos cromatogramas e o zoom na porção inferior do mesmo para a avaliação de possíveis interferentes presentes na matriz biológica. DL: desbutil-lumefantrina, DZ: diazepam, LF: lumefantrina..... | 145 |
| Figura 32 – Cromatogramas para avaliação da seletividade do método frente a outros fármacos e substâncias que possam eventualmente estar presentes na matriz biológica. Preto = analitos na concentração do LIQ e Vermelho = substâncias avaliadas na concentração de 100 µg/mL..... | 146 |
| Figura 33 – Cromatogramas para avaliação do efeito residual do método bioanalítico desenvolvido para quantificação da lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma..... | 147 |
| Figura 34 – Curvas de calibração para o parâmetro linearidade dos analitos lumefantrina (LF) e desbutil-lumefantrina (DL)..... | 150 |
| Figura 35 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma, empregando coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel composta por acetonitrila e TFA 0,05% (68:32); detecção em 305 nm; fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 25 µL. DL = debutil-lumefantrina, DZ = diazepam e LF = lumefantrina..... | 156 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Tipos de seletores quirais e alguns nomes comerciais..... | 38 |
| Tabela 2 – Trabalhos que utilizaram colunas CHIRALPAK AD e AD-H no período de 2010 a 2018..... | 44 |
| Tabela 3 – Propriedades físico-químicas da lumefantrina..... | 51 |
| Tabela 4 – Propriedades físico-químicas da desbutil-lumefantrina..... | 53 |
| Tabela 5 – Proporção dos excipientes utilizados para preparo do placebo, conforme composição dos comprimidos de Combiart..... | 59 |
| Tabela 6 – Procedimento de diluição da solução estoque para o parâmetro de linearidade..... | 60 |
| Tabela 7 – Procedimento de preparação das amostras para o parâmetro de exatidão..... | 62 |
| Tabela 8 – Parâmetros nominais e alterados para avaliação da robustez do método..... | 62 |
| Tabela 9 – Valores de área, concentração e teor obtidos durante a padronização do insumo de lumefantrina em três dias diferentes com amostras preparadas independentemente..... | 66 |
| Tabela 10 – Concentrações utilizadas e respostas obtidas para a construção da curva de calibração e comprovação da linearidade do método..... | 70 |
| Tabela 11 – Dados da ANOVA para os enantiômeros de lumefantrina para a verificação da significância da regressão e o desvio de linearidade..... | 72 |
| Tabela 12 – Parâmetros da regressão calculados para a curva de calibração dos enantiômeros de lumefantrina..... | 73 |
| Tabela 13 – Resultados obtidos com o parâmetro de precisão para o enantiômero 1 com o método quiral desenvolvido..... | 75 |
| Tabela 14 – Resultados obtidos com o parâmetro de precisão para o enantiômero 2 com o método quiral desenvolvido..... | 75 |
| Tabela 15 – Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método quiral desenvolvido para quantificação dos enantiômeros de lumefantrina..... | 76 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 16 – Resultados de teor dos enantiômeros da lumefantrina obtidos durante a avaliação da robustez do método para os parâmetros temperatura e comprimento de onda..... | 77 |
| Tabela 17 – Resultados da ANOVA para os enantiômeros de lumefantrina na avaliação da robustez do método para os parâmetros temperatura e comprimento de onda..... | 78 |
| Tabela 18 – Resultados obtidos para os enantiômeros de lumefantrina para o teste de comparações múltiplas de <i>Tukey</i> para os parâmetros temperatura e comprimento de onda..... | 79 |
| Tabela 19 – Resultados de teor dos enantiômeros da lumefantrina obtidos durante a avaliação da robustez do método em relação à marca do hexano..... | 81 |
| Tabela 20 – Resultados do teste <i>t</i> de <i>Student</i> pareado para o parâmetro marca do hexano..... | 81 |
| Tabela 21 – Resultados para a quantificação dos enantiômeros da lumefantrina pelo método quiral desenvolvido, em porcentagem do teor e em massa de ativo por comprimido..... | 82 |
| Tabela 22 – Métodos bioanalíticos para quantificação de lumefantrina em amostras biológicas publicados no período de 2010 a 2018..... | 111 |
| Tabela 23 – Procedimento de diluição da solução estoque dos analitos em estudo para construção da curva de calibração para avaliação inicial da linearidade do método..... | 122 |
| Tabela 24 – Experimentos do PFF 2 ² para otimização da extração por MEPS em meio aquoso..... | 123 |
| Tabela 25 – Experimentos do PFF 2 ³ para otimização da extração por MEPS em plasma..... | 124 |
| Tabela 26 – Procedimento de diluição das soluções estoque para avaliação do parâmetro de linearidade..... | 131 |
| Tabela 27 – Massa de cada analito nos eppendorfs de extração e a concentração teórica de cada <i>vial</i> após a dessorção do analito em 250 µL de fase móvel..... | 131 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 28 – Parâmetros de regressão para as curvas de calibração desenvolvidas para quantificação da lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma humano..... | 138 |
| Tabela 29 – Recuperação obtida em cada experimento do PFF 2^{3-1} para a lumefantrina e para a desbutil-lumefantrina em solução, por meio da MEPS. X1 = volume inicial da amostra, X2 = volume por aspiração e X3 = número de ciclos de aspiração..... | 139 |
| Tabela 30 – Recuperação obtida em cada experimento do PFF 2^{3-1} para a lumefantrina e para a desbutil-lumefantrina em amostras de plasma, por meio da MEPS. X1 = volume inicial da amostra, X2 = diluição da amostra, X3 = volume por aspiração e X4 = número de ciclos de aspiração..... | 142 |
| Tabela 31 – Fator matriz normalizado para os níveis de concentração CQB, CQM e CQA para avaliação do efeito matriz do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma... | 148 |
| Tabela 32 – Resultados para o parâmetro recuperação para o método bioanalítico desenvolvido para quantificar lumefantrina e seu metabólito em plasma..... | 149 |
| Tabela 33 – Parâmetros da regressão para as curvas de calibração construídas para avaliação da linearidade do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma..... | 150 |
| Tabela 34 – Desvios calculados para as três curvas de calibração construídas em três dias diferentes para avaliação da linearidade do método desenvolvido para quantificação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma..... | 151 |
| Tabela 35 – Resultados para o parâmetro de precisão e exatidão para o método desenvolvido para quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma..... | 153 |
| Tabela 36 – Resultados de EPR encontrados para a estabilidade dos analitos em matriz biológica..... | 154 |
| Tabela 37 – Resultados das áreas obtidas para o teste de estabilidade dos analitos em solução, comparando-se os resultados das amostras recém-preparadas com aquelas armazenadas em bancada e na geladeira por 15 dias..... | 155 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 38 – Resultados obtidos com aplicação do método validado para avaliação da quantificação da lumefantrina em plasma coletado após a administração do medicamento..... | 156 |
| Tabela 39 – Comparação da recuperação obtida em outros estudos publicados na literatura científica com técnicas distintas e o método desenvolvido por MEPS no presente trabalho..... | 158 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CLAE | Cromatografia a líquido de alta eficiência |
| CLAEq | Cromatografia a líquido de alta eficiência quiral |
| CQA | Controle de qualidade de alta concentração |
| CQB | Controle de qualidade de baixa concentração |
| CQD | Controle de qualidade de diluição |
| CQM | Controle de qualidade de média concentração |
| COEP | Comitê de Ética e Pesquisa |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| DDT | Diclorodifeniltricloroetano |
| DL | Desbutil-lumefantrina |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| DZ | Diazepam |
| ECC | Estabilidade após congelamento e descongelamento |
| ECD | Estabilidade curta duração |
| ECHA | <i>European Chemical Agency</i> |
| ELD | Estabilidade longa duração |
| EMA | <i>European Medicine Agency</i> |
| EPP | Estabilidade pós-processamento |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| IFA | Insumo farmacêutico ativo |
| IPA | Incidência Parasitárias Anual |
| LD | Limite de detecção |
| LF | Lumefantrina |
| LIQ | Limite inferior de quantificação |
| LQ | Limite de quantificação |
| LSQ | Limite superior de quantificação |
| MM | Massa molar |

| | |
|------|---|
| MMQO | Método dos mínimos quadrados ordinários |
| MS | Ministério da Saúde |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PI | Padrão interno |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| RPM | Rotações por minuto |
| SQR | Substância Química de Referência |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 21 |
| CAPÍTULO 1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO QUIRAL PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ENÂNTIOMEROS DE LUMEFANTRINA..... | 24 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 25 |
| 2 OBJETIVOS..... | 26 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 26 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 26 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 27 |
| 3.1 Malária: características da doença e tratamento..... | 27 |
| 3.1.1 <i>Agente etiológico da malária</i> | 29 |
| 3.1.2 <i>Ciclo de vida do parasita</i> | 29 |
| 3.1.3 <i>Tratamento</i> | 31 |
| 3.1.4 <i>Profilaxia</i> | 32 |
| 3.2 Indústria farmacêutica e investimentos em antimaláricos..... | 33 |
| 3.3 Quiralidade e separação enantiomérica..... | 34 |
| 3.4 Fases estacionárias quirais derivadas de carbamatos de polissacarídeos..... | 38 |
| 3.4.1 <i>Mecanismo de reconhecimento quiral e separação das fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos</i> | 46 |
| 3.5 Antimaláricos e estudos quirais..... | 49 |
| 3.6 Lumefantrina e desbutil-lumefrantrina..... | 50 |
| 3.6.1 <i>Farmacocinética e farmacodinâmica da lumefantrina e seus enantiômeros</i> | 51 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 55 |
| 4.1 Materiais..... | 55 |
| 4.1.1 <i>Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras</i> | 55 |
| 4.1.2 <i>Reagentes e vidrarias</i> | 55 |
| 4.1.3 <i>Equipamentos e materiais</i> | 55 |
| 4.2 Métodos..... | 56 |
| 4.2.1 <i>Caracterização do insumo farmacêutico de lumefantrina</i> | 56 |
| 4.2.1.1 <u>Padronização do insumo de lumefantrina</u> | 56 |
| 4.2.1.1.1 <i>Preparo das soluções padrão e amostra de lumefantrina</i> | 56 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.1.1.2 Condições cromatográficas para a padronização do insumo..... | 57 |
| 4.2.2 Desenvolvimento e validação de método analítico quiral para quantificação dos enantiômeros de lumefantrina em comprimidos..... | 57 |
| <u>4.2.2.1 Desenvolvimento do método cromatográfico quiral.....</u> | 57 |
| <u>4.2.2.2 Preparo das soluções padrão e amostra de lumefantrina.....</u> | 58 |
| <u>4.2.2.3 Validação do método cromatográfico quiral.....</u> | 58 |
| 4.2.2.3.1 Seletividade..... | 59 |
| 4.2.2.3.2 Linearidade..... | 59 |
| 4.2.2.3.3 Precisão..... | 61 |
| 4.2.2.3.4 Exatidão..... | 61 |
| 4.2.2.3.5 Limite de detecção e quantificação..... | 62 |
| 4.2.2.3.6 Robustez..... | 62 |
| 4.3 Doseamento dos comprimidos..... | 63 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 64 |
| 5.1 Caracterização do insumo farmacêutico de lumefantrina..... | 64 |
| <i>5.1.1 Padronização do insumo farmacêutico de lumefantrina.....</i> | 65 |
| 5.2 Desenvolvimento e validação do método cromatográfico quiral para quantificação de lumefantrina em comprimidos..... | 66 |
| <i>5.2.1 Desenvolvimento do método cromatográfico quiral.....</i> | 66 |
| <i>5.2.2 Validação do método analítico cromatográfico quiral.....</i> | 68 |
| <u>5.2.2.1 Seletividade.....</u> | 68 |
| <u>5.2.2.2 Linearidade.....</u> | 69 |
| <u>5.2.2.3 Precisão.....</u> | 74 |
| <u>5.2.2.4 Limite de detecção e quantificação.....</u> | 74 |
| <u>5.2.2.5 Exatidão.....</u> | 76 |
| <u>5.2.2.6 Robustez.....</u> | 76 |
| 5.3 Doseamento..... | 82 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 85 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 86 |
| CAPÍTULO 2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LUMEFANTRINA EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM SORVENTE EMPACOTADO COMO PREPARO DE AMOSTRA..... | 106 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 107 |
| 2 OBJETIVOS..... | 108 |

| | |
|--|-----|
| 2.1 Objetivo geral..... | 108 |
| 2.1 Objetivos específicos..... | 108 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 109 |
| 3.1 Métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos..... | 109 |
| 3.1.1 <i>Quantificação de lumefantrina em matrizes biológicas.....</i> | 110 |
| 3.1.2 <i>Microextração em fase sólida por sorvente empacotado como preparo de amostra.....</i> | 113 |
| 3.2 Métodos quimiométricos para otimização de experimentos..... | 116 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 118 |
| 4.1 Materiais..... | 118 |
| 4.1.1 <i>Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras.....</i> | 118 |
| 4.1.2 <i>Reagentes e vidrarias.....</i> | 118 |
| 4.1.3 <i>Equipamentos e materiais.....</i> | 118 |
| 4.1.4 <i>Amostras biológicas sem a presença do medicamento.....</i> | 119 |
| 4.2 Métodos..... | 120 |
| 4.2.1 <i>Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma humano empregando MEPS como preparo de amostra.....</i> | 120 |
| 4.2.2 <i>Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico para separação dos analitos.....</i> | 120 |
| 4.2.3 <i>Otimização dos parâmetros de extração dos fármacos.....</i> | 121 |
| 4.2.4 <i>Validação do método bioanalítico para quantificação de lumefantrina em PLH empregando microextração em fase sólida em sorvente empacotado.....</i> | 125 |
| 4.2.4.1 <u>Seletividade.....</u> | 125 |
| 4.2.4.2 <u>Efeito residual.....</u> | 127 |
| 4.2.4.3 <u>Efeito Matriz.....</u> | 128 |
| 4.2.4.4 <u>Recuperação.....</u> | 129 |
| 4.2.4.5 <u>Linearidade.....</u> | 129 |
| 4.2.4.6 <u>Precisão e exatidão.....</u> | 132 |
| 4.2.4.7 <u>Estabilidade dos analitos em plasma.....</u> | 133 |
| 4.2.4.8 <u>Estabilidade dos analitos em solução.....</u> | 134 |
| 4.2.5 <i>Aplicação do método bioanalítico desenvolvido e validado na análise de amostras de voluntários.....</i> | 135 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 136 |

| | |
|---|------------|
| 5.1 Desenvolvimento e otimização do método CLAE-UV para avaliação da extração dos fármacos por MEPS..... | 136 |
| 5.2 Validação do método bioanalítico para quantificação de lumefantrina empregando MEPS..... | 144 |
| 5.2.1 Seletividade..... | 144 |
| 5.2.2 Efeito residual..... | 146 |
| 5.2.3 Efeito matriz..... | 148 |
| 5.2.4 Recuperação..... | 148 |
| 5.2.5 Linearidade..... | 149 |
| 5.2.6 Precisão e exatidão..... | 152 |
| 5.2.7 Estabilidade dos analitos em matriz biológica..... | 154 |
| 5.2.8 Estabilidade dos analitos em solução..... | 155 |
| 5.3 Aplicação do método desenvolvido e validado na análise de amostras de voluntários..... | 155 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 159 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 160 |
| ANEXO I..... | 170 |
| ANEXO II..... | 171 |

INTRODUÇÃO GERAL

A população mundial tem sofrido com doenças parasitárias ao longo de toda a sua história. Dentre elas, as que mais se destacam são: amebíase, doença de Chagas, giardíase, leishmaniose, toxoplasmose, tricomoníase e malária, sendo essa última uma das mais alarmantes. O nome malária vem do italiano "*male ária*", ou seja, ar ruim, contaminado (TUTEJA, 2007). Esse nome originou-se devido ao fato de que no século XV as pessoas acreditavam que se contaminavam ao respirar o odor dos pântanos e esgotos (OLIVEIRA, 2009; PADILHA E SALES, 2011).

A malária é uma doença que remonta à era pré-cristã; entretanto, o conhecimento de suas características patológicas somente foi consolidado no século XIX (BRAGA E FONTES, 2005). O mecanismo de transmissão da malária pelo mosquito *Anopheles* foi descoberto por três pesquisadores italianos, Giovanni Battista Grassi, Giuseppe Bastianelli e Amico Bignami em 1898 (COX, 2010). Em 1880, o médico francês Laveran, que trabalhava na Argélia, identificou o causador dessa doença infecto-parasitária, o parasita do gênero *Plasmodium*. Posteriormente, em 1897, Sir Ronald Ross, médico militar inglês servindo na Índia, demonstrou que os mosquitos do gênero *Anopheles* são seus transmissores (SHARMA, 2006). Com essas descobertas, diferentes abordagens para o tratamento da malária foram propostas com a intenção de interromper a transmissão da doença (BRAGA E FONTES, 2005).

Como exemplo de tratamentos, podemos citar o Programa de Erradicação da Malária, proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1955 e implantado no Brasil em 1965 (LOIOLA *et al.*, 2002). Esse programa previa a borrifação de paredes com inseticidas de ação residual, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) e tratamento em massa dos pacientes com um fármaco antimalárico de baixa toxicidade (cloroquina). Apesar dos esforços, a medida não conseguiu erradicar a doença do mundo, principalmente em regiões da África, Ásia e América do Sul (Amazônia Brasileira) (SILVA E PAIVA, 2015).

Essa falha na erradicação da infecção foi atribuída principalmente ao desenvolvimento de resistência dos parasitos aos antimaláricos utilizados, o que fez com que a OMS, a partir de 1992, modificasse sua estratégia de combate à malária, implantando o

plano de ação denominado de Estratégia Global da Malária. Essa estratégia visa à integração de esforços dos serviços de saúde direcionados para cada situação local específica a ser enfrentada (SILVEIRA E REZENDE, 2001).

No Brasil, o controle da malária é realizado por políticas de saúde promovidas pelo Ministério da Saúde em consonância com medidas da OMS. O país atualmente faz parte da Estratégia Global da Malária. Por meio de guias informativos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os padrões de tratamento e o manejo da doença principalmente nas regiões endêmicas, como a Amazônica (BRASIL, 2010).

Em relação ao tratamento da malária, existe uma gama variada de fármacos antimaláricos disponíveis no mercado e a grande maioria são moléculas quirais administradas ao paciente na forma de racemato (BROCKS E MEHVAR, 2003), em terapias combinadas. Um exemplo dessas terapias é a associação composta de artemeter e lumefantrina, dois fármacos com ações farmacológicas diferentes (WHITE *et al.*, 1999; CUI & SU, 2009), muito indicada para o tratamento da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* em regiões endêmicas (BRASIL, 2010).

A enantioseletividade dos antimaláricos é evidenciada na ocorrência de efeitos adversos e na susceptibilidade distinta do *Plasmodium* frente aos enantiômeros. Dessa maneira, avaliar a enantioseletividade dos antimaláricos por meio de métodos analíticos quirais, capazes de separar e quantificar os enantiômeros de forma apropriada é essencial para a eficácia clínica, segurança e avaliação da resistência a esses fármacos (BROCKS E MEHVAR, 2003).

A administração correta dos antimaláricos e a monitorização de suas concentrações plasmáticas são muito importantes, uma vez que doses subterapêuticas são correlacionadas ao desenvolvimento de resistência desses fármacos. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos bioanalíticos adequados para a determinação desses antimaláricos em medicamentos e em amostras biológicas é importante para assegurar tratamento e profilaxia apropriados (JEMAL, 2000; NATAL, 2002; CASSIANO *et al.*, 2006). Técnicas que permitam uma extração rápida, barata e eficaz do fármaco a partir de matrizes biológicas se mostram ideais para esse objetivo. Dentro deste contexto, a microextração em sorvente empacotado, seguida da análise

por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), demonstra ser uma técnica adequada, já que permite a utilização de volumes de amostra e solventes reduzidos, é rápida e pode ser automatizada (PEREIRA et al., 2014).

Desta forma, com o presente trabalho, buscou-se o desenvolvimento de novas estratégias analíticas para quantificação de lumefantrina, disponibilizando novos métodos analítico e bioanalítico, visando contribuir para uma terapia antimalária eficaz e segura.

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO QUIRAL PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ENÂNTIOMEROS DE LUMEFANTRINA EM COMPRIMIDOS

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos quirais é muito importante, visto que a maioria das moléculas comercializadas possuem centros estereogênicos. A quiralidade é uma propriedade química que fornece grandes barreiras ao completo entendimento do mecanismo de ação, da farmacocinética e dos efeitos adversos que as moléculas apresentam. Isso ocorre devido ao fato dos enantiômeros serem moléculas com propriedades muito parecidas, sendo diferenciados somente no ambiente quiral do organismo, onde proteínas, lipídeos receptores e outras moléculas endógenas possuem quiralidade e, dessa forma, conseguem diferenciar um enantiômero do outro.

Os fármacos quirais possuem uma história trágica protagonizada pelo fármaco talidomida, que nos anos 1960 causou a má-formação de muitos fetos cujas mães utilizaram o fármaco durante a gestação para evitar enjoos. Um dos enantiômeros da talidomida apresenta características teratogênicas e como o medicamento era comercializado em sua forma racêmica, esse enantiômero foi responsável pelo aumento do número de casos de crianças com má-formações. Com a descoberta, os demais medicamentos que apresentavam quiralidade passaram a ser monitorados pelos cientistas e indústrias farmacêuticas e, assim, passou-se a procurar métodos para separar esses enantiômeros e descrever suas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas.

Diante do exposto, o desenvolvimento de método quiral para a lumefatrina é muito importante, visto que o fármaco apresenta dois enantiômeros e é utilizado em larga escala nas áreas endêmicas da doença. Apesar de vários estudos já terem sido descritos na literatura sobre sua atividade farmacológica e sua toxicologia, ainda não há muitos estudos que descrevem sua atividade quiral no organismo ou os efeitos da comercialização de sua mistura racêmica. Assim, o método quiral desenvolvido nesse trabalho pode ser uma ferramenta útil para avaliação dos aspectos enantiosseletivos do fármaco na terapia antimalárica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ❖ Desenvolver e validar método analítico quiral para separação e quantificação dos enantiômeros da lumefantrina em comprimidos.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Desenvolver método analítico por CLAE acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) e coluna quiral a base de polissacarídeo – tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose – para quantificação de lumefantirna em comprimidos;
- ❖ validar o método desenvolvido segundo as normativas da resolução n°166/2017 da ANVISA;
- ❖ realizar a quantificação dos enantiômeros de lumefantrina em comprimidos atualmente distribuídos no país.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

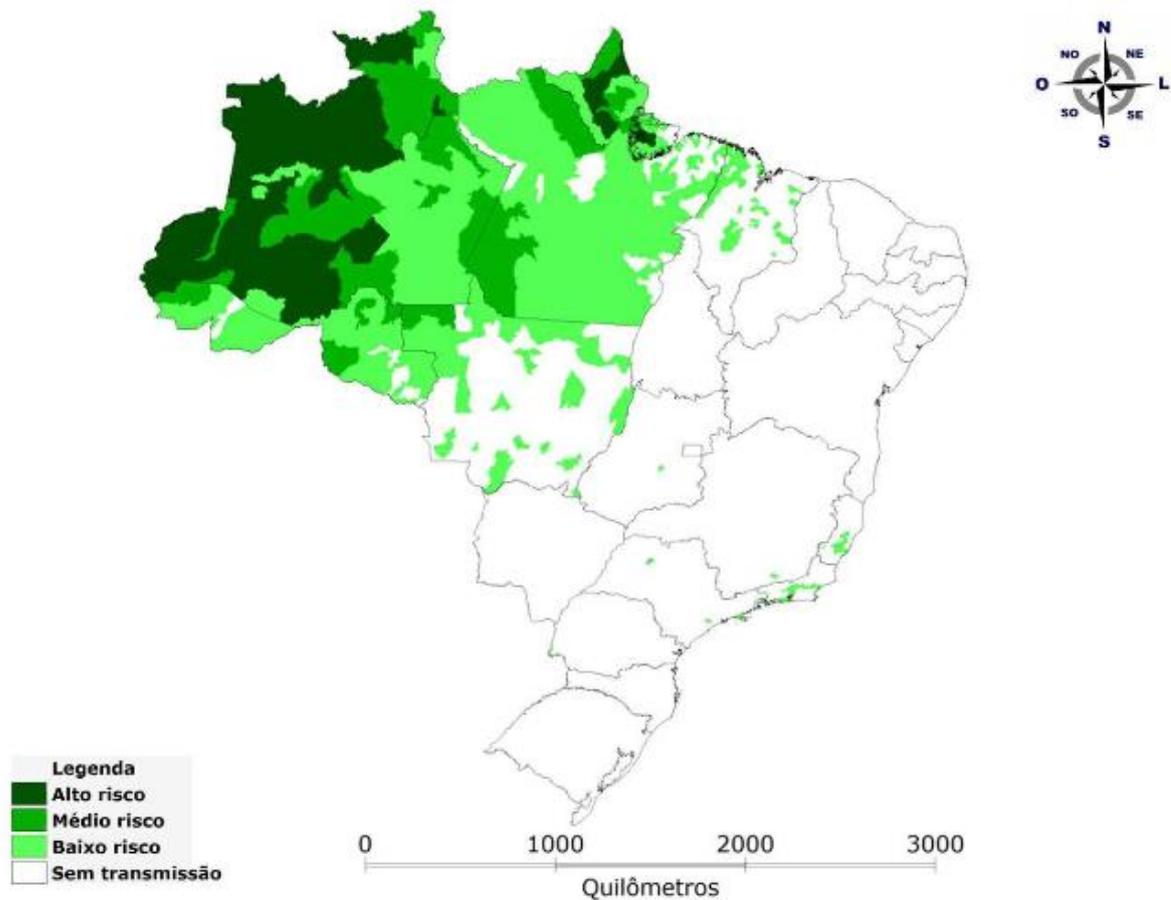
3.1 Malária: características da doença e tratamento

A malária é uma infecção endêmica das zonas tropicais e subtropicais do mundo (BRAGA E FONTES, 2005), ocorrendo principalmente em nações pobres da África e países em desenvolvimento como o Brasil (BROCKS E MEHVAR, 2003). Esses países representam uma parcela de 40% da população mundial, entretanto, ainda assim, os medicamentos destinados à profilaxia e ao tratamento da malária são escassos, não cobrindo as necessidades dos pacientes acometidos com a enfermidade e daqueles em risco de contrair a doença. Além disso, o desenvolvimento de resistência do protozoário aos antimaláricos vigentes compromete a eficácia e utilização desses fármacos (BROCKS E MEHVAR, 2003).

Segundo a última atualização epidemiológica da OMS, houve um aumento de casos de malária nos últimos anos na América Latina. Estima-se que em 2016 houve cinco milhões de casos a mais de malária do que em 2015. Já os óbitos pela doença ficaram em torno de 445 mil, número similar ao ano de 2015. A OMS recomenda que os países das Américas fortaleçam as ações de vigilância e controle da malária após um aumento no número de casos em vários países da região durante os anos 2016 e 2017 (WHO, 2017).

Atualmente, a OMS atua em 21 países com a meta de erradicar a malária até 2020. A iniciativa é denominada E-2020 e foca na erradicação da malária em locais indígenas e na prevenção da transmissão da malária proveniente de outros locais (WHO, 2018).

No Brasil, a região Amazônica é o principal foco da infecção (**Figura 1**). Segundo o Ministério da Saúde, o risco de contrair a doença nessa região não é uniforme. O risco é medido pela Incidência Parasitária Anual (IPA), que corresponde à quantidade de lâminas positivas dividida pela população sob risco e multiplicado por uma constante, geralmente 1.000 (BRASIL, 2003).



Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS

Figura 1 - Regiões de transmissão da malária no Brasil.

Os fatores que contribuem para a alta incidência de malária estão relacionados à população suscetível, ao agente etiológico e à presença do vetor. Considera-se que a população da Amazônia apresenta um alto nível de suscetibilidade à infecção devido à ausência de uma imunidade adquirida. Em locais como a África, onde os indivíduos apresentam alto grau de imunidade adquirida, a evolução da doença é mais lenta levando a quadros clínicos menos graves da infecção. Outro fator que colabora para alta incidência da malária é o agente etiológico, onde se destacam a resistência aos fármacos, o atraso no diagnóstico e no tratamento, e a fragilidade da vigilância epidemiológica. A presença do vetor constitui outro determinante direto para a elevada incidência da malária e dentre os fatores colaboradores encontram-se a existência de focos de infestação, baixa efetividade dos inseticidas, exposição ao vetor e pouca integração entre medidas de controle e de prevenção (BRASIL, 2003).

3.1.1 Agente etiológico da malária

O agente etiológico responsável pela malária pertence ao gênero *Plasmodium*. Esse gênero apresenta diversas espécies, entretanto, somente quatro delas parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*, sendo que este último está presente em áreas restritas do continente africano. O vetor invertebrado da malária é o mosquito do gênero *Anopheles* (MAHMUD, 2017) .

A transmissão da malária ocorre quando a fêmea do mosquito *Anopheles* parasitadas com esporozoítos, em suas glândulas salivares, inoculam estas formas infectantes no hospedeiro durante o repasto sanguíneo. A doença não é contagiosa. Raramente pode ocorrer a transmissão por meio de transfusão de sangue contaminado ou do uso compartilhado de seringas contaminadas. Mais rara ainda é a transmissão congênita (BRASIL, 2009). Somente o ciclo eritrocítico assexuado é responsável pelas manifestações clínicas da infecção. A destruição dos eritrócitos e a consequente liberação dos parasitas e de seus metabólitos na circulação provocam uma resposta do hospedeiro, determinando alterações morfológicas e funcionais observadas clinicamente no indivíduo com malária (MEHLHORN, 2016)

3.1.2 Ciclo de vida do parasita

A doença se inicia quando o vetor inocula no hospedeiro vertebrado (homem) esporozoítos infectantes (**Figura 2**). Os esporozoítos permanecem sob a pele cerca de 15 minutos até atingirem a corrente sanguínea. Ao alcançarem a corrente sanguínea, eles circulam pelo organismo até infectarem os hepatócitos onde efetivamente ocorrerá o desenvolvimento parasitário. No hepatócito, os esporozoítos se convertem em trofozoítos pré-eritrocíticos. Estes, por sua vez, se multiplicam por reprodução assexuada (esquizogonia) originando os esquizontes teciduais e, posteriormente, os merozoítos que irão invadir os eritrócitos (hemácias). Em seguida, na hemácia, eles se convertem em trofozoítos jovens e depois trofozoítos maduros. A reprodução do parasita se dá por esquizogonia originando os esquizontes (BRAGA E FONTES, 2005).

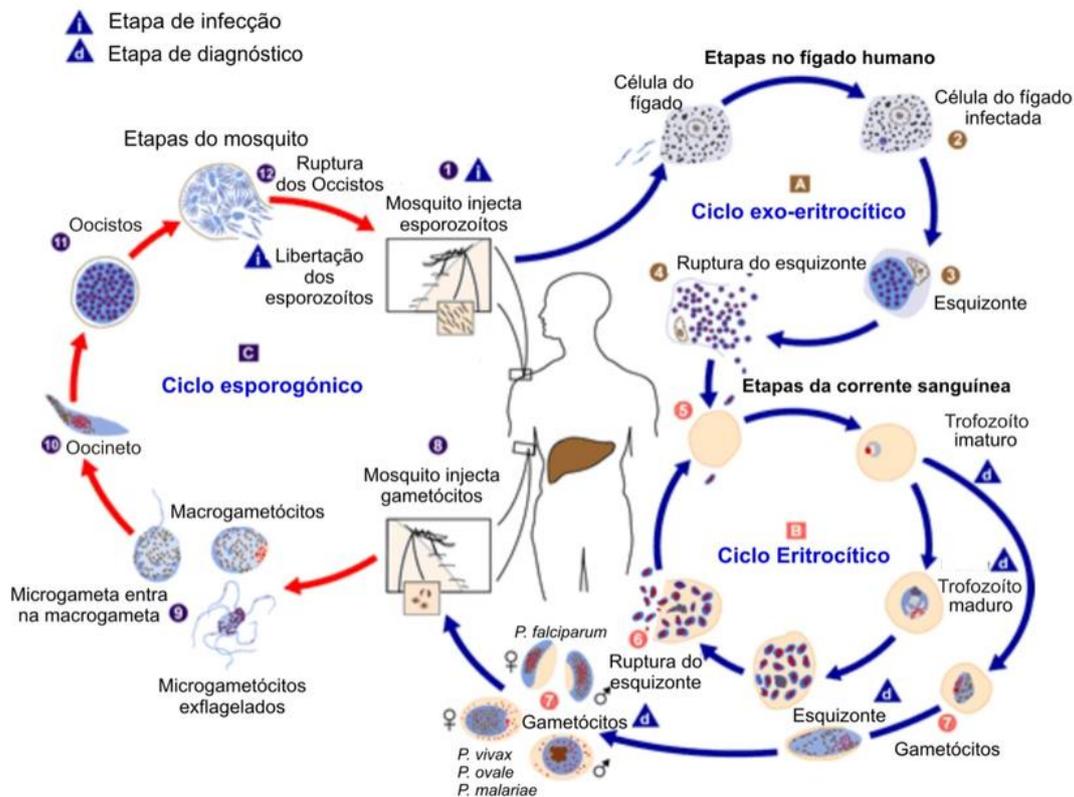


Figura 2 - Ciclo do Plasmodium em humanos e no vetor. Fonte: França et al., 2008

O ciclo eritrocítico começa quando os merozoítos derivados do ciclo pré-eritrocítico invadem as hemácias. Na hemácia ocorre a diferenciação em estágios sexuais originando gametócitos que não mais se dividem e que seguirão o seu ciclo de desenvolvimento no vetor, dando origem aos esporozoítos. O ciclo sanguíneo se repete várias vezes, a cada 48 horas para infecções atribuídas pelo *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e a cada 72 horas, nas infecções pelo *P. malariae* (MAHMUD, 2018). A fêmea do vetor, ao picar o hospedeiro vertebrado, ingere as formas sanguíneas (gametócitos) do parasita originando o ciclo sexual ou esporogônico. No intestino do mosquito, condições propícias de temperatura e pH (inferior a 30 °C, elevação do pH por baixa pressão de CO₂) favorecem a gametogênese. O gametócito feminino se converte em macrogameta e o masculino dá origem a oito microgametas pelo processo de exflagelação. Em seguida, um microgameta fecunda um macrogameta formando um zigoto que após 24 horas começa a se movimentar por contrações do corpo sendo denominado oocineto. Este, por sua vez, se instala na parede do intestino sendo chamado oocisto e com ele se inicia o processo de divisão esporogônica. Após 14 dias, a parede do oocisto sofre ruptura liberando os esporozoítos. Estes serão

espalhados pelo organismo do inseto até atingir as glândulas salivares. Ao picar o hospedeiro vertebrado, esses esporozoítos localizados nas glândulas salivares irão ser repassados através da saliva (MEHLHORN, 2016).

3.1.3 Tratamento

Inicialmente, o tratamento da malária era conduzido pela administração de cloroquina e este fármaco era utilizado para as quatro espécies de plasmódios que parasitam o homem. Entretanto, com o desenvolvimento de resistência pelo *P. falciparum* à cloroquina e também a diversos outros fármacos, o manejo da doença se tornou cada vez mais um desafio para os serviços de saúde (WHO, 2015).

Em geral, o tratamento é focado na interrupção do ciclo sanguíneo da malária no ser humano, responsável pelas manifestações características da doença. Entretanto, devido à complexidade do ciclo biológico do parasita, outros alvos terapêuticos também são utilizados para erradicar formas latentes do parasita (hipnozoítos) no ciclo tecidual de *P. vivax* e *P. ovale*, evitando dessa forma as recaídas tardias. Além disso, a abordagem terapêutica de pacientes residentes em regiões endêmicas pode visar também à interrupção da transmissão, pela utilização de fármacos que eliminam as formas sexuadas dos parasitos (FUNASA, 2001; WHO, 2015).

O tratamento da malária por *P. falciparum* não complicada é aplicado aos pacientes que apresentam sintomas da doença e teste parasitológico positivo, mas com nenhuma característica de malária complicada definida. O manejo desse tipo de malária pode ser feito seguindo uma terapia combinada com derivados de artemisina: artemeter + lumefantrina; artesunato + amodiaquina; artesunato + mefloquina; dihidroartemisinina + piperaquina; artesunato + sufadoxina + pirimetamina. Entretanto, para grávidas no primeiro trimestre, essas combinações não são aplicáveis, sendo proposta uma terapia de sete dias com a combinação de quinina + clindamicina (WHO, 2015).

Para o tratamento das espécies *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*, a abordagem segue o seguinte protocolo: se o agente não é conhecido, o tratamento deve ser feito como para *P. falciparum* não complicada. No caso de o agente ser conhecido, o tratamento

pode ser feito com cloroquina em regiões onde não existe resistência ao fármaco. Nas regiões com infecções resistentes a cloroquina, o tratamento deve ser feito para *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale* não complicada com terapia de combinação com artemisinina ou cloroquina. O tratamento de grávidas resistentes à cloroquina deve ser feito com quinina (BOULOUS *et al.* 1997; ABDON *et al.*, 2001; WHO, 2015).

O tratamento da malária complicada é feito com artesunato intravenoso e intramuscular por pelo menos 24 horas, até que o paciente possa tolerar a medicação oral. Uma vez que o paciente tenha recebido pelo menos 24 horas da terapia parenteral e pode tolerar a terapia oral, é dada continuidade ao tratamento com 3 dias da terapia de combinação com artemisinina (BRAGA E FONTES, 2005; WHO, 2015).

3.1.4 Profilaxia

A profilaxia da malária é conduzida utilizando-se medidas de proteção individual, coletivas ou quimioterápicas. As medidas de proteção individual incluem conhecimento do horário de maior atividade de mosquitos vetores da malária (ao amanhecer e ao anoitecer), uso de roupas claras e de manga longa em atividades de exposição elevada, uso de barreiras (telas nas portas e janelas, ar condicionado e mosquiteiro impregnado com piretróides), uso de repelentes a base de DEET (N-N-dietilmetatoluamida). (BRASIL, 2008; BRASIL, 2010).

O diagnóstico e o tratamento precoce constituem uma medida de prevenção da malária grave e da morte por *P. falciparum*. A identificação dos serviços de saúde da região mais próximos para que o diagnóstico seja realizado em menos de 24 horas é muito importante visto que em regiões onde a malária não é endêmica, tem-se observado formas graves da enfermidade, principalmente devido à demora no diagnóstico e tratamento da infecção. O principal método para o diagnóstico da malária é a pesquisa de hematozoários em sangue periférico (gota espessa). É um método simples, de baixo custo, rápido e de alta sensibilidade e especificidade (BRASIL, 2010).

A quimioprofilaxia é outra medida de prevenção da malária e consiste na utilização de fármacos antimaláricos em doses subterapêuticas com o objetivo de reduzir formas

clínicas graves e mortes devido ao *P. falciparum*. Atualmente, são recomendados cinco fármacos para a quimioprofilaxia: doxiciclina, mefloquina, a combinação atovaquona/proguanil e cloroquina. Os dois primeiros são de ação esquizotóxica sanguínea e a combinação atovaquona/proguanil possui ação esquizotóxica sanguínea e tecidual (BRASIL, 2008; BRASIL, 2010).

3.2 Indústria farmacêutica e investimentos em antimaláricos

A malária está no grupo das doenças negligenciadas, principalmente, pela indústria farmacêutica. O problema fundamental, com doenças tropicais, é como induzir as indústrias a investir recursos para o desenvolvimento de fármacos para tratar essas doenças. A questão se agrava porque a maior parte dessas doenças acometem populações pobres do mundo. Dessa forma, embora exista uma grande demanda potencial para esses medicamentos, o valor de mercado é baixo devido a essa população não possuir recursos para custear essa medicação (TROUILLER *et al.*, 2002; DIMITRI, 2012).

Outro grande problema é a baixa qualidade dos medicamentos. No sul da África, na África subsaariana e na Ásia, a qualidade dos antimaláricos que chegam até a população não é satisfatória. Essa baixa qualidade dos antimaláricos acarreta o aumento da resistência e um tratamento inapropriado da doença. A seleção de parasitas resistentes ocorre quando são administradas doses suficientes para inibir a multiplicação de parasitas sensíveis, mas insuficiente para os parasitas resistentes. Dessa forma, fármacos de baixa qualidade podem conter subdoses de antimaláricos e conseqüentemente contribuir para a seleção de parasitas resistentes (WHITE, 1992; WHITE, 2004).

Em um estudo de 2012 publicado na Revista Inglesa *The Lancet*, foram analisadas 1437 amostras de 5 classes diferentes de fármacos oriundos de sete países diferentes do sudeste da Ásia. Desses fármacos, 35% apresentaram não conformidades nas análises químicas, 46% de 919 apresentaram não conformidades nas análises de embalagem e 36% de 1260 foram classificados como falsificados. O padrão histórico de disponibilidade e uso de antimaláricos de baixa qualidade coincide com o surgimento de resistência dos fármacos. A compreensão dessa questão é essencial

para prolongar a utilidade dos medicamentos atuais e proteger os novos fármacos desenvolvidos (WHITE, 2004; BROCK *et al.*, 2018).

De acordo com a Lista de Produtos Farmacêuticos para a Malária, classificados de acordo com o Fundo Global de Políticas de Garantia da Qualidade, das empresas e dos países que produzem medicamentos antimaláricos, a grande maioria deles se encontra na Índia e na China. Dentre as grandes multinacionais farmacêuticas, encontram-se Novartis Pharma e Sanofi Aventis. Comparando-se essas duas multinacionais, a Novartis tem uma estimativa de arrecadação para 2018 de 42,8 bilhões de dólares, enquanto a Sanofi Aventis \$ 38,2 bilhões de dólares. A Novartis foi a responsável por introduzir no mercado o tratamento combinado com artemisinina e ainda dois novos protótipos estão sendo estudados: o KAE609 e o KAF156, havendo a expectativa de que um deles entre no mercado até 2021 (DIAGANA, 2015; WARD, 2016).

Uma luz no fim do túnel é o desenvolvimento de uma nova vacina, chamada Mosquirix. Ela é produzida pela companhia britânica GSK (*GlaxoSmithKline*) e está sendo testada na África. Essa vacina será utilizada para a proteção de crianças e recebeu o aval da Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês, *European Medicine Agency*) para realização dos testes clínicos. Junto à vacina, a OMS procura formas de agregar ao tratamento medidas de prevenção da doença. (ARIF, 2007; HAQUE E ENGWERDA, 2011; ROSENTHAL, 2011; BIAMONTE *et al.*, 2013; EMA, 2018; GSK, 2018).

3.3 Quiralidade e separação enantiomérica

Para conceituar a quiralidade é necessário, primeiramente, conhecer alguns termos e conceitos que definem o que é isomeria. Isômeros são substâncias que possuem os mesmos átomos, porém dispostos na molécula de maneira diferente, de forma que essas moléculas possuem propriedades químicas diversas. Os isômeros apresentam diferentes classificações de acordo com essa disposição dos átomos (ELIEL E WILEN, 1994; CAREY E GIULIANO, 2013; SOLOMONS *et al.*, 2013).

Os estereoisômeros são isômeros cujos átomos ou grupos de átomos possuem uma disposição espacial diferente na molécula. Eles podem ser classificados de duas maneiras: geométricos ou ópticos. Os geométricos são estereoisômeros que não possuem atividade óptica, ou seja, não possuem a capacidade de desviar o plano da luz polarizada. Para descrever sua disposição espacial são utilizados os termos *cis* (mesmo lado) e *trans* (lado oposto) (MCMURRY, 2005; MITRA E CHOPRA, 2011).

Os isômeros ópticos são aqueles que possuem atividade óptica, contendo centros quirais ou centros assimétricos. Dessa forma, pode-se dizer que o fenômeno da quiralidade manifesta-se quando a molécula possui os seguintes grupos de características: um centro de quiralidade (C^* , Si^* , S^* , P^* , N^*), ou seja, um átomo central ligado a 4 átomos ou grupo de átomos diferentes, um eixo de quiralidade (aleno), um plano de quiralidade e uma forma de hélice (hexaeliceno) (LIMA, 1997; SOLOMONS *et al.*, 2013).

Moléculas que apresentam quiralidade possuem enantiomeria. Os enantiômeros são estereoisômeros que apresentam uma simetria em relação a um plano. As moléculas que apresentam dois ou mais elementos de quiralidade possuem diastereoisomeria. Diastereoisômeros não são enantiômeros e possuem propriedades físico-químicas diferentes, ao contrário dos enantiômeros que possuem as mesmas características (MCMURRY, 2005; SOLOMONS *et al.*, 2013).

Um enantiômero existe sob a forma de dois pares de isômeros que são imagem especulares uma da outra não superponíveis, nem por rotação nem por translação, mas simétricos em relação a um plano (**Figura 3**).

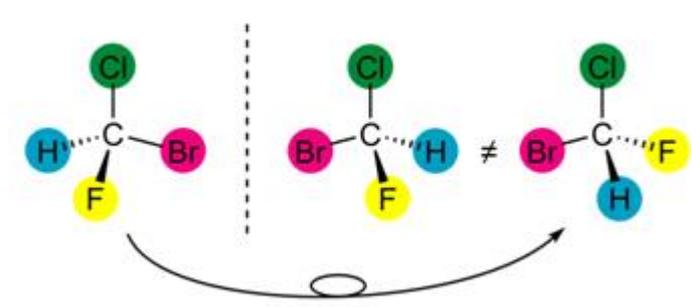


Figura 3 - Estrutura de uma molécula quiral e seus enantiômeros. Fonte: FOGAÇA, 2018

Os enantiômeros apresentam desvios polarimétricos opostos de mesma magnitude nos quais o ângulo de rotação é simplesmente a rotação observada. Misturas enantioméricas que possuem a mesma quantidade de enantiômeros (50:50) são denominadas de misturas racêmicas ou racemato e são opticamente inativas. O poder rotatório específico é obtido em condições experimentais e foi definido pelo físico francês Biot em 1860. Biot determinou que o poder rotatório é uma propriedade inerente de uma molécula opticamente ativa e é tão importante na caracterização de uma dada molécula quanto o ponto de fusão, ebulição ou a densidade, sendo dessa forma, definido pela seguinte equação:

$$[\alpha] = \frac{100\alpha}{cl}$$

em que $[\alpha]$ é a rotação específica; α é a rotação observada; c é a concentração da amostra em g/mL de solução e l é o comprimento do tubo do polarímetro, em dm (HABRAKEN, 1995).

As configurações das estruturas revelam a disposição dos átomos ou grupos de átomos ao redor do centro estereogênico. Estas configurações são contempladas pelo sistema de Cahn-Ingold-Prelog e não possuem relação alguma com o desvio da luz plano polarizada. Esse sistema permite identificar dois enantiômeros diferentes: R e S. Se um enantiômero possui a configuração R, o outro necessariamente terá a configuração S. Outro sistema de nomenclatura para substância opticamente ativas é o que utiliza D e L para determinar a configuração relativa de aminoácidos, açúcares e substâncias análogas, em projeção de Fisher (MADESCLAIRE, 1987).

Os enantiômeros possuem propriedades físico-químicas idênticas, exceto quanto à rotação específica $[\alpha]$. Entretanto, eles podem exibir grandes diferenças em características relacionados à disposição dos átomos no espaço, demonstrando propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas distintas (reconhecimento quiral) (CAREY E GIULIANO, 2013; SOLOMONS *et al.*, 2013). O termo reconhecimento quiral tem sido aplicado para mecanismos nos quais algum receptor quiral (ou mesmo reagente quiral) interage seletivamente com um dos enantiômeros da molécula quiral

e está relacionado ao nível de interação demonstrado entre cada um dos enantiômeros e o sítio de ligação quiral (CAREY E GIULIANO, 2013). Em processos biológicos, um grau elevado de reconhecimento quiral pode ser observado. Isso se deve ao complexo enzimático presente no organismo e receptores estereoespecíficos que determinam comportamentos farmacocinéticos e farmacodinâmicos distintos (BARREIRO *et al.*, 1997).

O organismo humano possui diversos compostos quirais em sua composição, apresentando uma estrutura seletora quiral que interage com fármacos quirais, de forma que cada enantiômero pode ser metabolizado de maneira diferente, originando atividade farmacológica distinta (LANDONI & SORACI, 2001). A quiralidade é uma questão muito significativa em farmacologia, devido às consequências clínicas da administração de misturas racêmicas sem o conhecimento da farmacocinética e da farmacodinâmica de cada enantiômero. Muitos fármacos antimaláricos são administrados como racematos e diversos estudos procuram avaliar quais as consequências dessa administração (BRAY *et al.*, 1999; BROCKS E MEHVAR, 2003; FOLEY E TILLEY, 1998).

Os enantiômeros podem ser separados por CLAE por dois métodos: o indireto e o direto. O método indireto consiste na formação de um par de diastereoisômeros com a utilização de reagentes quirais, seguida da sua separação em colunas aquirais, visto que os diastereoisômeros apresentam propriedades distintas. O método direto consiste na utilização de aditivos quirais à fase móvel ou de colunas contendo fase estacionária quiral (CASS *et al.*, 1997; LIMA, 1997).

Atualmente tem-se muitas opções de fases estacionárias quirais que são capazes de separar os mais diversos tipos de substâncias. Esses tipos variados de fases estacionárias quirais e alguns nomes comerciais estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Tipos de seletores quirais e alguns de seus nomes comerciais.

| TIPO | SELETOR QUIRAL | | NOME COMERCIAL |
|---|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Polissacarídeo | Celulose* | Benzato | CHIRALCEL OB, CHIRALCEL OB-H |
| | | 3,5-dimetilfenil carbamato | CHIRALCEL OD, CHIRALCEL OD-H, CHIRALCEL OD-R CHIRALCEL OD-RH |
| | | 4-metilbenzoato | CHIRALCEL OJ, CHIRALCEL OJ-H, CHIRALCEL OJ-RH |
| | | 4-metilfenil carbamato | CHIRALCEL OG |
| | | 4-clorofenil carbamato | CHIRALCEL OF |
| | | Cinimato | CHIRALCEL OK |
| | | Fenil carbamato | CHIRALCEL OC |
| | Amilose* | 3,5-dimetilfenil carbamato | CHIRALPAK AD, CHIRALPAK AD-H, CHIRALPAK AD-RH |
| | | (S)- α -metilbenzil carbamato | CHIRALPAK AS, CHIRALPAK AS-H, CHIRALPAK AS-RH |
| | Baixa massa molar | D-dinitrobenzoilfenilglicina | |
| L-dinitrobenzoilfenilglicina | | CHIRAL 3 | |
| (3R,4R)-4-(3,5-dinitrobenzamido)1,2,3,4-tetrafenantraceno | | (R,R)-WHELK-O1 | |
| (3S,4S)-4-(3,5-dinitrobenzamido)1,2,3,4-tetrafenantraceno | | (S,S)-WHELK-O1 | |
| Troca de ligante | N,N dioctil-L-alanina | | CHIRALPAK MA(+) |
| | L-hidroxiprolina - cobre | | CHIRAL 1 |
| Antibióticos macrocíclicos | Vancomicina | | CHIROBIOTIC V |
| | Teicoplanina | | CHIROBIOTIC T |
| | Ristocetina | | CHIROBIOTIC R |
| Éter de coroa | (S)-18-coroa-6-éter | | CROWNPAK CR(+) |
| | (R)-18-coroa-6-éter | | CROWNPAK CR (-) |
| Ciclodextrinas | β -ciclodextrina | | NUCLEODEX β -OH |
| | β -ciclodextrina permetilada | | NUCLEODEX β -PM |
| | β -ciclodextrina fenilcarbamato | | ULTRON ES-PhCD |

*A denominação "H" significa fase estacionária preparada com sílica de 5 μ m. A denominação "R" é referente ao uso da coluna no modo fase reversa. Fonte: (BONATO *et al.*, 2005; THOMPSON, 2005)

3.4 Fases estacionárias quirais derivadas de carbamatos de polissacarídeos

A busca por fases estacionárias quirais remota ao início do século XX. Uma das primeiras tentativas foi em 1904 com o químico alemão Willstater, que tinha interesse em avaliar a resolução de enantiômeros baseada em sua adsorção seletiva de uma fase líquida para um material quiral, determinando dessa forma se a coloração da lâ era um processo químico ou físico (infelizmente ele não obteve sucesso, mas ganhou

o Nobel de química em 1915 por outras pesquisas feitas) (WILLSTÄTTER, 1904). Entretanto, muitos outros cientistas ao longo do século foram testando novas formas de separação e novos materiais. Em 1951, Kotake *et al.* demonstraram a separação de enantiômeros em papel cromatográfico utilizando celulose como seletor quiral (KOTAKE *et al.*, 1951). Dez anos depois, o uso de celulose em colunas cromatográficas para separação quiral de catequinas foi relatada (MAYER & MERGER, 1961). Finalmente, em 1973, os pesquisadores Hesse e Hagel demonstraram a utilização de derivados de polissacarídeos como seletos quirais (HESSE E HAGEL, 1973).

Após o relato da utilização de derivados de polissacarídeos como seletos quirais, diversas otimizações foram sendo feitas nessas fases estacionárias a partir da década de 1980, principalmente com os trabalhos do grupo de Okamoto e da empresa Daicel no Japão. O grupo testou diversos tipos de polissacarídeos como celulose, amilose, inulina, quitosana, xilano e dextrano e denominou o novo tipo de seletor quiral como polissacarídeos de fenilcarbamato. Os seus estudos demonstraram que os melhores tipos de polissacarídeos a serem utilizados como seletos quirais são a celulose e a amilose (**Figura 4**). Essa conclusão foi baseada no reconhecimento quiral, na disponibilidade em forma pura e na simplicidade do tratamento destes materiais (OKAMOTO *et al.*, 1984; CHANKVETADZE, 2012).

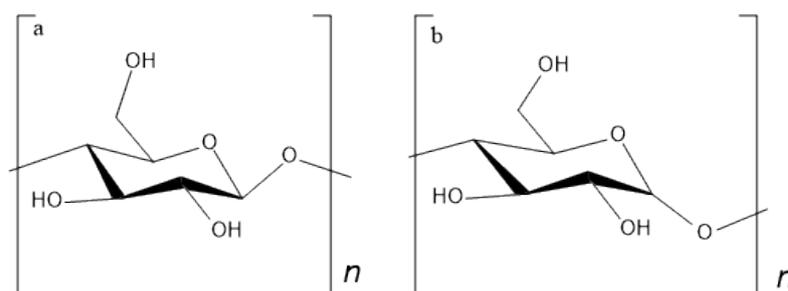


Figura 4 – Estrutura química da celulose (a) e amilose (b).

Os compostos polissacarídicos, em sua forma natural, apresentam limitada capacidade de discriminação quiral devido às suas reduzidas propriedades mecânicas, elevada polaridade e limitações de manuseio, de modo que não podem ser utilizados como fase estacionária quiral isoladamente (YASHIMA E OKAMOTO, 1997). Dessa forma, inúmeras outras fases estacionárias quirais foram sintetizadas recobrando-se partículas de sílica gel macroporosa com derivados de polissacarídeos.

O suporte de sílica proporcionou a resistência mecânica necessária para obtenção de colunas mais eficientes e estáveis frente à modificação na composição da fase móvel (YASHIMA E OKAMOTO, 1997; BONATO *et al.*, 2005; SHEN E OKAMOTO, 2016).

Vários derivados de polissacarídeos tem sido estudados, especialmente os estéres e carbamatos, e ambos demonstraram uma enantioseletividade adequada como seletores quirais. Derivados de alquil, cicloalquil e aril foram estudados e combinados com os estéres e carbamatos e os derivados aril foram identificados como os seletores quirais mais aplicáveis. Foram sintetizados também derivados de fenilcarbonato e benzoilformato com celulose e amilose, porém ambos não exibiram reconhecimento quiral superior aos respectivos derivados de estér e fenilcarbamato (LÜTTRINGHAUS *et al.*, 1967; HESSE E HAGEL, 1973; OKAMOTO *et al.*, 1984; CHANKVETADZE *et al.*, 1994; OKAMOTO & KAIDA, 1994; YASHIMA E OKAMOTO, 1997; IKAI *et al.*, 2005; IKAI E OKAMOTO, 2009).

Muitos estudos foram descritos por Okamoto e colaboradores demonstrando que estéres aromáticos e carbamatos de polissacarídeos exibem grande capacidade de enantioseleção, entretanto, essas propriedades melhoram muito quando substituintes que doam ou retiram elétrons estão presentes em posições adequadas do grupamento fenil (**Figura 5**) (ICHIDA *et al.*, 1984; OKAMOTO & KAIDA., 1984; OKAMOTO *et al.*, 1986; OKAMOTO *et al.*, 1987; IKAI E OKAMOTO, 2009).

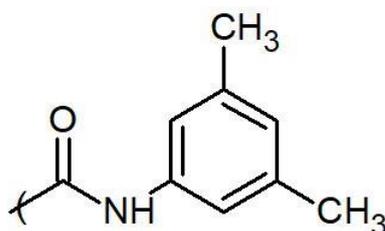


Figura 5 - Estrutura química do tris(3,5-dimetilfenilcarbamato).

Estudos demonstraram que os derivados de fenilcarbamato substituídos apresentam maior enantiosseletividade, pois os substituintes afetam a densidade eletrônica das porções carbamato dos polissacarídeos de fenilcarbamato e, dessa maneira, afetam também sua interação com analitos quirais. Quando um substituinte retirador de elétrons é introduzido, a acidez do próton do grupo NH dos grupos carbamato

aumenta. Dessa forma, o tempo de retenção da maioria dos analitos aumenta porque eles interagem por ligação de hidrogênio com o grupo NH. Por outro lado, quando os substituintes são doadores de elétrons, a densidade eletrônica do oxigênio do grupo carbonila dos grupos carbamato aumenta. Conseqüentemente, os analitos que possuem grupos doadores de elétrons tem uma interação mais forte com esse tipo de derivado (OKAMOTO *et al.*, 1986; CHANKVETADZE *et al.*, 1995; CHANKVETADZE *et al.*, 1997).

Nos derivados de fenilcarbamato de celulose, existe uma ligação de hidrogênio intramolecular entre a porção carbamato substituída nas posições 2 e 3 vizinhas às unidades de glicose. Portanto, os substituintes da porção fenil afetam não só a interação dos analitos quirais com esses polissacarídeos, mas também sua solubilidade em muitos solventes orgânicos. A aplicação de polissacarídeos de fenilcarbamato como seletores quirais em CLAE exige que esses polissacarídeos sejam solúveis para que seja possível dissolvê-los e adsorvê-los na sílica. Em contrapartida, um derivado de polissacarídeo utilizado como seletor quiral deve ser insolúvel em solventes utilizados em CLAE como fase móvel (OKAMOTO *et al.*, 1986).

A interação entre analitos quirais e polissacarídeos pode ser um processo bem lento comparado com um seletor quiral de baixo peso molecular, contribuindo para um alargamento de bandas em CLAE. Dessa forma, para seletores quirais de polissacarídeos, uma estrutura secundária bem ordenada e a presença de sítios de interação uniformes com os analitos quirais é uma característica muito importante. Portanto, as porções de carbamato possuem dupla função nos polissacarídeos de fenilcarbamato: são o sítio mais provável de interação dos analitos quirais; e devido ao envolvimento na ligação de hidrogênio intramolecular, essas porções determinam a solubilidade dos derivados de polissacarídeo em certos solventes orgânicos, bem como sua estrutura. Considerando que ambas propriedades mencionadas são desejáveis para seletores quirais, os polissacarídeos de fenilcarbamato tem um bom balanceamento entre as porções carbamato livres que estão disponíveis para a interação com o analito, e as porções carbamato envolvidas na ligação de hidrogênio intramolecular que fornecem a baixa solubilidade desses polissacarídeos em solventes empregados na CLAE (CHANKVETADZE *et al.*, 1994; CHANKVETADZE *et al.*, 1995; CHANKVETADZE *et al.*, 1996; CHANKVETADZE *et al.*, 1997).

Os derivados mais utilizados da celulose e amilose são os tri-ésteres e tri-carbamatos. (ALI *et al.*, 2009). As fases estacionárias tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (**Figura 5 e 6**) comercializadas pela Diacel com os nomes comerciais Chiralpack® AD e Chiralcel® OD são bastante utilizadas devido a grande capacidade de resolução de uma ampla variedade de compostos. A discriminação quiral ocorre devido à formação de complexos de inclusão e pelas ligações polares com os grupamentos carbamatos (OKAMOTO *et al.*, 1988; BELAZ, 2007). Na Figura 6, pode ser observada a estrutura de algumas fases estacionárias derivadas de carbamato de celulose e amilose.

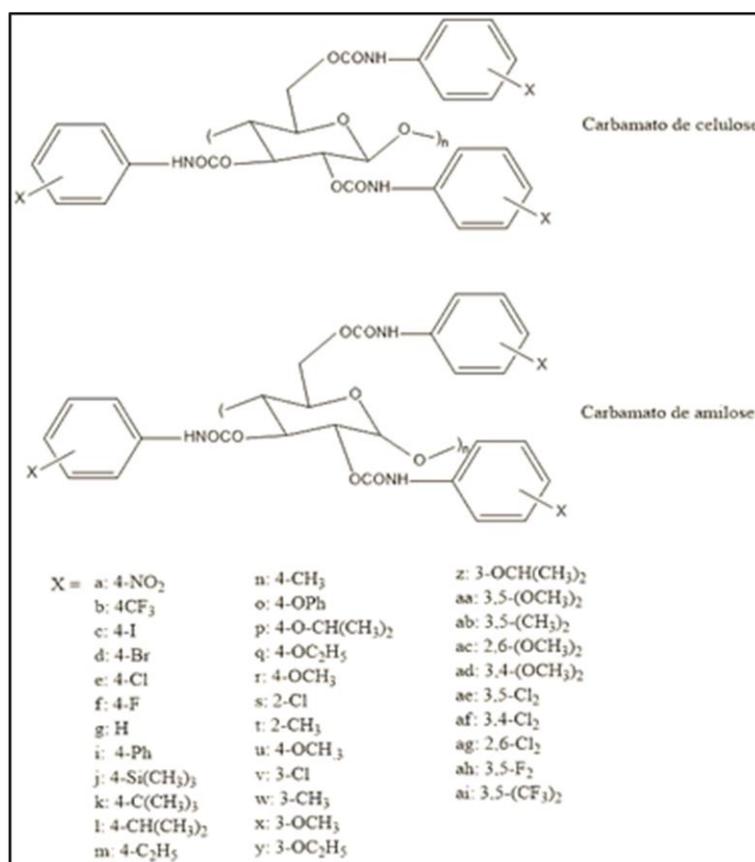


Figura 6 - Fases estacionárias derivadas de carbamato de celulose e de amilose.
Fonte: CHANKVETADZE, 2012)

As fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos podem ser utilizadas por meio de três formas de interação: normal, reverso e polar orgânico. Embora estas colunas apresentem uma grande aplicabilidade na discriminação de várias misturas enantioméricas, quando o seletor está adsorvido na superfície da sílica, solventes usuais como tetrahydrofurano (THF), acetato de etila, acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido, diclorometano e tolueno não podem ser utilizados, uma vez que

podem solubilizar o seletor quiral. Esse problema não é observado com fases imobilizadas (IKAI *et al.*, 2006; MORANTE-ZARCERO *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; LOURENÇO *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2010; DOSSOU *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2014).

Trabalhos que utilizaram a coluna Chiralpak AD-H (contendo amilose ligada a 3,5-dimetilfenil carbamato) são apresentados na **Tabela 2**. Para construir a tabela, foram utilizados os termos Chiralpak AD-H e validação, no período entre 2010 e 2018, sendo obtidos 108 artigos no Portal de Periódicos da Capes, a tabela demonstra somente uma parte dos artigos encontrados focados em análises no modo normal de eluição que é o aplicado no presente trabalho. Pela tabela, observa-se que na maior parte dos trabalhos foram utilizadas colunas de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm, como solvente de eluição todos os trabalhos utilizaram hexano, como principal solvente, misturado com proporções de isopropanol ou etanol. O objetivo principal da grande maioria dos estudos foi a avaliação da separação dos enantiômeros e avaliação da pureza enantiomérica.

Tabela 2 - Trabalhos que utilizaram colunas CHIRALPAK AD e AD-H no período de 2010 a 2018.

| Comprimento da coluna | Substâncias analisadas | Condições cromatográficas | Objetivo do estudo quiral | Referência |
|-----------------------|--|--|--|---------------------------------------|
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Derivados de sulfonamida | FM: hexano:isopropanol (90:10); 1 mL/min; 30°C; 20 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros. | Zeng <i>et al.</i> , 2018 |
| NC | 3-fluoro-3-hidroximetiloxindols derivados de Cinchona. | FM: hexano:isopropanol (diferentes proporções); 1 mL/min | Avaliar os enantiômeros sintetizados. | Zhao <i>et al.</i> , 2018 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Derivados de alcaloides carbazólicos | FM: hexano:isopropanol (70:30); 1 mL/min; | Avaliar a separação dos enantiômeros. | Ma <i>et al.</i> , 2018 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Molécula estereogênica CORE + OMe | FM: hexano:etanol (90:10); 1 mL/min; 20°C; | Avaliar a separação dos enantiômeros. | Joshi <i>et al.</i> , 2018 |
| 250 mm, 10 mm, 5 µm | Lactofeno | FM: hexano: isopropanol (80:20); 5 mL/min; 25°C; 50 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros | Xie <i>et al.</i> , 2018 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Anatoxina-A e Homoanatoxina-A | FM: hexano: isopropanol (99:1) | Avaliar a pureza dos enantiômeros | Addante-Moya <i>et al.</i> , 2018 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | IDO1 Inibidor NLG919 | FM: hexano: etanol (85:15); 1 mL/min; 20°C; | Avaliar a pureza dos enantiômeros | Liu <i>et al.</i> , 2018 |
| NC | Derivados 5H-oxazol-4-ona | FM: hexano: isopropanol (90:10); 0,9 mL/min; | Avaliar a separação dos enantiômeros | Xu <i>et al.</i> , 2018 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Oxazolidinona WCK 4086 | FM: hexano: isopropanol: metanol:TFA:(80:10:10:0.4); 1 mL/min; 30°C; 10 µL | Avaliar a separação de impurezas quirais | Ahirrao <i>et al.</i> , 2018 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Derivados de sulfonamidas diaminociclohexano | FM: hexano: isopropanol (70:30); 0,7 mL/min | Avaliar a separação dos enantiômeros | Dajek <i>et al.</i> , 2018 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Nitrilase | FM: hexano: isopropanol (90:10); 1 mL/min; 25°C | Avaliar a separação dos enantiômeros | Chhiba-Govindjee <i>et al.</i> , 2018 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Pidotimod® | FM: heptano: isopropanol:TFA (70:29,9:0,1) | Avaliar a pureza dos enantiômeros | Sarno <i>et al.</i> , 2017 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Acetilglutamina | FM: hexano c/ 0,1% ácido acético: etanol (75:25); 1 mL/min; 25°C; 10 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros | Zhang <i>et al.</i> , 2017 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Letermovir | FM: hexano: isopropanol (80:20); 1 mL/min; 30°C; 10 µL | Avaliar a pureza dos enantiômeros | Zhang <i>et al.</i> , 2016 |

| Comprimento da coluna | Substâncias analisadas | Condições cromatográficas | Objetivo do estudo quiral | Referência |
|-----------------------|--|--|--|---------------------------------------|
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Arotinolol | FM: hexano: etanol em 0,02% DEA (20:80:1); 0,55 mL/min; 40°C; | Avaliar a separação dos enantiômeros | Qian <i>et al.</i> , 2015 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Repertaxin | FM: hexano: isopropanol (90:10); 1 mL/min; 30°C; 10 µL | Avaliar a pureza dos enantiômeros | Liu <i>et al.</i> , 2015 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | (-)- <i>trans</i> -paroxetina | FM: hexano: etanol: ETNA (80:20:0.2); 1 mL/min; 25°C; 20 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros | Lisowska-Kuźmicz <i>et al.</i> , 2014 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Piperidina-3-amina | FM: hexano:isopropanol(90:10) 0,5 mL/min; 27°C; 5 µL | Avaliar a separação de impurezas | Babu <i>et al.</i> , 2014 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Ramelteon | FM: hexano: etanol: AMSF(900:100:0,1); 1 mL/min; 25°C; 20 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros | Patil <i>et al.</i> , 2013 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Meta-clorobenzoíco em cloridrato de bupropiona | FM: hexano: etanol (1000:50); 1 mL/min; 25°C; 20 µL | Avaliar a separação de impurezas | Sinha <i>et al.</i> , 2013 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Tapentadol | FM: hexano: isopropanol:DEA (980:20:1); 1 mL/min; 35°C; 5 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros | Douša <i>et al.</i> , 2013 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Darunavir | FM: hexano: etanol:DEA (80:20:1); 1 mL/min; 40°C; 20 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros. | Rao <i>et al.</i> , 2012 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | 2 séries de derivados de 4-substituído-1,4-dihidropiridina | FM: hexano: isopropanol (85:15); 1 mL/min; 25°C; 10 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros. | Dai <i>et al.</i> , 2012 |
| 150 mm, 4,6 mm, 5 µm | Donepezil, 5-O-desmetil donepezil, 6-O-desmetil donepezil | FM: hexano:etanol:metanol:TEA (75:20:5:0,3); 1,5 mL/min; 25°C; 50 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros | Barth <i>et al.</i> , 2012 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Naringenina | FM: hexano: isopropanol: TFA - gradiente; 0,8 mL/min; 30°C; 20 µL | Avaliar a separação dos enantiômeros e a farmacocinética | Wan <i>et al.</i> , 2011 |
| 250 mm, 4,6 mm, 5 µm | Lesatropano | FM: hexano: isopropanol:DEA (80:20:0,1); 0,7 mL/min; 25°C; 10 µL | Avaliar a separação de impurezas | Yang <i>et al.</i> , 2011 |

*NC: não consta; FM: fase móvel; AMSF: ácido metanossulfônico; DEA: dietilamina; TFA: ácido trifluoroacético; TEA: trietilamina; ETNA: etanolamina

3.4.1 Mecanismo de reconhecimento quiral e separação das fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos

A cromatografia a líquido de alta eficiência quiral (CLAEq) tem um importante papel na área de pesquisa farmacêutica. As fases estacionárias quirais são o principal fator a ser avaliado no desenvolvimento de um método analítico quiral. O entendimento de como as moléculas quirais são reconhecidas em uma coluna quiral é muito importante para o planejamento do método de separação dos enantiômeros (CASS *et al.*, 1997; HEGADE *et al.*, 2017; DAVANKOV, 1994; BEESLEY & SCOTT, 1998; MAIER *et al.*, 2001).

O desenho e desenvolvimento de uma fase estacionária quiral capaz de efetivamente reconhecer e resolver uma grande faixa de enantiômeros é um ponto central na CLAEq. Diversos estudos descrevem detalhes do processo de enantioseparação por CLAEq (PIRKLE & POCHAPSKY, 1989; TAYLOR & MAHER, 1992; NEUMEYER, 1998). Além disso, já foram publicados artigos que descrevem a influência da temperatura, da fase móvel e do tamanho de partícula na separação quiral (OKAMOTO & KAIDA, 1994; OGUNI *et al.*, 1995; PAN *et al.*, 2011; BEZHITASHVILI *et al.*, 2017; HORVÁTH & NÉMETH, 2018). Entretanto, no presente trabalho o principal foco é o mecanismo de separação quiral da fase estacionária quiral derivada de polissacarídeo, visto que atualmente tem-se uma variedade muito grande de fases estacionárias quirais.

Durante o desenvolvimento das fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeo, vários fatores contribuem para o grau de resolução quiral, como o pH e os tipos de aditivos (ácidos, bases, sais) (ISHIKAWA e SHFFIATA, 1993). Além disso, a discriminação quiral pode ser influenciada pela conformação da cadeia principal e dos grupos substituintes. Em geral, compostos neutros não são influenciados pelos aditivos. Os compostos ácidos precisam de fase móvel adequadamente acidificada. E para compostos básicos, a resolução vai depender do tipo de sal adicionado na fase móvel, caso seja necessária essa adição (OGUNI *et al.*, 1995).

O mecanismo de reconhecimento quiral das fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos tem sido extensivamente investigado, normalmente em métodos cromatográficos. Essa abordagem pode fornecer uma grande quantidade de informações, particularmente parâmetros termodinâmicos de interação entre os analitos e as fases estacionárias quirais, durante a resolução enantiosseletiva (ALLENMARK, 1991). Entretanto, para compreender o reconhecimento quiral no nível molecular, abordagens espectroscópicas incluindo ressonância magnética nuclear combinada com modelagem computacional são necessárias. Uma das fase estacionária quiral derivada de polissacarídeo, mais estudadas são aquelas compostas de fenilcarbamato de celulose e amilose (YASHIMA *et al.*, 1996; OKAMOTO E YASHIMA, 1998).

O mecanismo de reconhecimento quiral das fases estacionárias quirais, é bastante influenciado pelos grupos substituintes nas porções fenil devido à alteração da polaridade dos grupos carbamato. Isso indica que os principais sítios de discriminação quiral nos derivados de fenilcarbamato podem ser atribuídos aos grupos carbamatos polares. A **Figura 7** demonstra a possível estrutura dos derivados de fenilcarbamato obtidas por cálculos moleculares e por análise de raio-X (VOGT & ZUGENMAIER, 1985) e possíveis interações nos seus sítios. Os derivados de fenilcarbamato possuem uma hélice tripla e resíduos de glicose são regularmente arranjados ao longo do eixo axial da hélice. Um sulco helicoidal quiral com resíduos de carbamato polares existem ao longo da cadeia principal. Os grupos carbamatos polares são alocados na parte interna da hélice, e grupos aromáticos hidrofóbicos na parte externa a cadeia polimérica. Os enantiômeros vindos da parte externa do sulco podem interagir efetivamente com os grupos carbamatos polares por ligação de hidrogênio com os grupos amino e carboxila, e por interações dipolo-dipolo com a carboxila. Portanto, a natureza dos substituintes dos grupos fenil afeta a polaridade dos resíduos de carbamato, o que acarreta diferentes resoluções quirais. Além das interações polares, interações π - π entre os grupos fenil das fases estacionárias quirais e grupos aromáticos do analito podem contribuir para o reconhecimento quiral, especialmente em fase reversa (OKAMOTO *et al.*, 1986; OKAMOTO *et al.*, 1987; YASHIMA, 2001).

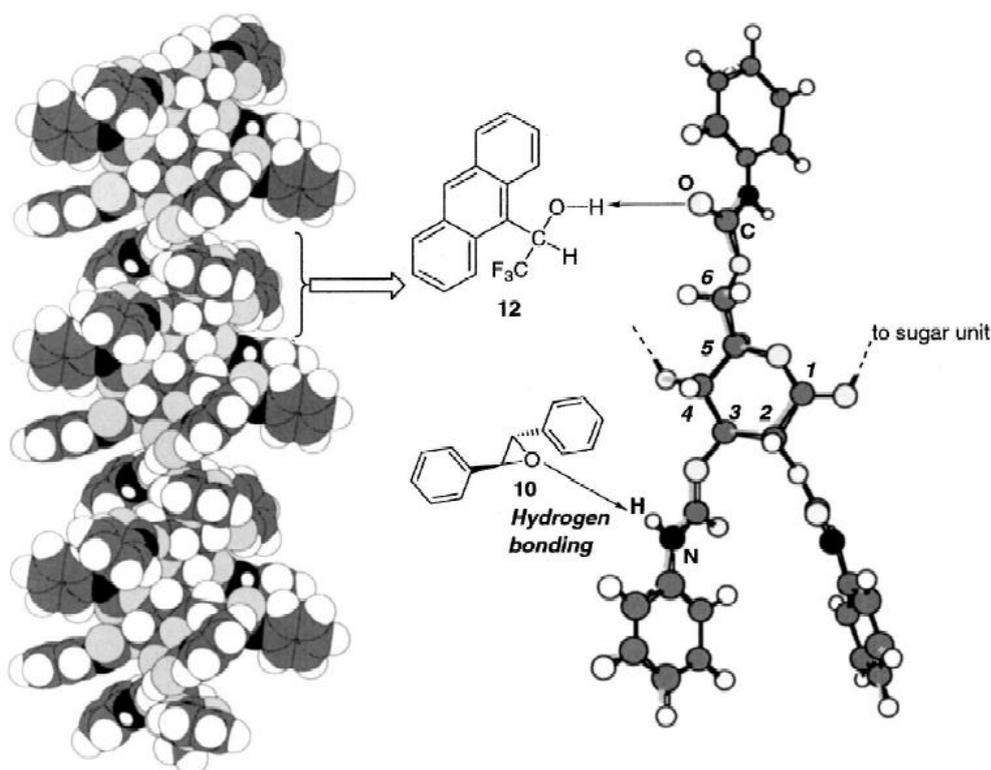


Figura 7 - Estrutura otimizada (esquerda) e possíveis sítios de interação (direita) em derivados de tris(fenilcarbamato) de celulose. Fonte: YASHIMA, 2001.

A interação entre a fase estacionária quiral e o analito envolve a formação de um complexo diastereoisomérico transitório, constituído por ligações intermoleculares, como interações iônicas, íon-dipolo ou dipolo-dipolo, interações π - π , van der Waals e ligações de hidrogênio. Os diversos tipos de interações entre a fase estacionária quiral e o analito foram sumarizadas no trabalho de Schneider (SCHNEIDER, 2009). As interações de longo alcance, como as iônicas, são frequentemente atribuídas à ligação inicial do analito com a fase estacionária quiral, uma vez que são formadas em ambos os enantiômeros. Em contraste, as interações de curto alcance como as ligações de hidrogênio e interações π - π podem ser responsáveis primariamente pela ligação estereosseletiva. Além disso, fatores estéricos, resultantes do arranjo espacial da cavidade de ligação ou da fenda do seletor quiral também podem contribuir para o reconhecimento quiral. A mudança conformacional do seletor na interação fase estacionária quiral e analito também pode ser considerada na discriminação quiral (OKAMOTO *et al.*, 1987; YASHIMA, 2001; SCRIBA, 2016).

Dentre os dois polissacarídeos mais estudados, amilose e celulose, a amilose se organiza na forma de hélice, ao passo que na celulose as cadeias se organizam lado a lado, dessa forma a amilose possui maior número de sulco quirais que, portanto, fornece uma melhor resolução quiral comparada com a celulose (**Figura 8**). A introdução de grupos metila no grupo fenil do carbamato aumenta esse poder de resolução quiral dos derivados de amilose. Além disso, na literatura é demonstrado que as colunas contendo derivados de amilose possuem enantioseleção superior aos derivados de celulose (CHANKVETADZE, 1995; MEYRING, 2000; GIROD, 2001; BIELEJEWSKA, 2007; ALI, 2009).

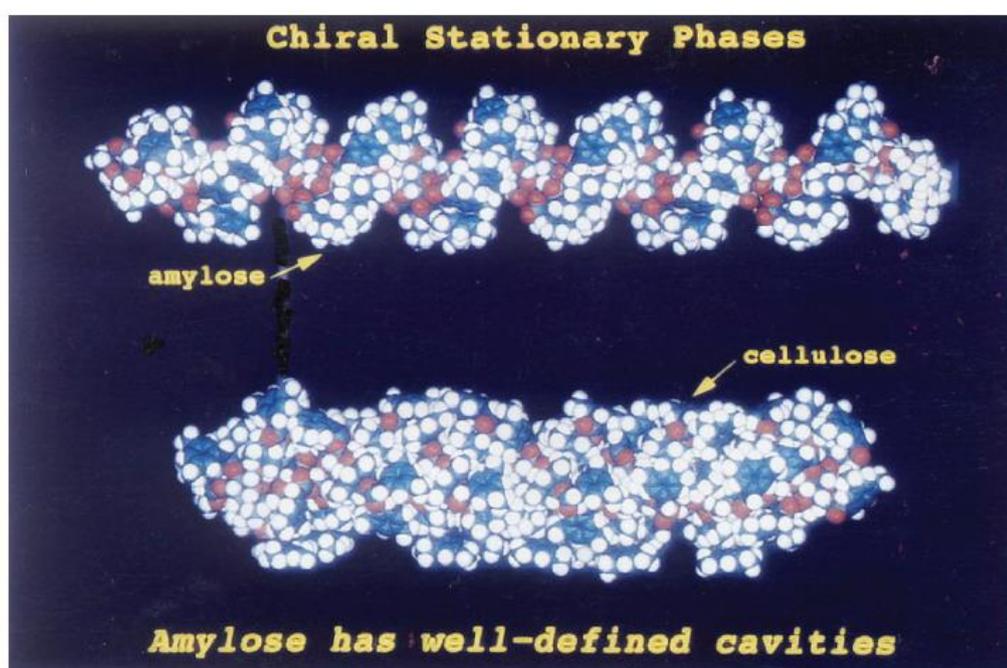


Figura 8 - Estrutura tridimensional dos polímeros de celulose e amilose. Fonte: ALI, 2009.

3.5 Antimaláricos e estudos quirais

A maioria dos fármacos empregados atualmente no tratamento e profilaxia da malária são quirais, mas comercializados como uma mistura racêmica. Eles demonstram enantioseletividade em suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas em humanos e animais. Dessa maneira, avaliar o comportamento dessas substâncias no organismo utilizando métodos confiáveis é essencial para melhorar a terapia com esses fármacos. Além disso, a metabolização desses fármacos racêmicos muitas vezes fornece metabólitos também racêmicos, de forma que é importante avaliar a

enantioseletividade tanto do fármaco quanto do metabólito (SANTOS MAGALHAES & BONATO, 2010).

Muitos estudos têm sido conduzidos para analisar as diferenças na atividade antimalárica dos enantiômeros desses fármacos em diferentes espécies de *Plasmodium*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (WEBSTER *et al.*, 1991; WERNSDORFER *et al.*, 1998). Dentre esses estudos, grande parte envolve a suscetibilidade *in vitro* com iguais concentrações dos enantiômeros contra cepas de *Plasmodium falciparum*. Com base nos resultados, a maior parte dos antimaláricos não possui estereoseletividade em sua atividade farmacológica *in vitro* (Basco *et al.*, 1992). Entretanto, esses fármacos podem demonstrar estereoseletividade *in vivo*, uma vez que no organismo a complexidade é maior pelos sistemas quirais *in vivo* possuírem maior especificidade (WEBSTER *et al.*, 1991).

3.6 Lumefantrina e desbutil-lumefrantrina

A lumefantrina, ou benflumetol (**Figura 9**), é um antimalárico esquizonticida sanguíneo empregado nos estágios eritrocíticos do *P. falciparum*. O fármaco é utilizado em combinação com o artemeter como tratamento de primeira escolha para malária *falciparum*. A lumefantrina tem meia-vida de eliminação mais longa comparada com o artemeter, e dessa forma é responsável por eliminar do organismo qualquer parasita remanescente no tratamento combinado (BASCO *et al.*, 1998; WHITE *et al.*, 1999). A **Tabela 3** lista as principais propriedades físico-químicas da lumefantrina.

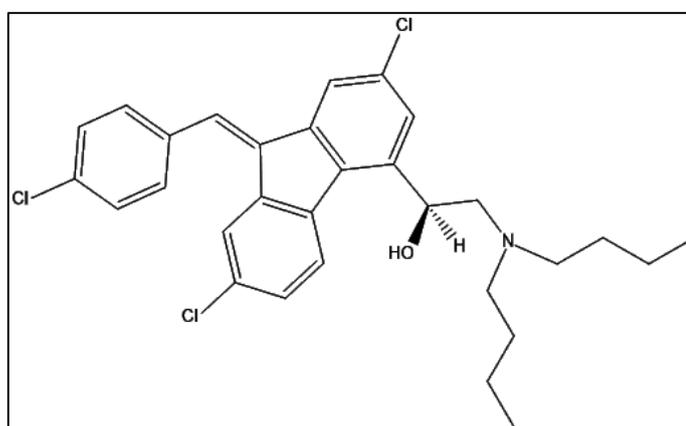


Figura 9 - Estrutura química da lumefantrina.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas da lumefantrina.

| PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS LUMEFANTRINA | | |
|---|---|---|
| Nome químico (1RS)-2-(dibutilamino)-1-1[(9Z)-2,7-dicloro-9-[(4-clorofenil)metilideno]-9H-fluoren-4-il]etanol | | |
| Fórmula química C ₃₀ H ₃₂ Cl ₃ NO | Número CAS 82-186-77-4 | Número DCB 5462 |
| Massa molar 528,94 g/mol | pKa básico: 9,78 pKa ácido: 14,1 log P: 9,19 | Ponto de fusão 129-131 °C Ponto de ebulição 587-697 °C |
| Solubilidade Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em clorofórmio e acetato de etila, solúvel em diclorometano, pouco solúvel em metanol e etanol. | | |
| Aspecto físico Pó amarelo fino e cristalino | | |

Fonte: ECHA, 2017, FARMACOPEIA, 2010

O medicamento de referência que contém lumefantrina é denominado Coartem® (artemer 20 mg + lumefantrina 120 mg ou artemer 80 mg + lumefantrina 480 mg – comprimidos dispersíveis) produzido pela Novartis (NOVARTIS, 2015). Outros medicamentos que possuem essa combinação de fármacos são: Riamet® (artemeter 20 mg + lumefantrina 120 mg – comprimido dispersível) também produzido pela Novartis e o Co-artesiane® (artemeter 20 mg + lumefantrina 120 mg - comprimidos, artemeter 180/360 mg + lumefantrina 1080/2160 mg – suspensão oral), produzidos pela Dafra pharma.

3.6.1 Farmacocinética e farmacodinâmica da lumefantrina e seus enantiômeros

Devido à lipofilicidade da lumefantrina, sua absorção é lenta e variável. Um estudo com pacientes portadores de malária *falciparum* demonstrou que a meia-vida de absorção é de 5,3 horas e a concentração plasmática máxima foi lentamente alcançada após seis a oito horas da administração (EZZET *et al.*, 2000; ZENG *et al.*, 1996).

A lumefantrina possui alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (> 99%), principalmente às lipoproteínas de alta densidade (HDL) (COLUSSI *et al.*, 1999). O

grande volume de distribuição aparente do fármaco permite alta ligação aos tecidos (KARBWANG *et al.*, 1994). A lumefantrina é eliminada em uma taxa lenta, com meia-vida de eliminação de 2 a 6 dias (EZZET *et al.*, 2000).

A lumefantrina, em humanos, é metabolizada principalmente pelo CYP3A4 nos microsossomos hepáticos, perdendo um grupo N-desbutil, originando a desbutil-lumefantrina (**Figura 10**) que possui atividade antimalárica *in vitro* maior que do fármaco de origem (NOEDL *et al.*, 2001). Em animais, a glicuronidação ocorre diretamente após a biotransformação oxidativa. Em humanos, a exposição à lumefantrina aumenta com a administração repetida durante três dias de tratamento, levando a eliminação mais lenta do fármaco (EZZET *et al.*, 2000). Estudos em ratos e cães indicam que a excreção do fármaco ocorre, principalmente, através da bile com excreção pelas fezes, onde o fármaco inalterado predomina sobre a desbutil-lumefantrina (EZZET *et al.*, 2000). A **Tabela 4** apresenta as propriedades físico-químicas da DL.

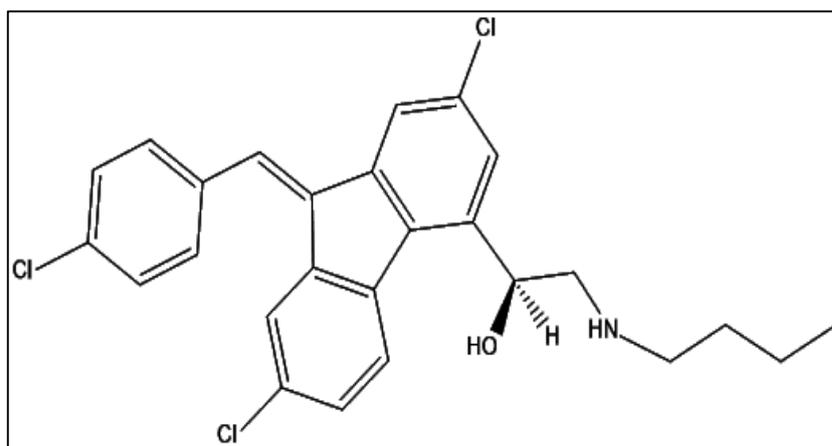


Figura 10 - Estrutura química da desbutil-lumefantrina.

Em 2001, um estudo conduzido na Tailândia avaliou a atividade da desbutil-lumefantrina, em cepas de *P. falciparum*. Um total de 155 amostras isoladas de *P. falciparum* foram testadas, utilizando-se o sistema de microteste *in vitro* da OMS. Os resultados demonstraram que a atividade do metabólito foi de 4 a 5 vezes maior que o antimalárico relacionado, lumefantrina. Apesar de maiores pesquisas serem necessárias para garantir o seu potencial antimalárico, a desbutil-lumefantrina pode ser vista como um candidato para profilaxia e tratamento da malária (NOEDL *et al.*, 2001)

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas da desbutil-lumefantrina.

| PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DESBUTIL-LUMEFANTRINA | | |
|--|--|-------------------------------------|
| Nome químico 1RS-2-(butilamino)-1-[(9Z)-2,7-dicloro-9-[(4-clorofenil)metilideno]]fluoren-4-il]etanol | | |
| Fórmula química C ₂₆ H ₂₄ Cl ₃ NO | Número CAS 252990-19-5 | Número DCB Não possui. |
| Massa molar 472,83 g/mol | pKa: 9,72 log P: 7,48 | Ponto de fusão 159-161 °C |
| Solubilidade Solúvel em dimetilsulfóxido, clorofórmio e levemente solúvel em metanol. | | |
| Aspecto físico Pó amarelo fino e cristalino | | |

Fonte: DRUG BANK, 2018; HMDB, 2018.

A atividade sinérgica da lumefantrina e seu metabólito foi avaliada por meio de 44 amostras isoladas de pacientes com *P. falciparum* da região de Mae Sot (Tailândia). Foi feita uma combinação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina na proporção de 4,25:1. Os resultados demonstraram que a presença do metabólito aumentou a atividade da lumefantrina, indicando um possível candidato para terapia combinada, em áreas onde a lumefantrina já vem sendo utilizada (LEEB *et al.*, 2010).

Em 1998, foi publicado um estudo avaliando a enantiosseletividade dos enantiômeros da lumefantrina, no qual foi medida a concentração específica responsável pela inibição da maturação dos esquizontes, em um isolado fresco de *P. falciparum*. Dos 29 isolados investigados no estudo, nenhum produziu evidência de diferenças substanciais na atividade farmacológica dos enantiômeros e do racemato de lumefantrina. Entretanto, a farmacocinética dos enantiômeros em relação à mistura racêmica não foi avaliada (WERNSDORFER *et al.*, 1998).

Alguns estudos demonstram que a estereosseletividade dos fármacos halofantrina, primaquina e cloroquina podem ocasionar certos eventos adversos nos pacientes. A estereosseletividade foi observada frequentemente no volume de distribuição e/ou na excreção do fármaco. A enantiosseletividade da lumefantrina foi analisada somente *in vivo* até o momento, como citado pelo estudo de Wernsdorfer. Entretanto, devido à

sua grande semelhança estrutural e farmacocinética com a halofantrina, é importante realizar sua separação quiral, especialmente pelo fato da lumefantrina ser mais empregada na rotina do tratamento da malária e estar presente na lista de medicamentos preconizados pela OMS (MILTON *et al.*, 1989; KARBWANG & NA BANGCHANG, 1994; HUMBERSTONE *et al.*, 1996; BROCKS & TONI, 1999; EZZET *et al.*, 2000; BROCKS & WASAN, 2002; SHACKLEFORD *et al.*, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras

- Lumefantrina SQR, United States Pharmacopoeia (Rockville, EUA), lote FOH108;
- Lumefantrina insumo farmacêutico ativo, Dafra Pharma (Turnhout, Bélgica), lote 06032403;
- Combiart comprimidos – 20 mg artemeter + 120 mg lumefantrina (Strides Arcolab Limited – Bangalore, Índia), lotes 7222852 e 7222613;
- Lumiter comprimidos – 20 mg artemeter + 120 mg lumefantrina (Macleods Pharmaceuticals Ltd. – Mumbai, Índia), lote EAB5411B.

4.1.2 Reagentes e vidrarias

- Solventes grau cromatográfico: acetonitrila JT Baker (Xalostoc, México), hexano Schalau (Barcelona, Itália), isopropanol Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha), etanol Synth (Diadema, Brasil);
- solventes e reagente grau analítico: ácido acético glacial Synth (Diadema, Brasil), ácido trifluoroacético Tedia (Fairfield, EUA);
- água destilada e água ultrapurificada em sistema Merck Millipore® modelo Direct Q3 (Billerica, EUA);
- pipetas e balões volumétricos calibrados;
- béqueres, kit de filtração, seringas, vials.

4.1.3 Equipamentos e materiais

- Aparelho de ultra-som BRANSONIC 220;
- balança analítica Shimadzu com precisão de 0,01 mg;
- coluna cromatográfica Chiralpak- ADH (150 x 4,6 mm; 5 µm) – Daicel;
- coluna cromatográfica LiChroCART CN (125 x 4,0 mm; 5 µm) – Merck;
- coluna cromatográfica Chirobiotic V (100 x 2,1; 5 µm) – Supelco;

- cromatógrafo a líquido de alta eficiência Hewlett-Packard (HP) 1100, com forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) e software HP ChemStation LC 3D;
- filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 μm para seringa – Millex Merck Millipore (Billerica, EUA);
- micropipetas;
- polarímetro modelo ADP 220 – Bellingham Stanley Ltd.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização da lumefantrina insumo farmacêutico ativo (IFA)

Os espectros da lumefantrina insumo farmacêutico ativo, na região do ultravioleta, na faixa de 200 a 400 nm, foram obtidos por meio do detector de arranjo de diodos acoplado ao cromatógrafo. O insumo farmacêutico da lumefantrina foi também avaliado quanto ao desvio da luz plano polarizada, para confirmar que se tratava de mistura racêmica. Para avaliação do poder rotatório, preparou-se solução amostra utilizando o insumo farmacêutico ativo, em duplicata, a 1% em metanol com ácido acético 1% (p/v). As medidas do poder rotatório foram realizadas em polarímetro com lâmpada de sódio, a 21 °C, utilizando-se tubo de 1,0 dm.

4.2.1.1 Padronização do insumo de lumefantrina

4.2.1.1.1 Preparo das soluções padrão e amostra de lumefantrina

Solução padrão de lumefantrina: aproximadamente 15 mg de lumefantrina SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Uma alíquota de 2 mL de etanol com 1,0% de ácido acético foi adicionada para solubilização e o volume do balão foi completado com fase móvel (acetonitrila: ácido trifluoroacético 0,05% - 80:20). Transferiram-se 2 mL da solução obtida para balão volumétrico de 25 mL. O volume do balão foi completado com fase móvel, de modo a obter solução a 24 $\mu\text{g/mL}$.

Solução amostra do insumo de lumefantrina: aproximadamente 15 mg de lumefantrina IFA foram exatamente pesados, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e submetidos ao mesmo procedimento descrito para a solução padrão.

4.2.1.1.2 Condições cromatográficas para a padronização do insumo

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido HP 1100 provido de DAD a 335 nm e software HP ChemStation LC 3D. Empregou-se coluna cromatográfica LiChroCART CN (125 x 4,0 mm; 5 µm), mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila e TFA (ácido trifluoroacético) 0,05% (v/v) (80:20), fluxo de 1,4 mL/minuto e volume de injeção de 20 µL. As condições cromatográficas foram previamente descritas e validadas por CÉSAR (2008). Foram analisadas quatro replicatas, preparadas independentemente, em três dias diferentes.

4.2.2 Desenvolvimento e validação de método analítico quiral para quantificação dos enantiômeros de lumefantrina em comprimidos

4.2.2.1 Desenvolvimento do método cromatográfico quiral

A coluna avaliada para separação dos enantiômeros de lumefantrina foi a Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm; 5 µm), por haver trabalhos prévios na literatura que utilizaram esta coluna para análise quiral de halofantrina, um antimalárico com estrutura similar à da lumefantrina. Esta coluna apresenta fase estacionária composta de 3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose. Foi testada também uma coluna Chirobiotic V (100 x 2,1; 5 µm), com fase estacionária a base de vancomicina (glicopeptídeo macrocíclico).

Para a separação dos enantiômeros da lumefantrina, inicialmente foram avaliadas as condições propostas por Janßen (2005), que utilizou coluna Chiralpak AD (250 x 4,6 x 5 µm), a 25 °C, fase móvel contendo hexano, etanol e dietilamina (85,9: 14: 0,1), detecção UV a 335 nm, fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. Em seguida, foram otimizados os parâmetros de proporção da fase móvel substituindo o etanol pelo isopropanol e as proporções testadas variaram de hexano a 85% a hexano puro e isopropanol 15% a 0%. O fluxo foi avaliado entre 0,8 a 1,2 mL/min e a temperatura

foi avaliada em 20, 25 e 30 °C. O principal parâmetro cromatográfico avaliado para assegurar um método adequado foi a resolução, visto que é necessário a completa separação dos enantiômeros para quantificação dos mesmos separadamente.

4.2.2.2 Preparo das soluções padrão e amostra de lumefantrina

Solução padrão de lumefantrina: aproximadamente 60 mg do insumo farmacêutico padronizado de lumefantrina foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionaram-se 5 mL de etanol com 1,0% de ácido acético para completa solubilização e o volume do balão foi completado com hexano. Transferiu-se 1 mL da solução obtida para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com hexano, de modo a obter uma solução a 240 µg/mL (120 µg/mL para cada enantiômero).

Solução amostra de lumefantrina: uma quantidade de pó dos comprimidos triturados, equivalente a 60 mg de lumefantrina, foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionaram-se 5 mL de etanol com 1,0% de ácido acético para completa solubilização e o volume do balão foi completado com hexano. Transferiu-se 1 mL da solução obtida para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com hexano, de modo a obter uma solução a 240 µg/mL (120 µg/mL para cada enantiômero).

4.2.2.3 Validação do método cromatográfico quiral

As condições cromatográficas otimizadas para o método foram coluna Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm; 5 µm), mantida a 25°C, fase móvel composta por hexano e isopropanol (97:3), fluxo de 1,0 mL/minuto, detecção em 335 nm e volume de injeção de 20 µL. O método por CLAE quiral, após otimização de seus parâmetros, foi validado de acordo com os procedimentos recomendados pela Resolução RDC 166 da ANVISA, de 25 de julho de 2017. Para a validação do método foi utilizado o lote 7222613 do medicamento Combiart.

4.2.2.3.1 Seletividade

A seletividade do método cromatográfico quiral foi determinada pela avaliação da pureza espectral dos picos dos enantiômeros de lumefantrina obtidos em cromatogramas de soluções padrão e amostra, com auxílio do DAD. Além disso, foram injetadas soluções placebo, preparada pelo mesmo procedimento das soluções padrão e da amostra, com a finalidade de avaliar possíveis picos interferentes no cromatograma com o mesmo tempo de retenção dos picos da lumefantrina. O placebo foi preparado conforme proporções descritas na **Tabela 5**. As proporções foram estabelecidas de acordo com os excipientes citados na bula do medicamento (Combiart) e as proporções de cada um foram estimadas segundo referências da literatura (KIBBE, 2000; CÉSAR *et al.*, 2008; CÉSAR, 2009).

Tabela 5 - Proporção dos excipientes utilizados para preparo do placebo, conforme composição dos comprimidos de Combiart.

| Excipiente | Proporção presente na formulação |
|-----------------------------|----------------------------------|
| Celulose microcristalina | 81,5% |
| Hidroxipropilmetilcelulose | 5,0% |
| Croscarmelose sódica | 5,0% |
| Estearato de magnésio | 5,0% |
| Polisorbato 80 | 3,0% |
| Dióxido de silício coloidal | 0,5% |

4.2.2.3.2 Linearidade

A linearidade do método analítico quiral foi determinada por meio da construção de três curvas analíticas contendo 5 níveis de concentração, na faixa de 80% a 120% da concentração de trabalho do analito (120 µg/mL). Para isso, foram preparadas três soluções padrão estoque, conforme descrito na parte inicial do item **4.2.2.2**, e a partir destas, foram preparadas soluções diluídas de acordo com a faixa de trabalho proposta para o método (**Tabela 6**). Para cada concentração foram preparadas, a partir das soluções estoque, três soluções individuais, totalizando 15 soluções.

Tabela 6 – Procedimento de diluição da solução estoque para o parâmetro de linearidade.

| Concentração (%) | Concentração (µg/mL) | Volume de solução estoque (µL) |
|------------------|----------------------|--------------------------------|
| 80 | 96 | 800 |
| 90 | 108 | 900 |
| 100 | 120 | 1000 |
| 110 | 132 | 1100 |
| 120 | 144 | 1200 |

De posse dos resultados, procedeu-se à análise estatística dos dados. O primeiro parâmetro avaliado foi a presença de *outliers*, utilizando-se o teste de resíduo padronizado de *Jackknife*, que permite a exclusão de até 22% do total de dados originais obtidos durante a análise. Entretanto, o teste não permite que sejam excluídos os valores correspondentes à última replicata de cada nível. Em seguida, foi avaliada a normalidade dos resíduos por meio do teste de *Ryan-Joiner*, que calcula um valor *Req*, comparando-o a um valor crítico determinado pelo espaço amostral.

Para a determinação da homocedasticidade dos resíduos, foi empregado o teste de *Brown-Forsythe*, ou teste de Levene modificado. O teste calcula o valor *tL* de Brown-Forsythe e o valor de *p*. Por fim, porém não menos importante, o parâmetro de correlação ou independência dos resíduos foi avaliada por meio do teste de *Durbin-Watson*, no qual o valor *d* foi calculado e comparado a valores críticos correspondentes a um limite inferior (*dL*) e a um limite superior (*dU*), a partir dos quais são calculados os valores de *4-dL* e *4-dU*.

Após a avaliação de todos esses parâmetros, foi verificada a regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Os parâmetros da regressão linear, como coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de determinação foram estabelecidos (R^2). Para garantir o ajuste do modelo linear foi avaliado a significância da regressão e o desvio de linearidade por ANOVA. Uma nova curva de linearidade foi construída, plotando-se as médias das áreas dos picos dos enantiômeros pela concentração. Essa curva foi utilizada para calcular outros parâmetros de validação, como limite de detecção, limite de quantificação e teor.

4.2.2.3.3 Precisão

As precisões intra e intercorridas foram avaliadas. A primeira foi avaliada pelo mesmo analista no mesmo dia e a segunda foi avaliada com analista diferente e em dia diferente da primeira análise. Foram preparadas seis soluções na concentração de trabalho (120 µg/mL para cada enantiômero), todas individualmente preparadas desde a pesagem até a diluição e injeção no cromatógrafo. As soluções amostra foram preparadas conforma descrito no item 4.2.2.2. Para a avaliação da concordância entre as medições, foi calculado o desvio padrão relativo de cada dia de análise e entre todas as medições dos dois dias.

4.2.2.3.4 Exatidão

O parâmetro exatidão foi avaliado pelo método do placebo fortificado, que se baseia na adição de quantidades determinadas do IFA a uma mistura dos excipientes que constituem a fórmula do comprimido. A relação dos excipientes empregados com suas respectivas proporções está demonstrada na **Tabela 5**

Foram preparadas, em triplicata, soluções padrão estoque de lumefantrina a 2,4 mg/mL, em hexano. Cada solução estoque foi diluída para três diferentes concentrações (96, 120 e 144 µg/mL para cada enantiômero), em balão volumétrico de 10 mL, contendo 260 mg da formulação dos excipientes (**Tabela 8**). A quantidade da formulação de excipientes adicionada correspondeu ao valor da diferença entre o peso médio do comprimido e a quantidade de fármacos presentes. As soluções foram submetidas a banho de ultrassom por quinze minutos, o volume do balão foi ajustado com hexano e, em seguida, as soluções foram filtradas. A porcentagem de recuperação foi calculada segundo a equação:

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{\text{concentração obtida} - \text{concentração teórica}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Tabela 7 – Procedimento de preparo das amostras para o parâmetro de exatidão.

| Concentração (%) | Concentração (µg/mL) | Volume de solução estoque (µL) | Massa excipiente adicionada (mg) |
|------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 80 | 96 | 800 | 260 |
| 100 | 120 | 1000 | 260 |
| 120 | 144 | 1200 | 260 |

4.2.2.3.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados a partir da equação que leva em consideração os parâmetros da curva analítica:

$$LD = \frac{DPa \times 3,3}{b} \quad LQ = \frac{DPa \times 10}{b}$$

Em que DPa é o desvio padrão do intercepto e b é a média das inclinações da curva analítica.

4.2.2.3.6 Robustez

Para avaliação da robustez do método cromatográfico quiral, foram selecionados três parâmetros considerados críticos, que foram avaliados a partir de seis soluções preparadas de forma independente. Cada parâmetro foi avaliado duas unidades abaixo e acima da unidade nominal, exceto o parâmetro marca do solvente (**Tabela 8**), perfazendo dessa forma um total de 36 corridas analíticas.

Tabela 8 - Parâmetros nominais e alterados para avaliação da robustez do método.

| Condições alteradas | Parâmetro nominal | Parâmetro alterado |
|---------------------------|-------------------|--------------------|
| Temperatura Baixa | 25°C | 23°C |
| Temperatura Alta | 25°C | 27°C |
| Comprimento de onda menor | 335 nm | 333 nm |
| Comprimento de onda maior | 335 nm | 337 nm |
| Marca do hexano | Schalau | Merck |

Para cada parâmetro, foi realizada uma injeção de cada solução obtida, na concentração de trabalho (120 µg/mL de cada enantiômero). Para determinar a

significância da variação de cada parâmetro no resultado final, foi aplicado ANOVA seguido do teste de *Tukey* para os parâmetros temperatura e comprimento de onda e o teste *t de Student* para o parâmetro marca do hexano. As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 7.04, com nível de significância de 5%.

4.3 Doseamento dos comprimidos

Após finalizar a validação do método analítico, foram analisados três lotes diferentes dos comprimidos (dois lotes do medicamento Combiart® e um lote do medicamento Lumifer), para comprovar a aplicabilidade do método desenvolvido a amostras reais. Cada lote foi analisado em duplicata e as amostras foram preparadas conforme descrito no item **4.2.2.2**. O teor dos enantiômeros foi determinado pela curva analítica padrão. Por fim, foram obtidas a média dos valores de teor de cada lote e seus respectivos desvio padrão relativo (DPR). Os resultados foram comparados com os trabalhos disponíveis sobre o tema e com as farmacopeias pertinentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do insumo farmacêutico de lumefantrina

O insumo farmacêutico da lumefantrina foi caracterizado quanto à proporção dos enantiômeros e o resultado obtido comprovou que o insumo se trata de uma mistura racêmica. Foi obtido no polarímetro um valor de ângulo de rotação de $+0,02^\circ$. O valor próximo a zero indica que a luz não é rotacionada predominantemente para nenhum dos lados e, portanto, que a proporção de cada enantiômero é de aproximadamente 50%. Na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, o limite especificado em relação ao desvio da luz plano polarizada para insumos farmacêuticos que são misturas racêmicas é de $-0,1^\circ$ a $+0,1^\circ$ (FARMACOPEIA, 2010).

A lumefantrina apresentou quatro máximos de absorção característicos em seu espectro de absorção no UV (234, 264, 305 e 335 nm), conforme demonstrado na **Figura 11**. Embora 335 nm não seja o comprimento de onda no qual a lumefantrina apresenta maior absorvidade molar, é o máximo de absorção que possui maior comprimento de onda na região do UV. O uso deste comprimento de onda para detecção do fármaco confere maior seletividade ao método, evitando os possíveis interferentes, pois um número menor de moléculas absorve nessa região do espectro. Dessa forma, o comprimento de onda 335 nm foi selecionado para detecção da lumefantrina.

Os espectros em DAD dos enantiômeros foram obtidos e o resultado da pureza espectral pode ser observado na **Figura 11**. Os picos de lumefantrina encontram-se puros, pois os espectros no ultravioleta de cada ponto do pico se sobrepõem perfeitamente, indicando a pureza satisfatória dos enantiômeros. Além disso, os picos cromatográficos dos dois enantiômeros apresentaram pureza de 99,6%, valor maior do que o mínimo (95%) estabelecido para um composto ser considerado puro.

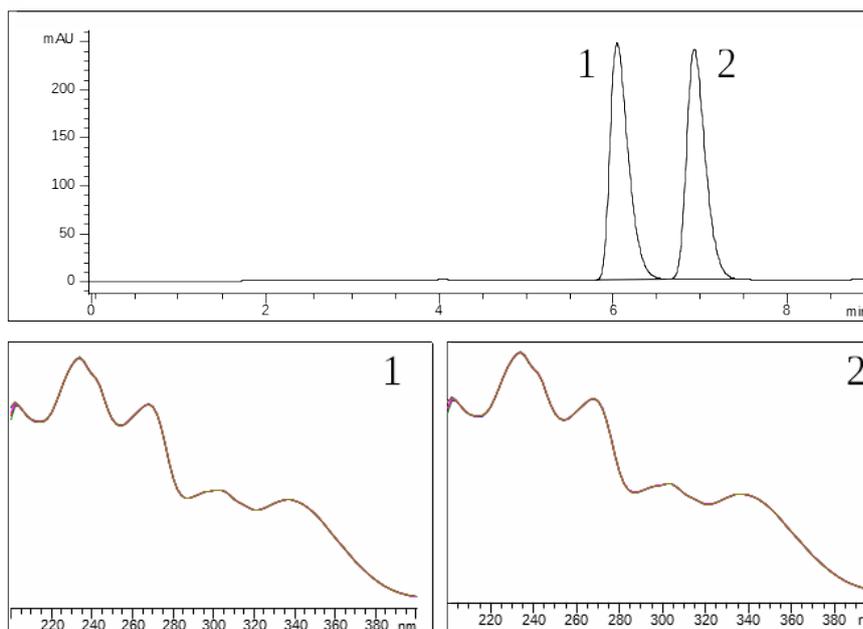


Figura 11 - Cromatograma para os enantiômeros 1 e 2 de lumefantrina e os espectros superpostos para avaliação da pureza espectral dos picos de cada enantiômero.

5.1.1 Padronização do insumo farmacêutico de lumefantrina

O resultado da padronização do teor da lumefantrina IFA foi 99,14% (**Tabela 9**), demonstrando que o insumo possui pureza satisfatória para ser utilizado como padrão secundário no desenvolvimento e validação do método analítico quiral. O cromatograma obtido com o método empregado pode ser observado na **Figura 12**. O método apresentou valores de performance adequados para tempo de retenção (4,53 min), assimetria (1,2), e número de pratos teóricos (5795) segundo os critérios propostos por SNYDER (1997) que são assimetria $<1,5$; número de pratos teóricos >2000 e o tempo de retenção entre 4 a 10 minutos.

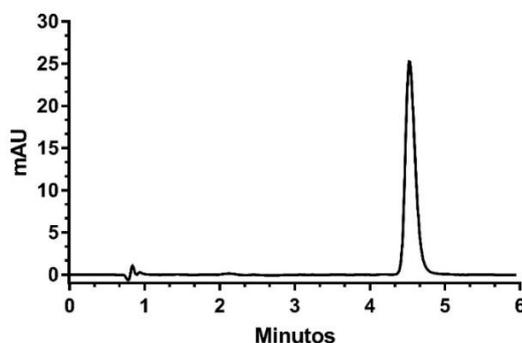


Figura 12 - Cromatograma obtido para o método de padronização do insumo farmacêutico de lumefantrina na coluna LiChroCART CN (125 x 4,0 mm; 5 μ m), fase móvel acetonitrila e TFA 0,05% (80:20), 1,0 mL/min, 335 nm.

Tabela 9 - Valores de área, concentração e teor obtidos durante a padronização do insumo de lumefantrina em três dias diferentes com amostras preparadas independentemente.

| Peso do padrão: 15,21 mg Pureza do padrão: 99,80% | | | | |
|--|----------------------|---------|----------------------|--------------|
| Solução Padrão: 24, 3360 µg/mL Área do padrão: 234.715 | | | | |
| Amostra | Peso da amostra (mg) | Área | Concentração (µg/mL) | Teor (%) |
| 1 | 15,36 | 233.867 | 24,2481 | 98,67 |
| 2 | 15,24 | 232.809 | 24,1384 | 98,99 |
| 3 | 15,10 | 231.855 | 24,0394 | 99,50 |
| 4 | 15,20 | 232.001 | 24,0546 | 98,91 |
| Média (%) | | | | 99,25 |
| DPR (%) | | | | 0,35 |
| 1 | 15,70 | 237.607 | 24,6358 | 98,07 |
| 2 | 15,44 | 236.569 | 24,5282 | 99,29 |
| 3 | 15,18 | 230.887 | 23,9391 | 98,56 |
| 4 | 15,29 | 234.846 | 24,3496 | 99,53 |
| Média (%) | | | | 98,86 |
| DPR (%) | | | | 0,68 |
| 1 | 15,34 | 235.983 | 24,4674 | 99,69 |
| 2 | 15,46 | 237.805 | 24,6564 | 99,68 |
| 3 | 15,40 | 233.848 | 24,2460 | 98,40 |
| 4 | 15,10 | 231.896 | 24,0436 | 99,52 |
| Média (%) | | | | 99,32 |
| DPR (%) | | | | 0,62 |
| Média total (%) | | | | 99,14 |

5.2 Desenvolvimento e validação do método cromatográfico quiral para quantificação de lumefantrina em comprimidos

5.2.1 Desenvolvimento do método cromatográfico quiral

As colunas quirais adsorvidas são muito sensíveis e podem sofrer danos se eventuais resíduos de solventes entrarem em contato com a fase estacionária. Dessa forma, é muito importante que o equipamento seja inicialmente ambientado com os solventes compatíveis com esse tipo de fase estacionária. Esses cuidados devem ser observados para aumentar o tempo de vida útil da coluna. Os solventes que podem ser utilizados no tipo de coluna empregada nesse trabalho não representam uma lista muito grande, como citado anteriormente; dessa forma, os solventes testados se restringiram a hexano, etanol e isopropanol.

O parâmetro mais relevante a ser avaliado no desenvolvimento de um método analítico quiral é a resolução entre os picos dos enantiômeros. Esse parâmetro deve ser no mínimo 1,5 para que ocorra uma boa separação entre os enantiômeros no nível de linha de base (SNYDER, 1997). Dos solventes testados para a separação dos enantiômeros a mistura hexano e etanol não demonstrou ser adequada, isso porque observou-se uma instabilidade na linha de base, talvez, devido à miscibilidade do etanol com o hexano ser menor do que a miscibilidade com o isopropanol. Dessa maneira, o etanol foi substituído pelo isopropanol que possui uma miscibilidade maior em hexano. A adição de trietilamina e dietilamina não demonstrou nenhuma variação significativa no aspecto dos cromatogramas, dessa maneira, foi descartada a adição deles. Foi testada também uma outra coluna quiral para avaliar a separação da lumefantrina. Esse teste foi executado com a coluna Chirobiotic V, entretanto, a coluna de glicopeptídeos não promoveu enantioseparação em nenhuma das condições testadas: polar iônico, fase reversa e fase normal e, conseqüentemente, essa possibilidade foi descartada.

Portanto, foi definido que a fase móvel seria composta de hexano e isopropanol e ajustes na composição da mesma foram realizadas para garantir uma corrida analítica em tempo curto, mas adequado para assegurar uma separação eficiente, isto é, com uma resolução maior que 1,5. Das diversas proporções testadas entre hexano e isopropanol, aquela que apresentou melhor resolução, com picos simétricos e sem alargamento foi hexano e isopropanol 97:3. As combinações com maior quantidade de isopropanol apresentaram enantioseparação insatisfatória, com resolução menor que 1,5. As proporções maiores que 97% de hexano apresentaram alargamento dos picos e aumento do tempo de corrida.

Após definir a fase móvel, o próximo parâmetro avaliado foi o fluxo, parâmetro este muito importante para esse tipo de cromatografia visto que em fluxos menores observa-se melhor resolução dos enantiômeros (LAYTON, 2005). Foram avaliados fluxos de 0,8 mL/min a 1,2 mL/min. Como resultado observou-se que com a variação do fluxo da fase móvel, fluxos maiores do que 1,0 mL/min apresentaram resolução inferior a 1,5, enquanto em fluxos menores obteve-se alargamento dos picos e aumento do tempo de retenção.

Por fim, foi otimizada a temperatura do forno da coluna variando-se de 20 °C a 30 °C. A temperatura apresentou pouca influência na separação e dessa forma foi mantida a 25 °C. E por fim, a adição de aditivos básicos trietilamina e dietilamina não demonstrou nenhum efeito no formato dos picos. Um cromatograma com o método definido (coluna Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel hexano e isopropanol (97:3), a 25 °C, fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 335 nm) pode ser observado na **Figura 13**.

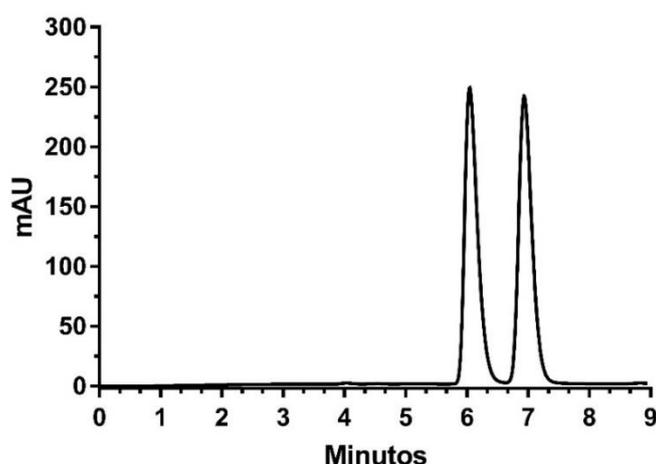


Figura 13 - Cromatograma obtido a partir do método desenvolvido para a separação e quantificação dos enantiômeros lumefantrina empregando coluna Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel hexano e isopropanol (97:3), 1,0 mL/min, 335 nm.

5.2.2 Validação do método analítico cromatográfico quiral

5.2.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se os cromatogramas correspondentes ao padrão de lumefantrina, ao placebo contendo os excipientes presentes no comprimido e aos comprimidos (**Figura 14**). O placebo foi utilizado para demonstrar que os excipientes presentes no comprimido não interferem na quantificação da lumefantrina e que nenhum interferente possui tempo de retenção igual ou próximo ao tempo de retenção dos picos dos enantiômeros. A pureza espectral obtida para os picos dos enantiômeros foi de 99,6%, demonstrando que nenhum interferente coeluiu com os enantiômeros do fármaco.

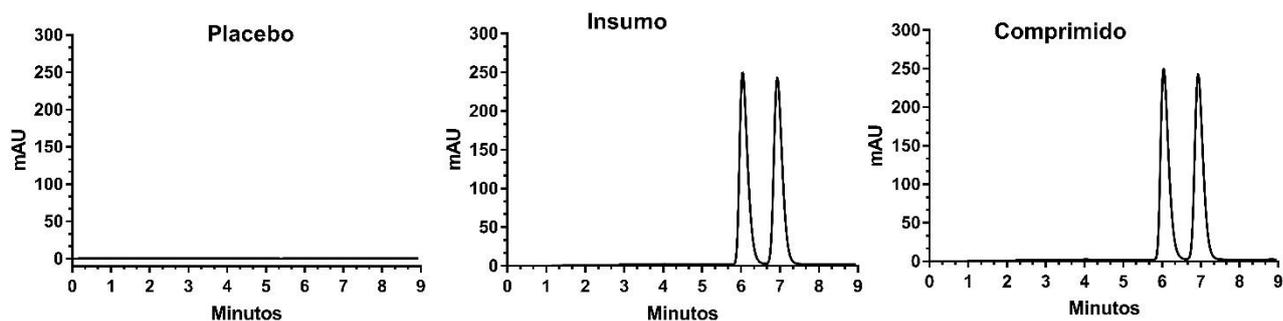


Figura 14 - Cromatogramas obtidos para a avaliação da seletividade do método para o placebo, padrão e comprimido de lumefantrina.

5.2.2.2 Linearidade

A linearidade do método quiral foi determinada avaliando-se uma série de parâmetros estatísticos que garantem que os pontos da faixa de trabalho utilizada seguem uma regressão linear. Das quinze corridas analíticas realizadas e analisadas pelo teste de resíduo padronizado de *Jackknife*, não se observou nenhum valor *outlier* que devesse ser excluído das curvas de nenhum dos enantiômeros (**Tabela 10**). Em seguida, foram aplicados testes para verificar se os dados de regressão linear atendem às premissas para o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). O MMQO ou regressão linear simples é um método estatístico que parte das seguintes premissas: os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são independentes entre si e possuem variância constante ao longo do eixo x (SOUZA, 2007).

Tabela 10 - Concentrações utilizadas e respostas obtidas para a construção da curva de calibração e comprovação da linearidade do método.

| | Enantiômero 1 | | Enantiômero 2 | | |
|-----|---------------|--------------|---------------|--------------|------|
| | (%) | Concentração | Área | Concentração | Área |
| 80 | | 0,0970 | 1695 | 0,0970 | 1699 |
| | | 0,0970 | 1677 | 0,0970 | 1682 |
| | | 0,0970 | 1696 | 0,0970 | 1701 |
| 90 | | 0,1090 | 1848 | 0,1090 | 1845 |
| | | 0,1090 | 1853 | 0,1090 | 1839 |
| | | 0,1090 | 1845 | 0,1090 | 1851 |
| 100 | | 0,1210 | 2006 | 0,1210 | 2008 |
| | | 0,1210 | 2021 | 0,1210 | 2017 |
| | | 0,1210 | 2012 | 0,1210 | 2007 |
| 110 | | 0,1330 | 2183 | 0,1330 | 2174 |
| | | 0,1330 | 2189 | 0,1330 | 2183 |
| | | 0,1330 | 2182 | 0,1330 | 2171 |
| 120 | | 0,1450 | 2353 | 0,1450 | 2359 |
| | | 0,1450 | 2368 | 0,1450 | 2344 |
| | | 0,1450 | 2367 | 0,1450 | 2359 |

Para avaliar o parâmetro de normalidade dos resíduos, foi empregado o teste de *Ryan-Joiner*. O R_{eq} calculado para os enantiômeros 1 e 2 foram 0,9553 e 0,9509 respectivamente, sendo, portanto, maior que o valor para o $R_{crítico}$ definido para $\alpha = 0,05$ ($R_{crítico} = 0,9383$ para ambos os enantiômeros). Dessa maneira, não existem evidências para se rejeitar a hipótese nula do teste, assumindo-se que os dados de ambos os enantiômeros seguem a distribuição normal. A inspeção visual dos gráficos de quartis (**Figura 15**) confirma os resultados do teste de *Ryan-Joiner*, pois verifica-se pouco desvio dos resíduos em relação à reta traçada.

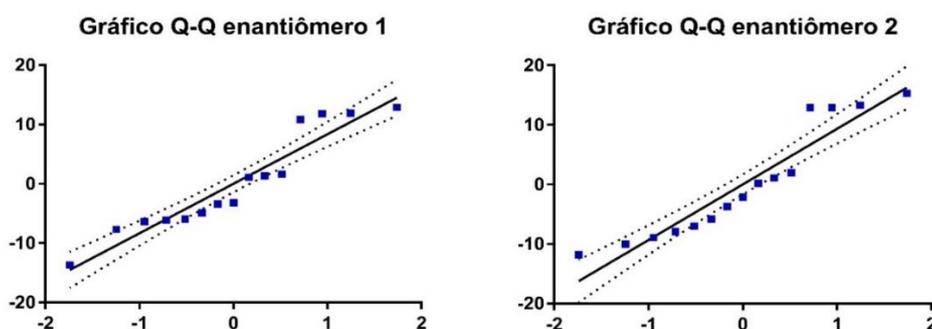


Figura 15 - Gráfico de quartis para os enantiômeros de lumefantrina.

Para a avaliação do parâmetro de independência (ou correlação) dos resíduos, foi aplicado o teste de *Durbin-Watson* (d). Os valores críticos para os limites inferior (d_L) e superior (d_u) de cada enantiômero foram estimados por interpolação polinomial de acordo com a equação 3, considerando um n igual a 15 e os valores tabelados para o teste, sendo adotados d_L igual a 1,0770 e d_u igual a 1,3596 para ambos os enantiômeros. O valor de d calculado para os resíduos dos enantiômeros 1 e 2 foram de 1,7708 e 2,2142, respectivamente, encontrando-se entre os valores de d_U e $4-d_U$ (1,36 e 2,64 respectivamente), região em que ocorre rejeição da hipótese nula do teste e, portanto, que não há autocorrelação dos resíduos. Conclui-se, dessa maneira, que os resíduos são independentes entre si. Em conjugação a esses resultados, o gráfico de resíduos (**Figura 16**) demonstra uma distribuição aleatória e sem tendências dos resíduos entre os quartis do gráfico, confirmando a independência dos resíduos.

$$d_{crítico}(\alpha) \approx a + \frac{b}{\sqrt{n}} + \frac{c}{n} + \frac{d}{n^2} \quad (\text{equação 3})$$

$$d_L = 1,9693 + \left(-\frac{2,8607}{\sqrt{15}}\right) + \left(-\frac{3,4148}{15}\right) + \left(\frac{16,6400}{15^2}\right) = 1,0770$$

$$d_u = 1,98323 + \left(-\frac{3,0547}{\sqrt{15}}\right) + \left(\frac{1,3862}{15}\right) + \left(\frac{16,3662}{15^2}\right) = 1,3596$$

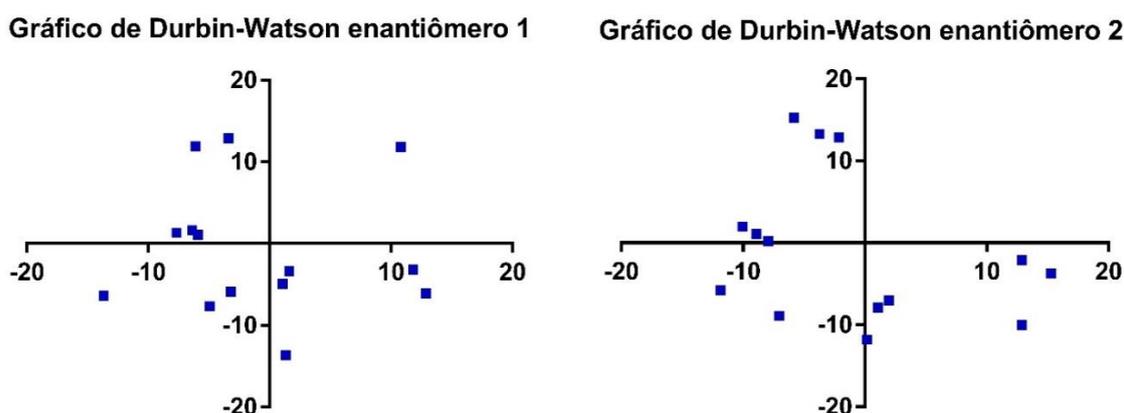


Figura 16 - Gráfico de resíduos de Durbin-Watson para os enantiômeros de lumefantrina.

A homocedasticidade foi determinada pelo teste de *Brown-Forsythe*, encontrando-se para os enantiômeros 1 e 2 valores de p e de estatística tL de *Levene* iguais a 0,6994 e 0,39; e 0,9262 e 0,09, respectivamente. Sendo os valores de p superiores ao nível

de significância estabelecido ($\alpha = 0,05$), não foram apresentados indícios para rejeição da hipótese nula do teste, presumindo-se, assim, que os resíduos são homocedásticos. Após confirmados os parâmetros de normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos, o método de MMOQ pôde ser aplicado para a análise da regressão linear. O ajuste ao modelo linear foi determinado por ANOVA, verificando-se a significância da regressão e a ausência de desvio da linearidade (Tabela 11).

Tabela 11 - Dados da ANOVA para os enantiômeros de lumefantrina para a verificação da significância da regressão e o desvio de linearidade.

| Enantiômero 1 | | | | | | |
|-------------------------------|----|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| FV | GL | SQ | QM | F _{calculado} | p | F _{crítico} |
| Regressão | 1 | $8,49 \times 10^5$ | $8,49 \times 10^5$ | 11346,42 | $1,65 \times 10^{-20}$ | 4,667193 |
| Resíduo | 13 | $9,73 \times 10^2$ | 74,9 | | | |
| Desvio da linearidade | 6 | $4,29 \times 10^2$ | 71,4 | 0,92 | 0,533508 | 3,865969 |
| Entre níveis | 7 | $8,50 \times 10^5$ | | | | |
| Erro puro (dentro do níveis) | 7 | $5,45 \times 10^2$ | 77,8 | | | |
| Total | 14 | $8,50 \times 10^5$ | | | | |
| Enantiômero 2 | | | | | | |
| FV | GL | SQ | QM | F _{calculado} | p | F _{crítico} |
| Regressão | 1 | $8,18 \times 10^5$ | $8,18 \times 10^5$ | 8638,34 | $9,69 \times 10^{-20}$ | 4,667193 |
| Resíduo | 13 | $1,23 \times 10^3$ | 94,7 | | | |
| Desvio da linearidade | 6 | $6,52 \times 10^2$ | 109 | 1,31 | 0,361065 | 3,865969 |
| Entre níveis | 7 | $8,18 \times 10^5$ | | | | |
| Erro puro (dentro dos níveis) | 7 | $5,79 \times 10^2$ | 82,7 | | | |
| Total | 14 | $8,19 \times 10^5$ | | | | |

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; SQ: soma dos quadrados.

Os valores de $F_{\text{calculado}}$ para os enantiômeros 1 e 2 (11346,2 e 8638,34, respectivamente) para a regressão linear foram superiores ao valor do $F_{\text{crítico}}$ (4,68), com um valor de p obtido muito menor que o α estabelecido de 0,05, o que fornece evidências para que se rejeite a hipótese nula do teste, concluindo-se que a regressão é estatisticamente significativa. Para o desvio da linearidade, os valores de $F_{\text{calculado}}$ para os enantiômeros 1 e 2 (0,92 e 1,31, respectivamente) foram inferiores ao $F_{\text{crítico}}$ (3,87), com valor de p igual a 0,53 e 0,36, respectivamente, maiores do que 0,05. Dessa forma, a hipótese nula do teste não é rejeitada, concluindo-se que não existe

desvio da linearidade, isto é, que o modelo de regressão linear é adequado para descrever os dados obtidos. Após avaliação de *outliers*, confirmação das premissas de regressão e ajuste ao modelo de regressão linear, os dados foram plotados em um gráfico de dispersão (**Figura 17**), que correlaciona a área do pico por concentração de cada enantiômero da lumefantrina e determinou-se a equação da reta e os parâmetros de regressão (**Tabela 12**).

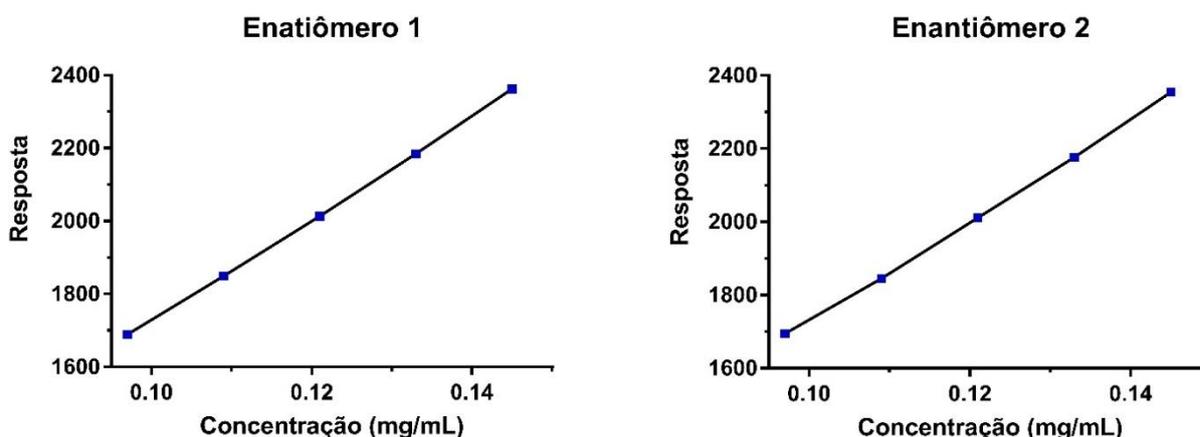


Figura 17 - Curvas de calibração obtidas para o parâmetro de linearidade do método quiral para os enantiômeros de lumefantrina.

Tabela 12 - Parâmetros da regressão calculados para a curva de calibração dos enantiômeros de lumefantrina.

| Parâmetros da regressão | Enantiômero 1 | Enantiômero 2 |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Coefficiente de determinação (R^2) | 0,9989 | 0,9985 |
| Coefficiente de correlação (R) | 0,9994 | 0,9992 |
| Inclinação \pm desvio padrão | 14022,2222 \pm 131,6399 | 13758,3333 \pm 148,0304 |
| Intercepto \pm desvio padrão | 322,9778 \pm 16,0843 | 351,1750 \pm 18,0870 |
| <i>F de significância</i> | 1,65 $\times 10^{-20}$ | 9,69 $\times 10^{-20}$ |
| Faixa de concentração (%) | 80 – 120 | 80 – 120 |
| Número de pontos | 15 | 15 |

O coeficiente de correlação (r) foi superior a 0,99, atendendo à recomendação da RDC nº 166/2017 da ANVISA. O gráfico de resíduos (**Figura 18**) demonstrou que não há tendências na variação dos resíduos, indicando, assim, que o modelo cumpre todas as premissas da regressão linear.

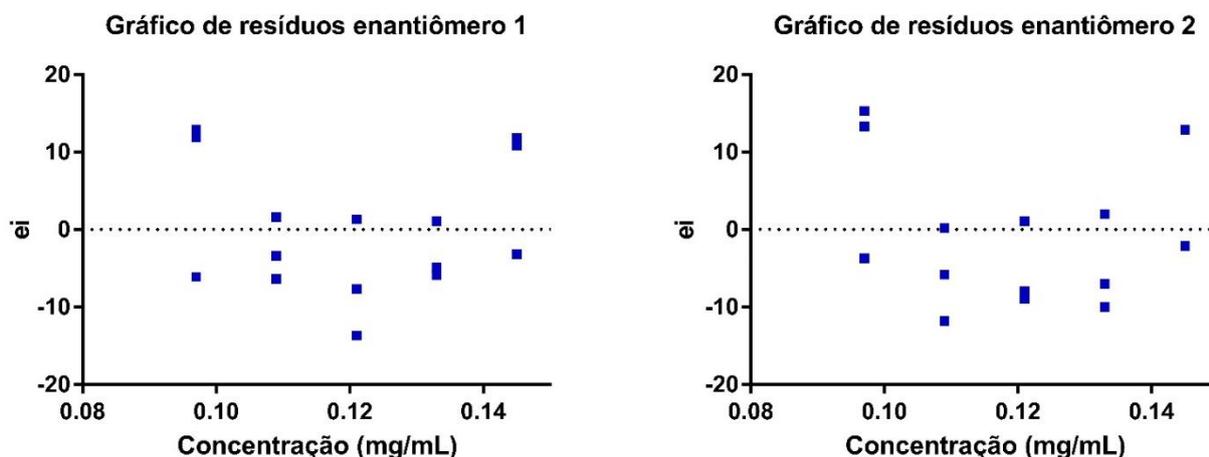


Figura 18 - Gráfico de resíduos obtidos para os enantiômeros de lumefantrina durante o processo estatístico para avaliação da linearidade do método.

5.2.2.3 Precisão

Os resultados da avaliação da precisão intra e interdias dos enantiômeros 1 e 2 podem ser observados nas **Tabelas 13 e 14**, respectivamente. A média de teor entre os diferentes dias de análise foi de 99,83% para o enantiômero 1 e de 100,68% para o enantiômeros 2. Os valores de DPR obtidos para precisão interdias para o enantiômero 1 foi de 1,17% e para o enantiômero 2 foi de 1,12%. Os valores de DPR encontram-se dentro do critério de aceitação recomendado (<1,3% para a repetibilidade e <2,0% para a precisão intermediária) demonstrado que o método possui precisão adequada (AOAC, 2016).

5.2.2.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção do método para os enantiômeros 1 e 2 foi de 3,79 e 4,34 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. E os limites de quantificação foram 11,47 e 13,15 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os valores foram estimados pela inclinação e desvio padrão do intercepto da equação da reta obtida na avaliação da linearidade (**Tabela 12**). O menor ponto da curva analítica no parâmetro de linearidade foi 96 $\mu\text{g/mL}$, dessa forma os limites de detecção e quantificação propostos para o método são sensíveis o suficiente para quantificar o analito em estudo.

Tabela 13 - Resultados obtidos com o parâmetro de precisão para o enantiômero 1 com o método quiral desenvolvido.

| Enantiômero 1 | | | | | |
|----------------------|---------|------------------------------------|------|---------------------------------|---------------|
| | | Peso do padrão: 60,35 mg | | Pureza do padrão: 99,14% | |
| | | Solução padrão: 0,121 mg/mL | | Área do padrão: 1862 | |
| Dia | Amostra | Peso da amostra (mg) | Área | Concentração (mg/mL) | Teor CLAE (%) |
| 1 | 1 | 30,03 | 1852 | 0,1204 | 100.19 |
| | 2 | 30,14 | 1859 | 0,1208 | 100.20 |
| | 3 | 30,10 | 1865 | 0,1212 | 100.66 |
| | 4 | 30,45 | 1875 | 0,1218 | 100,04 |
| | 5 | 30,47 | 1856 | 0,1226 | 100.56 |
| | 6 | 30,01 | 1810 | 0,1227 | 97.44 |
| | | | | Média (n=6) | 99,85 |
| | | | | DPR (n=6) | 1,20 |
| | | Peso do padrão: 60,04 mg | | Pureza do padrão: 99,14% | |
| | | Solução padrão: 0,120 mg/mL | | Área do padrão: 1591 | |
| Dia | Amostra | Peso da amostra (mg) | Área | Concentração (mg/mL) | Teor CLAE (%) |
| 2 | 1 | 30,01 | 1554 | 0,1172 | 97,64 |
| | 2 | 30,06 | 1591 | 0,1200 | 99,80 |
| | 3 | 30,03 | 1566 | 0,1181 | 98,33 |
| | 4 | 30,08 | 1573 | 0,1186 | 98,61 |
| | 5 | 30,02 | 1559 | 0,1176 | 97,92 |
| | 6 | 30,08 | 1595 | 0,1203 | 99,98 |
| | | | | Média dias 1 e 2 (n=12) | 99,83 |
| | | | | DPR dias 1 e 2 (n=12) | 1,17 |

Tabela 14 - resultados obtidos com o parâmetro de precisão para o enantiômero 2 com o método quiral desenvolvido.

| Enantiômero 2 | | | | | |
|----------------------|---------|------------------------------------|------|---------------------------------|---------------|
| | | Peso do padrão: 60,35 mg | | Pureza do padrão: 99,14% | |
| | | Solução padrão: 0,121 mg/mL | | Área do padrão: 1909 | |
| Dia | Amostra | Peso da amostra (mg) | Área | Concentração (mg/mL) | Teor CLAE (%) |
| 1 | 1 | 30,33 | 1940 | 0,1230 | 101,36 |
| | 2 | 30,34 | 1952 | 0,1237 | 101,95 |
| | 3 | 30,40 | 1958 | 0,1241 | 102,06 |
| | 4 | 30,45 | 1953 | 0,1238 | 101,63 |
| | 5 | 30,47 | 1966 | 0,1246 | 102,24 |
| | 6 | 30,43 | 1900 | 0,1204 | 98,94 |
| | | | | Média (n=6) | 101,36 |
| | | | | DPR (n=6) | 1,21 |
| | | Peso do padrão: 60,35 mg | | Pureza do padrão: 99,14% | |
| | | Solução padrão: 0,121 mg/mL | | Área do padrão: 1600 | |
| Dia | Amostra | Peso da amostra (mg) | Área | Concentração (mg/mL) | Teor CLAE (%) |
| 2 | 1 | 30,01 | 1597 | 0,1198 | 99,78 |
| | 2 | 30,06 | 1600 | 0,1207 | 100,36 |
| | 3 | 30,03 | 1587 | 0,1197 | 99,65 |
| | 4 | 30,08 | 1603 | 0,1209 | 100,49 |
| | 5 | 30,02 | 1594 | 0,1202 | 100,12 |
| | 6 | 30,08 | 1588 | 0,1198 | 99,55 |
| | | | | Média dias 1 e 2 (n=12) | 100,68 |
| | | | | DPR dias 1 e 2 (n=12) | 1,12 |

5.2.2.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método do placebo fortificado, em três níveis de concentração, contemplando toda a faixa de trabalho do método. Cada nível foi analisado em triplicata. Os resultados de recuperação para o parâmetro exatidão são demonstrados para ambos os enantiômeros na **Tabelas 15**.

O enantiômero 1 apresentou uma recuperação de 101,21%, enquanto o enantiômero 2 apresentou recuperação média de 100,36%. Como pode ser observado, os valores de exatidão encontram-se dentro dos critérios de aceitação preconizados (98% a 102%), para os dois enantiômeros (AOAC, 2016).

Tabela 15 – Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método quiral desenvolvido para quantificação dos enantiômeros de lumefantrina.

| | | | Enantiômero 1 | Enantiômero 2 |
|------------------|----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| Concentração (%) | Padrão (mg/mL) | Padrão + Placebo (mg/mL) | Recuperação (%) | Recuperação (%) |
| 80 | 0,096 | 0,098 | 101,78 | 100,40 |
| | | | 101,69 | 100,40 |
| | | | 102,26 | 101,21 |
| 100 | 0,120 | 0,121 | 101,66 | 100,49 |
| | | | 101,10 | 100,43 |
| | | | 101,03 | 100,24 |
| 120 | 0,144 | 0,145 | 100,56 | 100,05 |
| | | | 100,51 | 100,33 |
| | | | 100,28 | 99,68 |
| Média | | | 101,21 | 100,36 |
| DPR | | | 0,67 | 0,41 |

5.2.2.6 Robustez

Para avaliação da robustez do método cromatográfico quiral, foram realizadas variações na temperatura da coluna, comprimento de onda de detecção e marca do solvente hexano. Os resultados do teste de robustez e suas análises estatísticas podem ser observados na **Tabela 16**.

Tabela 16 - Resultados de teor dos enantiômeros da lumefantrina obtidos durante a avaliação da robustez do método para os parâmetros temperatura e comprimento de onda.

| Temperatura | | | | | | |
|---------------------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | Enantiômero 1 | | | Enantiômero 2 | | |
| | Nominal | 23 °C | 27 °C | Nominal | 23 °C | 27 °C |
| Teor (%) | 92,16 | 92,87 | 89,85 | 89,99 | 89,94 | 89,18 |
| | 91,60 | 92,79 | 90,38 | 89,45 | 90,45 | 89,73 |
| | 91,26 | 92,23 | 89,32 | 89,28 | 89,99 | 88,82 |
| | 91,24 | 91,90 | 88,89 | 89,25 | 90,00 | 88,84 |
| | 92,15 | 93,82 | 90,62 | 90,00 | 91,80 | 90,65 |
| | 91,20 | 92,95 | 89,56 | 89,80 | 91,20 | 90,21 |
| Média | 91,61 | 92,76 | 89,77 | 89,63 | 90,56 | 89,57 |
| DPR(%) | 0,49 | 0,71 | 0,72 | 0,38 | 0,85 | 0,84 |
| Comprimento de onda | | | | | | |
| | Enantiômero 1 | | | Enantiômero 2 | | |
| | Nominal | 333 | 337 | Nominal | 333 | 337 |
| Teor (%) | 92,16 | 88,03 | 84,07 | 89,99 | 88,82 | 84,88 |
| | 91,60 | 87,95 | 84,00 | 89,45 | 88,76 | 85,31 |
| | 91,26 | 87,31 | 83,41 | 89,28 | 88,17 | 84,63 |
| | 91,24 | 87,12 | 83,06 | 89,25 | 87,98 | 84,60 |
| | 92,15 | 88,67 | 84,45 | 90,00 | 89,61 | 86,10 |
| | 91,20 | 87,86 | 83,53 | 89,80 | 88,99 | 85,78 |
| Média | 91,60 | 87,82 | 83,76 | 89,63 | 88,72 | 85,22 |
| DPR(%) | 0,49 | 0,63 | 0,61 | 0,38 | 0,66 | 0,73 |

O primeiro parâmetro estatístico avaliado foi o DPR entre as determinações obtidas para uma mesma condição para verificar se não havia nenhum desvio interno nos grupos. Como pode ser observado, não houve nenhum desvio significativo dentro de uma mesma condição de análise, com os desvios variando de 0,38% a 0,85%. Em seguida, foi aplicada a ANOVA (**Tabela 17**) para avaliar se houve variação estatisticamente significativa dos teores dos enantiômeros, quando foram inseridas variações na temperatura e no comprimento de onda de detecção da análise.

Tabela 17 - Resultados da ANOVA para os enantiômeros de lumefantrina na avaliação da robustez do método para os parâmetros temperatura e comprimento de onda.

| Enantiômero 1 | | | | | | |
|----------------------------|-----------|----|----------|------------------------|----------------------------|----------------------|
| FV | SQ | GL | MQ | F _{calculado} | valor-P | F _{crítico} |
| Temperatura | | | | | | |
| Entre grupos | 27,2682 | 2 | 13,6341 | 38,4555 | 1,2457 x 10 ⁻⁶ | 3,6823 |
| Dentro dos grupos | 5,3181 | 15 | 0,3545 | | | |
| Total | 32,5864 | 17 | | | | |
| Comprimento de onda | | | | | | |
| Entre grupos | 184,7372 | 2 | 92,3686 | 359,6862 | 2,1199 x 10 ⁻¹³ | 3,6823 |
| Dentro dos grupos | 3,8521 | 15 | 0,2568 | | | |
| Total | 188,5893 | 17 | | | | |
| Enantiômero 2 | | | | | | |
| Temperatura | | | | | | |
| Entre grupos | 3,7045 | 2 | 1,8523 | 4,3331 | 0,03271 | 3,6823 |
| Dentro dos grupos | 6,4121 | 15 | 0,4275 | | | |
| Total | 10,1166 | 17 | | | | |
| Comprimento de onda | | | | | | |
| Entre grupos | 1124,0558 | 2 | 562,0279 | 1889,8512 | 9,4809 x 10 ⁻¹⁹ | 3,6823 |
| Dentro dos grupos | 4,4609 | 15 | 0,2974 | | | |
| Total | 1128,516 | 17 | | | | |

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; SQ: soma dos quadrados.

Como pode ser observado, os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram superiores ao $F_{\text{crítico}}$ (3,68) para os dois parâmetros avaliados, e para os dois enantiômeros, indicando que há uma variação significativa entre as condições de análise. Diante da evidência de variação entre os grupos, foi aplicado o teste de *Tukey*, um teste de comparações múltiplas, normalmente empregado quando as diferenças são significativas no teste ANOVA. O teste permite comparar médias e indicar qual é a diferença mínima significativa entre os diferentes tratamentos (BUSSAB, 2017). O teste de *Tukey* foi aplicado para comparar os resultados de teor obtidos na condição nominal com aqueles obtidos nas condições alteradas (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Resultados obtidos para os enantiômeros de lumefantrina para o teste de comparações múltiplas de Tukey para os parâmetros temperatura e comprimento de onda.

| Teste comparações múltiplas de Tukey | | | | | | |
|--------------------------------------|---------------|-------------|-------------|---------------|----------------|--------------|
| Temperatura | | | | | | |
| Parâmetros | Enantiômero 1 | | | Enantiômero 2 | | |
| | N vs. 23 | N vs. 27 | 23 vs. 27 | N vs. 23 | N vs. 27 | 23 vs. 27 |
| Diferença das médias | -1,159 | 1,831 | 2,99 | -0,933 | 0,056 | 0,989 |
| Diferença 95% do IC | -2,052/-0,266 | 0,938/2,724 | 2,097/3,883 | -1,914/0,047 | -0,924 a 1,037 | 0,009 a 1,97 |
| <i>p</i> -valor ajustado | 0,0110 | 0,0002 | <0,0001 | 0,0633 | 0,9879 | 0,0479 |
| Comprimento de onda | | | | | | |
| Parâmetros | N vs. 333 | N vs. 337 | 333 vs. 337 | N vs. 333 | N vs. 337 | 333 vs. 337 |
| | | | | | | |
| Diferença das médias | 3,778 | 7,845 | 4,068 | 0,9092 | 4,41 | 3,501 |
| Diferença 95% do IC | 3,018/4,538 | 7,085/8,605 | 3,308/4,828 | 0,109/1,709 | 3,610/5,210 | 2,701/4,301 |
| <i>p</i> -valor ajustado | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | 0,0252 | <0,0001 | <0,0001 |

IC: intervalo de confiança; N = Condição nominal.

Quando os valores obtidos para *p* ajustado são menores do que o α estabelecido (0,05), isso indica que existem variações significativas entre os grupos. Como pode ser observado, para o enantiômero 1, os parâmetros de temperatura e comprimento de onda apresentaram valores de *p* ajustado menores do que o α estabelecido (0,05) para todas as combinações de tratamentos. Já para o enantiômero 2, esses valores foram menores do que 0,05 em todos os tratamentos do comprimento de onda e em relação à comparação das temperaturas 23 °C vs. 27 °C. Dessa forma, podemos afirmar que houve variação significativa nos resultados obtidos ao se alterar esses parâmetros no método, demonstrando que o mesmo não possui uma robustez adequada frente a essas variáveis. Complementarmente, é possível observar os gráficos de 95% do intervalo de confiança (**Figura 20**), que confirmam que as variações são realmente significativas estatisticamente.

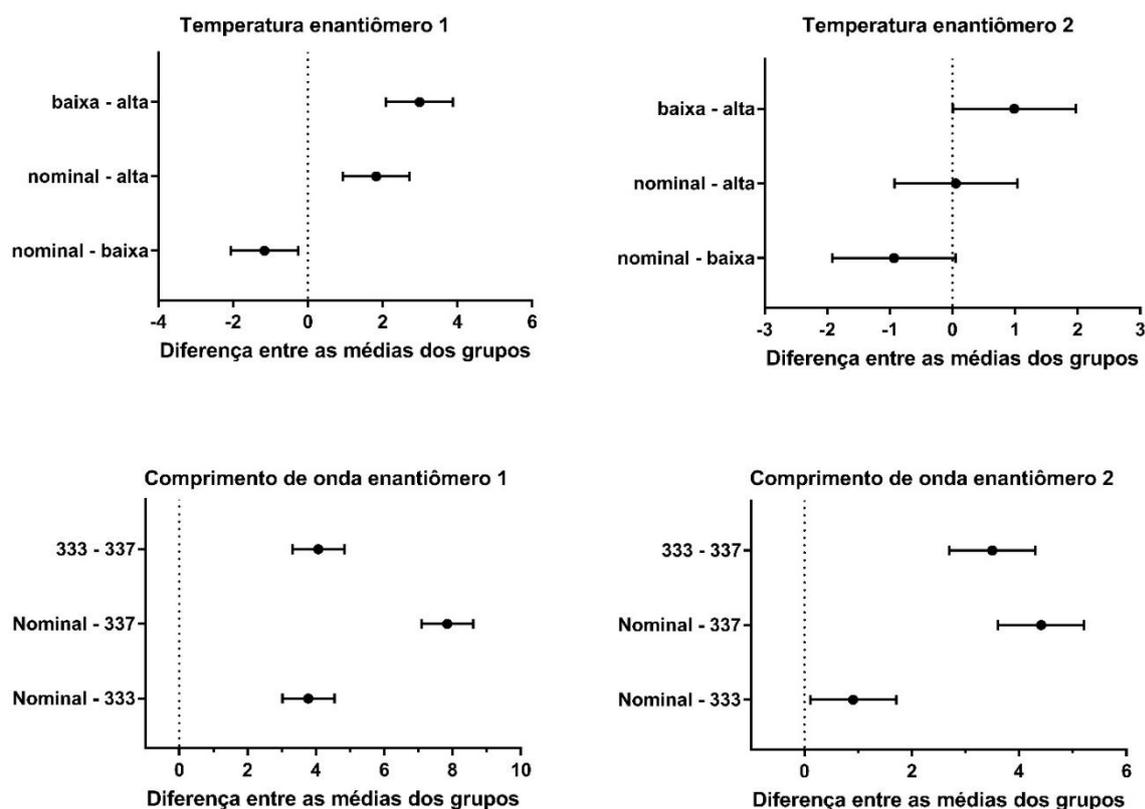


Figura 19 - Gráfico intervalo de confiança 95% para os enantiômeros de lumefantrina em relação aos parâmetros temperatura e comprimento de onda, obtidos pelo teste de Tukey.

O último parâmetro avaliado para a robustez foi a marca do solvente hexano (**Tabela 19**), devido à sensibilidade da cromatografia quiral e a alta proporção desse solvente empregada no método. Assim como nos parâmetros anteriores, o primeiro passo foi avaliar por meio do DPR se havia variação dentro de uma mesma condição. Como pode ser observado, o DPR variou entre 0,38% e 0,53%, demonstrando que não houve desvios significativos dentro de uma mesma condição.

O próximo passo foi avaliar os grupos pelo teste *t* de *Student* (**Tabela 20**), que permite analisar se há diferença estatística entre as médias de duas amostras (BUSSAB & MORETTIN, 2017). Foi escolhido o teste *t* pareado, pois esse teste permite analisar o mesmo conjunto de itens que foram medidos sob duas condições diferentes, antes e depois de um tratamento.

Tabela 19 - Resultados de teor dos enantiômeros da lumefantrina obtidos durante a avaliação da robustez do método em relação à marca do hexano.

| | Enantiômero 1 | | Enantiômero 2 | |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Schalau | Merck | Schalau | Merck |
| Concentração | 92,1636 | 93,1449 | 89,9924 | 88,7392 |
| | 91,5961 | 92,6961 | 89,4526 | 88,4226 |
| | 91,2571 | 92,2923 | 89,2822 | 88,2601 |
| | 91,2431 | 92,2160 | 89,2549 | 88,3342 |
| | 92,1481 | 93,4396 | 89,9976 | 89,4181 |
| | 91,1969 | 92,4791 | 89,8014 | 88,9678 |
| Média | 91,6008 | 92,7117 | 89,6302 | 88,6903 |
| DPR(%) | 0,49 | 0,53 | 0,38 | 0,50 |

Os resultados do teste *t* (**Tabela 20**) demonstram que os valores de $t_{\text{calculado}}$ (18,89 e 10,2) para ambos os enantiômeros foi superior em termos absolutos ao $t_{\text{crítico}}$ (2,57) e o *p*-valor foi menor que o α estabelecido (0,05). Dessa forma, pode-se afirmar que houve variação estatisticamente significativa entre os tratamentos, indicando que a mudança de marca do hexano leva a variação nas medições do método.

Tabela 20 – Resultados do teste *t* de Student pareado para o parâmetro marca do hexano.

| Resultados do teste <i>t</i> -student pareado para o parâmetro marca do hexano | | |
|--|---------------|---------------|
| | Enantiômero 1 | Enantiômero 2 |
| p-valor | <0,0001 | 0,0002 |
| $t_{\text{calculado}}$ | -18,89 | 10,2 |
| $t_{\text{crítico}}$ | 2,57 | 2,57 |

Assim, verificou-se que o método cromatográfico quiral para quantificação dos enantiômeros de lumefantrina não apresentou robustez adequada. Como a resolução entre os enantiômeros da lumefantrina é limítrofe, pequenas variações nos parâmetros analíticos tem um impacto significativo na separação e no formato dos picos, prejudicando a integração e conseqüente quantificação dos enantiômeros. Durante o desenvolvimento do método, foi observado que variáveis como fluxo e proporção dos solventes da fase móvel não podem ser alterados, visando manter uma resolução adequada entre os picos. Com isso, foram selecionados parâmetros analíticos menos críticos para avaliação da robustez do método. Apesar dos resultados absolutos de teor não terem apresentado grande variação entre a condição nominal e aquelas variadas, os testes estatísticos demonstraram diferença

significativa entre esses valores. Tal fato não invalida o método desenvolvido, mas demonstra que todas as condições cromatográficas e analíticas devem ser estritamente controladas durante a análise, para não comprometerem o resultado final.

5.3 Doseamento

Os resultados do doseamento dos enantiômeros de lumefantrina em três lotes de comprimidos podem ser observados na **Tabela 21**. Entre os enantiômeros, não houve grande variação em relação ao teor, ambos apresentando valores próximos entre si e indicando que os medicamentos realmente contêm a mistura racêmica de lumefantrina.

Tabela 21 – Resultados para a quantificação dos enantiômeros da lumefantrina pelo método quiral desenvolvido, em porcentagem do teor e em massa de ativo por comprimido.

| Lote | Enantiômero 1 | | Enantiômero 2 | |
|--------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|
| | Teor (mg/comprimido) | Teor (%) | Teor (mg/comprimido) | Teor (%) |
| 1 | 56,22 | 93,70 | 56,52 | 94,19 |
| | 56,63 | 94,39 | 56,28 | 93,80 |
| Média | 56,43 | 94,04 | 56,40 | 94,00 |
| 2 | 59,71 | 99,51 | 59,89 | 99,81 |
| | 60,19 | 100,31 | 60,33 | 100,55 |
| Média | 59,95 | 99,91 | 60,11 | 100,18 |
| 3 | 62,09 | 103,49 | 59,89 | 99,82 |
| | 62,47 | 104,12 | 59,60 | 99,33 |
| Média | 62,28 | 103,81 | 59,75 | 99,58 |

Não existe nenhuma monografia farmacopeica ou artigo científico que descreva a quantificação de enantiômeros de lumefantrina em comprimidos, dessa maneira, utilizou-se como referência as especificações propostas pela Farmacopeia Internacional, que apresenta a monografia dos comprimidos contendo a associação artemeter e lumefantrina. De acordo com a Farmacopeia Internacional, a especificação para a lumefantrina está compreendida entre 90% e 110% do valor rotulado. Dessa forma, os valores de doseamento encontrado para os enantiômeros empregando o método quiral satisfaz adequadamente essa especificação

farmacopeica, além de demonstrar, como dito anteriormente, a natureza racêmica da lumefantrina nos comprimidos.

O método quiral desenvolvido é o primeiro a separar e quantificar os enantiômeros de lumefantrina em comprimidos. O único trabalho encontrado na literatura sobre a separação desses enantiômeros é de Janßen (2005) que descreveu apenas a separação dos enantiômeros da lumefantrina em plasma. Entretanto, o método não foi validado nem aplicado para um estudo completo. Dessa forma, o único resultado possível e convergente com o método desenvolvido nesse trabalho de ser comparado é a separação quiral promovida nos dois trabalhos. A coluna quiral utilizado pelo trabalho de Janßen é um pouco diferente da Chiralpak AD-H utilizada no presente trabalho, pois foi utilizada uma Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, 5 µm). A diferença entre as duas colunas reside no comprimento e tamanho de partícula, mas ambas foram capazes de separar adequadamente os enantiômeros de lumefantrina.

Outros trabalhos que podem ser comparados com a separação quiral da lumefantrina são os desenvolvidos com uma molécula muito semelhante à lumefantrina, o fármaco halofantrina (**Figura 20**). A separação quiral da halofantrina é um pouco mais estudada que da lumefantrina e como os fármacos são semelhantes é possível fazer uma comparação entre eles. Dentre os trabalhos publicados para separação quiral da halofantrina temos CAMILLERI (1989) e GORICHON (1998); o primeiro demonstra somente a separação quiral dos enantiômeros da halofantrina numa coluna Pirkle (250 x 4,9 mm), já o segundo demonstra um método completo e validado de separação e quantificação da halofantrina e seu metabólito numa coluna Chiralpak AD (250 x 4,4 mm).

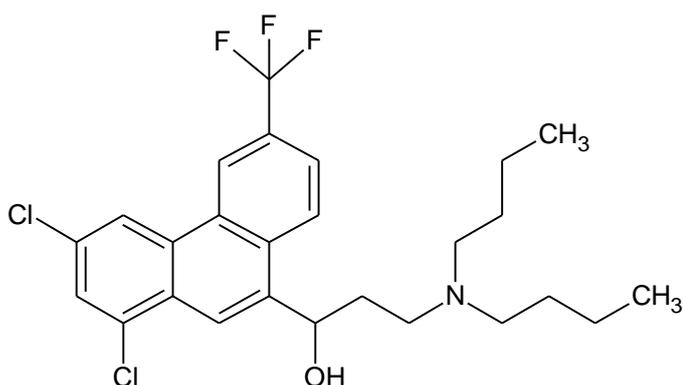


Figura 20 – Estrutura química da halofantrina.

É possível observar pelos trabalhos publicados que nenhum deles utilizou a coluna Chiralpak AD-H para separar os enantiômeros da lumefantrina ou seu metabólito. Além disso, nenhum método foi empregado para quantificação dos enantiômeros da lumefantrina em comprimidos e nem dos enantiômeros da halofantrina. Dessa maneira, o método desenvolvido nesse trabalho é pioneiro no estudo dos enantiômeros de lumefantrina, pois permite aplicá-lo na rotina de controle de qualidade dos comprimidos contendo esse fármaco, permitindo avaliar seu conteúdo racêmico nessa forma farmacêutica, além de poder servir como um estudo prévio para aplicação dessa separação quiral para avaliação dos enantiômeros também em matrizes complexas, como o plasma humano.

6 CONCLUSÃO

- A coluna quiral contendo 3,5-tris(dimetilfenilcarbamato) de amilose demonstrou ser um excelente seletor quiral, sendo capaz de separar os enantiômeros da lumefantrina com grande eficácia e rapidez. A coluna demonstrou ser de fácil aplicação no desenvolvimento analítico de métodos quirais, devendo se atentar apenas aos cuidados necessários para garantir sua durabilidade.
- A cromatografia em fase normal isocrática demonstrou ser um modo cromatográfico fácil de ser manejado, com poucos problemas de linha de base. O único inconveniente da aplicação desse modo cromatográfico foi sua pouca utilização na rotina laboratorial, sendo, portanto, necessário a lavagem dos equipamentos com grandes quantidades de hexano e isopropanol previamente, o que gerou bastante quantidade de resíduos.
- O método quiral por CLAE com detecção UV (335 nm) desenvolvido e validado se mostrou simples e adequado para quantificação dos enantiômeros de lumefantrina. O método quiral demonstrou ser seletivo, linear na faixa de 96 a 144 µg/mL, preciso (DPR < 1,3%), exato (recuperação próxima a 100%), podendo ser empregado para quantificação dos enantiômeros do fármaco e análise da qualidade dos comprimidos.
- Dos parâmetros de validação testados a robustez é o que deve ser monitorado, isso porque a separação quiral envolve uma questão muito delicada que é a separação de uma mesma substância com uma única característica que a distingue a isomeria óptica. Isso faz com que a resolução entre os enantiômeros seja muito pequena e, conseqüentemente, qualquer variação do método provoca uma variação muito grande do parâmetro de resolução.
- A análise dos lotes dos comprimidos, empregando o método quiral desenvolvido e validado, demonstraram que o medicamento apresentava mistura racêmica dos enantiômeros de lumefantrina, sendo obtidos valores médios de teor entre 94,00% a 103,81% para os enantiômeros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDON, N. P., PINTO, A. Y. N., SILVA, R. S. U., SOUZA, J. M., Avaliação da resposta aos esquemas de tratamento reduzidos para malária vivax, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 343-348, 2001.

ADDANTE-MOYA, L. G., AGULLÓ, C., QUINONES-REYES, G., MERCADER, J. V., ABAD-FUENTES, A., ABAD-SOMOVILLA, A., A unified approach to the synthesis of both enantiomers of anatoxin-a and homoanatoxin-a cyanotoxins. **Tetrahedron**, v. 74, n. 38, p. 5022-5031, 2018.

AHIRRAO, V. K., RANE, V. P., PATIL, K. R., PATIL, V. J., YEOLE, R. D., PATEL, M. V., Development and Validation of the Chiral Liquid Chromatography Method for Separation of Enantiomeric Impurity in Novel Oxazolidinone Antibacterial Agent WCK 4086. **Journal of Chromatographic Science**, p. 1-5, 2018.

ALLENMARK, S. G. Chromatographic enantioseparation: methods and applications. In: HORWOOD, E. (Ed.). Chichester, England, 1991. cap. 7, p.224.

ALI, I., SALEEM, K., HUSSAIN, I., GAITONDE, V. D., ABOUL-ENEIN, H. Y., Polysaccharides chiral stationary phases in liquid chromatography. **Separation & Purifications Reviews**, v. 38, p. 38-97, 2009.

AOAC. Association of official analytical chemists. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. Official methods of analysis of AOAC International. 21 ed . 2019.

ARIF, S. H. Sickle cell disease and malaria. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 23, n. 3, p. 70-72, 2007.

BABU, C. V. R., VUYYURU, C. R., REDDY, N. P., SURYANARAYANA, K. V., MUKKANTI, M. K., Estimation of Enantiomeric Impurity in Piperidin-3-Amine by Chiral HPLC With Precolumn Derivatization. **Chirality**, v. 26, n. 12, p. 775-779, 2014.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, v. 20, p. 647-656, 1997.

BARTH, T., CONTI, R., PUPO, M. T., OKANO, L. T., BONATO, P. S., CHIRAL HPLC analysis of donepezil, 5-O-desmethyl donepezil and 6-O-desmethyl donepezil in culture medium: application to fungal biotransformation studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 1, p. 257-266, 2012.

BASCO, L. K.; BICKII, J.; RINGWALD, P. In Vitro Activity of Lumefantrine (Benflumetol) against Clinical Isolates of em Plasmodium falciparum em in Yaoundé, Cameroon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 9, p. 2347-2351, 1998.

BASCO, L. K., GILLOTIN, C., GIMENEZ, F., FARINOTTI, R., & LE BRAS, J. IN vitro activity of the enantiomers of mefloquine, halofantrine and enpiroline against Plasmodium falciparum. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 517-520, 1992.

BEESELEY, T. E.; SCOTT, R. P. W. Chiral Chromatography. Chichester, England: Wiley, 1998. 497

BELAZ, K. R. A. Quantificação de metabolitos do albendazol em plasma bovino por cromatografia líquida quiral de alta eficiencia, com injeção direta de amostras. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Química, Universidade de São Carlos, São Paulo, p.148, 2007.

BEZHITASHVILI, L., BARDAVELIDZE, A., ORDJONIKIDZE, T., CHANKVETADZE, L., CHITY, M., FRAKAS, T., CHANVETADZE, B., Effect of pore-size optimization on the performance of polysaccharide-based superficially porous chiral stationary phases for the separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1482, p. 32-38, 2017.

BIAMONTE, M. A.; WANNER, J.; LE ROCH, K. G. Recent advances in malaria drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 10, p. 2829-2843, 2013.

BIELEJEWSKA, A., DUSZCZYK, K., KULIG, K., MALAWSKA, B., MIS'KIEWICZ, M., LES', A., ZUKOWSKI, J. Influence of the mobile phase composition on chiral recognition of some pyrrolidin-2-ones in the liquid chromatographic system with polysaccharide stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 52–57, 2007.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. D. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BOULOUS, M., DUTRA, A. P., DISANTI, S. M., SHIROMA, M., NETO, V. A., Avaliação clínica do quinino para o tratamento de malária por *Plasmodium falciparum*, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 211-213, 1997.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. Plasmodium - Malária. In: (Ed.). Parasitologia humana. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.143-161.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, *Programa Nacional de Prevenção da Malária*. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, *Guia para profissionais da saúde sobre prevenção da malária em viajantes*, Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária*, Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia prático de tratamento da malária no Brasil*. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

BRAY, P. G.; JANNEH, O.; RAYNES, K. J. Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in *Plasmodium falciparum*. **Journal of Cell Biology**, v. 145, p. 363-376, 1999.

BROCK, A. R., ROSS, J. V., PARIKH, S., ESTERMAN, A., The role of antimalarial quality in the emergence and transmission of resistance. **Medical Hypotheses**, v. 111, p. 49-54, 2018.

BROCKS, D.; MEHVAR, R. Stereoselectivity on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the chiral antimalarial drugs. **Clinical pharmacokinetics**, v. 42, n. 15, p. 1359-1382, 2003.

BROCKS, D. R.; TONI, J. W. Pharmacokinetics of halofantrine in the rat: stereoselectivity and interspecies comparisons. **Biopharmaceutical & Drug Disposition**, v. 20, n. 3, p. 165-9, 1999.

BROCKS, D. R.; WASAN, K. M. The influence of lipids on stereoselective pharmacokinetics of halofantrine: Important implications in food-effect studies involving drugs that bind to lipoproteins. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 91, n. 8, p. 1817-26, 2002.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. Estatística Básica. 9. São Paulo: Saraiva, 2017.

CAMILLERI, P., DYKE, C., HOSSNER, F., Chiral separation of the optical isomers of the antimalarial drug halofantrine. *Journal of Chromatography*, v. 477, p. 471-473, 1989.

CAREY, F. A.; GIULIANO, R. M. Organic Chemistry. 9 New York: Mc Graw Hill, 1232p., 2013.

CASS, Q. B., TIRITAN, M. E., BASSI, A. L., CALAFATTI, S. A., & DEGANI, A. L. G., Discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 49-57, 1997.

CASSIANO, N. M., LIMA V. V., OLIVEIRA, R. V., DE PIETRO A. C., CASS, Q. B., Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 7, p. 1462-1469, 2006.

CÉSAR, I. C.; ANDRADE, F. H. N.; PIANETTI, G. A. Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 951-954, 2008.

CÉSAR, I. C., Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano. Tese (Doutorado em Química). Faculdade da Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009.

CHANKVETADZE, B. Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers. **Journal of Chromatography A**, v. 1269, p. 26-51, 2012.

CHANKVETADZE, B., CHANKVETADZE, L., SIDAMONIDZE, S., KASASHIMA, E., YASHIMA, E., OKAMOTO, Y., 3-Fluoro-, 3-chloro- and 3-bromo-5-methylphenylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 787, n. 1, p. 67-77, 1997.

CHANKVETADZE, B., CHANKVETADZE, L., SIDAMONIDZE, S., KASASHIMA, E., YASHIMA, E., OKAMOTO, Y., High performance liquid chromatography enantioseparation of chiral pharmaceuticals using tris(chloro-methylphenylcarbamate) of cellulose. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 8, p. 1295-1303, 1996.

CHANKVETADZE, B.; YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chloromethylphenylcarbamate derivatives of cellulose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 670, n. 1, p. 39-49, 1994.

CHANKVETADZE, B.; YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Dimethyl-, dichloro- and chloromethylphenylcarbamates of amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 694, n. 1, p. 101-109, 1995.

CHHIBA-GOVINDJEE, V. P., MATHIBA, K., VAN DER WESTHUYZEN, C. W., STEENKAMP, P., RASHAMUSE, J. K., STOYCHEV, S., BODE, M. L., BRADY, D., DIMETHYLFORMAMIDE is a novel nitrilase inducer in *Rhodococcus rhodochrous*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018.

COLUSSI, D; PARISOT, C; LEGAY, F; LEFÉVRE, G. Binding of artemether and lumefantrine to plasma proteins and erythrocytes. *European journal of Pharmaceutical science*, v. 9, n.1, p. 9-16, 1999.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 5, 2010.

CUI, L.; SU, X.-Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 8, p. 999, 2009.

DAI, Z.; PITTMAN, C. U.; LI, T. Enantiomeric Recognition of Racemic 4-Aryl-1,4-dihydropyridine Derivatives via Chiralpak AD-H Stationary Phases. **Chirality**, v. 24, n. 10, p. 854-859, 2012.

DAJEK, M.; KOWALCZYK, R.; BORATYŃSKI, P. J. trans-1,2-Diaminocyclohexane-based sulfonamides as effective hydrogen-bonding organocatalysts for asymmetric Michael–hemiacetalization reaction. **Catalysis Science & Technology**, v. 8, n. 17, p. 4358-4363, 2018.

DAVANKOV, V. A. Chiral selectors with chelating properties in liquid chromatography: Fundamental reflections and selective review of recent developments. **Journal of Chromatography A**, v. 666, n. 1, p. 55-76, 1994.

DIAGANA, T. T. Supporting malaria elimination with 21st century antimalarial agent drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 10, p. 1265-1270, 2015.

DIMITRI, N. R&D investments for neglected diseases can be sensitive to the economic goal of pharmaceutical companies. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 15, p. 818-823, 2012.

DOSSOU, K. S. S. FARCAS, E., SERVAIS, A. C., CHIAP, P., CHANKVETADZE, B., CROMMEN, J., FILLET, M., Optimization of the liquid chromatography enantioseparation of chiral acidic compounds using cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) as chiral selector and polar organic mobile phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1234, p. 56-63, 2012.

DOUŠA, M., LEHNERT, P., ADAMUSOVA, H., BOSAKOVA, Z., Fundamental study of enantioselective HPLC separation of tapentadol enantiomers using cellulose-based chiral stationary phase in normal phase mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 74, p. 111-116, 2013.

DRUG BANK. Disponível em: < <https://www.drugbank.ca/metabolites/DBMET00438> >
Acesso em: 27 de setembro de 2018.

ECHA, European Chemicals Agency. Lumefantrine. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benflumetol#section=Top> >. Acesso em: 22 abr 2017.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. Stereochemistry of Organic Compounds. New York: John Wiley, 1994.

EMA. Mosquirix H-W-2300 plasmodium falciparum and hepatitis B vaccine (recombinant, adjuvanted). 2018. Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/document_listing/document_listing_000395.jsp&mid= >. Acesso em: 07 de setembro de 2018.

EZZET, F., VAN VUGT, M., NOSTEN, F., LOOAREESUWAN, S., WHITE, N. J., Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lumefantrine (Benflumetol) in Acute Falciparum Malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 697-704, 2000.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents, **Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, p. 55-87, 1998.

FOGAÇA, J. R. V. "O que são Enantiômeros na Isomeria?"; *Brasil Escola*. Disponível em <<https://brasilecola.uol.com.br/quimica/o-que-sao-enantiomeros-na-isomeria.htm>>. Acesso em 15 de dezembro de 2018.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G. D.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FUNASA. Ministério da Saúde. *Manual de terapêutica da malária*. Brasília, 2001.

GIROD, M., CHANKVETADZE, B., OKAMOTO, Y., BLASCHKE, G., Highly efficient enantioseparations in non-aqueous capillary electrochromatography Carbohydrate Chiral Stationary Phases using cellulose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) as chiral stationary phase. **Journal of Separation Sciences.**, v. 24, p. 27–34, 2001.

GORICHON, E., MARTIN, C., BANGCHANG, K., KARBWANG, J., TRUILLIER, A., FARINOTTI, R., GIMENEZ, F., Chiral chromatographic method to determine the enantiomers of halofantrine and its main chiral desbutyl metabolite in erythrocytes. *Journal of Chromatography B*, v. 712, p. 259-262, 1998.

GSK. Vacina candidata contra a malária da GSK, Mosquirix™ (RTS, S), recebe parecer positivo da agência regulatória Europeia para a prevenção da malária em crianças na África Subsaariana 2018. Disponível em: < <https://br.gsk.com/pt-br/sala-de-imprensa/press-releases/2015/vacina-candidata-contra-a-mal%C3%A1ria-da-gsk-mosquirix-rtss-recebe-parecer-positivo-da-ag%C3%Aancia-regulat%C3%B3ria-europeia-para-a-preven%C3%A7%C3%A3o-da-mal%C3%A1ria-em-crian%C3%A7as-na-%C3%A1frica-subsaariana/> >. Acesso em: 07 de setembro de 2018.

HABRAKEN, C. L. Stereochemistry of Organic Compounds E.L. Eliel and S.H. Wilen John Wiley, Chichester, 1994 xv + 1267 pp, £57.00/\$80.00 (hardback) £29.95/\$52.50 (paperback) ISBN 0-471-05446-1. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, v. 114, n. 8, p. 379-379, 1995.

HAQUE, A.; ENGWERDA, CHRISTIAN R. An Antioxidant Link between Sickle Cell Disease and Severe Malaria. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 335-336, 2011.

HEGADE, R. S.; DE BEER, M.; LYNEN, F. Chiral stationary phase optimized selectivity liquid chromatography: A strategy for the separation of chiral isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 1515, p. 109-117, 2017.

HESSE, G.; HAGEL, R. Eine vollständige Recemattennung durch eluitionschromatographie a cellulose-tri-acetat. **Chromatographia**, v. 6, n. 6, p. 277-280, 1973.

HMDB. The Human Metabolome Database. Disponível em: < <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0061083> > Acesso em: 27 de setembro de 2018.

HORVÁTH, S.; NÉMETH, G. Hysteresis of retention and enantioselectivity on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases in mixtures of 2-propanol and methanol. **Journal of Chromatography A**, v. 1568, p. 149-159, 2018.

HUMBERSTONE, A. J.; PORTER, C. J.; CHARMAN, W. N. A physicochemical basis for the effect of food on the absolute oral bioavailability of halofantrine. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 85, n. 5, p. 525-9, May 1996.

ICHIDA, A. ICHIDA, A., SHIBATA, T., OKAMOTO, I. Resolution of enantiomers by HPLC on cellulose derivatives. **Chromatographia**, v. 19, n. 1, p. 280-284, 1984.

IKAI, T.; OKAMOTO, Y. Structure Control of Polysaccharide Derivatives for Efficient Separation of Enantiomers by Chromatography. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 11, p. 6077-6101, 2009.

IKAI, T., YAMAMOTO, C, KAMIGAITO, M, OKAMOTO, Y., by HPLC using phenylcarbonate, benzoylformate, p-toluenesulfonylcarbamate, and benzoylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phases. **Chirality**, v. 17, n. 6, p. 299-304, 2005.

IKAI, T., YAMAMOTO, C., OKAMOTO, Y., Immobilized Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases for HPLC. **Polymer Journal**, v. 38, p. 91, 2006.

ISHIKAWA, A.; SHFFIATA, T. Cellulosic Chiral Stationary Phase Under Reversed-Phase Condition. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 16, n. 4, p. 859-878, 1993.

JANßEN, N. Bioanalytik von Arzneistoffen: Bewertung neuer Fluoreszenzdetektoren und Untersuchungen zum Metabolismus von Lumefantrin. Dissertation (Phd). Fachbereich Chemie und Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, p. 190, 2005.

JEMAL, M. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 14, n. 6, p. 422-429, 2000.

JOSHI, N., DHAMARLAPATI, B., PILLAI, A., PAULOSE, J., TAN, J., BLUE, L. E., TEDROW, J., FARRELL, B., SEPARATION and quantitation of eight isomers in a molecule with three stereogenic centers by normal phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1538, p. 108-111, 2018/02/23/ 2018.

KARBWANG, J.; NA BANGCHANG, K. Clinical pharmacokinetics of lumefantrine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 27, n. 2, p. 104-19, 1994.

KIBBE, A. H. Handbook of pharmaceutical excipients. 3. London: 2000.

KOTAKE, M., SAKAN, T., NAKAMURA, N., SENOH, S., Resolution into optical isomers of some amino acids by paper chromatography. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 6, p. 2973-2974, 1951.

LANDONI, M.; SORACI, A. Pharmacology of chiral compounds 2-arylpropionic acid derivatives. **Current Drug Metabolism**, v. 2, n. 1, p. 37-51, 2001.

LAYTON, S. E. Comparison of various chiral stationary phases for the chromatographic separation of chiral pharmaceuticals. Master of Science degree. North Carolina, p.99. 2005

LEEB, A. WERNSDORFER, G., SATIMAI, W., WIEDERMANN, U., CONGPUONG, K., WERNSDORFER, W. H., Pharmacodynamic interaction between lumefantrine and desbutyl-benflumetol in *Plasmodium falciparum* in vitro. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 122, n. 3, p. 61-65, 2010.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 657-663, 1997.

LISOWSKA-KUŹMICZ, M., Lisowska-Kuźmich, M., Kantor-Boruta, M., Jończyk, A., Jarończyk, M., Ocios-Bębenek, A., P. Mazurek, A., Chilmonczyk, A., Jaros, M., New validated HPLC methodology for the determination of (-)trans-paroxetine and its enantiomer in pharmaceutical formulations with use of ovomucoid chiral stationary phase. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 15, p. 3697-3702, 2014.

LIU, W. Q., FANG-FANG, L., JIE, Z., LI, S., YAN, L., XIAO-GUANG, C.,_CHIRAL resolution, absolute configuration determination, and stereo-activity relationship study of IDO1 inhibitor NLG919. **Tetrahedron**, v. 74, n. 24, p. 3045-3051, 2018.

LIU, Y. , MENGYA & CUIWEI, ZHANG & BAI, YULI & SONG, HONGLIAN & ZHANG, YIWEN & WANG, XIN. Determination of Repertaxin Enantiomeric Purity by HPLC on Chiral Stationary Phase. **Chromatographia**, v. 78, n. 23, p. 1485-1489, 2015.

LOIOLA, C. C. P.; SILVA, C. J. M.; TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 235-244, 2002.

LOURENÇO, T. D. C.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.

LÜTTRINGHAUS, A.; HESS, U.; ROSENBAUM HEINZ, J. I. Mitt.: Optisch aktives 4.5.6.7-Dibenzo-1.2-dithiacyclooctadien. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 22, n. 12, p. 1296, 1967.

MA, X. CAO, N., ZHANG, C., GUO, X., ZHAO, M., TU, P., JIANG, Y. Cytotoxic carbazole alkaloid derivatives from the leaves and stems of *Murraya microphylla*. **Fitoterapia**, v. 127, p. 334-340, 2018.

MADESCLAIRE, M. Stéréoisométrie. Généralités et incidences en chimie thérapeutique. Paris: Ellipses, 1987.

MAHMUD, R., LIM, Y. A. L., AMIR, A. Medical Parasitology. Springer International Publishing, 191p. 2017.

MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 906, n. 1, p. 3-33, 2001.

MAYER, W.; MERGER, F. Über Kondensationsreaktionen der Catechine, II. Die Reaktion der Catechine mit Phloroglucin. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 644, n. 1, p. 70-78, 1961.

MCMURRY, J. Química Orgânica. 6 ed. Cengage Learning, 2005.

MEHLHORN, H. Human Parasites. 1 ed. Springer International Publishing, 461 p., 2016.

MEYRING, M., CHANKVETADZE, B., BLASCHKE, G., Simultaneous separation and enantioseparation of thalidomide and its hydroxylated metabolites using high-performance liquid chromatography in common-size columns, capillary liquid chromatography and nonaqueous capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 876, p. 157–167, 2000.

MILTON, K. A., EDWARDS, G., WARD, S. A., ORME, M. L., BRECKENRIDGE, A. M., Pharmacokinetics of halofantrine in man: effects of food and dose size. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 71-7, 1989.

MITRA, S.; CHOPRA, P. Chirality and anaesthetic drugs: A review and an update. **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 55, n. 6, p. 556, 2011.

MORANTE, S., DEL HIERRO, I., SIERRA, I., FARJARDO, M., Chiral separation of glycidol enantiomers by normal-phase high-performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, n. 2, p. 185-192, 2006.

NATAL, S. Emergência da resistência às drogas. Rio de Janeiro. 2002

NEUMEYER, J. L. The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use Edited by Hassan Y. Aboul-Enein and Irving W. Wainer. John Wiley & Sons, New York. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 14, p. 2661-2662, 1998.

NOEDL, H., ALLMENDINGER, T., PRAJAKWONG, S., WERNSDORFER, G., WERNSDORFER, W.H., Desbutyl-Benflumetol, a Novel Antimalarial Compound: In Vitro Activity in Fresh Isolates of Plasmodium falciparum from Thailand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2106-2109, 2001.

NOVARTIS Pharmaceutical Ltd. The electronic Medicines Compendium: Riamet®, 2015. Disponível em <http://emc.medicines.org.uk/medicine/9196/SPC/Riamet+20+120mg+tablets>. Acessado em 21 de abril de 2017.

OGUNI, K.; ODA, H.; ICHIDA, A. Development of chiral stationary phases consisting of polysaccharide derivatives. **Journal of Chromatography A**, v. 694, n. 1, p. 91-100, 1995.

OKAMOTO, Y.; ABURATANI, R.; HATADA, K. Chromatographic chiral resolution: XIV. Cellulose tribenzoate derivatives as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 389, p. 95-102, 1987.

OKAMOTO, Y., ABURATANI, R., HATANO, K., HATADA, K., Optical Resolution of Racemic Drugs by Chiral HPLC on Cellulose and Amylose Tris(phenylcarbamate) Derivatives. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 11, n. 9-10, p. 2147-2163, 1988.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 666, n. 1, p. 403-419, 1994.

OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; HATADA, K. Chromatographic resolution. 7. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 18, p. 5357-5359, 1984.

OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; HATADA, K. Chromatographic resolution: XI. Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel. **Journal of Chromatography A**, v. 363, n. 2, p. 173-186, 1986.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharide Derivatives for Chromatographic Separation of Enantiomers. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 8, p. 1020-1043, 1998.

OLIVEIRA, A. R. M. D.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1971-1974, 2009.

PADILHA, J.; SALES, T. Malária: uma doença tão antiga quanto complicada. *Ciência para todos*, 2011.

PAN, F.-Y., LI, X.-F., LIU, G.-H., WANG, F., YONG-LONG LI, Y.-L., SHOU-WANTANG, S.-W., Preparation of Polysaccharide Derivatives-based Composite Chiral Stationary Phases and Their Chiral Recognition Abilities. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 7-11, 2011.

PATIL, S. D., KHANDEKAR, N., KASAWAR, G. B., SHAIKH, K. A., Enantiomeric separation of a melatonin agonist Ramelteon using amylose-based chiral stationary phase. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 103-109, 2013.

PENG, L., JAYAPALAN, S., CHANKVETADZE, B., FARKAS, T., Reversed-phase chiral HPLC and LC/MS analysis with tris(chloromethylphenylcarbamate) derivatives of cellulose and amylose as chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 44, p. 6942-55, 2010.

PEREIRA. J., CÂMARA, J.S., COLMSJO, A., ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent: an emerging, selective and high-throughput extraction technique in bioanalysis. **Biomedical Chromatography**. V. 28, n. 6, p. 839-47, 2014.

PIRKLE, W. H.; POCHAPSKY, T. C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatography separation of enantiomers. **Chemical Reviews**, v. 89, n. 2, p. 347-362, 1989.

QIAN, Z., XU, Y., ZHENG, L., ZHANG, J., HONG, Z., SHEN, X., Enantiospecific determination of arotinolol in rat plasma by LC–MS/MS: Application to a stereoselective pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 299-304, 2015.

RAO, R. N.; KUMAR, K. N.; KUMAR, B. S. Liquid chromatographic separation and thermodynamic investigation of stereoisomers of darunavir on Chiralpak AD-Hcolumn. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 20, p. 2671-2677, 2012

ROSENTHAL, P. J. Lessons from Sickle Cell Disease in the Treatment and Control of Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2549-2551, 2011.

SANTOS MAGALHAES, I. R.; BONATO, P. S. Enantioselective Analysis of Antimalarial Drugs and their Metabolites. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 1, p. 15-29, 2010.

SARNO, S., MANZO, A. M., FERRARIS, D. M., MIGGIANO, R., RIZZI, M., PALIN, L., BOCCALERI, E., MILANESIO, M., Absolute structure and structure-function relationships of 4R,2'R and 4S,2'S Pidotimod®. **Journal of Molecular Structure**, v. 1147, p. 810-814, 2017.

SCHNEIDER, H.-J. Binding Mechanisms in Supramolecular Complexes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 22, p. 3924-3977, 2009.

SCRIBA, G. K. E. Chiral recognition in separation science – an update. **Journal of Chromatography A**, v. 1467, p. 56-78, 2016.

SHACKLEFORD, D. M.; PORTER, C. J.; CHARMAN, W. N. Does stereoselective lymphatic absorption contribute to the enantioselective pharmacokinetics of halofantrine *in vivo*? **Biopharmaceutical & Drug Disposition**, v. 24, n. 4, p. 153-7, 2003.

SHARMA, S. Sir Ronald Ross and the malarial parasite. **Resonance**, v. 11, n. 7, p. 4-13, 2006.

SHEN, J.; IKAI, T.; OKAMOTO, Y. Synthesis and application of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1363, p. 51-61, 2014.

SHEN, J.; OKAMOTO, Y. Efficient Separation of Enantiomers Using Stereoregular Chiral Polymers. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 3, p. 1094-1138, 2016.

SILVA, R. D.; PAIVA, C. H. A. The Juscelino Kubitschek government and the Brazilian Malaria Control and Eradication Working Group: collaboration and conflicts in Brazilian

and international health agenda, 1958-1961. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 22, p. 95-114, 2015.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. **Organização Pan-Americana da Saúde**, p. 12-17, 2001.

SINHA, S., PARASHAR, V., REDDY, K. S., KHAN, M. A., HAQUE, S. K. M., Liquid chromatographic determinations of meta-chlorobenzoic acid in bupropion hydrochloride. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 435-439, July 1, 2013 2013.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC method development. 2. ed. New York: 1997.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. Organic Chemistry. 11 ed. Wiley, 2013.

SOUZA, Scheilla Vitorino Carvalho de et al. In-house validation of a multi-residue method for determining residual avermectin in cow's milk by hplc coupled with fluorescence detection. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n. 4, p. 823-836, Dec. 2007.

TAYLOR, D. R.; MAHER, K. Chiral Separations by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 30, n. 3, p. 67-85, 1992.

THOMPSON, R. A Practical Guide to HPLC Enantioseparations for Pharmaceutical Compounds. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 7/8, p. 1215-1231, 2005.

TROUILLER, P., OLLIARO, P., TORREELE, E., ORBINSKI, J., LAING, R., FORD, N., Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188-2194, 2002.

TUTEJA, R. Malaria—an overview. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 2007.

VOGT, U.; ZUGENMAIER, P. Structural Models for Some Liquid Crystalline Cellulose Derivatives. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 89, n. 11, p. 1217-1224, 1985.

WAN, L., SUN, X., WANG, X., LI, Y., YU, Q., GUO, C., A Stereospecific HPLC Method and Its Application in Determination of Pharmacokinetics Profile of Two Enantiomers of Naringenin in Rats. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, n. 4, p. 316-320, 2011.

WARD, A. Big Pharma hunts for malaria drugs to fight mosquito resistance. 2016. Disponível em: < <https://www.ft.com/content/bd3220e4-f835-11e5-96db-fc683b5e52db> >. Acesso em: 07 de setembro de 2018.

WEBSTER, R. V., CRAIG, J. C., SHYAMALA, V., KIRBY, G. C., WARHURST, D. C., Antimalarial activity of optical isomers of quinacrine dihydrochloride against chloroquine-sensitive and resistant plasmodium falciparum in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. S225-S227, 1991.

WERNSDORFER, W. H., LANDGRAF, B., KILIMALI, V. A., WENSDORFER, G., Activity of benflumetol and its enantiomers in fresh isolates of Plasmodium falciparum from East Africa. **Acta Tropica**, v. 70, n. 1, p. 9-15, 1998.

WHITE, N. J. Antimalarial pharmacokinetics and treatment regimens. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 1992.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 8, p. 1084-1092, 2004.

WHITE, N. J.; FARKAD, E.; VUGT, V. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. **Clinical Medicine**, v. 37, n. 2, p. 105-125, 1999.

WHO, World Health Organization. *Guidelines for the Treatment of Malaria*, 3^a ed., WHO, Geneva, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>>. Acesso em: 14 de abril de 2017

WHO. World Malaria Report. p.196. 2017. Disponível em < <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf;jsessionid=AD55761CFD00F287B5338328F7DB39AC?sequence=1>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2019.

WHO. World Health Organization. U2020 Initiative of update on the e-2020 initiative of 21 malaria-eliminating countries. 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/e-2020-progress-report/en/>>. Acesso em: 07 de setembro de 2018.

WILLSTÄTTER, R. Ueber einen Versuch zur Theorie des Färbens. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 37, n. 3, p. 3758-3760, 1904.

XIE, J., ZHAO, L., LIU, K., GUO, F., CHEN, Z., LIU, W., Enantiomeric characterization of herbicide lactofen: Enantioseparation, absolute configuration assignment and enantioselective activity and toxicity. **Chemosphere**, v. 193, p. 351-357, 2018.

XU, H.; SHA, F.; WU, X.-Y. Highly enantioselective allylic alkylation of 5H-oxazol-4-ones with Morita-Baylis-Hillman carbonates. **Tetrahedron**, v. 74, n. 32, p. 4331-4338, 2018.

YANG, L.-M., XIE, Y. F., GU, Z. H., WANG, A. L., CHEN, H. Z., LU, Y., Development and validation of a reversed-phase HPLC method for determination of lesatropane and enantiomeric impurity. **Chirality**, v. 23, n. 8, p. 581-584, 2011.

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 906, n. 1, p. 105-125, 2001.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral recognition mechanism of polysaccharide chiral stationary phase n the impact of stereochemistry on drugs development and use. New York: Jonh Wiley & Sons, 1997.

YASHIMA, E.; YAMAMOTO, C.; OKAMOTO, Y. NMR Studies of Chiral Discrimination Relevant to the Liquid Chromatographic Enantioseparation by a Cellulose Phenylcarbamate Derivative. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 17, p. 4036-4048, 1996.

ZENG, M., LU, Z., YANG, S. LIAO, J., LIU, S., TENG, X., Determination of benflumetol in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 681, p. 299-306, 1996.

ZENG, Q., WEN, Q., XIANG, Y., ZHANG, L., Chromatographic enantioseparation of chiral sulfinamide derivatives on polysaccharide-based chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1571, p. 240-244, 2018.

ZHANG, T.; FRANCO, P.; SUBRAMANIAN, G. Analytical and preparative potencial immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases. 3. ed. 2007.

ZHANG, T., LIAO, M., TIAN, Y., WANG, F., YE, T., ZHANG, Y., ZHANG, X., CHEN, Y., HPLC Determination of Enantiomeric Purity of Letemovir Based on CHIRALPAK AD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 9, p. 1495-1500, 2016.

ZHANG, X., GAO, L., ZHANG, Z., TIAN, Y., Separation and determination of acetylglutamine enantiomers by HPLC–MS and its application in pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 5, p. 303-308, 2017.

ZHAO, J.-B., REN, X., ZHENG, B., JI, J., QIU, Z., LI, Y., Cinchona-alkaloid-catalyzed enantioselective hydroxymethylation of 3-fluorooxindoles with paraformaldehyde. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 215, p. 44-51, 2018.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LUMEFANTRINA E DESBUTIL- LUMEFANTRINA EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO EM SORVENTE EMPACOTADO E CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA

1 INTRODUÇÃO

Os estudos em matrizes complexas como plasma, sangue e fluidos biológicos trilharam um longo caminho na história das ciências da saúde e sempre contribuíram para melhorar a qualidade dos tratamentos e diagnósticos feitos para os pacientes. O campo das análises clínicas e toxicológicas cresceu muito ao longo dos últimos anos, graças ao desenvolvimento de novas tecnologias analíticas que permitiram a realização de avaliações mais precisas e exatas e a quantificação de substâncias muitas vezes na concentração de traços.

A química analítica juntamente com as análises clínicas vem desenvolvendo técnicas cada vez mais modernas, rápidas, eficientes e com custo mais baixo para quantificar substâncias em matrizes complexas. Atualmente, as técnicas convencionais de preparo dessas amostras envolvem muitas vezes alto consumo de reagentes, tempo de preparo muito longo, ou volume de amostra muito grande. Dessa maneira, o desenvolvimento de técnicas que permitem diminuir esses fatores é muito relevante para o campo da saúde, uma vez que poderão reduzir os gastos com as análises laboratoriais em hospitais e serviços de saúde, além de contribuir sustentavelmente para o meio ambiente.

Outra questão importante no desenvolvimento de métodos bioanalíticos é a monitorização terapêutica de fármacos no sangue, que permite manejar o tratamento de uma forma mais adequada garantindo doses corretas para o paciente. Esse monitoramento permite compreender melhor a farmacocinética de cada fármaco e, no caso dos antimaláricos, por exemplo, a monitorização contribui para evitar doses subterapêuticas do fármaco no sangue, o que favorece a seleção de patógenos resistentes. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas rápidas e eficientes garante, ao mesmo tempo, segurança para os pacientes, e eficácia e redução de custos para o sistema de saúde e laboratórios analíticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ❖ Desenvolver e validar método bioanalítico para quantificação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma humano empregando microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida.

2.1 Objetivos específicos

- ❖ Otimizar a etapa de preparo de amostra por microextração em sorvente empacotado para extração de lumefantrina e desbutil-lumefantrina a partir de amostras de plasma humano, por meio da aplicação de planejamento fatorial;
- ❖ desenvolver e validar método bioanalítico empregando microextração em sorvente empacotado na etapa de preparo de amostra e CLAE-DAD nas etapas de separação e detecção, para quantificação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma humano;
- ❖ aplicar o método desenvolvido para análise de amostras de plasma de voluntários que receberam comprimidos de lumefantrina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos

A determinação de fármacos em amostras biológicas evoluiu ao longo do tempo e, atualmente, métodos rápidos e eficientes têm sido geralmente utilizados. Métodos bioanalíticos usualmente possuem três etapas: preparo de amostra, separação e detecção do analito (GONZALEZ *et al.*, 2014; MOEIN *et al.*, 2017).

Atualmente, a CLAE é a técnica de separação mais empregada e mais segura para quantificar fármacos em amostras biológicas. Entretanto, para a análise cromatográfica de fármacos presentes em matrizes biológicas (soro, plasma, urina), normalmente é necessário um pré-tratamento da amostra. Isso porque essas matrizes apresentam alto grau de complexidade, possuem substâncias incompatíveis com a fase estacionária da coluna cromatográfica, e na grande maioria dos casos, estão em baixa concentração, dificultando sua detecção (QUEIROZ *et al.*, 2001). Diversas técnicas têm sido aplicadas para realizar o preparo de amostras complexas como: precipitação de proteínas (NIELSEN E JOHANSEN, 2009; LIU *et al.*, 2013; TELVING *et al.*, 2016), extração líquido-líquido (KHALIL *et al.*, 2011; KHUDA ET AL., 2014; TAKITANE *et al.*, 2018), extração em fase sólida (SNOW, 2000; VUCKOVIC *et al.*, 2010; FONG *et al.*, 2011; NAMERA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018) e a microextração em sorvente empacotado (ADAM *et al.*, 2012; ARES *et al.*, 2017), que será discutida em maiores detalhes neste trabalho. Essas técnicas, atualmente, tem sido automatizadas na rotina para minimizar os erros de manipulação (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Nos métodos cromatográficos, o tipo e os parâmetros do detector afetam diretamente a resposta do analito de três maneiras relacionadas entre si: sensibilidade, seletividade e razão sinal-ruído. Dessa forma, para a quantificação de fármacos em matrizes biológicas, é necessária a utilização de detector que apresente alta sensibilidade, capaz de quantificar pequenas concentrações do fármaco, e alta seletividade, capaz de detectar apenas o analito de interesse mesmo na presença de interferentes. A seleção do detector mais adequado à análise é feita de acordo com as características do fármaco a ser quantificado, concentração do analito na amostra,

presença de interferentes, além de custo e disponibilidade dos detectores (SNYDER *et al.*, 1997).

Antes de iniciar o desenvolvimento do método bioanalíticos, existem alguns pontos que devem ser considerados, como a estrutura química do analito, valor de pka (no caso de fármacos que possuem grupos ionizáveis em sua estrutura), solubilidade, propriedades de estabilidade e adsorção (plástico ou vidro). A concentração do analito em bioanálises é um conceito dinâmico, sendo determinada pelos processos de absorção, biotransformação, distribuição, excreção, às vezes pela degradação química do analito, pela dose e pela forma de administração. Dessa forma, a concentração dependerá de como o fármaco é influenciado por esses fatores e poderá ser determinada por diferentes tipos de investigações como estudos farmacocinéticos, toxicológicos, de metabolismo e absorção. Para se obter um método eficiente e válido, é necessária uma faixa de concentração estável. Para estudos clínicos e não clínicos, a faixa de concentração dos analitos deve ser aproximadamente conhecida. Isso é importante para definir os limites inferior e superior da detecção e para estabelecer uma curva de calibração (BUICK *et al.*, 1990; MOEIN *et al.*, 2017).

3.1.1 Quantificação de lumefantrina em matrizes biológicas

Um expressivo número de trabalhos que relatam a quantificação da lumefantrina em amostras biológicas pode ser encontrado na literatura científica. Alguns trabalhos descrevem também a análise do metabólito desbutil-lumefantrina. Uma busca realizada para o período compreendido entre 2010 e 2018 encontrou 42 trabalhos relacionados aos analitos acima e alguns deles estão sumariamente descritos na **Tabela 22**. É interessante observar que o método de detecção mais aplicado é a espectrometria de massas, isso devido à sua maior sensibilidade e seletividade. Entretanto, isso não descarta a possibilidade de aplicação da detecção por espectrofotometria de absorção na região do UV. Apesar desta técnica apresentar menor poder de detecção, ela pode ser satisfatoriamente aplicada para analitos com uma maior concentração plasmática e elevada absorvidade na região do ultravioleta. Quanto ao preparo de amostras, a técnica mais aplicada é a precipitação de proteínas, uma técnica simples, mas que leva a amostras menos limpas. Na cromatografia, o tipo de coluna mais utilizada é a C18, devido à baixa polaridade da lumefantrina.

Tabela 22 – Métodos bioanalíticos para quantificação de lumefantrina em amostras biológicas publicados no período de 2010 a 2018.

| Matriz | Padrão interno | Preparo de amostra | Solvente ou sorvente | Condições cromatográficas | Deteção | LQ (ng/mL) | Recuperação (%) | Referência |
|--|--|--------------------|--|---|---|------------|---|-----------------------------------|
| Plasma humano | Halofantrina | MISPE | Acetonitrila Metanol TFA 0,05% | FE: C18 (100 x 4,6 mm, 5 µm) FM: MeOH: ACN: TFA 0,14% (50:33:17) | UV (305 nm) | 15 | 83,7-85,4 | DA SILVA, <i>et al.</i> , 2018 |
| Machas de sangue seca | Lumefantrina e desbutil-lumefantrina deuterada | LLE | Metanol Ácido fórmico 1% | FE: C18 (75 x 2,1 mm, 5 µm) FM: Tampão acetato de amônio 2 mM: ACN + 0,1% AF – eluição em gradiente | ESI-MS/MS <i>m/z</i> 530 - <i>m/z</i> 512) | 20 | 63,3-123,5 | GALLAY <i>et al.</i> , 2018 |
| Plasma de rato | Halofantrina | PPT | Acetonitrila | FE: C18 (50 x 4,6, 5 µm) FM: ACN: MeOH (50:50) e tampão formiato de amônio 10 mM, pH 4,5 (95:5) | ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 529 - <i>m/z</i> 511,3) | 3,9 | 94,6 – 109,6 | WAHAJUDDIN <i>et al.</i> , 2015 |
| Plasma humano | NC | PPT | Acetonitrila | FE: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: MeOH:acetato de amônio 0,025M, pH 3,8(48:52) | UV (216 nm) | 3000,0 | 94,3-97,2 | SANDHYA, SHUJI KUMAR, MEENA, 2015 |
| Sangue total de camundongo e plasma humano | Isótopo deuterado de LMF (D9-LMF) | PPT | Ácido fórmico 0,1% e acetonitrila (1:3, v/v) | FE: pentafluorofenil (50 x 2,0 mm, 5 µm) FM: ACN:ácido fórmico 0,1% (30:70, v/v) | ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 530,1 - <i>m/z</i> 347,8) | 15,6 | 83,6-106,5 (sangue total) 100.5-114.2 (plasma) | GOVENDER <i>et al.</i> , 2015 |
| Plasma humano | Isótopo deuterado de LMF (D9-LMF) | PPT | Metanol e dimetilsulfóxido 1:1 v/v | FE: C18 (20 x 2,1 mm; 1,9 µm) FM: ácido fórmico 0,5%:ácido fórmico 0,5% em MeOH – eluição em gradiente | ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 528,2 - <i>m/z</i> 510,2) | 21,0 | 19,6-44,2 | SILVA <i>et al.</i> , 2015 |
| Plasma humano | Meloxicam | PPT e LLE | Acetonitrila (PPT) Hexano:acetato de etila (75:25, v/v) (LLE) | FE: C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) FM: ACN:TFA 0,05% (70:30, v/v) | UV (335 nm) | 18,0 | 87,80–89,11 | KHUDA <i>et al.</i> , 2014 |
| Plasma humano | Halofantrina | PPT | Ácido acético 0,5% em acetonitrila | FE: C16 (150 x 4,6 mm, 3 µm) FM: TFA 0,01% em ACN:TFA 0,01% em acetato de amônio 0,1 M – eluição em gradiente. | UV (300 nm) | 125,0 | 101,0-103,0 | MAGANDA <i>et al.</i> , 2013 |
| Plasma humano | Isótopo deuterado de LMF (D9-LMF) | LLE | Ácido fórmico 5% e acetato de etila | FE: C8 (50 x 2,1 mm, 5 µm) FM: ácido fórmico 0,1% em ACN:formiato de amônio 10 | ESI-MS/MS (<i>m/z</i> 528 - <i>m/z</i> 510) | 50,0 | 81,0-84,3 | HUANG <i>et al.</i> , 2012 |

| Matriz | Padrão interno | Preparo de amostra | Solvente ou sorvente | Condições cromatográficas | Deteção | LQ (ng/mL) | Recuperação (%) | Referência |
|---------------|-------------------------------|--------------------|--|--|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------------|
| | | | | mM, pH 4,0 – eluição em gradiente | | | | |
| Plasma humano | Artesunato | PPT | Ácido acético glacial 0,5% em metanol | FE: ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm) FM: MeOH:acetato de amônio 10 mM com 0,2% de ácido acético e 0,1% de ácido fórmico – eluição em gradiente | ESI-MS/MS (m/z 530 - m/z 348) | 10,0 | 81,4-83,2 | CÉSAR <i>et al.</i> , 2011 |
| Plasma humano | Halofantrina | LLE | Hexano:acetato de etila (70:30, v/v) | FE: fenil (250 x 3,0 mm, 4 µm) FM: ACN:tampão acetato de amônio 0,1 M pH 4,9 (85:15, v/v) | UV (335 nm) | 12,5 | 88,0-102,0 | KHALIL <i>et al.</i> , 2011 |
| Plasma humano | Halofantrina | PPT e SPE | Acetonitrila (PPT) Copolímero de poli(divinil benzeno-co-N-vinilpirrolidona (SPE) | FE: C18 (100 x 2,1 mm, 5 µm) FM: ACN:ácido fórmico 0,1% – eluição em gradiente | ESI-MS/MS (m/z 530,2 - m/z 512,4) | 2,0 | 49,7-89,9 | SETHI, DUA, JAIN, 2011 |
| Sangue total | NC | PPT e SPE | Acetonitrila:Ácido acético 0,5 M (50:50, v/v) (PPT) C8 (SPE) | FE: C18 (150 x 2,0 mm, 5 µm) FM: ACN:formiato de amônio 20 mM com 1,0% de ácido fórmico (5:95, v/v) e ACN:formiato de amônio 10 mM com 1% de ácido fórmico (80:20, v/v) – eluição em gradiente. | ESI-MS | 200,0 (LD) | 20,0 | BLESSBORN <i>et al.</i> , 2010 |
| Plasma humano | Piperazina-bis-cloroquinolina | PPT | Ácido fórmico 0,5% em metanol | FE: C8 (50 x 4,6 mm, 5 µm) FM: ACN:tampão acetato de amônio 10 mM:ácido acético 0,05% (85:10:5, v/v/v) | ESI-MS/MS (m/z 528,2 - m/z 510,3) | 220,0 | 51,5-64,8 | MUNJAL <i>et al.</i> , 2010 |

AF: ácido fórmico; ESI: ionização por electrospray; FE: fase estacionária; FM: fase móvel; LD: limite de detecção; LLE: extração líquido-líquido; LQ: limite de quantificação; LMF: lumefantrina; PPT: precipitação de proteínas; MS/MS: espectrometria de massas sequencial; MISPE: extração em fase sólida molecularmente impressa NC: não consta; SPE: extração em fase sólida; UV: detector ultravioleta.

3.1.2 Microextração em sorvente empacotado como preparo de amostra

A microextração em sorvente empacotado (do inglês, *microextraction by packed sorbent* - MEPS) foi desenvolvida em 2003 e é uma miniaturização da extração em fase sólida convencional (ABDEL-REHIM, 2004; ABDEL-REHIM, 2010; ALVES *et al.*, 2013).

Esta técnica representa uma alternativa moderna, eficiente e de custo reduzido em relação às técnicas tradicionais, sendo aplicada para grandes ou pequenas quantidades de amostra. Geralmente, possibilita a redução da quantidade de reagentes, do volume das amostras, do tempo de análise e do número de etapas envolvidas no preparo de amostra. Além disso, o dispositivo utilizado não é descartável, sendo possível lavar e reutilizar o cartucho de 10 a 300 vezes, dependendo da matriz (EL-BEQQALI *et al.*, 2007; MOEIN, 2014). Com a técnica, é possível analisar compostos polares, apolares, neutros e iônicos. Isso é possível devido à ampla variedade de fases estacionárias disponíveis: fase normal (sílica), reversa (C2, C8, C18), de troca iônica (aniônica e catiônica) e modo misto (C18 associada a troca iônica) (BLOMBERG, 2009; ABDEL-REHIM, 2010).

O dispositivo utilizado na MEPS consiste de alguns miligramas (1-4 mg) de sorvente sólido empacotados em um cartucho, que é então acoplado em uma seringa (100-250 µL) facilmente manuseável (**Figura 21**). A técnica originalmente foi concebida para ser utilizada totalmente automatizada e acoplada aos cromatógrafos líquido e gasoso. Porém, na literatura estão disponíveis vários trabalhos empregando a técnica no modo manual *off-line* (ALTUN *et al.*, 2004; ALTUN E ABDEL-REHIM, 2008; SARACINO *et al.*, 2010; MANDRIOLI *et al.*, 2011; SARACINO *et al.*, 2011; SOMAINI *et al.*, 2011; RANI E MALIK, 2012; RANI *et al.*, 2012; SARACINO *et al.*, 2012; WIETECH-POSŁUSZNY *et al.*, 2012).



Figura 21 - Seringa e cartucho utilizados para microextração em sorvente empacotado.

O processo de extração do analito por MEPS ocorre conforme demonstrado na **Figura 22**. Alguns parâmetros são críticos para o desempenho da MEPS, como a composição e o volume das soluções de aspiração, lavagem e eluição da amostra, a velocidade de aspiração e ejeção, e as características da matriz da amostra (MOEIN *et al.*, 2015).

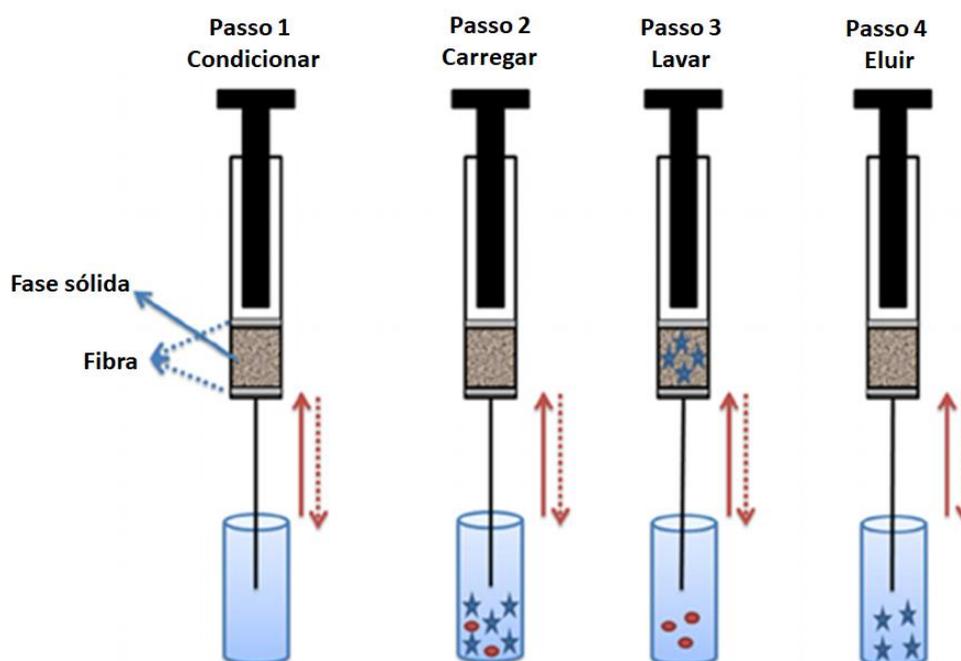


Figura 22 - Etapas para execução da microextração em fase sólida por sorvente empacotado.
Fonte: MOEIN *et al.*, 2015.

Os solventes e o fluxo podem afetar todas as etapas da MEPS e dependem do tipo de dispositivo utilizado para controlar a extração. Estes parâmetros devem ser controlados para modular a interação entre analito e o sorvente. Um fluxo menor usualmente melhora a interação entre o analito e o sorvente. Isso pode ser um problema no caso da extração no modo manual, pois o fluxo não é medido e a

repetibilidade é dependente do analista e susceptível a erros experimentais. Na primeira etapa do procedimento, o condicionamento, os volumes de solventes e os ciclos de aspirações devem ser otimizados para evitar efeito residual de extrações anteriores. Para o condicionamento, recomendam-se dois volumes totais da seringa, sendo um de solvente orgânico e outro de água para reequilíbrio. O volume da amostra deve ser otimizado para se obter um equilíbrio adequado entre um bom desempenho analítico e um bom método de extração. A seleção da melhor condição dependerá da natureza da matriz, da capacidade e da especificidade de retenção do sorvente. A etapa de lavagem, por sua vez, é normalmente realizada com o mesmo solvente utilizado para equilibrar o sorvente na etapa de condicionamento e deve ser otimizada para cada condição. Por fim, a dessorção do analito permite a liberação do analito ligado no sorvente em um solvente adequado. O volume de solvente utilizado deve ser o menor possível para que haja concentração do analito (MOEIN *et al.*, 2015; MOEIN *et al.*, 2017).

A matriz tem uma grande influência no desempenho da técnica. Amostras de plasma e urina devem ser diluídas em água (pelo menos 4 vezes); para o sangue total a diluição deve ser de 20 vezes. O efeito residual é bem descrito em bioanálises. As pequenas quantidades utilizadas em MEPS podem ser facilmente lavadas entre as injeções para reduzir o efeito residual. Com a automação da MEPS, as lavagens podem ocorrer enquanto a amostra anterior está sendo analisada. Em alguns estudos, o efeito residual foi reduzido para menos de 0,02% quando o sorvente foi lavado pelo menos 4 vezes com solução de eluição e solução de lavagem entre as extrações (ABDEL-REHIM, 2010).

A reutilização dos cartuchos pode ser feita seguramente, desde que sejam feitas lavagens apropriadas do sorvente. Tem sido descrito um efeito residual de menos de 0,1% com lavagens com metanol de 4 a 5 vezes (ALTUN E ABDEL-REHIM, 2008). Além disso, controlando-se alguns fatores como o tipo e o tamanho de partícula da fase sólida, e as soluções de lavagem e eluição, pode-se reduzir ou prevenir o efeito residual (ABDEL-REHIM, 2011; MOEIN *et al.*, 2015).

As vantagens da MEPS em relação às técnicas convencionais incluem a redução do uso de solventes e de sorvente, sendo, portanto, mais sustentável. Os cartuchos

podem ser reutilizados, reduzindo os custos da análise. Além disso, a MEPS pode ser considerada uma técnica rápida e simples. Como desvantagem pode-se citar a possibilidade de entupimento do sorvente empacotado. Também não é recomendada para volumes de amostra muito grandes, visto que normalmente o limite da técnica é 500 µL por cada aspiração. Por fim, outra limitação são os tipos de sorventes disponíveis comercialmente, que ainda não contemplam uma gama tão variada (ALTUN *et al.*, 2004; ABDEL-REHIM, 2011; MOEIN *et al.*, 2015).

3.2 Métodos quimiométricos para otimização de experimentos

Na pesquisa científica, conhecer quais são as variáveis que impactam no experimento e o grau de influência das mesmas é essencial para otimizar o experimento, reduzir tempo e custos. O método multivariado de análise consiste em estabelecer e executar o menor número de experimentos necessários para obter o máximo de informação dos dados coletados de maneira a analisar e/ou melhorar um produto ou processo. Com esse objetivo, todos os fatores importantes são alterados simultaneamente em um conjunto de experimentos pré-estabelecidos e os resultados são empregados para a construção de modelos matemáticos que descrevem o comportamento do experimento dentro do domínio experimental estudado. Para isso, são aplicados planejamentos fatoriais (GALDAMEZ, 2002; BARROS NETO *et al.*, 2010; BREITKREITZ E POPPI, 2014).

O planejamento fatorial é uma técnica muito aplicada quando se tem dois ou mais fatores independentes. Ele permite uma combinação de todos os fatores em vários níveis, obtendo-se assim a análise de um fator, sujeito a todas as combinações dos demais (STEWART, 1979; DEMING, 1987; MONTGOMERY, 2012). Planejamentos fatoriais são extremamente relevantes para medir os efeitos (ou influências) de uma ou mais variáveis na resposta de um evento. Normalmente, é realizado um planejamento fatorial com dois níveis, no máximo três. O emprego de mais níveis no planejamento aumenta de forma desnecessária o número de pontos experimentais, o que deve ser evitado quando se constrói um planejamento. A representação matemática de um planejamento fatorial em dois níveis é 2^k , onde 2 significa o número de níveis e k o número de fatores. No caso de três níveis, tem-se 3^k (STEWART, 1979; DEMING, 1987; MONTGOMERY, 2012).

O planejamento fatorial 2^k utiliza k fatores analisados em 2 níveis. No caso de se ter 3 variáveis, $2^3 = 8$, significando com isso que 8 experimentos devem ser executados. Esse tipo de planejamento é aplicável nos estágios iniciais de um processo experimental, quando ainda se tem uma ampla faixa de variáveis para se estudar e analisar. Esse procedimento fornece um menor número de experimentos com os quais os k fatores podem ser avaliados em um planejamento fatorial completo. Dessa maneira, esses planejamentos são amplamente aplicados em experimentos de varredura de fatores (STEWART, 1979; DEMING, 1987; CALADO E MONTGOMERY, 2003; MONTGOMERY, 2012).

Os planejamentos multivariados possuem as seguintes vantagens em relação ao método univariado: (a) as interações entre as variáveis podem ser conhecidas. No experimento univariado cada fator é avaliado individualmente, mantendo-se os outros constantes. A limitação com o modelo univariado é que um fator pode depender dos demais, ou seja, podem existir interações entre eles que afetam o resultado final. As interações apenas podem ser evidenciadas com o planejamento multivariado, nos quais a ordem dos experimentos não afeta a resposta, uma vez que todas as variáveis são avaliadas simultaneamente. (b) os modelos de regressão propostos a partir dos resultados obtidos de um planejamento fatorial possibilitam a construção de uma superfície capaz de descrever como o fator de interesse (resposta) varia em função da variação dos níveis dos fatores (superfície de resposta), permitindo prever o que acontece com a mesma dentro de todo o domínio experimental, não apenas nos pontos onde os experimentos foram realizados. Já os métodos univariados utilizam somente o último resultado obtido e não possuem a avaliação de interações necessária para a construção de uma superfície de resposta e, dessa forma, fornecem somente informações nos pontos onde os experimentos foram de fato realizados. (c) Os planejamentos fatoriais permitem ao pesquisador organizar seu trabalho de forma mais racional e objetiva e tratar todas as variáveis com igual importância, eliminando eventuais pré-julgamentos, os quais nem sempre são corretos (BEZERRA *et al.*, 2008; BREITKREITZ E POPPI, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras

- Lumefantrina SQR, United States Pharmacopoeia (Rockville, EUA), lote FOH108;
- lumefantrina insumo farmacêutico ativo - Dafra Pharma (Turnhout, Bélgica), lote 06032403;
- desbutil-lumefantrina SQR fornecida pela Worldwide Antimalarial Resistance Network, lote 20160530;
- diazepam SQR – Anhui Medipharm Co. Ltd. (Anhui, China), lote PMD/83;
- comprimidos de lumefantrina – Macleods Pharmaceutcals (Mumbai, Índia) – validade 07/2020.
- amostras de plasma branco, lipêmico, hemolisado e com lumefantrina coletados no Laboratório de Hematologia da UFMG, sob supervisão da Prof. Maria das Graças Carvalho.

4.1.2 Reagentes e vidrarias

- Solventes grau cromatográfico: acetonitrila JT Baker (Xalostoc, México), metanol Synth (Diadema, Brasil);
- solventes e reagente grau analítico: ácido acético glacial Synth (Diadema, Brasil), ácido trifluoroacético Tedia (Fairfield, EUA); ácido perclórico Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha);
- água destilada e água ultrapurificada em sistema Merck Millipore® modelo Direct Q3 (Billerica, EUA);
- pipetas e balões volumétricos calibrados;
- béqueres, kit de filtração, seringas, vials.

4.1.3 Equipamentos e materiais

- Aparelho de ultra-som BRANSONIC 220;
- Balança analítica Shimadzu com precisão de 0,01 mg;

- Balança analítica Satorius com precisão de 0,01 mg
- Centrífuga Datamed MR23;
- Coluna cromatográfica LiChrospher 100 CN (250 x 4,0 mm x 5 µm) – Merck
- Coluna cromatográfica Luna C18(2) (250 x 4,6 mm; 5 µm) – Phenomenex;
- Coluna cromatográfica Luna C18(2) (125 x 4,0 mm; 5 µm) – Phenomenex;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu LC 10ADvp, com bomba, forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) e software Class-VP 6.14;
- Filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm;
- Seringa, agulha e cartucho C18 para MEPS SGE Analytical Science (Ringwood, Australia);
- Micropipeta.

4.1.4 Amostras biológicas sem a presença do medicamento

As amostras de plasma foram coletadas no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob a responsabilidade da Dr. Maria das Graças Carvalho. Essa etapa das análises foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, conforme protocolo CAAE 54567716.4.0000.5149 (**ANEXO I**). As amostras foram coletadas em tubos heparinizados e identificadas por números para preservar o sigilo de cada voluntário. As amostras de plasma normal e hemolisado foram coletadas no período da manhã com voluntários sadios em jejum ou leve desjejum, determinado por uma alimentação pouco calórica e ausente de alimentos e bebidas ricos em xantinas, como café, chás e chocolate, essa condição foi estabelecida para se evitar possíveis interferentes nas análises. Já para as amostras de plasma lipêmicas, foram realizadas coletas após o horário de almoço. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi transferido para tubos Falcon de 15 mL, identificados e armazenados a -70 °C até o momento de sua utilização. Em uma das amostras foi induzido hemólise, por meio de ciclos de resfriamento e agitação em vórtex, para obtenção de amostras de plasma branco hemolisado. O sobrenadante obtido foi transferido para tubos Falcon de 15 mL, que foram armazenados a -70 °C. Os voluntários foram informados das condições da coleta e consentiram em participar do

estudo após leitura e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO II).

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma humano empregando MEPS como preparo de amostra

Foram testados neste trabalho diversos fármacos como padrão interno (PI), como halofantrina, mefloquina, quinina, piroxicam, imipramina, citalopram, amodiaquina, clonazepam e diazepam (**Figura 23**). A escolha dos fármacos teve o respaldo de aspectos químicos e estruturais, além da disponibilidade comercial e da utilização prévia em outros trabalhos presentes na literatura científica.

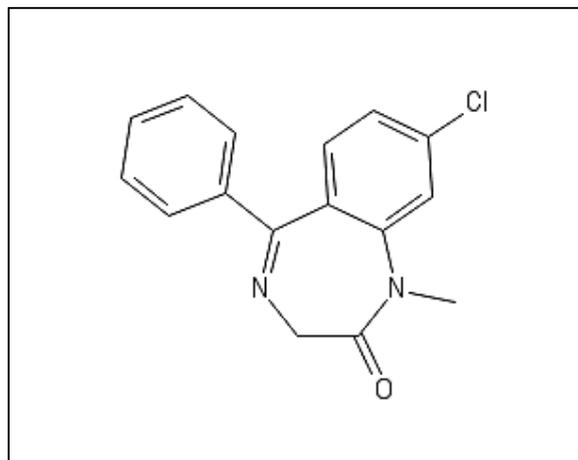


Figura 23 – Estrutura química do padrão interno diazepam utilizado para o desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma.

4.2.2 Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico para separação dos analitos

O início do desenvolvimento do método cromatográfico teve como base trabalhos prévios publicados pelo nosso grupo de pesquisa e outros trabalhos encontrados na literatura científica. O método foi empregado para a separação dos analitos tanto em fase aquosa, quanto em plasma humano (CÉSAR *et al.*, 2008; CÉSAR, 2009; CÉSAR

et al., 2011; KHALIL *et al.*, 2011; KHUDA *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2018; RIVELLI *et al.*, 2018).

Primeiramente, foi selecionado o melhor comprimento de onda para a detecção, visto que estão presentes três analitos (lumefantrina, desbutil-lumefantrina e o padrão interno) com características distintas. A escolha da fase estacionária foi realizada de acordo com a disponibilidade de colunas no laboratório e sua eficiência. Foram testadas três colunas: uma ciano (LiChrospher 100 CN – 250 x 4,0 mm, 5 µm) e duas C18 (Phenomenex Luna C18 – 125 x 4,0 mm x 5 µm e Phenomenex Luna C18 – 250 x 4,6 mm x 5 µm).

Por fim, procedeu-se à otimização da fase móvel. Considerou-se como condições iniciais para fase móvel uma mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% na proporção de 80:20 (v/v), de acordo com os métodos propostos por César (2011). Foi avaliado ainda a utilização de acetonitrila e tampão acetato de amônio 0,1 M nos valores de pH 3,0; 4,9 e 6,0, de acordo com o trabalho de Khalil (2011). O TFA foi testado nas concentrações de 0,05% e 0,1%, tomando-se o cuidado de avaliar o pH, para não afetar a fase estacionária da coluna.

4.2.3 Otimização dos parâmetros de extração dos analitos

Para a otimização dos parâmetros de extração, foi inicialmente construída uma curva de calibração de acordo com o método cromatográfico otimizado, para quantificar a recuperação dos analitos, na faixa de 100 a 5000 ng/mL. As concentrações utilizadas para a construção da curva, bem como as diluições feitas, estão demonstradas na **Tabela 23**. As soluções estoque foram preparadas da seguinte forma:

Solução estoque de lumefantrina (SEL1): aproximadamente 0,5 mg de lumefantrina SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Uma alíquota de 2 mL de metanol contendo 1,0% de ácido acético foi adicionada para solubilização e o volume do balão foi completado com fase móvel, para obter uma solução a 50 µg/mL.

Solução estoque de desbutil-lumefantrina (SED1): aproximadamente 0,5 mg de desbutil-lumefantrina SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Uma alíquota de 2 mL de metanol contendo 1,0% de ácido acético foi adicionada para solubilização e o volume do balão foi completado com fase móvel, para obter uma solução a 50 µg/mL.

Solução estoque de diazepam: aproximadamente 0,5 mg de diazepam SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Uma alíquota de 2 mL de metanol contendo 1,0% de ácido acético foi adicionada para solubilização e o volume do balão foi completado com fase móvel para obter uma solução a 50 µg/mL.

Tabela 23 – Procedimento de diluição da solução estoque dos analitos em estudo para construção da curva de calibração para avaliação inicial da linearidade do método.

| Concentração teórica (ng/mL) | Volume de solução estoque lumefantrina (µL) | Volume de solução estoque desbutil-lumefantrina (µL) | Volume de solução estoque diazepam (µL) | Volume final (mL) |
|------------------------------|---|--|---|-------------------|
| 100 | 200 | 200 | 100 | 10 |
| 200 | 400 | 400 | 100 | 10 |
| 300 | 600 | 600 | 100 | 10 |
| 500 | 1000 | 1000 | 100 | 10 |
| 1000 | 200 | 200 | 100 | 10 |
| 2000 | 400 | 400 | 100 | 10 |
| 3000 | 600 | 600 | 100 | 10 |
| 5000 | 1000 | 1000 | 100 | 10 |

Construídas as curvas, o próximo passo foi avaliar a extração dos analitos e otimizar o método de extração por MEPS. Em um primeiro momento, foram avaliados os tipos de solventes que seriam necessários para as etapas de lavagem e dessorção. Foram propostas as seguintes condições baseadas nas características dos analitos e em trabalhos prévios (Da Silva *et al.*, 2018):

- ✓ Condição 1: Lavagem: metanol: TFA 0,05% (10:90)
Dessorção: acetonitrila: TFA 0,05% (90:10)
- ✓ Condição 2: Lavagem: metanol: TFA 0,05% (10:90)
Dessorção: acetonitrila: TFA 0,05% (68:32)

A segunda condição foi proposta para avaliar se a proporção da fase móvel seria igualmente efetiva para a dessorção dos analitos e, dessa forma, interferiria menos na corrida analítica da amostra. Além disso, foram propostos nessa etapa os procedimentos de condicionamento e de recondicionamento do cartucho de extração. Para a etapa de condicionamento, foi determinado o seguinte procedimento: 250 µL de acetonitrila, seguida de 250 µL de água para o reequilíbrio do cartucho. Para o recondicionamento, foi utilizado o mesmo procedimento definido para o condicionamento, aplicado sempre após o procedimento de lavagem do cartucho em cada ciclo de extração do analito.

Definidos esses parâmetros, procedeu-se à otimização empregando planejamento experimental. Para isso, foram inicialmente testados os analitos em solução aquosa e nessa etapa de extração foi empregado planejamento fatorial fracionário (PFF) meia fração com dois níveis e três variáveis (PFF 2^{3-1}) e ponto central (**Tabela 24**). As variáveis avaliadas foram volume da amostra (X_1), volume da amostra aspirado (X_2) e número de ciclos de aspiração e ejeção (X_3). As faixas avaliadas foram: $X_1 = 100, 250$ e $400 \mu\text{L}$, $X_2 = 40, 70$ e $100 \mu\text{L}$ e $X_3 = 5, 10$ e 15 ciclos.

Tabela 24 – Experimentos do PFF 2^2 para otimização da extração por MEPS em meio aquoso.

| Experimentos | Variáveis hipotéticas | | | Variáveis reais | | |
|--------------|-----------------------|----|----|-----------------|-----|----|
| | X1 | X2 | X3 | X1 | X2 | X3 |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 400 | 100 | 15 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 250 | 70 | 10 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 250 | 70 | 10 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 400 | 40 | 5 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 100 | 100 | 5 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 250 | 70 | 10 |
| 1 | -1 | -1 | 1 | 100 | 40 | 15 |

*os valores de -1, 0 e 1 correspondem aos valores maiores, centrais e menores da faixa de análise proposta para o planejamento, respectivamente.

No total foram executados sete experimentos para avaliar a etapa de extração em solução, sendo quatro deles correspondentes ao planejamento fatorial em si, e três ao ponto central, conforme apresentado na **Tabela 12**. Os testes em solução aquosa foram realizados para aprender a correta utilização da seringa e do cartucho de MEPS, além de auxiliar na avaliação da extração do analito promovida pelo cartucho. Os

experimentos foram realizados aleatoriamente, conforme definido no Software *Statistica* 10.0.

Após a avaliação do procedimento de extração em solução, os procedimentos definidos foram aplicados para a extração do analito na matriz plasmática. Para a avaliação em plasma, foi empregado um planejamento fatorial completo com dois níveis e quatro variáveis (2^4) e ponto central (**Tabela 25**). As variáveis avaliadas foram volume da amostra (X_1), diluição da amostra (X_2), volume da amostra aspirado (X_3) e número de ciclos de aspiração e ejeção (X_4). As faixas avaliadas foram: $X_1 = 100, 250$ e $400 \mu\text{L}$, $X_2 = 1:1, 1:2$ e $1:3$, $X_3 = 40, 70$ e $100 \mu\text{L}$ e $X_4 = 5, 10$ e 15 ciclos.

Tabela 25 – Experimentos do PFF 2^3 para otimização da extração por MEPS em plasma.

| Experimentos | Variáveis hipotéticas | | | | Variáveis reais | | | |
|--------------|-----------------------|----|----|----|----------------------|-----|----------------------|----|
| | X1 | X2 | X3 | X4 | X1 (μL) | X2 | X3 (μL) | X4 |
| 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 400 | 1:3 | 40 | 15 |
| 2* | 0 | 0 | 0 | 0 | 250 | 1:2 | 70 | 10 |
| 3* | 0 | 0 | 0 | 0 | 250 | 1:2 | 70 | 10 |
| 4 | -1 | 1 | -1 | -1 | 100 | 1:1 | 40 | 5 |
| 5 | 1 | 1 | 1 | -1 | 400 | 1:1 | 100 | 5 |
| 6 | -1 | -1 | 1 | -1 | 100 | 1:3 | 100 | 5 |
| 7 | 1 | 1 | -1 | -1 | 400 | 1:1 | 40 | 5 |
| 8 | -1 | -1 | 1 | 1 | 100 | 1:3 | 100 | 15 |
| 9* | 0 | 0 | 0 | 0 | 250 | 1:2 | 70 | 10 |
| 10 | 1 | -1 | 1 | 1 | 400 | 1:3 | 100 | 15 |
| 11 | 1 | 1 | -1 | 1 | 400 | 1:1 | 40 | 15 |
| 12 | -1 | -1 | -1 | 1 | 100 | 1:1 | 40 | 15 |
| 13 | -1 | -1 | -1 | -1 | 100 | 1:1 | 40 | 5 |
| 14 | 1 | -1 | -1 | -1 | 400 | 1:3 | 40 | 5 |
| 15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 400 | 1:1 | 100 | 15 |
| 16 | -1 | 1 | 1 | 1 | 100 | 1:1 | 100 | 15 |
| 17 | -1 | 1 | -1 | 1 | 100 | 1:1 | 40 | 15 |
| 18 | -1 | 1 | 1 | -1 | 100 | 1:1 | 100 | 5 |
| 19 | 1 | -1 | 1 | -1 | 400 | 1:3 | 100 | 5 |

*pontos centrais.

Entretanto, ao iniciar os testes aplicando-se somente a diluição da amostra sem uma etapa prévia de precipitação de proteínas, observou-se que seria inviável realizá-la, visto que o cartucho na terceira amostra entupiu completamente. Dessa maneira, foi proposta uma etapa prévia de precipitação de proteína utilizando-se para isso ácido

perclórico 0,2% em acetonitrila, seguido de centrifugação para separar o precipitado do sobrenadante. Dessa maneira, a etapa de diluição de amostra proposta para o teste foi feita simultaneamente à precipitação, variando-se a proporção de agente precipitante adicionado.

Os testes foram realizados com amostras na concentração de 4 µg/mL de lumefantrina, desbutil-lumefantrina e diazepam. O preparo dessas amostras está esquematizado na **Figura 24**. A etapa de dessorção foi executada em alíquotas de 50 µL em 5 repetições, totalizando o volume final de 250 µL, que foi diretamente transferido para *vials*.

De posse dos resultados obtidos, foi proposto a troca do processo de lavagem para metanol e água. Além disso, foi avaliado se a lavagem com metanol e TFA 0,05% promoveria a dessorção dos analitos.

4.2.4 Validação do método bioanalítico para quantificação de lumefantrina em plasma humano empregando microextração em fase sólida em sorvente empacotado

O método bioanalítico desenvolvido para a quantificação de lumefantrina em plasma humano foi validado, avaliando-se os parâmetros seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade do analito em plasma e estabilidade dos analitos e do PI em solução, de acordo com as normas preconizadas na RDC nº. 27, de 17 de maio de 2012, da ANVISA (BRASIL, 2012) e Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Europeia de Medicamentos (EUROPEAN, 2011) e FDA (FOOD AND DRUG, 2001).

4.2.4.1 Seletividade

A seletividade foi determinada por meio da comparação de cromatogramas obtidos após 9 corridas analíticas conduzidas da seguinte maneira:

- ✓ 4 amostras de plasma normal de fontes distintas;
- ✓ 1 amostra de plasma lipêmico;

- ✓ 1 amostra de plasma hemolisado;
- ✓ 3 amostras no Limite Inferior de Quantificação (LIQ) dos analitos.

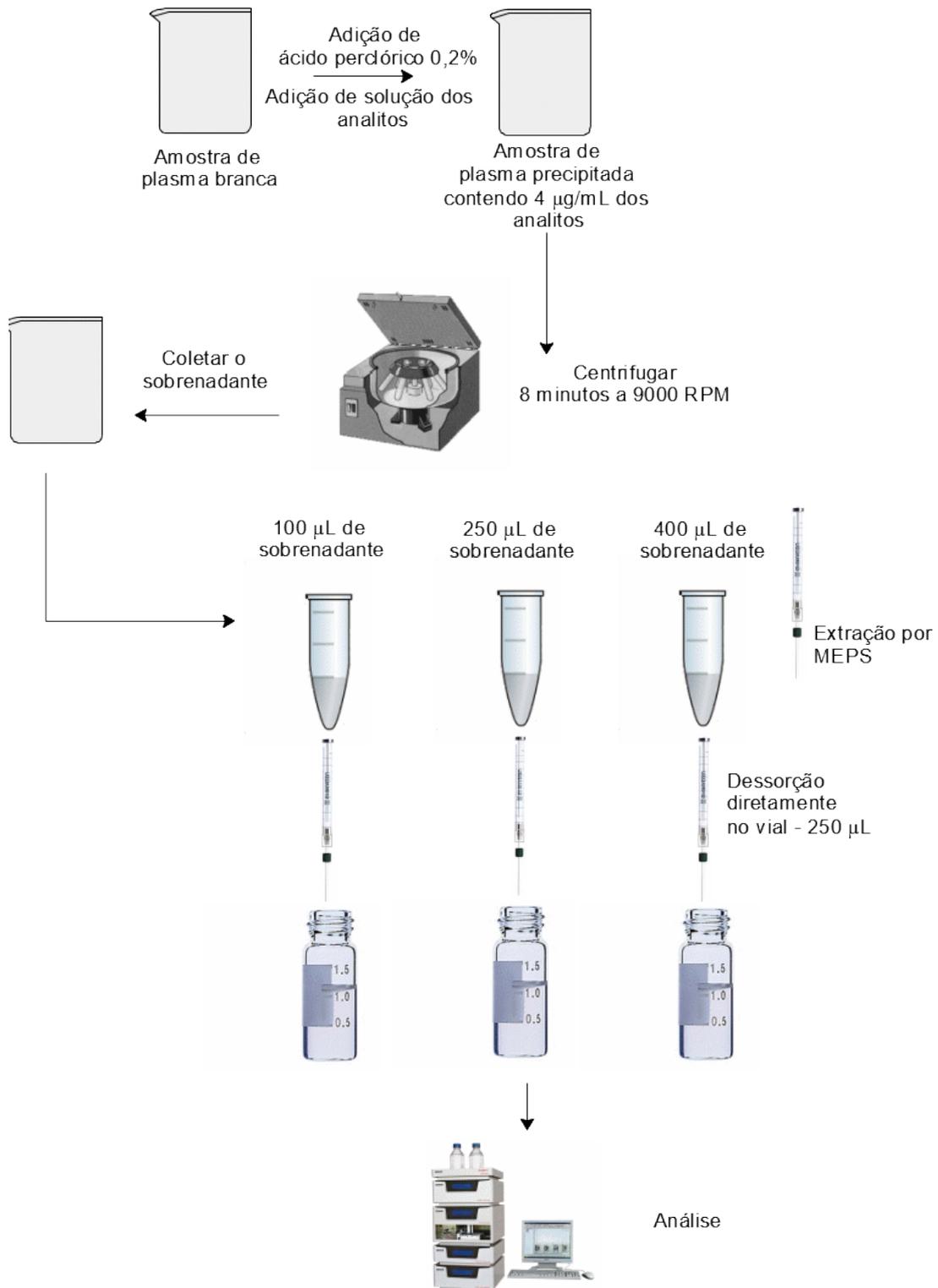


Figura 24 – Esquema de preparo de amostras para os testes determinados pelo planejamento fatorial para otimização da extração por MEPS.

De posse dos resultados, o cromatograma obtido a partir da amostra LIQ (50 ng/mL) foi sobreposto aos 6 cromatogramas das amostras branco, avaliando-se, por inspeção visual, a existência de picos interferentes na região do cromatograma que corresponde à integração dos picos de lumefantrina, desbutil-lumefantrina e PI. Em seguida, foram calculados os percentuais das áreas dos picos interferentes presentes nas amostras branco, nos tempos ou próximo aos tempos de retenção de lumefantrina, desbutil-lumefantrina e PI, em relação às áreas obtidas para a amostra LIQ. Os critérios de aceitação estabelecem que as respostas para os picos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta do analito e inferiores a 5% da resposta do PI na amostra LIQ (BRASIL, 2012).

A seletividade também foi avaliada frente a outros fármacos que podem eventualmente estar presentes em uma matriz de plasma. Dessa forma, cromatogramas obtidos de soluções de fármacos como amodiaquina, mefloquina, paracetamol, mebendazol e cafeína foram sobrepostos aos cromatogramas para amostras no LIQ, para avaliar uma possível interferência destes na análise da lumefantrina e da desbutil-lumefantrina. Foram preparadas soluções em fase móvel desses analitos, nas concentrações de 100 µg/mL. De posse dos cromatogramas, foi verificado por inspeção visual se os tempos de retenção desses fármacos coincidiam com os tempos de retenção da lumefantrina, desbutil-lumefantrina e PI.

4.2.4.2 Efeito residual

Para a avaliação do efeito residual, foram injetadas três amostras de plasma branco, sendo uma antes e duas depois de uma amostra na concentração do LSQ (5000 ng/mL).

O cromatograma obtido para a amostra LIQ, na seletividade, foi sobreposto aos cromatogramas obtidos para as amostras branco, antes e após a injeção de uma amostra LSQ. O efeito residual foi avaliado comparando-se as áreas dos picos nos cromatogramas para as amostras de plasma humano branco injetadas após a injeção da amostra LSQ com as áreas dos picos no cromatograma para a amostra LIQ. Em seguida, calcularam-se os percentuais das áreas dos picos interferentes nos cromatogramas da amostra branco, em relação às áreas dos picos dos analitos e do

PI para amostra LIQ. As respostas correspondentes aos picos interferentes devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos e inferiores a 5% da resposta do PI para a amostra LIQ (BRASIL, 2012; EMA, 2011, FOOD AND DRUG, 2013).

4.2.4.3 Efeito Matriz

O efeito matriz foi analisado utilizando amostras de plasma previamente processadas e adicionadas dos analitos e PI, nos níveis de controle de qualidade de baixa concentração (CQB – 150 ng/mL), de média concentração (CQM – 3000 ng/mL) e de alta concentração (CQA – 4000 ng/mL). Foram analisadas também amostras em solução nos mesmos níveis para comparar se havia ou não o efeito matriz. As amostras foram avaliadas conforme a seguinte sequência analítica:

- ✓ 3 amostras em solução nos níveis CQB, CQM e CQA.
- ✓ 3 amostras de plasma normal no nível CQB, adicionadas de analitos pós-extração;
- ✓ 3 amostras distintas de plasma normal no nível CQM, adicionadas de analitos pós-extração
- ✓ 3 amostras distintas de plasma normal no nível CQA, adicionadas de analitos pós-extração

Com os resultados obtidos foram calculados os fatores de matriz normalizado por PI (FMN), como descrito na equação:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução}}$$

O coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras foi determinado, sendo que a normatização estabelece que não há efeito matriz (ou que o efeito matriz é corrigido pelo padrão interno) se o CV calculado for inferior a 15,0% (BRASIL, 2012).

4.2.4.4 Recuperação

Esse parâmetro foi avaliado segundo o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (FDA, 2013), uma vez que esse parâmetro não é contemplado pela RDC nº 27/2012. Foram comparadas as respostas de amostras de plasma humano branco fortificadas de lumefantrina, desbutil-lumefantrina e PI com amostras desses analitos em solução, nos mesmos níveis, conforme a sequência abaixo:

- ✓ 5 injeções de amostra CQB em solução;
- ✓ 5 injeções de amostra CQM em solução;
- ✓ 5 injeções de amostra CQA em solução;
- ✓ 5 amostras de CQB em plasma branco;
- ✓ 5 amostras de CQM em plasma branco;
- ✓ 5 amostras de CQA em plasma branco;

Uma vez que o procedimento de preparo de amostras promove uma diluição de 1:2 na concentração inicial de analito e PI, na etapa de precipitação de proteínas, foi necessário o uso de fator de correção nos cálculos de recuperação, conforme a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{área do analito em matriz} \times 200}{\text{área do analito em solução}}$$

4.2.4.5 Linearidade

Para avaliação da linearidade, foram construídas 3 curvas de calibração, incluindo amostras branco (sem adição de analito e PI), amostras zero (amostras somente com adição de PI) e 9 amostras de diferentes concentrações de lumefantrina e desbutil-lumefantrina, na faixa de 50 a 5000 ng/mL de cada uma, adicionadas de diazepam em uma concentração fixa (5000 ng/mL). A faixa de 50 a 5000 ng/mL foi determinada baseando-se nas faixas adotadas em outros trabalhos e nos estudos farmacocinéticos para lumefantrina, como César (2009) e Ezzet *et al.* (2000).

Foram preparadas três replicatas independentes de cinco soluções estoque, duas de lumefantrina, duas de desbutil-lumefantrina e uma de diazepam. Essas soluções foram sucessivamente diluídas, em diferentes concentrações, na fase móvel, conforme **Tabela 26**. As soluções estoque foram preparadas conforme descrito a seguir:

Solução estoque de lumefantrina a 500 µg/mL (SEL1): pesaram-se exatamente 2,50 mg de lumefantrina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL. Adicionou-se 1 mL de uma solução de metanol com ácido acético 1% seguido por 2 mL de fase móvel submeteu-se ao ultrassom por 5 minutos, para completa solubilização. Completou-se o volume do balão com fase móvel e homogeneizou-se.

Solução estoque de lumefantrina a 50 µg/mL (SEL2): transferiram-se 500 µL da SEL1 para balão volumétrico de 5 mL, completou-se o volume com fase móvel e homogeneizou-se.

Solução estoque de desbutil-lumefantrina a 500 µg/mL (SED1): pesaram-se exatamente 2,50 mg de desbutil-lumefantrina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL. Adicionou-se 1 mL de uma solução de metanol com ácido acético 1% seguido por 2 mL de fase móvel submeteu-se ao ultrassom por 5 minutos, para completa solubilização. Completou-se o volume do balão com fase móvel e homogeneizou-se.

Solução estoque de desbutil-lumefantrina a 50 µg/mL (SED2): transferiram-se 500 µL da SED1 para balão volumétrico de 5 mL, completou-se o volume com fase móvel e homogeneizou-se.

Solução estoque de diazepam a 500 µg/mL (SEDZ): pesaram-se exatamente 2,50 mg de diazepam SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL. Adicionou-se 1 mL de uma solução de metanol com ácido acético 1% seguido por 2 mL de fase móvel submeteu-se ao ultrassom por 5 minutos, para completa solubilização. Completou-se o volume do balão com fase móvel e homogeneizou-se.

Tabela 26 – Procedimento de diluição das soluções estoque para avaliação do parâmetro de linearidade.

| Soluções | Concentração (ng/mL) | Volume de SEL (µL) | Volume de SED (µL) | Volume de SEDZ (µL) | Volume final (mL) |
|----------|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| S1 | 625 | 63 SEL2 | 63 SED2 | 250 | 5 |
| S2 | 1250 | 125 SEL2 | 125 SED2 | 250 | 5 |
| S3 | 3125 | 310 SEL2 | 310 SED2 | 250 | 5 |
| S4 | 6250 | 625 SEL2 | 625 SED2 | 250 | 5 |
| S5 | 12500 | 125 SEL1 | 125 SEL1 | 250 | 5 |
| S6 | 25000 | 250 SEL1 | 250 SEL1 | 250 | 5 |
| S7 | 37500 | 375 SEL1 | 375 SEL1 | 250 | 5 |
| S8 | 50000 | 500 SEL1 | 500 SEL1 | 250 | 5 |
| S9 | 62500 | 625 SEL1 | 625 SEL1 | 250 | 5 |

O preparo das soluções estoques de concentrações diferentes (**Tabela 26**) se justificou para que se adicionassem volumes iguais entre os diferentes níveis de concentração, garantindo que as características da matriz biológica se mantivessem similares. Em seguida, 20 µL das soluções S1 a S9 da **Tabela 20** foram transferidos para eppendorfs de 250 µL, e adicionados 80 µL de plasma branco em cada eppendorf, em duplicata, totalizando um volume final de 100 µL por amostra preparada. Considerando que a dessorção dos analitos foi realizada em 250 µL de solvente, as concentrações finais injetadas no cromatógrafo foram de 50 a 5000 ng/mL, conforme a **Tabela 27**:

Tabela 27 – Massa de cada analito nos eppendorfs de extração e a concentração teórica de cada *vial* após a dessorção do analito em 250 µL de fase móvel.

| Soluções da tabela 20 | Massa de cada analito em cada eppendorf (ng)* | Concentração teórica de cada analito no <i>vial</i> (ng/mL) |
|-----------------------|---|---|
| S1 | 12,5 | 50 |
| S2 | 25 | 100 |
| S3 | 62,5 | 250 |
| S4 | 125 | 500 |
| S5 | 250 | 1000 |
| S6 | 500 | 2000 |
| S7 | 750 | 3000 |
| S8 | 1000 | 4000 |
| S9 | 1250 | 5000 |

*a massa do PI em cada eppendorf foi de 500 ng. Os valores de massa são de lumefantrina e desbutil-lumefantrina separadamente.

A resposta avaliada para a construção das curvas analíticas foi a razão entre a área do pico para a lumefantrina ou desbutil-lumefantrina e a área do pico para o diazepam. No gráfico foram plotados a resposta *versus* a concentração de lumefantrina e desbutil-lumefantrina, sendo obtidas equações da reta para cada curva. As amostras brancas e as amostras zero não fizeram parte da construção da curva de calibração, entretanto foram empregadas na verificação da presença de picos interferentes (amostras branco) e na avaliação das respostas para o diazepam obtidas para as amostras zero, de maneira a se comparar se essas respostas se aproximavam das respostas para PI nos demais níveis de concentração.

Os pontos da curva que apresentaram desvio maior que 20% em relação à concentração nominal, para as amostras LIQ, e maior que 15% em relação à concentração nominal, para os outros pontos da curva, foram excluídos, não sendo utilizados para a determinação da equação da reta. Considerou-se aprovada uma curva quando pelo menos 75% dos pontos apresentaram desvios inferiores aos mencionados e pelo menos 6 níveis de concentração foram aprovados, incluindo as amostras LIQ e LSQ. A RDC nº 27/2012 preconiza que a variância dos resíduos seja constante no intervalo de quantificação contemplado pelo método, pois, caso contrário, deve-se utilizar fator de ponderação que propicie a menor soma dos desvios em relação às concentrações nominais.

4.2.4.6 Precisão e exatidão

Os parâmetros precisão e exatidão foram avaliados concomitantemente à determinação da linearidade. Dessa maneira, foram analisadas as três curvas de calibração simultaneamente às corridas para precisão e exatidão, sendo cada corrida em um dia diferente. Os ensaios foram realizados em cinco replicatas do LIQ e cinco replicatas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA e controle de qualidade de diluição (CQD).

O CQB foi definido como 150 ng/mL, concentração três vezes maior do que a concentração das amostras LIQ, enquanto o CQM foi estabelecido como 2000 ng/mL, aproximadamente a média entre LIQ e LSQ, e o CQA como 4000 ng/mL, concentração que representa aproximadamente 75% da concentração do LSQ. Por fim, o CQD foi

estipulado como 8000 ng/mL, concentração superior ao LSQ, de modo que um procedimento de diluição de 1:1 em plasma branco produz concentração similar ao CQA. O preparo desses controles de qualidade foi realizado como descrito para o preparo das soluções da curva de calibração, por meio de diluições de soluções estoques de lumefantrina, desbutil-lumefantrina e diazepam em plasma (**Tabelas 20 e 21**).

A avaliação da precisão se deu pela determinação do DPR entre os resultados, para cada nível de concentração, definindo-se como limites valores de DPR de no máximo 15% para os controles de qualidade e de no máximo 20% para o LIQ. Já para avaliação da exatidão, foram estimados erros padrão relativos (EPR), comparando-se a concentração experimental determinada, para cada nível, com o respectivo valor nominal, segundo a equação:

$$EPR (\%) = \frac{CMD - C_{nominal}}{C_{nominal}} \times 100$$

Em que CMD = concentração média determinada e $C_{nominal}$ = concentração nominal.

Não se admitem EPR fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, com exceção de amostras LIQ, para as quais não se admitem EPR fora da faixa de $\pm 20\%$, de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2012).

4.2.4.7 Estabilidade dos analitos em plasma

O estudo de estabilidade dos analitos em plasma foi avaliado em triplicata, nas concentrações de controle de qualidade baixa (CQB) e alta (CQA). Os ensaios foram conduzidos de forma que simulassem as condições reais de armazenamento, preparo e análise das amostras. As faixas de tempo de cada estudo foram propostas em função do tempo em que as amostras dos voluntários poderiam estar expostas a diferentes condições de temperatura e em função da rotina de funcionamento dos equipamentos no laboratório.

Para avaliação da estabilidade de curta duração (ECD), as amostras permaneceram em temperatura ambiente (23 ± 2 °C), em bancada, por 8 horas, tempo superior ao que as amostras de voluntários foram mantidas durante o preparo. Para a avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECC), as amostras foram inicialmente congeladas a -80 °C por 24 horas. Em seguida, procedeu-se ao descongelamento das amostras, a temperatura ambiente, por aproximadamente 2 horas, sendo novamente congeladas por mais 24 horas. O procedimento se repetiu por mais 2 vezes, completando-se 3 ciclos de congelamento e descongelamento, quando as amostras foram descongeladas, processadas e analisadas, em duplicata.

Para a avaliação da estabilidade pós processamento (EPP), as amostras, após processamento, foram mantidas na bandeja do amostrador do cromatógrafo, a 4 °C, por 72 horas, tempo superior ao tempo compreendido entre o preparo das amostras e o final da corrida analítica, sendo posteriormente analisadas, em duplicata.

Finalmente, para a avaliação da estabilidade de longa duração (ELD), as amostras de plasma contendo os analitos foram inicialmente congeladas a -80 °C por 15 dias, tempo superior ao intervalo entre a coleta da primeira amostra e análise da última amostra de voluntários. Em seguida, as amostras foram descongeladas, processadas e analisadas, em duplicata.

As amostras foram consideradas estáveis quando não apresentaram desvio superior a 15% da média de todas as concentrações obtidas quando comparadas à concentração nominal (BRASIL, 2012).

4.2.4.8 Estabilidade dos analitos em solução

A estabilidade dos analitos em solução foi determinada em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e em geladeira (5 ± 2 °C) por 15 dias. Foram preparadas, em duplicata, soluções contendo em um mesmo balão lumefantrina, desbutil-lumefantrina e diazepam a 5000 ng/mL, em fase móvel (acetonitrila e TFA 0,05% - 68:32). As soluções preparadas foram filtradas em membranas de 0,45 µm para 3 *vials* cada, identificados por H, B e G. Os *vials* H de cada solução foram imediatamente avaliados, em triplicata. Os *vials* B foram armazenados em bancada, a temperatura ambiente (25

± 2 °C), enquanto os *vials* G foram armazenados em geladeira, a 5 ± 2 °C, ambos por 15 dias. Após esse prazo, os *vials* B e G foram analisados, em triplicata. Para verificar a estabilidade, calculou-se o desvio entre a média das respostas dos analitos para soluções em estudo (*vials* B ou G) com a média das respostas para soluções recém-preparadas (*vials* H), conforme equação abaixo. Foram consideradas estáveis as soluções cujos desvios calculados não ultrapassaram os 10% (BRASIL, 2012).

$$\text{Desvio (\%)} = \frac{\text{área média B ou G} - \text{área média A} \times 100}{\text{área média A}}$$

4.2.5 Aplicação do método bioanalítico desenvolvido e validado na análise de amostras de voluntários

As amostras de plasma para a avaliação do método bioanalítico desenvolvido e validado foram coletadas seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.1.4. Os critérios de seleção dos voluntários foram: voluntários saudáveis, entre 18 e 60 anos, que não estavam fazendo uso de nenhum medicamento antimalárico. Foram administrados quatro comprimidos de lumefantrina (Macleods Pharmaceuticals, Mumbai, validade: 07/2020), correspondente a dose utilizada na terapêutica da malária na clínica, com leite integral. Como a lumefantrina é um fármaco lipofílico, a administração com leite aumenta sua biodisponibilidade (PINHEIRO, 2013). A coleta de sangue foi realizada em ponto único, 6 horas após a administração, tempo correspondente à concentração plasmática máxima de lumefantrina (NOELD, 2001). As amostras coletadas foram imediatamente centrifugadas, o plasma foi separado e congelado a -80 °C até o momento do processamento e análise. As amostras foram analisadas em quadruplicata, simultaneamente a uma curva de calibração. As concentrações plasmáticas de lumefantrina foram determinadas de acordo com a equação obtida na curva analítica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e otimização do método bioanalítico para quantificação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina empregando MEPS e CLAE-DAD

A utilização de padrão interno (PI) permite a obtenção de resultados precisos e exatos, e é indicada especialmente na análise de amostras complexas, que requerem uma etapa mais elaborada de preparo de amostra. Um padrão interno deve possuir as seguintes características: comportamento químico similar ao do(s) analito(s) nos processos de extração e preparo da amostra, ser compatível, não reagir, nem degradar os analitos em estudo, não estar presente previamente na amostra a ser analisada, sendo preferencialmente relacionado ao analito em estudo. (SNYDER *et al.*, 1997; CÉSAR *et al.*, 2011; KHALIL *et al.*, 2011; SETHI *et al.*, 2011; KHUDA *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2018). Dentre todas as substâncias testadas como PI, aquela que apresentou melhores resultados em relação ao tempo de retenção, compatibilidade, resolução cromatográfica, disponibilidade e comprimento de onda de absorção foi o diazepam.

Em seguida, foi avaliado e selecionado o comprimento de onda de detecção de 305 nm, devido à seletividade e sensibilidade adequadas tanto para lumefantrina e desbutil-lumefantrina, quanto para o PI.

Dentre as colunas cromatográficas testadas, aquela que apresentou melhor desempenho foi a Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm), pois apresentou pico mais finos e simétricos, com resolução adequada, com um tempo total de corrida de 7 minutos.

Na composição da fase móvel, a proporção acetonitrila: TFA 0,05% (80:20) não se mostrou adequada devido à baixa retenção dos analitos. A troca do solvente por metanol provocou uma retenção muito alta da lumefantrina e picos assimétricos da desbutil-lumefantrina em todas as proporções testadas, de forma que esse solvente foi descartado do método. O teste com tampão acetato também não forneceu resultados satisfatórios, exibindo picos da desbutil-lumefantrina também assimétricos. Assim, voltou-se a otimização para as diferentes proporções de acetonitrila e TFA.

As diferentes concentrações de TFA testadas não produziram grandes impactos na separação cromatográfica e, portanto, optou-se por utilizar uma concentração mais baixa do ácido, definindo-se 0,05% como a melhor condição. Essa concentração de ácido produziu uma fase móvel com pH 2,8. A acidificação da fase móvel é importante, porque os analitos em estudo possuem uma estrutura grande e lipofílica, dessa forma em colunas C18, que possuem fase estacionária também com carácter lipofílico, essas substâncias são fortemente retidas. Para evitar a retenção excessiva dos analitos a fase móvel foi acidificada, pois como tanto a lumefantrina (pka 9,78) quanto a desbutil-lumefantrina são fármacos básicos fracos, a acidificação do meio promove a protonação dessas substâncias, diminuindo sua lipofilicidade e sua retenção na coluna C18.

A proporção da fase móvel que forneceu um resultado satisfatório em relação à retenção e separação dos picos foi aquela contendo acetonitrila e TFA 0,05% (70:30). Assim, foi feito um ajuste fino da proporção entre 65:35 até 70:30, encontrando-se como melhor resultado a proporção 68:32. Porcentagens menores do que 65% de acetonitrila provocaram grande retenção da lumefantrina e alargamento de picos, enquanto valores maiores do que 70% provocavam coeluição dos picos de desbutil-lumefantrina e PI, além de reduzir muito o tempo de retenção dos analitos, fazendo com que os mesmos apresentassem tempos de retenção próximos do tempo morto.

O método desenvolvido se mostrou eficiente e rápido. A separação dos dois analitos, lumefantrina e seu metabólito, e do PI ocorreu em 7 minutos, um tempo de corrida adequado (**Figura 25**). Além disso, os parâmetros cromatográficos avaliados para desbutil-lumefantrina, diazepam e lumefantrina em relação à assimetria (1,38; 1,32 e 1,34), resolução (5,80 entre o pico da desbutil-lumefantrina e diazepam; 4,45 entre o pico de diazepam e lumefantrina), número de pratos teóricos (11946,15954 e 8077) e tempo de retenção (3,56; 4,34 e 5,16 min), foram satisfatórios.

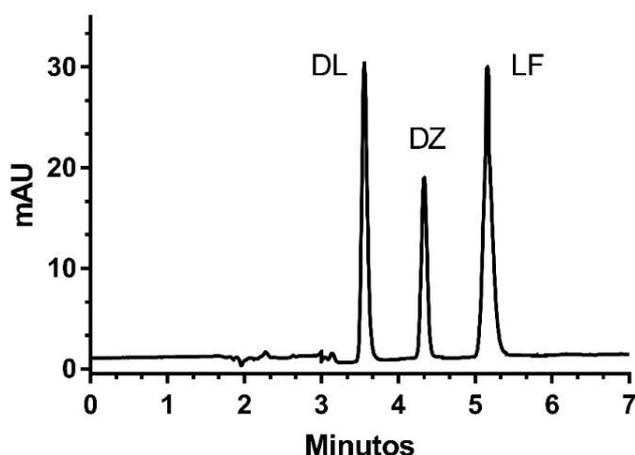


Figura 25 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a separação de lumefantrina e seu metabólito, empregando coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m); fase móvel composta por acetonitrila e TFA 0,05% (68:32); detecção em 305 nm; fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 25 μ L. DL = desbutil-lumefantrina, DZ = diazepam e LF = lumefantrina.

As curvas de calibração, obtidas para verificar a linearidade inicial do método e avaliar a extração demonstraram-se adequadas ao objetivo proposto (**Figura 26**). Tanto a curva de lumefantrina quanto a de desbutil-lumefantrina apresentaram resultados ideais para os parâmetros de regressão da curva (**Tabela 28**). O *F de significância* para as duas curvas ($4,64 \times 10^{-37}$ e $2,65 \times 10^{-36}$) foi muito inferior ao valor de α (0,05), demonstrando que a hipótese nula pode ser rejeitada e que, portanto, a regressão é estatisticamente significativa. Além disso, o coeficiente de correlação para as duas curvas (0,9993 e 0,9992) apresentou um valor maior que 0,99, confirmando o caráter linear do método.

Tabela 28 – Parâmetros de regressão para as curvas de calibração desenvolvidas para quantificação da lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma humano.

| Parâmetros da regressão | Lumefantrina | Desbutil-lumefantrina |
|--|------------------------|------------------------|
| Coefficiente de determinação (R^2) | 0,9986 | 0,9983 |
| Coefficiente de correlação (R) | 0,9993 | 0,9992 |
| Inclinação \pm desvio padrão | 0,0037 \pm 0,0003 | 0,0033 \pm 0,0003 |
| Intercepto \pm desvio padrão | 0,2000 \pm 0,0707 | 0,1195 \pm 0,0520 |
| <i>F de significância</i> | $4,64 \times 10^{-37}$ | $2,65 \times 10^{-36}$ |
| Faixa de concentração (ng/mL) | 50 – 5000 | 50 – 5000 |
| Número de pontos | 9 | 9 |

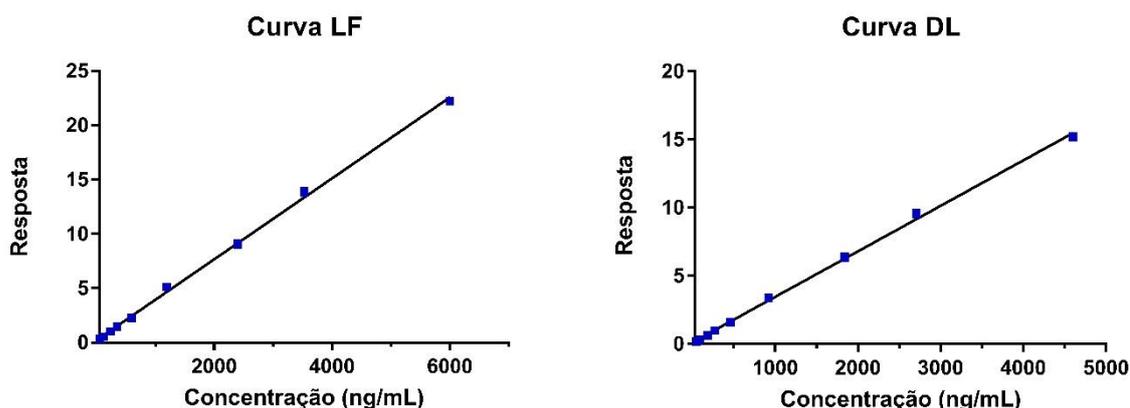


Figura 26 – Curvas de calibração para a lumefantrina (LF) e a desbutil-lumefantrina (DL) para avaliação prévia da linearidade do método desenvolvido para a quantificação desses fármacos em plasma humano.

A recuperação dos analitos foi a variável usada como resposta na avaliação dos planejamentos experimentais na etapa de preparo de amostras empregando MEPS. Os valores de recuperação para a lumefantrina e seu metabólito em cada experimento do PFF 2⁴⁻¹ são apresentados na **Tabela 29**. Dente os parâmetros testados, apenas o volume de amostra tomado (X_1) foi estatisticamente significativo (**Figura 27**), sendo obtidas recuperações superiores a 90% quando se empregou 100 μL como volume inicial de amostra. Os demais parâmetros, volume da amostra por aspiração (X_2) e número de ciclos de aspiração e ejeção (X_3), não influenciaram de forma significativa a resposta do teste.

Tabela 29 - Recuperação obtida em cada experimento do PFF 2³⁻¹ para a lumefantrina e para a desbutil-lumefantrina em solução, por meio da MEPS. X_1 = volume inicial da amostra, X_2 = volume por aspiração e X_3 = número de ciclos de aspiração.

| Experimentos | Variáveis | | | | |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------|--------------------|--------------------|
| | X_1 (μL) | X_2 (μL) | X_3 | Recuperação LF (%) | Recuperação DL (%) |
| 4 | 400 | 100 | 15 | 50,93 | 50,83 |
| 7 | 250 | 70 | 10 | 57,98 | 57,69 |
| 6 | 250 | 70 | 10 | 59,31 | 59,66 |
| 2 | 400 | 40 | 5 | 48,85 | 48,05 |
| 3 | 100 | 100 | 5 | 93,96 | 94,92 |
| 5 | 250 | 70 | 10 | 60,62 | 60,88 |
| 1 | 100 | 40 | 15 | 95,43 | 95,70 |

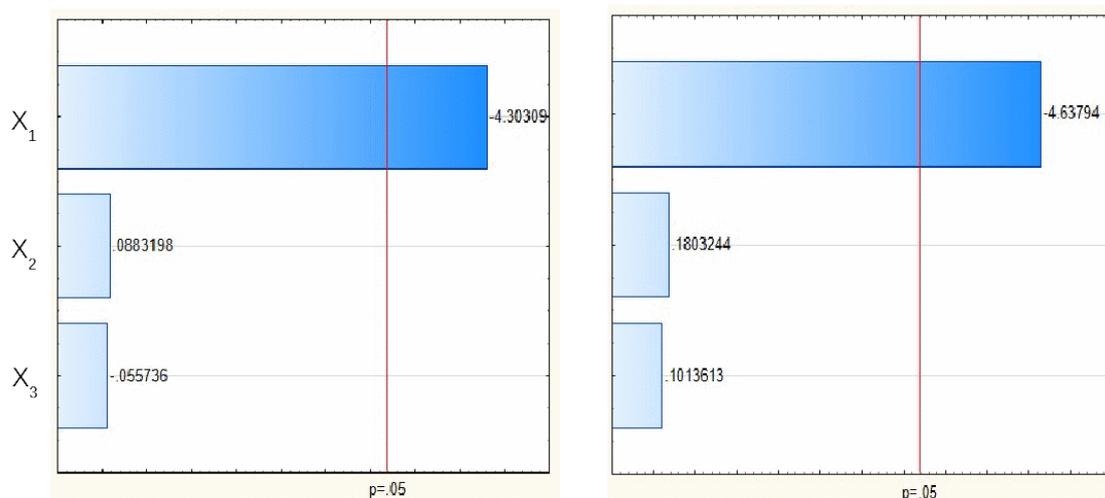


Figura 27 – Gráfico de pareto obtidos pelo PFF 2^{3-1} demonstrando a influência das variáveis (X_1 , X_2 e X_3) na etapa de extração em meio aquoso da lumefantrina (esquerda) e desbutil-lumefantrina (direita).

A otimização da dessorção demonstrou que o melhor solvente para essa etapa foi a acetonitrila, visto sua efetividade em dessorver os analitos do cartucho. Para a lavagem, foram utilizados metanol e água, pois a acidificação da solução poderia favorecer a dessorção do analito, visto que a lumefantrina em meio ácido se encontra protonada e interage menos com a fase estacionária C18 do cartucho de extração. Dessa forma, foi estabelecido o procedimento de lavagem com metanol e água (10:90). Por fim, a acetonitrila não foi considerada na lavagem, pois durante o desenvolvimento do método cromatográfico observou-se que esse solvente demonstrava maior poder de eluição dos analitos e, conseqüentemente, poderia promover perda do analito no processo de lavagem durante a extração.

Finalmente, o processo de lavagem do cartucho após os procedimentos de extração e dessorção foi determinado por referências da literatura científica como Altun e Abdel (2008). Segundo esse trabalho, procedimentos de lavagem com metanol com repetições de 4 a 5 vezes promovem a limpeza do cartucho com um efeito residual de 0,1%. Dessa forma, para evitar esse efeito e garantir uma efetiva limpeza do cartucho, foi trocado o solvente metanol por acetonitrila e TFA 0,05% (90:10) com repetições de 10 vezes. Como citado acima, a acetonitrila e o TFA 0,05% solubilizam e eluem melhor os analitos, assegurando a limpeza do cartucho.

Assim, acetonitrila foi o solvente escolhido para a eluição dos analitos por ser o solvente constituinte da fase móvel e porque demonstrou melhor capacidade de solubilizá-los comparada ao metanol.

Após estes testes preliminares em meio aquoso, foi feito em seguida um PFF⁴⁻¹ para avaliar a extração em plasma dos mesmos analitos avaliados em meio aquoso. Nestes experimentos, foi adicionado mais um fator de avaliação, a diluição da amostra, para verificar a necessidade da etapa de precipitação de proteína. Entretanto, o teste inicial demonstrou ser inviável extrair os analitos com os cartuchos de C18 sem a precipitação, pois nas cinco primeiras tentativas, um dos cartuchos entupiu completamente. Dessa maneira, a precipitação de proteínas foi necessária para se aplicar a técnica.

Os resultados dos testes feitos em plasma estão resumidos na **Tabela 20**. O diagrama de pareto para os testes em plasma (**Figura 28**) também demonstra que o parâmetro mais importante foi o volume de amostra utilizado e que os demais parâmetros não influenciam de forma significativa a extração dos fármacos. É possível observar também que em comparação ao meio aquoso, os demais parâmetros apresentaram valores mais expressivos, mas não significativos a ponto de ultrapassar o valor de p estabelecido (0,05). Além disso, as curvas de nível (**Figura 29**) também demonstram que um volume de 100 μ L fornece a recuperação adequada dos analitos, além de indicar que não há uma interação muito pronunciada entre as variáveis, devido às características de paralelismo nas curvas de nível obtidas.

Tabela 30 – Recuperação obtida em cada experimento do PFF 2^{3-1} para a lumefantrina e para a desbutil-lumefantrina em amostras de plasma, por meio da MEPS. X1 = volume inicial da amostra, X2 = diluição da amostra e X3 = volume por aspiração, X4 = número de ciclos de aspiração.

| Experimentos | Variáveis | | | | | |
|--------------|-----------|-----|---------|----|--------------------|--------------------|
| | X1 (µL) | X2 | X3 (µL) | X4 | Recuperação LF (%) | Recuperação DL (%) |
| 10 | 400 | 1:3 | 40 | 15 | 38,93 | 38,37 |
| 18 | 250 | 1:2 | 70 | 10 | 65,42 | 61,41 |
| 19 | 250 | 1:2 | 70 | 10 | 60,37 | 60,66 |
| 3 | 100 | 1:1 | 40 | 5 | 91,48 | 94,16 |
| 8 | 400 | 1:1 | 100 | 5 | 48,55 | 47,82 |
| 5 | 100 | 1:3 | 100 | 5 | 92,23 | 90,64 |
| 4 | 400 | 1:1 | 40 | 5 | 49,05 | 48,64 |
| 13 | 100 | 1:3 | 100 | 15 | 95,73 | 90,35 |
| 17 | 250 | 1:2 | 70 | 10 | 61,69 | 62,39 |
| 14 | 400 | 1:3 | 100 | 15 | 49,48 | 48,82 |
| 12 | 400 | 1:1 | 40 | 15 | 51,53 | 51,43 |
| 9 | 100 | 1:1 | 40 | 15 | 95,53 | 96,24 |
| 1 | 100 | 1:1 | 40 | 5 | 88,74 | 92,90 |
| 2 | 400 | 1:3 | 40 | 5 | 49,04 | 49,12 |
| 16 | 400 | 1:1 | 100 | 15 | 49,36 | 49,06 |
| 15 | 100 | 1:1 | 100 | 15 | 97,72 | 97,71 |
| 11 | 100 | 1:1 | 40 | 15 | 97,72 | 92,40 |
| 7 | 100 | 1:1 | 100 | 5 | 91,93 | 90,00 |
| 6 | 400 | 1:3 | 100 | 5 | 52,75 | 51,88 |

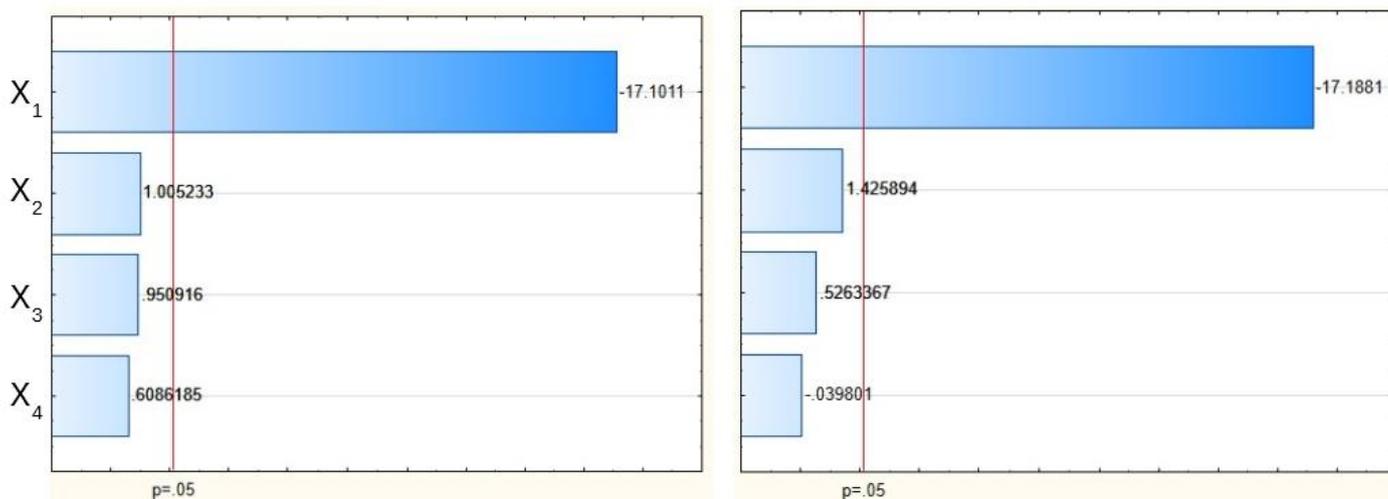


Figura 28 - Gráfico de pareto obtidos pelo PFF 2^{4-1} mostrando as variáveis (X₁, X₂, X₃ e X₄) que afetam a etapa de extração em plasma da lumefantrina (esquerda) e desbutil-lumefantrina (direita).

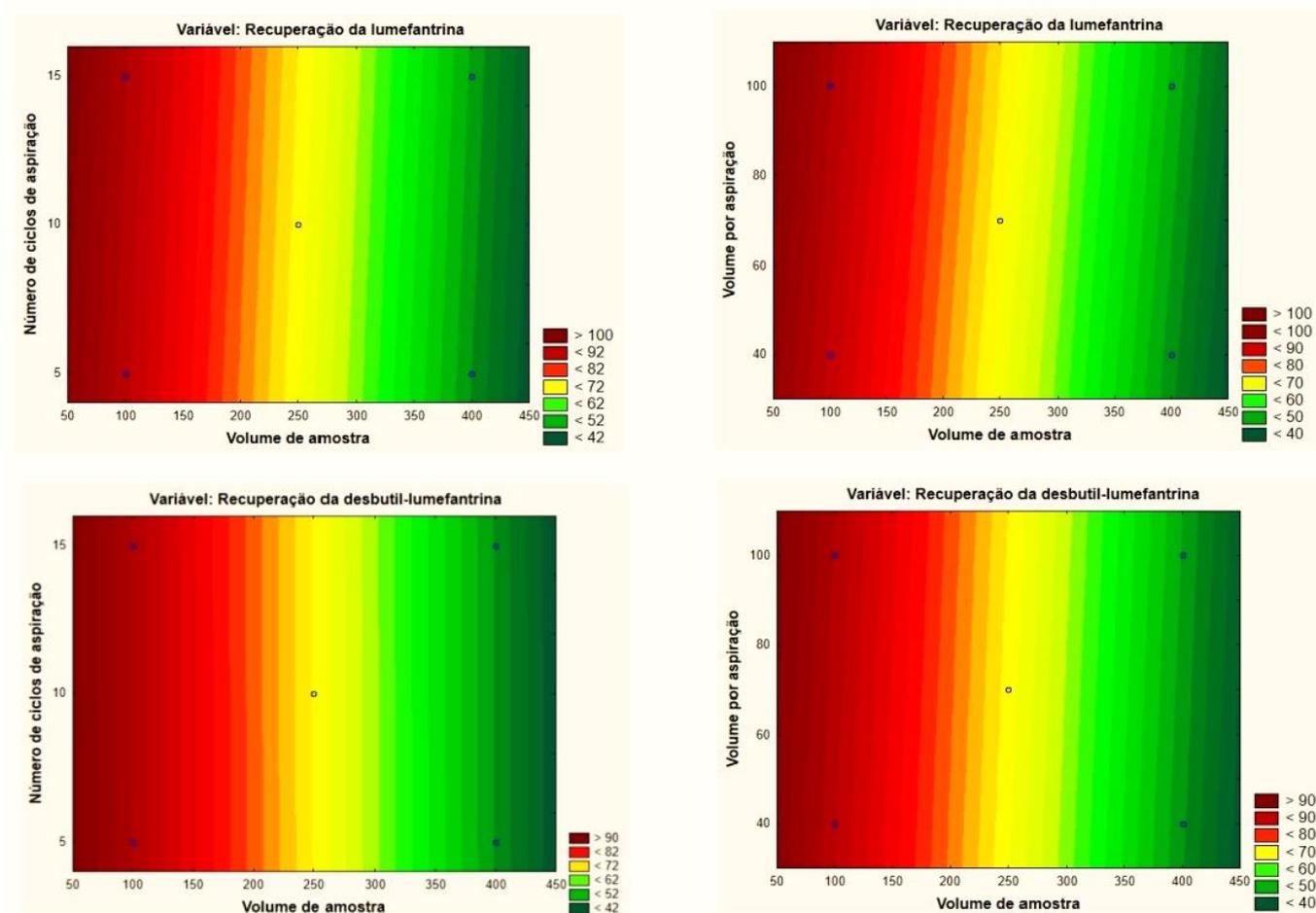


Figura 29 – Curvas de nível obtidas pelos experimentos PFF 2⁴⁻¹ para avaliação da extração em plasma da lumefantrina e desbutil-lumefantrina, demonstrando a relação entre número de ciclos de aspiração e volume de amostra, e entre volume por aspiração e volume de amostra.

Os demais parâmetros foram definidos de acordo com a maior praticidade, uma vez que forneciam uma boa recuperação, sem tornar a extração demorada. Dessa maneira, o número de ciclos, a diluição da amostra e o volume de aspiração foram 10, 1:1 e 70 µL, respectivamente. Por fim, o método completo de extração consistiu nos seguintes procedimentos (**Figura 30**):

- diluição 1:1 e precipitação das proteínas da amostra com ácido perclórico 0,2%, centrifugação e coleta do sobrenadante (100 µL);
- extração dos analitos pelo cartucho MEPS com 10 ciclos de aspiração contendo 70 µL de amostra por ciclo;
- lavagem do cartucho com metanol: água (10:90);
- dessorção dos analitos retidos no cartucho com acetonitrila:TFA 0,05% (90:10) diretamente para *vial* em 5 ciclos de 50 µL do solvente de dessorção.

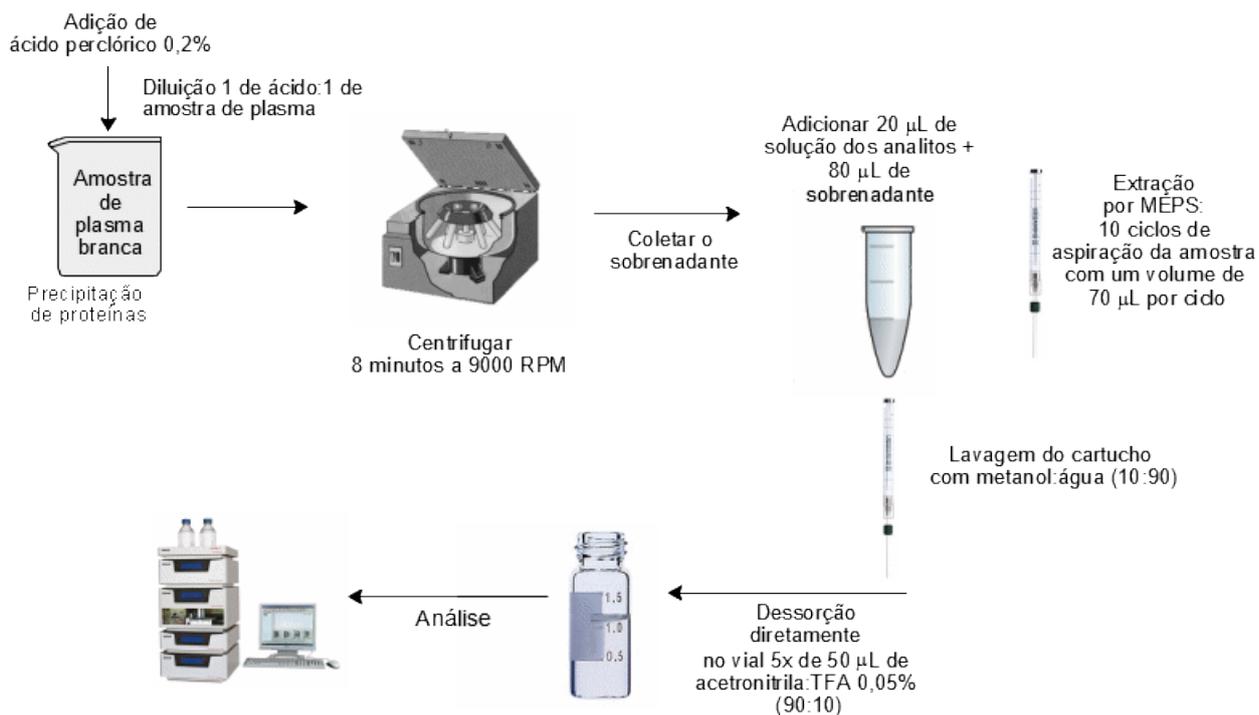


Figura 30 - Procedimento otimizado de extração dos analitos por MEPS para o parâmetro de linearidade.

5.2 Validação do método bioanalítico para quantificação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina, empregando MEPS e CLAE-DAD

5.2.1 Seletividade

Os cromatogramas obtidos para as seis amostras de plasma branco, sendo 4 amostras normais, uma hemolisada e uma lipêmica, foram sobrepostos ao cromatograma das amostras LIQ, com a finalidade de identificar possíveis picos interferente que pudessem estar presentes nas amostras biológicas (**Figura 31**). A análise visual dos cromatogramas sugere que a maior parte dos picos interferentes se encontram próximos ao tempo morto. Foram observados, entretanto, pequenos picos interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos e PI, em maiores ou menores proporções, comuns nas seis amostras de plasma branco utilizadas nos ensaios.

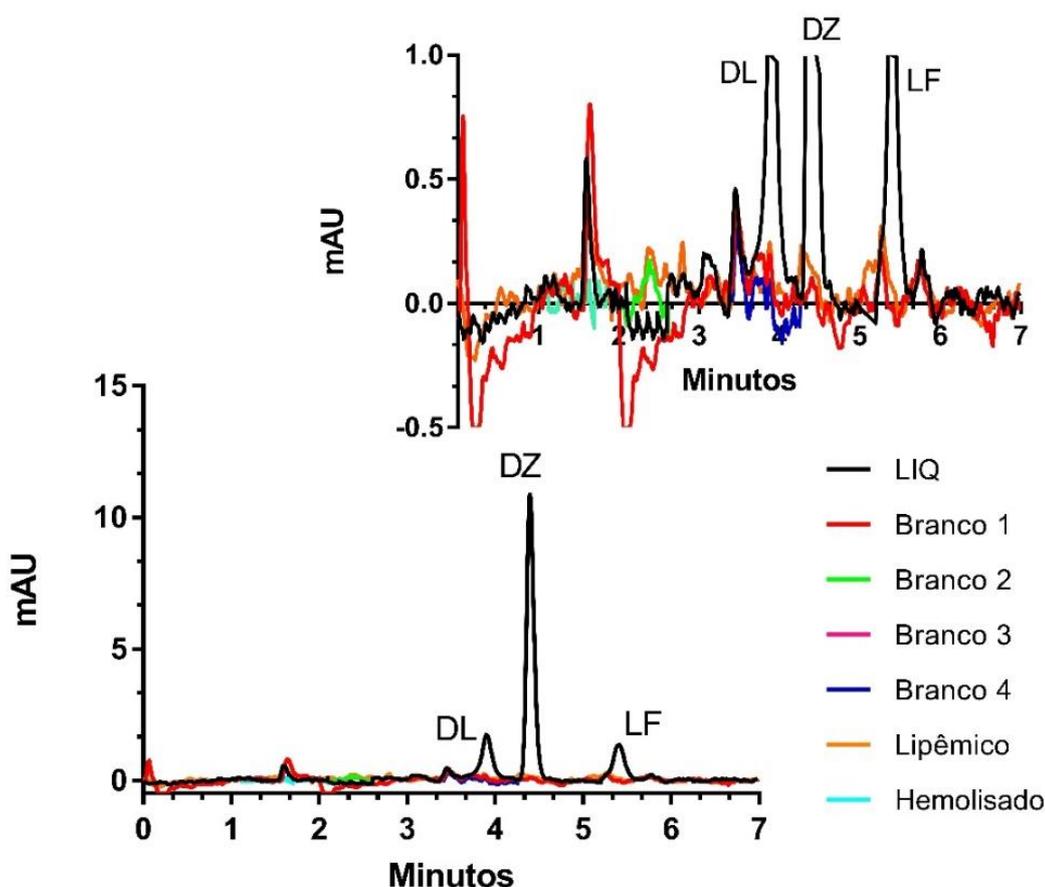


Figura 31 – Cromatogramas para a amostra LIQ e as amostras branco para o parâmetro de seletividade, demonstrando a sobreposição dos cromatogramas e o *zoom* na porção inferior do mesmo para a avaliação de possíveis interferentes presentes na matriz biológica. DL: desbutil-lumefantrina, DZ: diazepam, LF: lumefantrina.

Os percentuais de resposta dos picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos e PI foram calculados para as amostras de plasma branco, em relação às áreas encontradas para os analitos e PI na amostra LIQ. Em relação aos interferentes no tempo de retenção da desbutil-lumefantrina, foram encontrados percentuais de interferência entre 4,83% e 5,64%; para os interferentes no tempo de retenção do diazepam, os percentuais encontravam-se na faixa de 0,21% a 0,53%; e para os interferentes no tempo de retenção da lumefantrina, foram encontrados percentuais de interferência entre 4,28% e 7,23%. Como em nenhuma das amostras de plasma, nenhum dos picos interferentes apresentou área superior a 20% em relação à resposta para a desbutil-lumefantrina e lumefantrina e superior a 5% em relação à resposta do diazepam, nas amostras LIQ, a seletividade do método foi confirmada.

A seletividade do método bioanalítico foi avaliada também em relação a outros antimaláricos, como amodiaquina e mefloquina, à cafeína, aos analgésicos paracetamol e dipirona, e ao anti-helmíntico mebendazol, prováveis interferentes que poderiam estar presentes em amostras de voluntários que utilizarem o medicamento. Os cromatogramas para cada substância foram sobrepostos ao cromatograma obtido a partir da amostra LIQ (**Figura 32**). Não foram identificados picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos e PI nos cromatogramas obtidos para as substâncias testadas. Dentre os fármacos testados, somente o mebendazol apresentou um pico próximo ao pico da desbutil-lumefantrina; as demais substâncias apresentaram tempo de retenção relativamente próximo ao tempo morto.

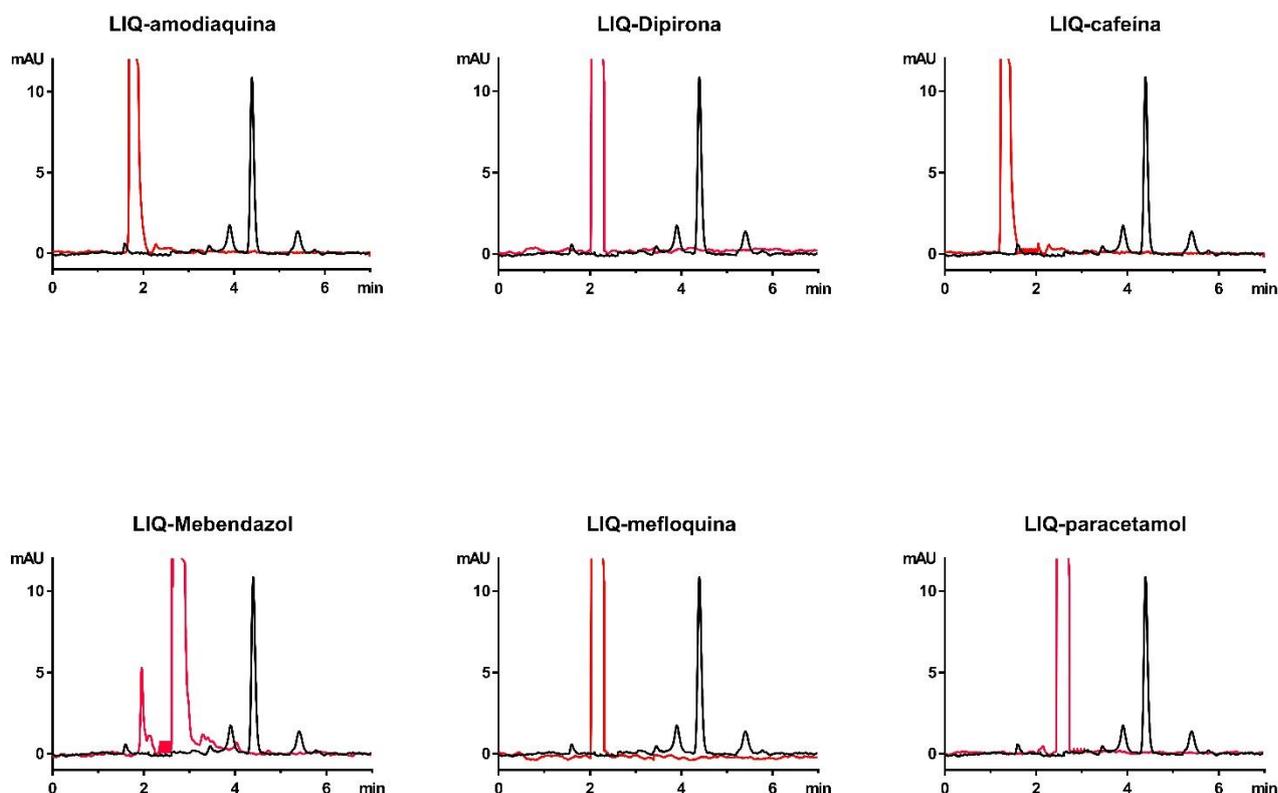


Figura 32 – Cromatogramas para avaliação da seletividade do método frente a outros fármacos e substâncias que possam eventualmente estar presentes na matriz biológica. Preto = analitos na concentração do LIQ e Vermelho = substâncias avaliadas na concentração de 100 µg/mL

5.2.2 Efeito residual

Os cromatogramas sobrepostos e o *zoom* na porção inferior dos cromatogramas obtidos na avaliação do efeito residual podem ser observados na **Figura 33**.

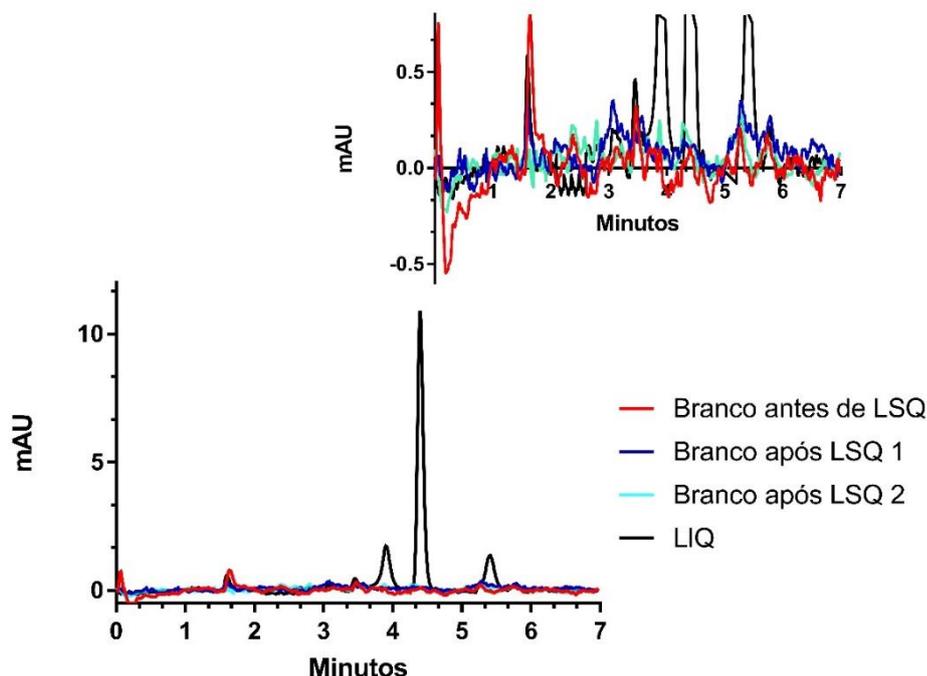


Figura 33 – Cromatogramas para avaliação do efeito residual do método bioanalítico desenvolvido para quantificação da lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma.

Uma análise visual dos cromatogramas demonstrou que não ocorreu surgimento ou aumento dos picos nos tempos de retenção correspondentes aos analitos e ao PI. Os picos interferentes observados haviam sido detectados anteriormente, na avaliação do parâmetro de seletividade. Apesar dos sinais dos interferentes aparentarem serem significativos, cabe ressaltar que a lumefantrina se encontra no limite inferior de quantificação estabelecido para o método. Foram determinadas as áreas desses picos interferentes e os percentuais de interferência, iguais a 4,57%; 5,69% e 0,26%, para desbutil-lumefantrina, lumefantrina e diazepam, respectivamente, não ultrapassaram os limites de 20% da resposta do analito e 5% da resposta do PI, em comparação à amostra LIQ. Com isso, comprova-se que não há efeito residual no método proposto, isto é, a solução de lavagem da agulha do autoinjeter e do *loop* do equipamento, que consiste em uma mistura de metanol e ácido acético a 1%, mostrou-se adequada para lavagem das vias e controle do efeito residual.

5.2.3 Efeito matriz

Os resultados encontrados para FMN e para CV para amostras CQB, CQM e CQA estão descritos na **Tabela 31**.

Tabela 31 – Fator matriz normalizado para os níveis de concentração CQB, CQM e CQA para avaliação do efeito matriz do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma.

| Replicata | Fator matriz normalizado (FMN) | | | | | |
|------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|
| | CQB | | CQM | | CQA | |
| | DL | LF | DL | LF | DL | LF |
| 1 | 0,64 | 0,85 | 0,79 | 0,89 | 0,99 | 1,01 |
| 2 | 0,65 | 0,85 | 0,79 | 0,88 | 1,00 | 1,01 |
| 3 | 0,65 | 0,84 | 0,80 | 0,88 | 1,00 | 1,01 |
| Média FMN | 0,65 | 0,84 | 0,79 | 0,88 | 1,00 | 1,01 |
| CV (%) | 0,69 | 0,62 | 0,68 | 0,66 | 0,29 | 0,23 |

O método bioanalítico desenvolvido não exibiu efeito matriz significativo ou o efeito matriz exibido foi compensado pelo PI escolhido, uma vez que o CV geral foi inferior ao limite estabelecido de 15%. Porém, não se pode garantir que não há efeito matriz absoluto, isso porque o FMN leva em consideração a capacidade que o PI tem de corrigir um eventual efeito matriz sobre o analito assegurando, portanto, precisão e exatidão adequadas.

Apesar de o efeito matriz ser um parâmetro de validação comumente avaliado quando espectrometria de massas é utilizada como método de detecção, optou-se por avaliar também este parâmetro na validação do método bioanalítico desenvolvido com detecção ultravioleta, para confirmar ausência de interferências na absorvância e na resposta do método decorrentes da matriz. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se ausência de alterações ou interferências pela matriz, nas três concentrações avaliadas.

5.2.4 Recuperação

O parâmetro recuperação não é preconizado pela RDC nº 27/2012 da ANVISA; dessa maneira, o parâmetro foi avaliado de acordo com o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA. A recuperação foi determinada pela comparação de respostas de amostras preparadas em plasma, nos níveis CQB, CQM e CQA, com respostas

para analitos e PI em solução, em quintuplicata, sendo determinados os percentuais de recuperação, conforme **Tabela 32**.

Tabela 32 – Resultados para o parâmetro recuperação para o método bioanalítico desenvolvido para quantificar lumefantrina e seu metabólito em plasma.

| Replicata | Recuperação (%) | | | | | | | | |
|---------------|-----------------|--------------|--------------|------------------|--------------|--------------|------------------|--------------|--------------|
| | CQB (150 ng/mL) | | | CQM (2000 ng/mL) | | | CQA (4000 ng/mL) | | |
| | DL | DZ | LF | DL | DZ | LF | DL | DZ | LF |
| 1 | 95,01 | 98,10 | 95,09 | 88,85 | 95,27 | 98,62 | 99,49 | 98,89 | 98,97 |
| 2 | 98,23 | 98,44 | 92,03 | 91,20 | 99,23 | 91,96 | 98,31 | 98,74 | 99,07 |
| 3 | 92,97 | 98,47 | 98,96 | 92,48 | 91,39 | 86,68 | 99,64 | 90,65 | 98,05 |
| 4 | 98,04 | 88,62 | 95,07 | 98,42 | 92,70 | 94,29 | 98,43 | 91,68 | 99,24 |
| 5 | 98,11 | 88,44 | 95,16 | 90,85 | 96,13 | 89,25 | 99,20 | 95,86 | 99,46 |
| Média | 96,47 | 94,41 | 95,26 | 92,36 | 94,94 | 92,16 | 99,01 | 95,16 | 98,96 |
| CV (%) | 2,46 | 5,69 | 2,58 | 3,93 | 3,23 | 5,00 | 0,62 | 4,06 | 0,55 |

Os percentuais de recuperação médios de desbutil-lumefantrina encontrados variaram entre 92,36% e 99,01%. Para a lumefantrina, os percentuais médios variaram entre 92,16% e 98,96% e para o PI a média de recuperação ficou entre 94,41% e 95,16%. Os resultados podem ser considerados altos e, portanto, satisfatórios para os analitos e PI. Apesar de não serem exigidas recuperações próximas a 100%, os elevados valores obtidos refletem a eficiência do método de extração desenvolvido e contribuem para a sensibilidade do método de detecção.

5.2.5 Linearidade

A linearidade foi avaliada construindo-se três curvas de calibração independentes, no intervalo de 50 a 5000 ng/mL para desbutil-lumefantrina e lumefantrina, mantendo-se fixa a concentração de diazepam, a 2000 ng/mL. Os resultados, expressos como a razão entre a área do pico do analito pela área do pico de PI, foram plotados em relação à concentração do analito, em gráficos de dispersão para cada curva, sendo obtidas ainda equações da reta e desvios em relação à concentração nominal (**Tabelas 33 e 34**). Os gráficos de dispersão entre razão das áreas por concentração de lumefantrina são apresentados na **Figura 34**.

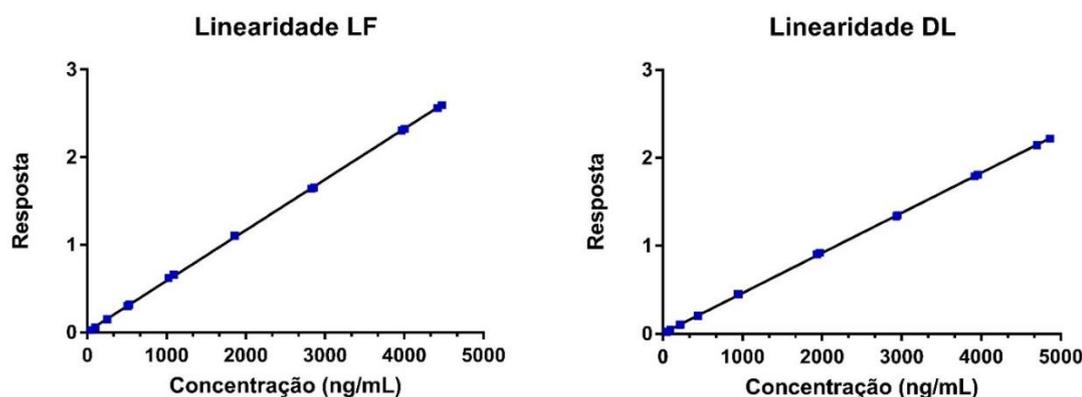


Figura 34: Curvas de calibração para o parâmetro linearidade dos analitos lumefantrina (LF) e desbutil-lumefantrina (DL).

Os parâmetros de regressão linear para as curvas de calibração são apresentados na **Tabela 33**. O método dos mínimos quadrados ordinários foi empregado para determinação da regressão e não foi realizado ponderação dos valores da curva. Os coeficientes de correlação e determinação foram superiores a 0,99 para as três curvas, indicando que mais que 99% da resposta medida é atribuída a variações na concentração do analito. Esse resultado demonstra ainda a qualidade do ajuste dos pontos à reta. Foram encontrados coeficientes angulares e lineares muito similares entre as três curvas, mesmo tendo sido preparadas em três dias diferentes.

Tabela 33 – Parâmetros da regressão para as curvas de calibração construídas para avaliação da linearidade do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma.

| Parâmetros da regressão | Lumefantrina | Desbutil-lumefantrina |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Coefficiente de determinação (R^2) | 0,9999 | 0,9975 |
| Coefficiente de correlação (R) | 0,9999 | 0,9987 |
| Inclinação \pm desvio padrão | $0,0006 \pm 1,44 \times 10^{-6}$ | $0,0005 \pm 3,21 \times 10^{-6}$ |
| Intercepto \pm desvio padrão | $0,0090 \pm 0,0033$ | $0,0010 \pm 0,0077$ |
| <i>F de significação</i> | $3,45 \times 10^{-92}$ | $3,73 \times 10^{-69}$ |
| Faixa de concentração (ng/mL) | 50-5000 | 50-5000 |
| Número de pontos | 9 | 9 |

Tabela 34 – Desvios calculados para as três curvas de calibração construídas em três dias diferentes para avaliação da linearidade do método desenvolvido para quantificação de lumefantrina e desbutil-lumefantrina em plasma.

| Concentração nominal (ng/mL) | Curva dia 1 | | | | Curva dia 2 | | | | Curva dia 3 | | | |
|---------------------------------|------------------------------|---------|------------|--------|------------------------------|---------|------------|-------|------------------------------|---------|------------|--------|
| | Concentração real (ng/mL) | | Desvio (%) | | Concentração real (ng/mL) | | Desvio (%) | | Concentração real (ng/mL) | | Desvio (%) | |
| | DL | LF | DL | LF | DL | LF | DL | LF | DL | LF | DL | LF |
| 50 | 48,35 | 47,85 | -3,29 | -4,30 | 44,46 | 46,93 | -11,08 | -6,14 | 48,87 | 48,31 | -2,25 | -3,38 |
| 100 | 90,28 | 99,69 | -9,72 | -0,31 | 89,95 | 95,81 | -10,05 | -4,19 | 91,73 | 103,17 | -8,27 | 6,17 |
| 250 | 218,78 | 251,92 | -12,49 | 0,77 | 219,77 | 259,29 | -12,09 | 3,72 | 227,19 | 240,87 | -9,13 | -3,65 |
| 500 | 439,28 | 520,01 | -12,14 | 4,00 | 427,40 | 525,63 | -14,52 | 5,13 | 446,84 | 495,70 | -10,63 | -0,86 |
| 1000 | 946,59 | 1060,01 | -5,34 | 6,00 | 961,18 | 1098,70 | -3,88 | 3,72 | 974,19 | 1107,22 | -2,58 | 10,72 |
| 2000 | 1955,08 | 1858,66 | -2,25 | -7,07 | 2264,16 | 1864,83 | 13,21 | 5,13 | 1952,46 | 1836,01 | -2,38 | -8,20 |
| 3000 | 2944,13 | 2844,87 | -1,86 | -5,17 | 2929,67 | 2792,60 | -2,34 | 9,87 | 2929,45 | 2821,72 | -2,35 | -5,94 |
| 4000 | 3936,89 | 3985,87 | -1,58 | -0,35 | 3975,62 | 3771,55 | -0,61 | -6,76 | 3968,58 | 3732,51 | -0,79 | -6,69 |
| 5000 | 4782,77 | 4447,70 | -4,34 | -11,05 | 4726,37 | 4427,11 | -5,47 | 9,87 | 4768,17 | 4401,33 | -4,64 | -11,97 |

A linearidade do método bioanalítico foi comprovada para a faixa entre 50 e 5000 ng/mL, para as três curvas de calibração, isso porque, para a totalidade dos pontos, os desvios calculados não foram superiores a 20% para as amostras LIQ e ou a 15% para os demais níveis de concentração analisados, tanto para a lumefantrina quanto para a desbutil-lumefantrina. Além disso, não foram identificados quaisquer picos interferentes, nas amostras branco, que apresentassem áreas superiores a 20% da área referente ao pico de analito e a 15% da área referente ao pico de PI obtidas para amostras LIQ, nos respectivos tempos de retenção de ambos os analitos analisados.

5.2.6 Precisão e exatidão

Os parâmetros precisão e exatidão foram avaliados simultaneamente à curva de calibração, para amostras LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, analisadas em quintuplicata, em três corridas analíticas feitas em dias diferentes. Os resultados para as concentrações experimentais determinadas, coeficientes de variação e erros padrão relativos encontrados para cada dia de análise estão apresentados na **Tabela 35**.

O método pode ser considerado preciso para quantificação de desbutil-lumefantrina e lumefantrina em plasma, pois os valores encontrados para CV nos três dias de análise foram inferiores a 20% para LIQ e a 15% para os controles de qualidade. Da mesma forma, o método apresentou adequada exatidão, uma vez que os EPR obtidos estão dentro da faixa de $\pm 20\%$ em relação à concentração nominal para o LIQ e de $\pm 15\%$ em relação à concentração nominal para as demais amostras.

Confirmou-se 50 ng/mL como o limite inferior de quantificação do método, pois nesta concentração obteve-se precisão e exatidão adequadas, e a razão sinal/ruído apresentou-se muito próxima a 10.

Tabela 35 – Resultados para o parâmetro de precisão e exatidão para o método desenvolvido para quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma.

| Lumefantrina | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------|--------|--------|-----------------|--------|--------|------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|
| Concentração Nominal | LIQ (50 ng/mL) | | | CQB (150 ng/mL) | | | CQM (2000 ng/mL) | | | CQA (4000 ng/mL) | | | CQD (4000 ng/mL) | | |
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 |
| Conc. Obtida (ng/mL) | 48,77 | 48,22 | 44,76 | 148,95 | 149,06 | 146,97 | 1748,49 | 1839,55 | 1820,72 | 3640,02 | 3640,45 | 3568,69 | 3652,17 | 3603,89 | 3645,48 |
| | 48,18 | 48,79 | 46,52 | 145,07 | 148,85 | 146,03 | 1766,67 | 1771,68 | 1788,67 | 3667,67 | 3672,64 | 3507,16 | 3528,02 | 3548,26 | 3549,29 |
| | 46,58 | 46,58 | 45,91 | 144,84 | 144,84 | 147,26 | 1773,62 | 1787,83 | 1742,74 | 3619,53 | 3613,01 | 3504,20 | 3537,53 | 3539,21 | 3532,17 |
| | 45,54 | 45,46 | 44,31 | 152,18 | 146,38 | 145,95 | 1780,72 | 1782,23 | 1750,53 | 3557,75 | 3590,33 | 3649,14 | 3628,32 | 3678,88 | 3564,77 |
| | 46,71 | 48,10 | 46,71 | 156,05 | 148,79 | 146,62 | 1779,67 | 1813,95 | 1791,62 | 3642,17 | 3595,44 | 3551,48 | 3674,32 | 3624,42 | 3527,90 |
| Conc. Média (ng/mL) | 47,16 | 47,43 | 45,64 | 149,42 | 147,58 | 146,57 | 1769,83 | 1799,05 | 1778,86 | 3625,43 | 3622,37 | 3556,13 | 3604,07 | 3598,93 | 3563,92 |
| Precisão (CV %) | 2,76 | 2,89 | 2,33 | 3,20 | 1,28 | 0,39 | 0,74 | 1,53 | 1,80 | 1,14 | 0,95 | 1,66 | 1,86 | 1,60 | 1,34 |
| Exatidão (EPR%) | -5,69 | -5,14 | -8,71 | -0,39 | -1,61 | -2,29 | -11,51 | -10,05 | -11,06 | -9,36 | -9,44 | -11,10 | -9,90 | -10,03 | -10,90 |
| Precisão Inter-corrida (CV %) | 3,03 | | | 2,05 | | | 1,50 | | | 1,50 | | | 1,58 | | |
| Exatidão Inter-corrida (EPR%) | -6,51 | | | -1,43 | | | -10,87 | | | -9,97 | | | -10,28 | | |
| Desbutil-lumefantrina | | | | | | | | | | | | | | | |
| Conc. Obtida (ng/mL) | 42,96 | 43,07 | 43,59 | 146,97 | 147,96 | 145,41 | 1987,21 | 1903,41 | 1989,97 | 3958,01 | 3640,32 | 3973,10 | 4057,55 | 3691,37 | 3860,24 |
| | 43,02 | 44,11 | 44,06 | 145,83 | 145,75 | 144,92 | 1986,54 | 1903,41 | 1963,08 | 3995,21 | 3829,71 | 3975,88 | 3896,76 | 3725,42 | 3742,88 |
| | 41,28 | 44,50 | 43,59 | 143,93 | 146,37 | 146,84 | 1983,97 | 1949,44 | 1962,15 | 3974,89 | 3739,50 | 3997,73 | 3985,02 | 3882,76 | 3770,15 |
| | 42,39 | 42,73 | 44,13 | 145,60 | 147,78 | 147,91 | 1993,21 | 1840,42 | 1982,33 | 3988,45 | 3691,94 | 4075,19 | 4026,46 | 4629,88 | 3715,63 |
| | 43,41 | 42,39 | 43,41 | 147,78 | 145,80 | 146,17 | 1975,50 | 1860,27 | 1982,12 | 3943,13 | 3727,52 | 4006,09 | 4061,78 | 3788,67 | 4661,85 |
| Conc. Média (ng/mL) | 42,61 | 43,36 | 43,75 | 146,02 | 146,73 | 146,25 | 1985,29 | 1891,39 | 1975,93 | 3971,94 | 3725,80 | 4005,60 | 4005,51 | 3943,62 | 3950,15 |
| Precisão (CV %) | 1,95 | 2,08 | 0,73 | 1,00 | 0,73 | 0,81 | 0,32 | 2,25 | 0,64 | 0,54 | 1,87 | 1,03 | 1,70 | 9,90 | 10,17 |
| Exatidão (EPR%) | -14,78 | -13,28 | -12,49 | -2,65 | -2,18 | -2,50 | -0,74 | -5,43 | -1,20 | -0,70 | -6,86 | 0,14 | 0,14 | -1,41 | -1,25 |
| Precisão Inter-corrida (CV %) | 1,93 | | | 0,82 | | | 2,55 | | | 3,50 | | | 7,64 | | |
| Exatidão Inter-corrida (EPR%) | -13,52 | | | -2,44 | | | -2,46 | | | -2,47 | | | -0,84 | | |

5.2.7 Estabilidade dos analitos em matriz biológica

A estabilidade da desbutil-lumefantrina, lumefantrina e diazepam foram determinadas em plasma por meio de estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECC), de estabilidade de curta duração (ECD), de estabilidade de longa duração (ELD) e de estabilidade pós processamento (EPP), em triplicata, para amostras CQB e CQA. Os resultados das concentrações determinadas foram comparados às concentrações nominais, sendo usados para cálculo dos EPR, separadamente, conforme **Tabela 36**.

Todas as amostras avaliadas apresentaram EPR inferiores a 15,0%, de modo que nenhuma concentração determinada se apresentou fora da faixa de $\pm 15\%$ em comparação à concentração nominal (**Tabela 36**). Os maiores EPR encontrados ocorreram nas amostras CQA, mas os EPR definidos, entre -3,77 e -12,87%, ainda assim estão dentro da faixa permitida. As variações foram maiores para a desbutil-lumefantrina do que para a lumefantrina, talvez por ser o metabólito menos estável do que o fármaco.

Tabela 36 – Resultados de EPR encontrados para a estabilidade dos analitos em matriz biológica.

| Replicatas | Níveis | Estabilidade em matriz biológica – EPR (%) | | | | | | | |
|------------|--------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ECD | | ECC | | ELD | | EPP | |
| | | LF | DL | LF | DL | LF | DL | LF | DL |
| 1 | CQB | -1,25 | -2,74 | -2,28 | -3,08 | -1,50 | -2,91 | -2,81 | -2,79 |
| 2 | | -3,93 | -0,71 | -4,84 | -4,45 | -5,81 | -2,50 | -0,67 | -2,94 |
| 3 | | -6,65 | -3,89 | -1,60 | -4,48 | -1,78 | -4,25 | -2,52 | -1,98 |
| 1 | CQA | -7,48 | -5,44 | -1,61 | -5,04 | -9,11 | -6,56 | -3,77 | -5,18 |
| 2 | | -7,29 | -7,08 | -4,13 | -1,93 | -4,46 | -3,95 | -7,60 | -4,03 |
| 3 | | -4,84 | -8,49 | -6,44 | -4,01 | -6,45 | -6,18 | -6,80 | -7,55 |

Diante do exposto, comprovou-se que a desbutil-lumefantrina e lumefantrina são estáveis em plasma nas condições de análise e armazenamento de amostras propostas. Durante a validação, nenhuma amostra foi submetida a mais do que três ciclos de congelamento e descongelamento, mantida a temperatura ambiente por mais que 24 horas, mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por mais de 15 dias ou armazenadas na bandeja

do autoinjeter por mais que 72 horas, o que garante a qualidade e eficiência das análises.

5.2.8 Estabilidade dos analitos em solução

Lumefantrina, desbutil-lumefantrina e diazepam tiveram suas estabilidades avaliadas na concentração de 5000 ng/mL, preparadas em solução. Tanto os analitos quanto o PI mostraram-se estáveis quando mantidos por 15 dias em temperatura ambiente (23 ± 2 °C) ou na geladeira (5 ± 2 °C), uma vez que as variações das áreas dos picos destas amostras em relação a amostras recém-preparadas foram sempre menores que 10%, conforme apresentado na **Tabela 37**. Não se observou diferença considerável na estabilidade dos fármacos em temperatura ambiente ou na geladeira, pois as variações encontradas, além de muito baixas, foram muito próximas entre si.

Tabela 37 – Resultados das áreas obtidas para o teste de estabilidade dos analitos em solução, comparando-se os resultados das amostras recém-preparadas com aquelas armazenadas em bancada e na geladeira por 15 dias.

| Replicatas | Estabilidade em solução – áreas | | | | | | | | |
|------------|---------------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| | Recém-preparadas | | | Bancada | | | Geladeira | | |
| | LF | DL | DZ | LF | DL | DZ | LF | DL | DZ |
| 1 | 223953 | 227732 | 81459 | 233866 | 237510 | 82466 | 218024 | 218024 | 80991 |
| 2 | 223296 | 226705 | 80923 | 234330 | 237457 | 81263 | 214829 | 217442 | 81123 |
| 3 | 222998 | 225936 | 80895 | 233586 | 236789 | 82565 | 216391 | 219289 | 80156 |
| Média | 223416 | 226791 | 81092 | 233927 | 237252 | 82098 | 216415 | 218252 | 80757 |
| Desvio (%) | - | - | - | 4,70 | 4,61 | 1,24 | -3,13 | -3,77 | -0,41 |

5.3 Aplicação do método desenvolvido e validado na análise de amostras de voluntários

A quantificação da lumefantrina em plasma de voluntários que receberam comprimidos pela via oral demonstrou um resultado satisfatório para a lumefantrina. Entretanto, seu metabólito apresentou concentrações muito baixas, inferiores ao limite de quantificação do método proposto. Um cromatograma do método desenvolvido e validado empregado na quantificação dos analitos em plasma pode ser observado na **Figura 35**. O resultado do doseamento de ambas as substâncias está apresentado

na **Tabela 38**. Para o cálculo da concentração dos analitos foram empregadas as curvas analíticas de cada analito, cujas equações da reta são descritas a seguir:

$$Y = 0,0006x + 0,0125 \text{ (lumefantrina)}$$

$$Y = 0,0004x + 0,0092 \text{ (desbutil-lumefantrina)}$$

Tabela 38 – Resultados obtidos com aplicação do método validado para avaliação da quantificação da lumefantrina em plasma coletado 6 h após a administração do medicamento.

| Replicatas | Concentração (ng/mL) | | | | | |
|--------------|----------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
| | Voluntário 1 | | Voluntário 2 | | Voluntário 3 | |
| | LF | DL | LF | DL | LF | DL |
| 1 | 1173,97 | 19,58 | 1458,97 | 13,76 | 1699,82 | 23,82 |
| 2 | 1227,11 | 15,59 | 1498,09 | 12,63 | 1702,87 | 23,88 |
| 3 | 1574,25 | 21,01 | 1463,52 | 14,16 | 1692,60 | 23,74 |
| 4 | 1585,62 | 21,14 | 1458,21 | 16,28 | 1696,06 | 23,70 |
| Média | 1390,24 | 19,33* | 1469,70 | 14,21* | 1697,84 | 23,79* |
| DPR | 15,84 | - | 1,30 | - | 0,26 | - |

* Inferior ao LIQ (50 ng/mL).

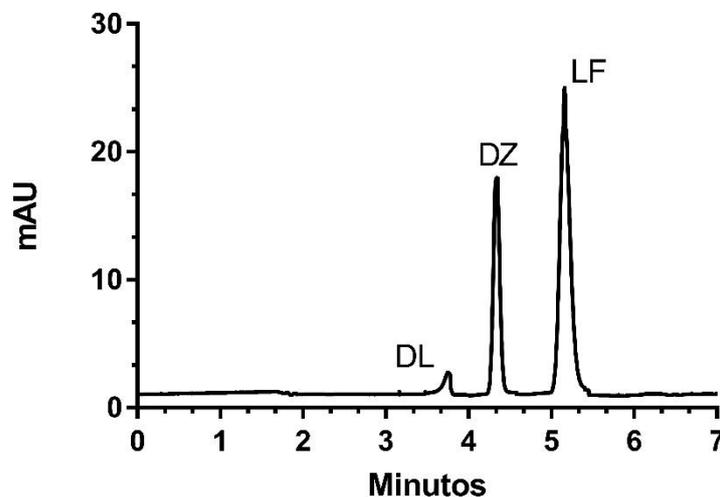


Figura 35 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma, empregando coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel composta por acetonitrila e TFA 0,05% (68:32); detecção em 305 nm; fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 25 µL. DL = debutil-lumefantrina, DZ = diazepam e LF = lumefantrina.

A concentração plasmática de lumefantrina descrita em trabalhos já publicados na literatura científica corresponde a valores próximos a 2000 ng/mL quando uma dose única de 480 mg de lumefantrina (4 comprimidos) foi administrada (ZENG *et al.*, 1996; CÉSAR, *et al.*, 2011; SETHI *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2018). Dessa forma, o método

desenvolvido e validado corrobora com outros trabalhos que foram publicados previamente, visto que as concentrações plasmáticas obtidas para a lumefantrina encontram-se próximas a esses valores. Para a desbutil-lumefantrina, é descrito que a biotransformação da lumefantrina produz cerca de 1% desse metabólito no organismo (CHILUKURI & COLANGELO, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2013). As concentrações plasmáticas encontradas de desbutil-lumefantrina, apesar de inferiores ao LIQ, foram próximas de 20 ng/mL, o que corresponde a aproximadamente 1% da concentração encontrada para o fármaco precursor (2000 ng/mL), demonstrando que realmente a biotransformação da lumefantrina em seu metabólito ocorre em pequena extensão. Nos trabalhos realizados por Khuda e colaboradores (2014) e Khalil e colaboradores (2011), a concentração de desbutil-lumefantrina em estudos farmacocinéticos ficou abaixo do limite de detecção dos métodos desenvolvidos.

Até o presente momento, não foi encontrado nenhum trabalho que aplicasse a MEPS no preparo de amostras para métodos empregados na quantificação de lumefantrina em amostras biológicas. O método desenvolvido e validado com extração por MEPS apresentou uma recuperação dos analitos acima de 90%. Em trabalhos descritos na literatura com outras técnicas, as recuperações para a lumefantrina foram inferiores às obtidas com o método proposto (**Tabela 39**), demonstrando que além do método consumir um menor volume de amostra e de reagentes, ele foi mais eficiente do que os métodos anteriormente propostos. O método por MEPS poderia ter sido ainda mais eficiente se tivesse sido aplicado de uma forma automatizada, com aparato específico. A redução na quantidade de amostra pode contribuir para a viabilidade das análises e conforto do paciente, visto que não é mais necessário grande volume de sangue para executar as análises. Além disso, o menor consumo de solventes torna o método mais sustentável, gerando menos resíduos e contribuindo para a química verde.

O desenvolvimento de métodos simples e inovadores para a monitorização terapêutica de antimaláricos no sangue, como a lumefantrina, é uma ferramenta muito importante para o tratamento e manejo da doença. Um dos grandes problemas de saúde pública, em doenças como a malária, é a baixa eficácia de muitos fármacos frente ao plasmódio devido ao desenvolvimento de resistência desses protozoários. Isso ocorre devido a uma característica farmacocinética intrínseca do fármaco, que

é a meia-vida longa. Fármacos com essa característica permanecem em concentrações subterapêuticas no plasma, eliminando os parasitas mais suscetíveis e permitindo que aqueles mais resistentes continuem seu ciclo (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

Tabela 39 – Comparação da recuperação obtida em outros estudos publicados na literatura científica com técnicas distintas e o método desenvolvido por MEPS no presente trabalho.

| Técnica de extração | Porcentagem de recuperação de lumefantrina | Referência |
|---|--|--------------------------------|
| Método em estudo | 95,46% | - |
| Precipitação de proteínas (acetoneitrila: ácido acético 99:1) | 89,00% | Annenberg <i>et al.</i> , 2005 |
| Precipitação de proteínas (metanol com 0,5% de ácido acético) | 82,10% | César <i>et al.</i> , 2011 |
| Extração em fase sólida (cartucho C8) | 85,10% | Sethi <i>et al.</i> , 2011 |
| Extração líquido-líquido (hexano-acetato de etila 70:30) | 88,00% | Khalil <i>et al.</i> , 2011 |
| Extração líquido-líquido (hexano: acetato de etila 75:25) | 89,11% | Khuda <i>et al.</i> , 2014 |
| Extração em fase sólida com polímero molecularmente impresso | 85,42% | Da Silva <i>et al.</i> , 2018 |

Além disso, tem-se um grande problema no mercado farmacêutico que é a falsificação e má qualidade de medicamentos (GRECH *et al.*, 2018). A utilização desses medicamentos pode contribuir para o desenvolvimento de resistência do plasmódio em áreas endêmicas de malária, devido à exposição a doses subterapêuticas do fármaco (GREEN *et al.*, 2001; ATEMNKENG *et al.*, 2007). Diante do exposto, o desenvolvimento de métodos bioanalíticos simples, confiáveis e rápidos é essencial para identificação e determinação quantitativa dos fármacos, contribuindo para uma terapia segura e eficaz e evitando doses subterapêuticas dos antimaláricos no sangue. Ademais, o desenvolvimento desses novos métodos pode contribuir para pesquisas futuras de farmacocinética e farmacodinâmica de lumefantrina em diferentes condições.

6 CONCLUSÃO

- ❖ O método bioanalítico por CLAE com detecção UV (305 nm) desenvolvido se mostrou simples e adequado para quantificação de lumefantrina e seu metabólito em plasma. O método demonstrou ser seletivo, linear na faixa de 50 a 5000 ng/mL, preciso (DPR < 1,3%), exato (EPR médio de 7,81% para lumefantrina e de 4,35% para desbutil-lumefantrina), sem efeito matriz ou residual, podendo ser empregado para quantificação dos analitos.
- ❖ A técnica de extração dos analitos por MEPS apresentou taxas de recuperação acima de 90%, evidenciando que essa técnica pode ser aplicada de forma satisfatória e eficaz. O cartucho de MEPS demonstrou uma durabilidade satisfatória podendo ser utilizado por várias sequências de análises, desde que se tome os cuidados necessários para que ele não sature.
- ❖ O metabólito, desbutil-lumefantrina, devido à sua baixa concentração plasmática, não pode ser quantificado pelo método proposto. Entretanto, foi possível evidenciar sua presença nos cromatogramas obtidos com o método. A concentração plasmática obtida para a lumefantrina (cerca de 1700 ng/mL) apresentou concordância com outros métodos desenvolvidos anteriormente, evidenciando que o método é capaz de quantificar satisfatoriamente o analito.
- ❖ A comparação com estudos anteriores demonstrou que o método desenvolvido e validado apresentou um desempenho melhor na extração, com tempo de análise e consumo de solventes menores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 317-321, 2004.

ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2569-2580, 2010.

ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 119-128, 2011.

ADAM, M., PAVLÍKOVÁ, P., ČÍŽKOVÁ, A, BAJEROVÁ, P, VENTURA, K., Microextraction by packed sorbent (MEPS) as a suitable selective method for L-ascorbic acid determination in beverages, **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1613-1618, 2012.

ALTUN, Z.; ABDEL-REHIM, M. Study of the factors affecting the performance of microextraction by packed sorbent (MEPS) using liquid scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 630, n. 2, p. 116-23, 2008.

ALTUN, Z.; ABDEL-REHIM, M.; BLOMBERG, L. G. New trends in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications: Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent, and MEPS–LC–MS–MS. **Journal of Chromatography B**, v. 813, n. 1, p. 129-135, 2004.

ALVES, G., RODRIGUES, M., FORTUNA, A., FALCÃO, A., QUEIROZ, J., A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 5, n. 11, p. 1409-42, Jun 2013.

ANNENBERG, A., SINGTOROJ, T., TIPMANEE, P., WHITE, N.J., DAY, N.P.J., LINDEGARDH, N., High throughput assay for determination of lumefantrine in plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 822, p. 330-333, 2005.

ARES, A.M., FERNÁNDEZ, P., REGENJO, M., FERNÁNDEZ, A.M., CARRO, A.M., LORENZO, R.A., A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC–MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid, **Talanta**, v. 174, p. 454-461, 2017.

ATEMNKENG, M. A.; MARCHAND, E.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Assay of artemether, methylparaben and propylparaben in a formulated paediatric antimalarial dry suspension. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 727-732, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 4. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414

BEZERRA, M. A., SANTELLI, R. E., OLIVEIRA, E. P., VILLAR, L. S., ESCALEIRA, L. A., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BLESSBORN, D; ROMSING, S.; BERGQVIST, Y.; LINDEGARDH, N. Assay for screening for six antimalarial drugs and one metabolite using dried blood spot sampling, sequential extraction and ion-trap detection. **Bioanalysis**, London, v. 2, p. 1839-1847, 2010.

BLOMBERG, L. G. Two new techniques for sample preparation in bioanalysis: Microextraction in packed sorbent (MEPS) and use of a bonded monolith as sorbent for sample preparation in polypropylene tips for 96-well plates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 3, p. 797-807, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação

de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, 2012.

BREITKREITZ, M. C.; POPPI, R. J. Experimento didático de Quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de Ferro com o-fenantrina: um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 564, 2014.

BUICK, A. R., DOIG, M. V., JEAL, S. C., LAND, G. S., MCDOWALL, R. D., Method validation in the bioanalytical laboratory. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 8, n. 8-12, p. 629-37, 1990.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. Planejamento de Experimentos usando Statistica. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260

CÉSAR, I. C. Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano. Tese (Doutorado em Química). Faculdade da Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009

CÉSAR, I. C.; ANDRADE, F. H. N.; PIANETTI, G. A. Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 951-954, 2008.

CÉSAR, I. C., RIBEIRO, J. A., TEIXEIRA, L. S., BELLORIO, K. B., DE ABREU, F. C., MOREIRA, J. M., CHELLINI, P. R., PIANETTI, G.A., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in human plasma: application for a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 1, p. 114-120, 2011.

DA SILVA, P. H. R., DINIZ, M. L. V., PIANETTI, G. A., CÉSAR, I. C., SILVA, M. E. S. R., FREITAS, R. F. S., SOUSA, R. G., FERNANDES, C., Molecularly imprinted polymer for determination of lumefantrine in human plasma through chemometric-

assisted solid-phase extraction and liquid chromatography. **Talanta**, v. 184, p. 173-183, 2018.

DEMING, S. N. Practical experimental designs and optimization methods for chemists, Charles K. Bayne and Ira B. Rubin, VCH Publishers, Inc., Deerfield Beach, FL, U.S.A. 1986. ISBN 0-89573-136-3. Price: \$39.50. **Journal of Chemometrics**, v. 1, n. 4, p. 249-249, 1987.

EL-BEQQALI, A., KUSSAK, A., BLOMBERG, L., ABDEL-REHIM, M., Microextraction in Packed Syringe/Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry for Quantification of Acebutolol and Metoprolol in Human Plasma and Urine Samples, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 4, p. 575-586, 2007.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guidelines on Bioanalytical Method Validation**. London, jul. 2011.

FONG, B. M.-W. et al. Development and validation of a high-throughput double solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of tetrodotoxin in human urine and plasma. **Talanta**, v. 83, n. 3, p. 1030-1036, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*. Rockville, May 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*. Rockville, set. 2013.

GALDAMEZ, E. V. C. Aplicação de técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos. Dissertação de Mestrado. São Carlos, p.133. 2002

GALLAY, J., PROD'HOM, S., MERCIER, T., BARDINET, C., SPAGGIARI, D., POTHIN, E., BUCLIN, T., GENTON, B., DECOSTERD, L. A., LC–MS/MS method for

the simultaneous analysis of seven antimalarials and two active e metabolites in dried blood spots for applications in field trials: Analytical and clinical validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 154, p. 263-277, 2018.

GONZALEZ, O., BLANCO, M. E., IRIARTE, G. BARTOLOMÉ, L., MAGUREGUI, M. I., ALONSO, R. M., Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 10-27, 2014.

GOVENDER, K.; GIBHARD, L.; DU PLESSIS, L.; WIESNER, L. Development and validation of a LC-MS/MS method for the quantitation of lumefantrine in mouse blood and plasma. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 985, p-6-13, 2015.

GRECH, J., ROBERTSON, J., THOMAS, J., COOPER, G., NAUNTON, M., KELLY, T., An empirical review of antimalarial quality field surveys: the importance of characterising outcomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 612-623, 2018.

GREEN, M. D.; MOUNT, D. L.; WIRTZ, R. A. Authentication of artemether, artesunate and dihydroartemisinin antimalarial tablets using a simple colorimetric method. **Tropical medicine and international health**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 980-982, 2001.

HUANG, L.; LI, X.; MARZAN, F.; LIZAK, P. S.; AWEEKKA, F. T. Determination of lumefantrine in small-volume human plasma by LC-MS/MS: using a deuterated lumefantrine to overcome matrix effect and ionization saturation. **Bioanalysis**, London, v. 4, p 157-166, 2012.

KHALIL, I. F., ABILDRUP, U., ALIFRANGIS, L. H., MAIGA, D., ALIFRANGIS, M., HOEGBERG, L., VESTERGAARD, L. S., PERSSON, O.P., NYAGONDE, N., LEMNGE, M. M., THEANDER, T. G., BYGBJERG, I. C., Measurement of lumefantrine and its metabolite in plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 1, p. 168-172, 2011.

KHUDA, F., IQBAL, Z., SHAH, Y., AHMMAD, L., NASIR, F., KHAN, A. Z., AMANULLAH, SHAHBAZ, N., Method development and validation for simultaneous determination of lumefantrine and its major metabolite, desbutyl lumefantrine in human plasma using RP-HPLC/UV detection. **Journal of Chromatography B**, v. 944, p. 114-122, 2014.

LIU, Y. SUN, J., LIAN, H., LI, X., CAO, W., BAI, L., WANG, Y., HE, Z., Determination of paclitaxel in hyaluronic acid polymeric micelles in rat blood by protein precipitation-micelle breaking method: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 935, p. 10-15, 2013.

MAGANDA, B.; HEUDI, O.; CORTINOVIS, A.; PICARD, F.; KRETZ, O.; MINZI, O. A fast and reliable reversed phase high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of selected anti-retroviral and lumefantrine in human plasma. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 919, p. 52-60, 2013.

MANDRIOLI, R., MERCOLINI, L., LATEANA, D., BONCOMPAGNI, G., RAGGI, M. A., Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV. **Journal of chromatography B**, I, v. 879, n. 2, p. 167-173, 2011.

MUNJAL, V.; PALIWAL, N.; CHAURSIA, B. K.; VARSHNEY, B.; AHMED, T.; PALIWAL, J. LC-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantification of Lumefantrine in Human Plasma and Its Application to Bioequivalence Study. **Chromatographia**, New York, v. 71, p. 505-510, 2010.

MOEIN, M. M. Towards more selective sorbents for extraction of drugs and biomarkers from biological fluids using molecularly imprinted polymers. Doctoral Thesis. Stockholm. 2014

MOEIN, M. M.; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 34-44, 2015.

MOEIN, M. M.; EL BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 3-11, 2017.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. 8 ed. New York: Wiley, 2012. 752p.

NAMERA, A., SAITO, T., OTA, S., MIYAZAKI, S., OIKAWA, H., MURATA, K., NAGAO, M., Optimization and application of octadecyl-modified monolithic silica for solid-phase extraction of drugs in whole blood samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1517, p. 9-17, 2017.

NIELSEN, M. K. K.; JOHANSEN, S. S. Determination of Olanzapine in Whole Blood Using Simple Protein Precipitation and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 212-217, 2009.

NOEDL, H., ALLMENDINGER, T., PRAJAKWONG, S., WERNSDORFER, G., WERNSDORFER, W.H., Desbutyl-Benflumetol, a Novel Antimalarial Compound: In Vitro Activity in Fresh Isolates of Plasmodium falciparum from Thailand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2106-2109, 2001.

PINHEIRO, P. N. Q., PENICHE, J. S. R., SCHALCHE, T. R., FERREIRA, M. E. S., CAMPOS, A. R. F., Aspectos farmacológicos do antimalárico lumefantrina. **Revista Paraense de Medicina**, v. 27, n. 1, 2013.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RANI, S.; MALIK, A. K. A novel microextraction by packed sorbent-gas chromatography procedure for the simultaneous analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 21, p. 2970-7, 2012.

RANI, S.; MALIK, A. K.; SINGH, B. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 3, p. 359-66, 2012.

RIVELLI, G. G., RICOY, L. B. M., CÉSAR, I. C., FERNANDES, C., PIANETTI, G. A., Level A in vitro-in vivo correlation: Application to establish a dissolution test for artemether and lumefantrine tablets. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 155, p. 262-269, 2018.

SANDHYA, S. M.; SHIJI KUMAR, P. S.; MEENA, S. A sensitive liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of lumefantrine and artemether in human plasma. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, Ayush, v. 5, n. 2, 2015.

SARACINO, M. MARCHESSELLI, C., SOMAINI, L., PIERI, M. C., GERRA, G., FERRANTI, A., RAGGI, M. A., A novel test using dried blood spots for the chromatographic assay of methadone. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 2, p. 503-511, 2012.

SARACINO, M. A., LAZZARA, G., PRUGNOLI, B., RAGGI, M. A., Rapid assays of clozapine and its metabolites in dried blood spots by liquid chromatography and microextraction by packed sorbent procedure. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 16, p. 2153-2159, 2011.

SARACINO, M. A.; TALLARICO, K.; RAGGI, M. A. Liquid chromatographic analysis of oxcarbazepine and its metabolites in plasma and saliva after a novel microextraction by packed sorbent procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 222-228, 2010.

SETHI, P.; DUA, V. K.; JAIN, R. A LC-MS/MS method for the determination of lumefantrine and its metabolite desbutyl-lumefantrine in plasma from patients infected with plasmodium falciparum malaria. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, n. 20, p. 2674-2688, 2011.

SILVA, A. V.; MWEBAZA, N.; NTALE, M.; GUSTAFSSON, L. L.; POHANKA, A. A., fast and sensitive method for quantifying lumefantrina and desbutyl-lumefantrine using LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 1004, p. 60-66, 2015.

SNOW, N. H., Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1, p. 445-455, 2000.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L., Practical HPLC method development. 2. ed. New York: 1997.

SOMAINI, L., SARACINO, M. A., MARCHESELLI, C., ZANCHINI, S., GERRA, G., RAGGI, M. A., Combined liquid chromatography-coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients. **Analytical Chimica Acta**, v. 702, n. 2, p. 280-7, 2011.

STEWART, W. E., Statistics for experimenters, George E. P. Box, William G. Hunter and J. Stuart Hunter, John Wiley & Sons, Inc. (1978), 653 pages, \$23.95. **AIChE Journal**, v. 25, n. 2, p. 383-383, 1979.

TAKITANE, J. LEYTON, V., ANDREUCETTI, G., GJERDE, H., VINDENES, V., BERG, T., Determination of cocaine, metabolites and a crack cocaine biomarker in whole blood by liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS. **Forensic Science International**, v. 289, p. 165-174, 2018.

TELVING, R.; HASSELSTRØM, J. B.; ANDREASEN, M. F. Targeted toxicological screening for acidic, neutral and basic substances in postmortem and antemortem whole blood using simple protein precipitation and UPLC-HR-TOF-MS. **Forensic Science International**, v. 266, p. 453-461, 2016.

VUCKOVIC, D., ZHANG, X., CUDJOE, E., PAWLISZYN, J., Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4041-4060, 2010.

WAHAJUDDIN, M.; SINGH, S. P.; ISHA, T.; RAJU, K. S. R.; GAYEN, J. R.; SIDDIQUI, H. H.; SINGH, S. K., Simultaneous quantification of proposed anti-malarial combination comprising of lumefantrine and CDRI 97-78 in rat plasma using the HPLC-ESI-MS/MS method: application to drug interaction study. **Malaria Journal**, London, v. 14, n. 172, 2015.

WIETECH-POŚLUSZNY, R., GARBACIK, A., WOŹNIAKIEWICZ, M., MOOS, A., WIECZOREK, M., KOŚCIELNIAK, P., Application of microextraction by packed sorbent to isolation of psychotropic drugs from human serum. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 7, p. 2249-2257, 2012.

WONGSRICHANALAI, C; PICKFORD, A. L.; WERNSDORFER, W. H.; MESHNICK, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 4, p. 209-218, 2002.

ZENG, M., LU, Z., YANG, S. LIAO, J., LIU, S., TENG, X., Determination of benflumetol in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 681, p. 299-306, 1996.

ZHANG, Y., ZHAO, Y. G., CHEN, W. S., CHENG, H. L., ZENG, X. Q., ZHU, Y., Three-dimensional ionic liquid-ferrite functionalized graphene oxide nanocomposite for pipette-tip solid phase extraction of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in human blood sample. **Journal of Chromatography A**, v. 1552, p. 1-9, 2018.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 54567716.4.0000.5149

Interessado(a): **Prof. Christian Fernandes**
Departamento de Produtos Farmacêuticos
Faculdade de Farmácia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de maio de 2016, o projeto de pesquisa intitulado "**Determinação de lumefantrina empregando extração em fase sólida molecularmente impressa e cromatografia líquida**", bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para o grupo 1 – Indivíduos não usuários de fármacos da classe dos antimaláricos)

Projeto de pesquisa de mestrado: “Determinação de lumefantrina empregando extração em fase sólida molecularmente impressa e cromatografia líquida”

Prezado(a) Sr.(a),

Você está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa que tem por objetivo desenvolver método que será utilizado para analisar substância presente em medicamento para o tratamento da malária, em sangue humano. Este método apresenta a vantagem de reduzir o consumo de substâncias químicas (reduzindo riscos para a saúde do trabalhador e ambiental), além de ser mais seletivo, quando comparado com os métodos convencionais.

Este estudo trará benefícios aos pacientes usuários de medicamentos usados no tratamento da malária, pela introdução de métodos modernos para a determinação de substância desta classe terapêutica.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 10 mL do seu sangue para realização das etapas do projeto. Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada associada à picada da agulha ou hematoma. Para reduzir esta reação local, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente, empregando rotina padronizada. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis. Outro risco associado ao procedimento de coleta de sangue, embora raro, é a sensação momentânea de tontura. Nesse caso, o profissional adotará as medidas pertinentes, para as quais está habilitado.

Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e que os dados particulares serão confidenciais. As amostras de sangue coletadas serão descartadas após a realização das análises.

Você não terá nenhum gasto, pois a coleta do sangue será feita na Faculdade de Farmácia da UFMG, de acordo com sua disponibilidade. Também não haverá remuneração para participação neste projeto.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão relacionados a seguir. As dúvidas relacionadas às questões éticas deverão ser esclarecidas com o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG. Você terá garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida que possa surgir relacionada ao estudo e também terá a liberdade de retirar seu consentimento e sair do estudo no momento em que desejar.

Se você compreendeu as informações e estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Christian Fernandes – cfernandes@farmacia.ufmg.br; 3409-6957

Isabela da Costa César – isabelacesar@ufmg.br; 3409-6958

Maria das Graças Carvalho – mgcwanner@gmail; 3409-6881

Sarah Siqueira – sarah.a.siqueira@gmail.com; 3409-6982

Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Faculdade de Farmácia - Campus UFMG

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. Sala 2005 – 2º andar. CEP: 31270-901. Telefone: 3409-4592.

NOME DO VOLUNTÁRIO: _____

Carteira de identidade: _____ Telefone: _____

Assinatura: _____ DATA: ____/____/____

Agradecemos sua valiosa participação!

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para o grupo 2 – Indivíduos sadios que farão uso de medicamento contendo arteméter e lumefantrina)

Projeto de pesquisa de mestrado: “Determinação de lumefantrina empregando extração em fase sólida molecularmente impressa e cromatografia líquida”

Prezado(a) Sr.(a),

Você está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa que tem por objetivo desenvolver método que será utilizado para analisar substância presente em medicamento para o tratamento da malária, em sangue humano. Este método apresenta a vantagem de reduzir o consumo de substâncias químicas (reduzindo riscos para a saúde do trabalhador e ambiental), além de ser mais seletivo, quando comparado com os métodos convencionais.

Este estudo trará benefícios aos pacientes usuários de medicamentos usados no tratamento da malária, pela introdução de métodos modernos para a determinação de substância desta classe terapêutica.

Para participar, você deverá atender aos critérios de inclusão no estudo. No dia da coleta, você deverá comparecer no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob coordenação da Profa. Dra. Luci Maria Sant’Ana Dusse, às 08:00 horas, em jejum. Você receberá um comprimido do medicamento Coartem (fabricado pela empresa Novartis), contendo arteméter (20 mg) e lumefantrina (120 mg), em dose única, e 200 mL de água potável. Serão coletados 10 mL do seu sangue 6 horas após administração do medicamento.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada associada à picada da agulha ou hematoma. Para reduzir esta reação local, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente, empregando rotina padronizada. Serão utilizadas agulhas e tubos descartáveis. Outro risco associado ao procedimento de coleta de sangue, embora raro, é a sensação momentânea de tontura. Nesse caso, o profissional adotará as medidas pertinentes, para as quais está habilitado. Os possíveis efeitos adversos do medicamento usado no estudo (contendo arteméter e lumefantrina) são considerados leves, bem toleráveis e reversíveis. Os principais são cefaleia, tontura, vômito, dor abdominal, náusea, diminuição no apetite, artralgia e mialgia. Caso os efeitos adversos se prolonguem ou ocorram intercorrências clínicas, você contará com assistência médica gratuita.

Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e que os dados particulares serão confidenciais. As amostras de sangue coletadas serão descartadas após a realização das análises.

Você não terá nenhum gasto, pois a coleta do sangue será feita na Faculdade de Farmácia da UFMG, de acordo com sua disponibilidade. Também não haverá remuneração para participação neste projeto.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão relacionados a seguir. As dúvidas relacionadas às questões éticas deverão ser esclarecidas com o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG. Você terá garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida que possa surgir relacionada ao estudo e também terá a liberdade de retirar seu consentimento e sair do estudo no momento em que desejar.

Se você compreendeu as informações e estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Responsáveis:

Christian Fernandes – cfernandes@farmacia.ufmg.br; 3409-6957

Isabela da Costa César – isabelacesar@ufmg.br; 3409-6958

Maria das Graças Carvalho – mgcwanner@gmail; 3409-6881

Sarah Siqueira – sarah.a.siqueira@gmail.com; 3409-6982

Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Faculdade de Farmácia - Campus UFMG

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. Sala 2005 – 2º andar. CEP: 31270-901. Telefone: 3409-4592.

NOME DO VOLUNTÁRIO: _____

Carteira de identidade: _____ Telefone: _____

Assinatura: _____ DATA: ____/____/____

Agradecemos sua valiosa participação!