

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

GRAZIELLA GOMES RIVELLI

**ESTUDO DE DISSOLUÇÃO DE ARTEMÉTER E LUMEFANTRINA EM
COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA PARA AVALIAÇÃO DE
CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO***

Belo Horizonte - MG

2016

GRAZIELLA GOMES RIVELLI

**ESTUDO DE DISSOLUÇÃO DE ARTEMÉTER E LUMEFANTRINA EM
COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA PARA AVALIAÇÃO DE
CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO***

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestra em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti
- UFMG

Coorientador: Profa. Dra. Isabela da Costa César - UFMG

Belo Horizonte - MG

2016



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO DE DISSOLUÇÃO DE ARTEMETER E LUMEFANTRINA EM
COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA PARA AVALIAÇÃO DE
CORRELAÇÃO IN VITRO-IN VIVO

GRAZIELLA GOMES RIVELLI

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 12 de julho de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Paula Rocha Chellini
UFJF

Prof. Christian Fernandes
UFMG

Profa. Isabela da Costa César - Coordenadora
UFMG

Prof. Gerson Antônio Pianetti - Orientador
UFMG

Belo Horizonte, 12 de julho de 2016.

Dedico esse trabalho...
à Alice e ao Tiago, fontes de luz e felicidade,
aos meus pais, Maria das Graças e Espedito, exemplos de determinação, sabedoria
e coragem,
Ao meu Ramiro, grande amor, ontem, hoje e sempre...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por colocar em meu caminho pessoas especiais.

Ao Professor Gerson Antônio Pianetti, por quem tenho a mais profunda admiração. Você "abraça minha alma com a doçura da amizade". O orientador que me acompanhou e cujos ensinamentos transcendem o saber científico. A cada conversa uma "dose" de aprendizado, em sua totalidade. Agradeço por todos os momentos que estivemos juntos e desejo sempre a graça do seu convívio.

À Professora Isabela Costa César, idealizadora desse projeto, agradeço pela oportunidade de dar continuidade às suas ideias, pela confiança, pela atenção dedicada durante o mestrado e orientações ao longo do trabalho.

À Professora Cristina Duarte Vianna Soares e ao Professor Christian Fernandes pela disponibilidade e colaboração nas soluções dos problemas técnicos.

A minha família, minha fortaleza. Meus filhos Alice e Tiago, meus amores, com quem compartilho o dom divino da maternidade, que alegram e coloremeus dias. Meu amor Ramiro, companheiro de vida, agradeço pelo apoio, carinho e desprendimento. Meus pais, Espedito e Maria das Graças, pelos exemplos diários de determinação e persistência, minhas irmãs Érika e Giovana, pela amizade e lealdade e à Maria Fernanda, pelo amor e carinho. Amo vocês! Aos meus familiares: Raimundo e Maria das Graças, Anar, Maria Olívia, Mara, Mateus, Chico, ao meu sobrinho Miguel, agradeço todo suporte e torcida.

A minha "anja" Jana, por sempre me ouvir, aconselhar e influenciar. Agradeço a Deus por tê-la colocado em meu caminho. A minha querida Dard, agradeço pelas oportunidades, trocas de ideias e conhecimento, confiança e amizade. Aos amigos maravilhosos, Fabiana Abrantes, Luiz Cardoso e Mari Jankunas, agradeço pela torcida e por estarem sempre por perto.

Aos amigos que encontrei durante o mestrado: Aninha, Ju Veloso e Pedro Reis, agradeço os nossos momentos de cafés e pães de queijo, troca de ideias, boas risadas e ajudas técnico-científicas. Nosso encontro é muito especial. À Naialy, com quem pude contar e recorrer em todos os momentos do meu trabalho, agradeço o carinho, a disponibilidade, a preocupação e por compartilhar suas experiências práticas e profissionais. À Ju Brêtas, Mateus Souza e Pedro Franco, agradeço a disponibilidade transmitir os conhecimentos operacionais em CLAE, sempre com muita paciência e, também, por compartilhar as boas ideias. Aos queridos do LCQ e CEDAFAR, que me receberam carinhosamente desde o início do mestrado, Paula Chellini, Carlos Eduardo, Jéssica Assis, Clara Elisa, Luciano Quaresma, Diego, Écio Geovani, Leonardo, Miriam, Tânia e Lúcia; e também aos que foram chegando ao decorrer desses dois anos: Ana Carolina, Camila Brêtas, Talita Valle, Jéssica Malta, Priscila, André Nascimento, Ingrid, Melina e Bárbara, uma grande família.

Ao professor Ricardo José Alves, um ser humano fantástico, agradeço a receptividade, disponibilidade e muita atenção em compartilhar seus conhecimentos. Ao Vitor Cunha e Lucas, agradeço pela disponibilidade e prontidão em realizar as análises espectroscópicas. Ao Vinícius Viana do LTF-FAFAR e Diego do laboratório de Fitoquímica, pela disposição e auxílio na realização dos testes de tamanho de partícula.

À Letícia Ricoy, agradeço pela grande ajuda voluntária, por ser minha companheira de trabalho realizado e compartilhar as descobertas.

Ao colegiado da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, agradeço pela oportunidade de defender os interesses dos discentes do programa visando o bem comum, e também, pela oportunidade de aprimoramento pessoal sobre o funcionamento do ambiente acadêmico e de pesquisa.

Ao Ministério da Saúde, nas pessoas do Sr. Luiz Henrique Costa e do Sr. Cristiano Fagundes da Rocha, por disponibilizarem as amostras para realização dos estudos.

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro e à Farmacopeia Brasileira, por possibilitar a minha continuidade na busca do saber científico.

“Nada está no intelecto sem antes ter passado pelos sentidos”.

Aristóteles

"No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo.

Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz".

Ayrton Senna

RESUMO

Atualmente, a malária é a infecção parasitária de maior incidência mundial. A terapia de combinação com artemisinina (*artemisinin based combination therapy* - ACT) tem sido proposta como um tratamento promissor para malária, sendo arteméter+lumefantrina (20+120 mg) a principal associação recomendada em áreas endêmicas. Apesar de sua ampla utilização, há ainda literatura incipiente sobre a dissolução de arteméter e lumefantrina, o que reflete na ausência de método específico em farmacopeias e códigos internacionais. Por se tratarem de fármacos pouco solúveis, tanto arteméter quanto lumefantrina são candidatos ao desenvolvimento de métodos de dissolução utilizando-se correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV). Neste trabalho, os métodos de dissolução para arteméter e lumefantrina foram desenvolvidos e validados de acordo com as diretrizes dos guias da ANVISA e do FDA. Foram realizados perfis de dissolução, avaliando os resultados obtidos com modificações alternadas dos parâmetros do teste, tais como composição do meio, pH, concentração de tensoativo e velocidade de agitação. Os testes foram realizados utilizando o mesmo lote de Coartem® avaliado em um estudo farmacocinético prévio, e os dados *in vivo* foram utilizados para selecionar as condições ideais para o ensaio de dissolução, baseado na CIVIV. Para quantificação dos fármacos, foi otimizado e validado um método seletivo por cromatografia a líquido de alta eficiência. Para essa formulação, as melhores condições encontradas para arteméter foram: pás, 900 mL de meio de dissolução contendo tampão pH 6,80 com 1% de laurilsulfato de sódio e velocidade de agitação de 100 rpm. Já para lumefantrina, as melhores condições encontradas foram: pás, 900 mL de meio de dissolução contendo tampão pH 1,20 com 1% de polissorbato 80 e velocidade de agitação de 100 rpm. Após a obtenção da curva da fração absorvida em função da fração dissolvida, os valores de coeficiente angular encontrados foram superiores a 0,95 para ambos os fármacos. Desta forma, foram estabelecidos métodos e critérios para ensaios de dissolução dos comprimidos de arteméter e lumefantrina em dose fixa combinada e, conseqüentemente, para elaboração da monografia para compor a Farmacopeia Brasileira.

Palavras chave: arteméter, lumefantrina, solubilidade em equilíbrio, dissolução, classificação biofarmacêutica, correlação *in vitro-in vivo*.

ABSTRACT

Nowadays, malaria is the most incident parasite infection worldwide. Artemisinin based combination therapy (ACT) has been proposed as a promising treatment for malaria, and artemether+lumefantrine (20 + 120 mg) is the main recommended association in endemic areas. Despite its widespread use, there is still incipient literature for dissolution of artemether and lumefantrine, reflecting in absence of specific method in pharmacopoeias and international codes. Because its low solubility, both artemether and lumefantrine are candidates for development of dissolution methods using *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC). In this study, dissolution methods for artemether and lumefantrine were developed and validated according to ANVISA and FDA guidelines. Dissolution profiles were performed, evaluating the results obtained with alternate changes of test parameters such as medium composition, pH, surfactant concentration and rotation speed. Experiments were conducted using the same batch of Coartem[®] evaluated in a previous pharmacokinetic study, and *in vivo* data were used to select the optimum conditions for dissolution test, based on IVIVC. For drugs quantitation, a selective method by high performance liquid chromatography was optimized and validated. For this formulation, the best conditions found for artemether were: paddle, 900 mL of dissolution medium containing pH 6.8 buffer with 1% sodium lauryl sulfate and rotation speed of 100 rpm. For lumefantrine, the best conditions were: paddle, 900 ml of dissolution medium containing pH 1.2 buffer with 1% polysorbate 80 and rotation speed of 100 rpm. After obtaining the curve of absorbed fraction due to dissolved fraction, the calculated slope values were above 0.95 for both drugs. Thus, methods and criteria were established for testing dissolution of artemether and lumefantrine tablets and consequently, for the elaboration of monograph for Brazilian Pharmacopoeia.

Keywords: artemether, lumefantrine, equilibrium solubility, dissolution, biopharmaceutical classification, *in vitro-in vivo* correlation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Método 1 (cestas).....	26
Figura 2 - Método 2 (pás).....	26
Figura 3 - Correlação nível A.	29
Figura 4 - Correlação nível B.	29
Figura 5 - Correlação nível C.	30
Figura 6 - Classes de Fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	31
Figura 7 - Ciclo de vida das espécies de <i>Plasmodium</i> causadoras de malária.....	35
Figura 8 - Espectro na região do infravermelho de arteméter, para a amostra.....	53
Figura 9 - Cromatograma da solução (1) do teste de substâncias relacionadas de arteméter insumo farmacêutico ativo por CLAE.	55
Figura 10 - Espectro da região do infravermelho de lumefantrina, para a amostra.....	59
Figura 11 - Espectro da região do ultravioleta, na faixa de 276 nm a 325 nm de lumefantrina, para a amostra.....	60
Figura 12 - Distribuição de resíduos obtidos no teste de <i>Jacknife</i> do método de doseamento de arteméter por CLAE, no intervalo de 48,00 a 112,00 µg/mL.....	81
Figura 13 - Curva analítica do doseamento de arteméter por CLAE, no intervalo de 48,00 a 112,00 µg/mL.	82
Figura 14 - Cromatograma da solução de arteméter a 80,00 µg/mL.....	83
Figura 15 - Cromatograma da degradação oxidativa de arteméter.	83
Figura 16 - Cromatograma da hidrólise alcalina de arteméter.....	84
Figura 17 - Distribuição de resíduos obtidos no teste de <i>Jacknife</i> do método de doseamento de lumefantrina por CLAE, no intervalo de 19,20 a 28,80 µg/mL.....	88
Figura 18 - Curva analítica do método de doseamento de lumefantrina por CLAE, no intervalo de 19,20 a 28,80 µg/mL.	89
Figura 19 - Cromatograma da solução de lumefantrina a 24,00 µg/mL.....	90
Figura 20 - Cromatograma da degradação alcalina de lumefantrina.	91
Figura 21 - Cromatograma da degradação de lumefantrina na presença de íons metálicos.	91
Figura 22 - Cromatograma da degradação oxidativa de lumefantrina.....	92
Figura 23 - Distribuições de resíduos obtidos no teste de <i>Jacknife</i> do método de doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos por CLAE.....	96
Figura 24 - Curvas analíticas do método de doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos por CLAE.....	97
Figura 25 - Cromatograma da solução de arteméter a 20,00 µg/mL e lumefantrina a 120,00 µg/mL em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).....	98
Figura 26 - Cromatograma da degradação alcalina de arteméter em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).	98
Figura 27 - Cromatogramas obtidos a partir da condição de degradação de hidrólise ácida de arteméter em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul)..	99
Figura 28 - Cromatograma da degradação de arteméter na presença de íons metálicos em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).....	
Figura 29 - Cromatograma do diluente em comprimento de onda de 210 nm e 390 nm (azul).	100

/continua

LISTA DE FIGURAS (continuação)

Figura 30 - Cromatograma do placebo em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).....	101
Figura 31 - Cromatograma de solução de lumefantrina a 120 µg/mL em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).	101
Figura 32 - Cromatograma da degradação em calor seco da lumefantrina nos comprimentos de onda 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).	102
Figura 33 - Cromatogramas da degradação de lumefantrina na presença de íons metálicos nos comprimentos de onda 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).....	103
Figura 34 - Cromatograma da solução de arteméter a 20 µg/mL, preparado isolamente, nos comprimentos de onda 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).	103
Figura 35 - Distribuições de resíduos obtidos no teste de <i>Jackknife</i> dos métodos de dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos por CLAE.	108
Figura 36 - Curvas analíticas dos métodos de dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos por CLAE.	108
Figura 37 - Cromatograma do meio de dissolução pH 6,80 + 1,00%LSS em comprimentos de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).	109
Figura 38 - Cromatograma obtido a partir da análise da solução tampão pH 1,20 + 1% de polissorbato 80 em comprimento de onda de 390 nm (azul).	109
Figura 39 - Incubadora com plataforma de agitação orbital Tecnal TE-4080	116
Figura 40 - Experimento de solubilidade em equilíbrio para arteméter e lumefantrina, pelo método <i>shake-flask</i>	118
Figura 41 - Solubilidades de arteméter em meios biorrelevantes, obtidas pelo método de <i>shake-flask</i> , após 48 horas.	126
Figura 42 - Solubilidades de arteméter em diferentes meios, com adição de tensoativos, obtidas pelo método de <i>shake-flask</i> , após 48 horas.	127
Figura 43 - Solubilidades de arteméter em pH 7,20, com adição de tensoativos, obtidas pelo método de <i>shake-flask</i> , após 48 horas.	128
Figura 44 - Solubilidades de lumefantrina em meios biorrelevantes, obtidas pelo método de <i>shake-flask</i> após 48 horas.	130
Figura 45 - Solubilidades de lumefantrina em diferentes meios, com adição de tensoativos, obtidas pelo método de <i>shake-flask</i> , após 48 horas.	130
Figura 46 - Solubilidades de lumefantrina em pH 7,20, com adição de tensoativos obtidas pelo método de <i>shake-flask</i> , após 48 horas.	131
Figura 47 - Perfis de dissolução de arteméter, aparelhagem pás, 50 rpm e 900 mL de meio de dissolução.	135
Figura 48 - Perfis de dissolução de arteméter, aparelhagem cestas, 100 rpm e 900 mL de meio de dissolução.	135
Figura 49 - Perfis de dissolução de arteméter, aparelhagem pás, nos meios de dissolução pH 4,50; pH 4,50 + 1% LSS e pH 4,50 + 1% P80.	137
Figura 50 - Perfis de dissolução de arteméter, aparelhagem pás, nos meios de dissolução pH 6,80; pH 6,80 + 1% LSS e pH 6,80 + 1% P80.	138
Figura 51 - Perfis de dissolução de lumefantrina, aparelhagem pás, a 100 rpm, nos meios de dissolução pH 1,20 na presença de polissorbato 80.	139
Figura 52 - Decaimento das concentrações plasmáticas de arteméter após a administração da dose usual de Coartem (80 mg) (escala logarítmica).	140

/continua

LISTA DE FIGURAS (conclusão)

Figura 53 - Frações absorvidas de arteméter obtidas por deconvolução das concentrações plasmáticas em função do tempo.....	141
Figura 54 - Decaimento das concentrações plasmáticas de lumefantrina após a administração da dose usual de Coartem (480 mg) (escala logarítmica).....	142
Figura 55 - Frações absorvidas de lumefantrina obtidas por deconvolução das concentrações plasmáticas médias em função do tempo.....	143
Figura 56 - Correlação <i>in vitro-in vivo</i> nível A, para arteméter em comprimidos de Coartem®.....	145
Figura 57 - Correlação <i>in vitro-in vivo</i> nível A para lumefantrina em comprimidos de Coartem®.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário de aparelhagem do teste de dissolução e principais aplicações...	25
Tabela 2 - Expectativa de correlação <i>in vitro-in vivo</i> para medicamentos de liberação imediata de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica.....	33
Tabela 3 - Características físico-químicas dos fármacos.	40
Tabela 4 - Parâmetros estimados para os modelos farmacocinético de arteméter, diidroartemisinina e lumefantrina.....	41
Tabela 5 - Condições cromatográficas do método de quantificação de lumefantrina insumo farmacêutico ativo por cromatografia a líquido de alta eficiência.....	51
Tabela 6 - Testes de solubilidade para arteméter IFA realizados a 25 °C.	53
Tabela 7 - Substâncias relacionadas por CLAE para o arteméter IFA.	55
Tabela 8 - Doseamento de arteméter IFA por CLAE.	57
Tabela 9 - Tamanho médio de partículas de arteméter IFA.	57
Tabela 10 - Testes de solubilidade para lumefantrina IFA, realizados a 25°C.	58
Tabela 11 - Determinação da perda por dessecação (%) de lumefantrina IFA.	61
Tabela 12 - Doseamento de lumefantrina IFA por titulação potenciométrica.....	62
Tabela 13 - Resultado do doseamento de lumefantrina IFA por CLAE.....	63
Tabela 14 - Tamanho médio de partículas de lumefantrina IFA.	63
Tabela 15 - Métodos e respectivas finalidades.....	67
Tabela 16 - Condições cromatográficas do método de doseamento de arteméter insumo farmacêutico ativo por CLAE.	68
Tabela 17 - Condições cromatográficas do método de doseamento de lumefantrina insumo farmacêutico ativo por CLAE.	69
Tabela 18 - Condições cromatográficas da quantificação de arteméter e lumefantrina por CLAE.....	70
Tabela 19 - Métodos e intervalos avaliados da linearidade.	71
Tabela 20 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de doseamento de arteméter por CLAE.	72
Tabela 21 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.	72
Tabela 22 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de doseamento de arteméter e lumefantrina por CLAE.	72
Tabela 23 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de dissolução de arteméter e lumefantrina por CLAE.	72
Tabela 24 - Condições de degradação para avaliação da seletividade do método de doseamento de arteméter por CLAE.	74
Tabela 25 - Condições de degradação para avaliação da seletividade do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.	75
Tabela 26 - Condições de degradação para avaliação da seletividade do método de doseamento de arteméter e lumefantrina por CLAE.	75
Tabela 27 - Métodos e níveis estudados no parâmetro precisão.....	76
Tabela 28 - Métodos e intervalos estudados no parâmetro exatidão.....	77
Tabela 29 - Composição percentual estimada dos excipientes de Coartem® para avaliação da exatidão dos métodos de doseamento e dissolução.....	78
Tabela 30 - Parâmetros para a avaliação da robustez.....	79
Tabela 31 - Parâmetros para a avaliação da robustez do método de doseamento de arteméter por CLAE.	79

/continua

LISTA DE TABELAS (continuação)

Tabela 32 - Parâmetros para a avaliação da robustez do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.....	79
Tabela 33 - Parâmetros para a avaliação da robustez do método de doseamento de arteméter e lumefantrina por CLAE.....	79
Tabela 34 - Parâmetros para a avaliação da robustez do método de dissolução arteméter e lumefantrina por CLAE.....	80
Tabela 35 - Concentrações e média das áreas dos picos relativos ao arteméter, da curva analítica do método de doseamento por CLAE.....	80
Tabela 36 - Teor de arteméter sob diferentes condições de estresse.	82
Tabela 37 - Repetitividade do método de doseamento de arteméter por CLAE.....	85
Tabela 38 - Precisão intermediária do método de doseamento de arteméter por CLAE.	85
Tabela 39 - Exatidão do método de doseamento de arteméter por CLAE.	86
Tabela 40 - Robustez do método de doseamento de arteméter por CLAE.....	86
Tabela 41 - Concentrações e média das áreas dos picos relativos à lumefantrina, da curva analítica do método de doseamento por CLAE.....	87
Tabela 42 - Teor de lumefantrina sob diferentes condições de estresse.	89
Tabela 43 - Repetitividade do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.....	93
Tabela 44 - Precisão intermediária do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.....	93
Tabela 45 - Exatidão do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.	94
Tabela 46 - Robustez do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.....	94
Tabela 47 - Concentrações e médias das áreas dos picos relativos ao arteméter, da curva analítica do método de doseamento de comprimidos por CLAE.	95
Tabela 48 - Concentrações e médias das áreas dos picos relativos à lumefantrina, da curva analítica do método de doseamento de comprimidos por CLAE.	96
Tabela 49 - Premissas necessárias à utilização dos MMQO.....	96
Tabela 50 - Teor das amostras sob diferentes condições de estresse.....	97
Tabela 51 - Repetitividade do método de doseamento dos fármacos em comprimidos por CLAE.....	104
Tabela 52 - Precisão intermediária do método de doseamento dos fármacos em comprimidos por CLAE.....	104
Tabela 53 - Exatidão do método de doseamento dos fármacos em comprimidos por CLAE.....	105
Tabela 54 - Robustez do método de doseamento de arteméter em comprimidos por CLAE.....	106
Tabela 55 - Robustez do método de doseamento de lumefantrina em comprimidos por CLAE.....	106
Tabela 56 - Concentrações e médias das áreas dos picos relativos ao arteméter da curva analítica do método de dissolução por CLAE.	107
Tabela 57 - Concentrações e médias das áreas dos picos relativos à lumefantrina, da curva analítica do método de dissolução por CLAE.	107
Tabela 58 - Premissas necessárias à utilização dos MMQO.....	108
Tabela 59 - Repetitividade do método de dissolução dos fármacos em comprimidos por CLAE.....	110

/continua

LISTA DE TABELAS (conclusão)

Tabela 60 - Precisão intermediária do método de dissolução dos fármacos em comprimidos por CLAE.....	110
Tabela 61 - Exatidão do método de dissolução dos fármacos em comprimidos por CLAE.....	111
Tabela 62 - Robustez do método de dissolução de arteméter em comprimidos por CLAE.....	111
Tabela 63 - Robustez do método de dissolução de lumefantrina em comprimidos por CLAE.....	112
Tabela 64 - Preparo dos meios utilizados nos estudos de solubilidade em equilíbrio e dissolução.....	116
Tabela 65 - Condições iniciais para avaliação da fração dissolvida <i>in vitro</i>	121
Tabela 66 - Meios de dissolução para avaliação da fração dissolvida dos fármacos <i>in vitro</i>	122
Tabela 67 - Parâmetros farmacocinéticos de lumefantrina.	124
Tabela 68 - Solubilidade de arteméter nos meios biorrelevantes e relação dose:solubilidade.	125
Tabela 69 - Valores de pH dos meios durante o teste de solubilidade de arteméter. .	128
Tabela 70 - Solubilidade de lumefantrina nos meios biorrelevantes e relação dose:solubilidade.	129
Tabela 71 - Valores de pH dos meios durante o teste de solubilidade de lumefantrina.	131
Tabela 72 - Solubilidades de arteméter e lumefantrina nos meios biorrelevantes em teste realizado de forma combinada.	132
Tabela 73 - Valores de pH dos meios durante o teste de solubilidade arteméter e lumefantrina no <i>Experimento (3)</i>	132
Tabela 74 - Avaliação da diferença das médias de solubilidade por teste <i>t</i> de <i>Student</i> para os meios que apresentaram maior solubilidade para arteméter.....	133
Tabela 75 - Frações absorvidas de arteméter, obtidas por deconvolução das concentrações plasmáticas.	141
Tabela 76 - Parâmetros farmacocinéticos de lumefantrina.	142
Tabela 77 - Frações absorvidas de lumefantrina obtidas por deconvolução das concentrações plasmáticas.	143
Tabela 78 - Avaliação da relação <i>in vitro-in vivo</i> , para arteméter.....	144
Tabela 79 - Avaliação da relação <i>in vitro-in vivo</i> , para lumefantrina.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
C_s^{\min}	Solubilidade mínima na faixa de pH fisiológico
μL	Microlitro(s)
μm	Micrômetro(s)
ACT	<i>Artemisinin based combination therapy</i>
An	Número de absorção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ART	Arteméter
ASC	Área sob a curva
BCS	<i>Biopharmaceutical classification system</i>
C_{18}	Sílica ligada a grupos octadecilsilanos
CIVIV	Correlação <i>in vitro-in vivo</i>
Cl	Clearance
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
cm	Centímetro
C_{\max}	Concentração plasmática máxima
CuSO_4	Sulfato de cobre
DCB	Denominação comum brasileira
dm	Decímetro
Dn	Número de dissolução
Do	Número da dose
DPR	Desvio Padrão Relativo
EM	Espectrometria de Massas
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
h	Hora(s)
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IV	Infravermelho
IVIVC	<i>In vitro-in vivo correlation</i>
k	Fator de retenção

/continua

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (conclusão)

K_{21}	Constante de velocidade de distribuição do fármaco do compartimento periférico para o compartimento central
K_a	Constante de absorção
KCl	Cloreto de potássio
LMF	Lumefantrina
Log P	Coeficiente de partição
LSS	Laurilsulfato de sódio
M	Molar
min	Minuto (s)
mm	Milímetros
NaOH	Hidróxido de sódio
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
p/v	Peso por volume
P80	Polissorbato 80
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação
PNCM	Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária
PVDF	Membrana fluoreto polivinidileno
R	Coeficiente de correlação
R^2	Coeficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
SQR	Substância química de referência
SUS	Sistema Único de Saúde
T_{abs}	Tempo médio de absorção
T_{diss}	Tempo médio de dissolução
T_R	Tempo de Retenção
T_{res}	Tempo médio de residência
USP	Farmacopeia Americana, do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
V	Volume de distribuição
V_o	Volume gástrico inicial igual a 250 mililitros
α	Nível de significância
β	Constante de velocidade de eliminação (modelo bicompartimental)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 Dissolução	23
3.2 Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	27
3.3 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).....	30
3.4 Malária	34
3.5 Associação de arteméter e lumefantrina.....	39
3.5.1 Propriedades farmacocinéticas	40
3.5.2 Propriedades farmacodinâmicas	42
4 CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES SECUNDÁRIOS DE ARTEMÉTER E LUMEFANTRINA	43
4.1 Materiais.....	43
4.1.1 Substâncias químicas de referências e insumos farmacêuticos ativos ...	43
4.1.2 Reagentes	43
4.1.3 Materiais e vidrarias	43
4.1.4 Equipamentos.....	44
4.2 Métodos.....	45
4.2.1 Caracterização de arteméter insumo farmacêutico ativo como padrão secundário	45
4.2.2 Caracterização de lumefantrina insumo farmacêutico ativo como padrão secundário	48
4.3 Resultados e discussão.....	52
4.3.1 Caracterização de arteméter insumo farmacêutico ativo como padrão secundário	52
4.3.2 Caracterização e qualificação de lumefantrina insumo farmacêutico ativo como padrão secundário.....	57
4.4 Conclusões	64
5 CAPÍTULO II: OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DOSEAMENTO DE ARTEMETER E LUMEFANTRINA EM INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS E EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA	65
5.1 Materiais.....	65
5.1.1 Substâncias químicas de referências e insumos farmacêuticos ativos ...	65
5.1.2 Reagentes	65
5.1.3 Materiais e vidrarias	65
5.1.4 Equipamentos.....	66
5.2 Métodos.....	67
5.2.1 Condições analíticas.....	68
5.2.2 Validação dos métodos	71
5.3 Resultados e Discussão	80
5.3.1 Validação do doseamento de arteméter insumo farmacêutico ativo por CLAE	80
5.3.2 Validação do doseamento de lumefantrina insumo farmacêutico ativo por CLAE	87

5.3.3 Validação do método analítico para doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE	95
5.3.4 Validação do métodos analítico para dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE	107
5.4 Conclusões	112
6 CAPÍTULO III: ESTUDOS DE SOLUBILIDADE, DISSOLUÇÃO E CORRELAÇÃO <i>IN VITRO-IN VIVO</i>	114
6.1 Materiais.....	
6.1.1 Insumos farmacêuticos ativos	
6.1.2 Reagentes	114
6.1.3 Materiais e vidrarias	114
6.1.4 Equipamentos.....	115
6.2 Métodos.....	115
6.2.1 Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (<i>shake-flask</i>)	115
6.2.2 Estudos de dissolução	120
6.2.3 Tratamento dos dados do estudo farmacocinético.....	122
6.2.4 Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	123
6.3 Resultados e Discussão	125
6.3.1 Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (<i>shake-flask</i>)	125
6.3.2 Estudos de dissolução	134
6.3.3 Correlação <i>in vitro- in vivo</i>	140
6.4 Conclusões	147
7 CONCLUSÕES FINAIS	148
REFERÊNCIAS.....	149
APÊNDICE A - Minuta de monografia para lumefantrina insumo farmacêutico ativo	153

1 INTRODUÇÃO

A avaliação das características biofarmacêuticas dos fármacos permite uma compreensão ampla e aplicabilidade dos modelos matemáticos para estabelecer atributos de controle de qualidade de medicamentos. Biofarmacotécnica estuda a influência dos fatores físicos e físico-químicos relacionados ao fármaco e forma farmacêutica nos efeitos do organismo. O conceito de qualidade de um medicamento vai além de aspectos técnicos considerados essenciais tais como, identidade, pureza, teor, potência, dentre outros, sendo indispensável que o fármaco seja liberado na quantidade e na velocidade adequada ao objetivo terapêutico pretendido (STORPIRTIS, 2009).

Em 1995, Amidon e colaboradores propuseram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) que classifica os fármacos em função da sua solubilidade no meio fisiológico e sua permeabilidade intestinal, que são os principais fatores que regem a absorção dos fármacos por via oral. Esta classificação é amplamente utilizada na definição de especificações de métodos de dissolução e na correlação *in vitro-in vivo*.

O estudo da solubilidade em equilíbrio realizado pelo método agitação orbital em frasco (*shake- flask*) mimetiza as condições encontradas pela forma farmacêutica no trato gastrointestinal, com valores de pH entre 1,2 e 6,8, denominados “biorrelevantes”. A avaliação da permeabilidade emprega métodos *in vitro*, tais como membranas lipídicas artificiais, cultura de células, tecidos animais, dentre outros (ANVISA, 2011; FDA, 1997a).

A correlação *in vitro-in vivo* relaciona os dados de dissolução e dados farmacocinéticos e é classificada em quatro níveis, de acordo com o respectivo grau de importância. O comportamento da dissolução encontrado para o biolote pode ser usado para estabelecimento de limites de especificação de dissolução (ANVISA, 2002). O teste de dissolução é utilizado em controle de qualidade de medicamentos seguindo as boas práticas de fabricação, entretanto, nem sempre está relacionado ao efeito biológico esperado. Padrões de dissolução simples e inexpressivos constam em inúmeras monografias compendiais. A aplicação de estudos de

correlação *in vitro-in vivo* auxilia o desenvolvimento de métodos de dissolução que asseguram a qualidade do medicamento e biodisponibilidade do fármaco, além de ser uma ferramenta de desenvolvimento farmacotécnico e controle de alterações pós-registro (HANSON, 1991; STORPIRTIS, 2009).

Com o presente trabalho, visa-se utilizar modelos *in vitro* para avaliar a solubilidade em equilíbrio dos fármacos arteméter e lumefantrina, utilizados em dose fixa combinada para tratamento de malária aguda não grave causada por *Plasmodium falciparum*, estudar a fração dissolvida dos fármacos em função da faixa de pH fisiológico e correlacionar os dados obtidos com a fração absorvida. Desta forma, espera-se contribuir com o estabelecimento de atributos de qualidade para arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada, especialmente por meio do desenvolvimento de método de dissolução farmacopeico relacionado diretamente com absorção do fármaco *in vivo* e, conseqüentemente, com a ocorrência do efeito desejado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para a avaliação da qualidade dos antimaláricos arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada, utilizados no Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), por meio do desenvolvimento e validação de métodos de dissolução por correlação *in vitro-in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a qualificação de padrões secundários de arteméter e lumefantrina.
- Determinar a solubilidade em equilíbrio de arteméter e lumefantrina na faixa de pH fisiológico.
- Validar os métodos analíticos por CLAE com detecção ultravioleta para quantificação de arteméter e lumefantrina nos intervalos de concentração do ensaio de solubilidade.
- Desenvolver e validar o método analítico por CLAE com detecção ultravioleta para quantificação simultânea de arteméter e lumefantrina em dose fixa combinada na proporção de 1:6, no intervalo de concentração do ensaio de dissolução.
- Desenvolver e validar o método de dissolução para a associação arteméter + lumefantrina (20+120) comprimidos, com a definição dos parâmetros do teste pela correlação entre a fração dissolvida e a fração absorvida para arteméter e lumefantrina.
- Elaborar a monografia de lumefantrina insumo farmacêutico ativo para compor a Farmacopeia Brasileira.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Dissolução

A dissolução é o processo pelo qual uma substância sólida entra em solução, ou seja, é dissolvida, sendo uma propriedade que influencia na velocidade e extensão da disponibilidade do fármaco (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

A velocidade de dissolução pode ser definida como a quantidade de substância ativa dissolvida a partir de uma forma farmacêutica sólida em uma unidade de tempo, sob condições padronizadas de interface líquido-sólido, temperatura e composição de meio (HANSON, 1991). A expressão matemática, baseada na lei de difusão de Fick, é a equação Noyes-Whitney (1897) e modificada por Underwood e Cadwallader (1978):

$$\frac{dW}{dt} = kS(C_{sat} - C_{sol})$$

Em que: dW/dt : velocidade de dissolução; k : constante de dissolução; S : área superficial do sólido; C_{sat} : concentração da solução saturada; C_{sol} : concentração em um dado tempo (HANSON, 1991).

A alteração da área superficial altera a dinâmica envolvida entre a partícula e o meio de dissolução, matematicamente descrito na equação Noyes-Whitney.

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal (EMAMI, 2006).

Os métodos de dissolução são padronizados e descritos em farmacopeias, compêndios reconhecidos pelas autoridades regulatórias para determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas (FARMACOPEIA, 2010; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

O teste de dissolução *in vitro* geralmente deve mimetizar a dissolução *in vivo*, e a seleção do método ideal requer a avaliação de uma série de condições do ensaio de dissolução, como por exemplo, meios de dissolução com pH variáveis, utilização de tensoativo, tipo e velocidade de rotação do aparato. Além disso, o conhecimento das propriedades do fármaco, formulação do produto, fisiologia gastrintestinal, dissolução *in vitro* e farmacocinética permitem a seleção de condições e especificações para o teste de dissolução *in vitro*. Para medicamentos que apresentam mais de um componente ativo, a dissolução deve ser determinada para cada fármaco (THE UNITED, 2016).

O teste de dissolução é recomendado para comprimidos de liberação imediata, de liberação modificada, sublinguais, de desintegração oral, mastigáveis, cápsula dura, cápsula mole, pós e granulados para suspensão, suspensões administradas por qualquer via de administração, adesivos transdérmicos, pomadas, géis, loções e cremes, supositórios, implantes, microparticulados injetáveis e gomas de mascar. Caso os produtos já se apresentem na forma de solução ou produtos que após a reconstituição resultam em uma solução, não é necessário realizar o teste de dissolução, já que o fármaco se encontra dissolvido, tais como: soluções, pós e granulados para solução, sprays nasais de ação imediata, pós ou suspensões de ação pulmonar imediata (FARMACOPEIA, 2010; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, estão padronizados três métodos de dissolução, sendo eles: *Método 1* - Cestas, *Método 2* - Pás e *Método 3* - Cilindros alternantes. O *Método 4* - Célula de fluxo, *Método 5* - Pá sobre disco, *Método 6* - Cilindro e *Método 7* - Suporte recíproco estão padronizados em outros códigos internacionais tais como as farmacopeias americana, japonesa e europeia (**Tabela 1**).

Existem equipamentos não convencionais para avaliar a liberação do fármaco a partir de gomas de mascar, supositórios, anéis vaginais, implantes e formas farmacêuticas semissólidas.

Tabela 1 - Sumário de aparelhagem do teste de dissolução e principais aplicações.

Aparelhagem	Principal aplicação
1 Cesto	Comprimidos de liberação imediata e modificada, cápsulas, comprimidos que não se desintegram (bomba osmótica) e supositórios.
2 Pás	Comprimidos de liberação imediata e modificada, cápsulas com a utilização de âncoras (se necessário), supositórios, pós e granulados para suspensão oral, após reconstituição.
3 Cilindros alternantes	Formas farmacêuticas de liberação modificada do tipo pérolas ou grânulos, pós e granulados para suspensão e suspensões orais.
4 Célula de fluxo	Comprimidos de liberação imediata, de liberação modificada, de desintegração oral, mastigáveis comprimidos que não se desintegram (bomba osmótica), cápsula dura, capsula mole, pós e granulados para suspensão, suspensões, pomadas, géis, loções, cremes, supositórios, implantes e microparticulados injetáveis.
5 Pá sobre disco	Adesivos transdérmicos e comprimidos que não se desintegram (bomba osmótica).
6 Cilindro	Adesivos transdérmicos.
7 Suporte recíproco	Comprimidos de liberação imediata, adesivos transdérmicos e comprimidos do tipo bomba osmótica.

Fontes: FARMACOPEIA, 2010; STORPIRTIS *et al.*, 2009; THE UNITED, 2016.

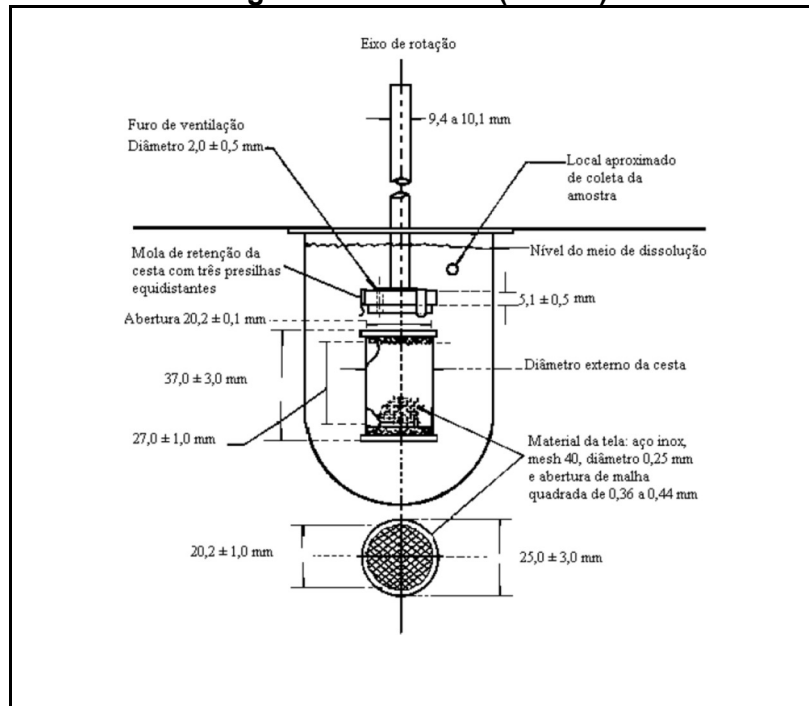
O equipamento utilizado para o teste de dissolução consiste de um sistema de três componentes:

(1) Recipientes abertos de forma cilíndrica e fundo hemisférico, denominados cubas, usualmente feitas em vidro boro silicato, com aberturas para inserção do agitador, coleta de amostras e inserção de termômetro. As dimensões para as cubas de um litro, que são as mais utilizadas, possuem altura de 185 ± 25 mm de altura e diâmetro interno de 102 ± 4 mm. As cubas são imersas recipiente contendo banho de água termostaticado, de material transparente e tamanho adequado, onde a temperatura seja mantida a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

(2) Hastes em aço inoxidável para prover agitação do meio. As aparelhagens cestas ou pás estão demonstradas nas **Figuras 1 e 2**.

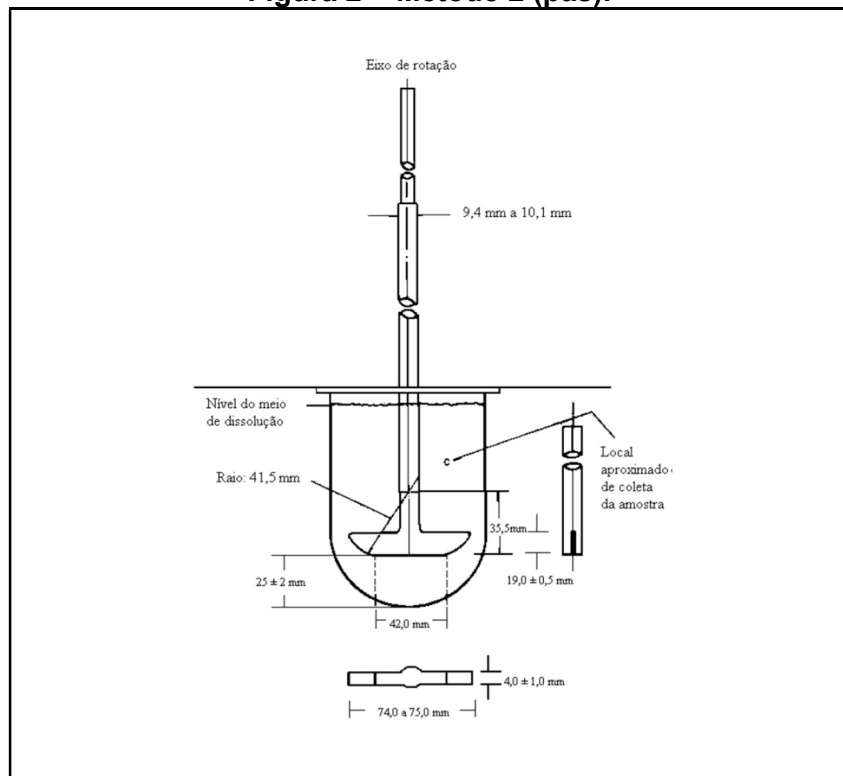
(3) Um motor que possibilita ajustar a velocidade de rotação conforme especificação do teste.

Figura 1 - Método 1 (cestas).



Fonte: FARMACOPEIA, 2010

Figura 2 - Método 2 (pás).



Fonte: FARMACOPEIA, 2010.

As condições do teste de dissolução (tipo de aparelhagem, composição e volume do meio), devem ser selecionadas de forma que o teste seja discriminativo, exato, transferível e robusto. Método discriminativo é aquele capaz de detectar mudanças

no produto, tais como alterações na formulação, processo de fabricação e características físico-químicas dos fármacos (tamanho de partículas, área superficial, polimorfos, estado de hidratação) que possam afetar significativamente a solubilidade e/ou o desempenho *in vivo* (STORPIRTIS *et al.*, 2009). Durante o desenvolvimento do teste de dissolução, a seleção da aparelhagem deve priorizar aquelas descritas em farmacopeias. Cestas são utilizadas com velocidades de 50 a 150 rpm e pás com velocidades entre 50 e 100 rpm.

No caso do fármaco, é essencial conhecer sua solubilidade em função do pH para que o volume do meio a ser selecionado possa garantir *sink conditions*. A definição mais aceita de *sink condition* é a condição que se equivale a no mínimo três vezes o volume do meio de dissolução para se obter uma solução saturada do fármaco. Na década de 90, foi sugerido por HANSON, o conceito de *sink condition* equivalente a valores entre cinco e dez vezes o volume do meio de dissolução. São aceitáveis desvios da *sink condition*, desde que o método seja caracterizado como discriminativo. Os volumes mais utilizados são entre 500 e 1000 mL, sendo 900 mL o mais comum (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

A composição do meio deve ser biorrelevante, ou, seja refletir as condições observadas *in vivo*. Dessa forma, o pH do meio de dissolução deve estar dentro da faixa fisiológica de pH de 1,0 a 6,8 para formas farmacêuticas de liberação imediata, baseada nos estudos de solubilidade em equilíbrio. A utilização de água como meio de dissolução deve ser evitada, por não ser biorrelevante e não apresentar capacidade tamponante (ANVISA, 2010; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

3.2 Correlação *in vitro-in vivo*

Nos últimos anos, o conceito e a aplicação de estudos de correlação *in vitro-in vivo* tem sido um dos principais focos da atenção da indústria farmacêutica, de pesquisadores e na área regulatória (EMAMI, 2006). No Brasil, diretrizes da Agência de Vigilância Sanitária sobre estudos de correlação *in vitro-in vivo* foram elaboradas em 2002, com a publicação da Resolução nº 482, intitulada "Guia para estudos de correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV)", sendo esta a legislação vigente até o momento.

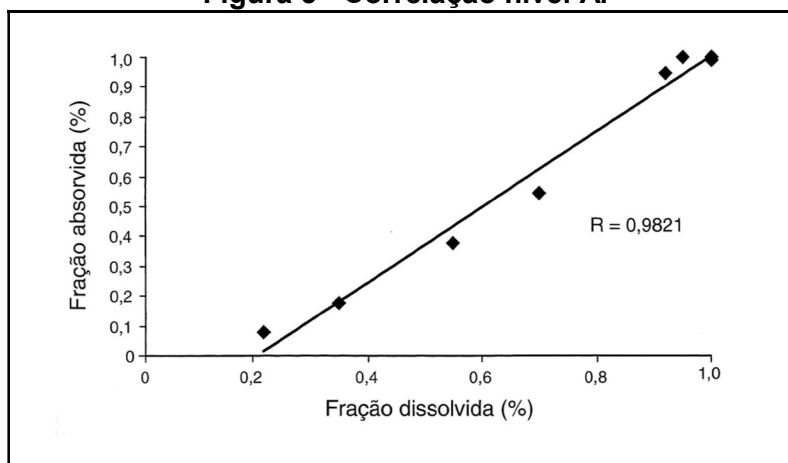
O estudo de correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) se refere ao estabelecimento de uma relação racional entre a propriedade biológica ou um parâmetro derivado desta, produzido por uma forma farmacêutica e sua respectiva propriedade físico-química. As propriedades biológicas mais comumente utilizadas são parâmetros farmacocinéticos, tais como concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e área sob a curva (ASC), obtidos após a administração do medicamento. A propriedade físico-química usualmente utilizada é o comportamento da dissolução *in vitro*, como por exemplo, o percentual de fármaco liberado sob um dado conjunto de condições. A relação quantitativa entre as duas propriedades, físico-química e biológica, é uma correlação *in vitro-in vivo* (ANVISA, 2002; EMAMI, 2006; THE UNITED, 2016). Um dos principais objetivos em se estabelecer uma correlação *in vitro-in vivo* é a substituição dos estudos de biodisponibilidade. Além disso, é uma ferramenta matemática que pode ser empregada para estabelecer especificações de dissolução, embasar e validar os métodos de dissolução (EMAMI, 2006).

Quatro níveis de correlação são propostos em ordem decrescente de qualidade (A, B, C e D). O conceito de nível de correlação está relacionado com a capacidade dos dados *in vitro* refletirem a curva de concentração plasmática como resultante da administração de dada forma farmacêutica. A relação entre a curva de dissolução *in vitro* e o perfil da concentração plasmática em função do tempo define a robustez da correlação e a sua preditividade (ANVISA, 2002; EMAMI, 2006; STORPIRTIS *et al.*, 2011; THE UNITED, 2016).

A correlação de nível A é o nível mais elevado e representa uma relação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* do fármaco, a partir da forma farmacêutica, e a velocidade de entrada do mesmo no organismo *in vivo*. As curvas de dissolução *in vitro* e *in vivo* são diretamente sobreponíveis, ou podem ser sobrepostas utilizando-se uma constante (ANVISA, 2002). Pode ser estabelecida quando a fração dissolvida em função do tempo é relacionada matematicamente com a fração absorvida obtida por deconvolução do perfil plasmático também em função do tempo (**Figura 3**). Geralmente, a fração do fármaco absorvido pode ser calculada pelas técnicas de equilíbrio de massa modelo-dependentes tais como *Wagner-Nelson* ou *Loo-Riegelman* ou modelos independentes. A sobreposição não é um requisito absoluto para o nível A de correlação. Se a dissolução e a curva de absorção são

diferentes e pode ser desenvolvida uma relação matemática para correlacionar as duas, o perfil plasmático pode ser previsível a partir dos dados da dissolução *in vitro*. A relação deve ser verdadeira não apenas em uma única velocidade de dissolução do produto, mas também em toda sua faixa (EMAMI, 2006; THE UNITED, 2016).

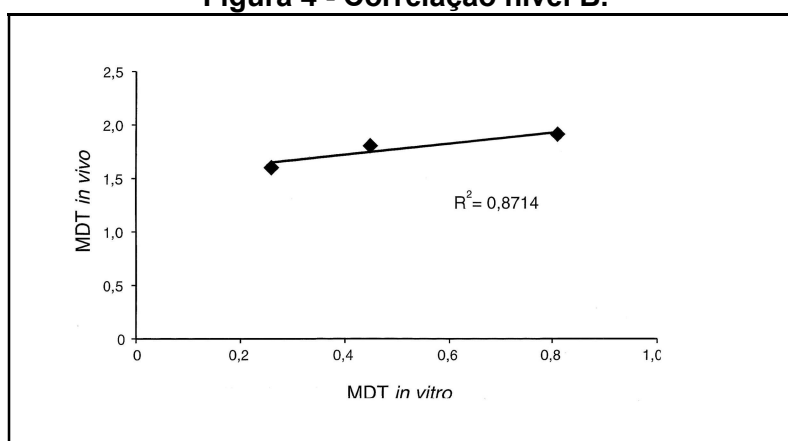
Figura 3 - Correlação nível A.



A fração dissolvida (*in vitro*) é correlacionada com a fração absorvida (*in vivo*) em função do tempo. **Fonte:** STORPIRTIS *et al.*, 2011, p. 157.

A correlação de nível B utiliza os princípios das análises de momentos estatísticos (**Figura 4**). Neste modelo, o tempo médio de dissolução *in vitro* (*Mean dissolution time* - MDT *in vitro*) é comparado ao tempo de residência (*Mean residence time* - MRT) ou ao tempo médio de dissolução *in vivo* (MDT *in vivo*). Esta correlação utiliza todos os dados obtidos *in vitro* e *in vivo*, mas não é considerada uma correlação ponto a ponto e emprega mais de uma formulação para construção da correlação *in vitro-in vivo* (EMAMI, 2006; STORPIRTIS *et al.*, 2011; THE UNITED, 2016).

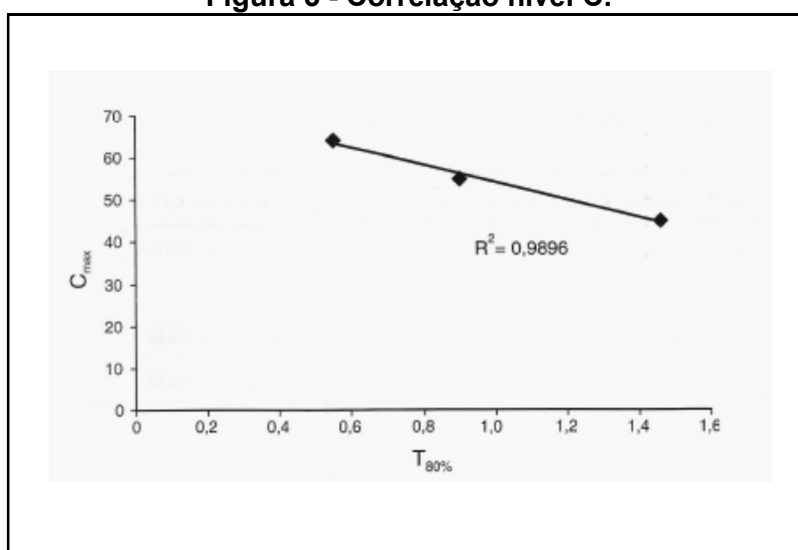
Figura 4 - Correlação nível B.



O MRT *in vivo* é correlacionado com a MDT *in vitro*. **Fonte:** STORPIRTIS *et al.*, 2011, p. 157.

A correlação de nível C relaciona um ponto de tempo de dissolução ($t_{50\%}$, $t_{90\%}$, etc.) a um parâmetro farmacocinético, tais como ASC, $C_{máx}$, ou $T_{máx}$, não representando uma correlação ponto a ponto (**Figura 5**). Em função disso, não é utilizada como uma ferramenta preditiva, sendo geralmente útil como uma referência no desenvolvimento farmacotécnico ou como um procedimento de controle de qualidade (EMAMI, 2006; THE UNITED, 2016).

Figura 5 - Correlação nível C.



O parâmetro $C_{máx}$ é correlacionado com o tempo em que 80% do fármaco são dissolvidos. **Fonte:** STORPIRTIS *et al.*, 2011, p.158.

A correlação de nível C múltipla relaciona um ou vários parâmetros farmacocinéticos de interesse, como C_{max} , ASC e a fração de fármaco dissolvida nos tempos de coleta dos perfis de dissolução. Esse nível pode ser avaliado em cada tempo, para um mesmo parâmetro farmacocinético, de modo que as alterações no perfil de dissolução possam refletir o comportamento *in vivo* de uma determinada formulação. A correlação nível D não é um modelo matemático considerado útil para avaliar a preditividade, se tratando apenas de uma avaliação qualitativa para fins de desenvolvimento farmacotécnico (EMAMI, 2006).

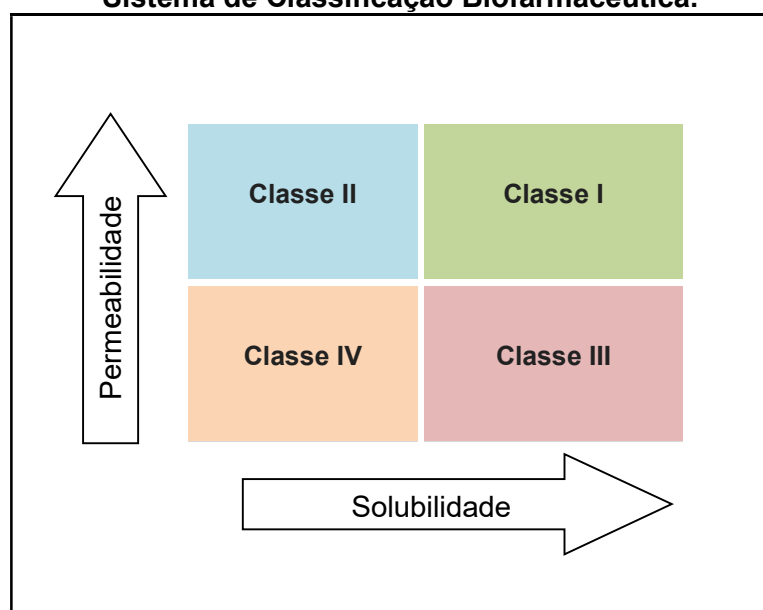
3.3 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

A rota de administração oral é a via preferencial para a administração dos medicamentos. A administração de um medicamento no organismo desencadeia os

eventos conhecidos como LADME (liberação, absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Cada um desses processos apresenta dois componentes: um cinético e outro relacionado à extensão ou quantidade do fármaco envolvida no processo. A distribuição e a eliminação, em conjunto, são também chamadas de disposição (STORPIRTIS *et al.*, 2009, 2011). Em 1995, AMIDON e colaboradores avaliaram em modelos experimentais os parâmetros chave que controlam a absorção: número de absorção (A_n), número de dissolução (D_n) e número da dose (D_o), o que representam, respectivamente, os processos de permeação pela membrana, dissolução do fármaco e sua dose.

Este sistema, denominado classificação biofarmacêutica (*Biopharmaceutical Classification System* - BCS, **Figura 6**) estabelece quatro classes de acordo com as características de solubilidade e permeabilidade do fármaco. Este modelo dispõe de base conceitual de quanto e sob quais condições as correlações *in vitro-in vivo* podem ser obtidas. É uma ferramenta para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de uso oral, permitindo estimativa da taxa e extensão da absorção de fármacos, pela avaliação de três parâmetros fundamentais: a dissolução, a solubilidade e a permeabilidade intestinal (ANVISA, 2002; AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 1997a).

Figura 6 - Classes de Fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.



Fonte: adaptado de AMIDON *et al.*, 1995.

O número de absorção (A_n) é a razão entre o tempo médio de residência do fármaco no organismo (T_{res}) e o tempo médio de absorção (T_{abs}) calculado de acordo com a equação (EMAMI, 2006):

$$A_n = \frac{T_{res}}{T_{abs}}$$

Um fármaco é considerado altamente permeável quando a extensão da absorção em humanos é superior a 90% da dose administrada, avaliado pelo balanço de massas ou quando comparado à referência após uma dose intravenosa (FDA, 1997a; REDDY; KARUNAKAR, 2011). O número de dissolução (D_n) é a razão entre o tempo médio de residência (T_{res}) e o tempo médio de dissolução (T_{diss}) estimado pela equação (EMAMI, 2006):

$$D_n = \frac{T_{res}}{T_{diss}}$$

Um fármaco é considerado altamente solúvel quando sua maior dose é solúvel em no máximo 250 mililitros, em meio aquoso, na faixa de pH entre 1,0 e 7,5 (ou 8,0 conforme FDA, 1997a) em temperatura de 37 °C. Uma forma farmacêutica apresenta alta dissolução quando 85% ou mais da quantidade declarada do fármaco se dissolvem em 30 minutos, utilizando aparelhagem cestas (método 1) ou pás (método 2) em volume equivalente a 900 mililitros de meio tamponado (FDA, 1997a; REDDY; KARUNAKAR, 2011). O número da dose (D_0) é calculado conforme a equação:

$$D_0 = \frac{\text{Dose}}{V_0 \times C_s^{\min}}$$

Em que: V_0 é o volume gástrico inicial igual a 250 mililitros, derivado do protocolo de administração do medicamento padronizado para estudos de bioequivalência; C_s^{\min} é a solubilidade mínima na faixa de pH fisiológico, na temperatura de 37 °C. A fração da dose absorvida pode ser estimada usando estes parâmetros adimensionais (EMAMI, 2006). Avaliando a classificação biofarmacêutica proposta por AMIDON e colaboradores, a probabilidade da CIVIV está relacionada na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Expectativa de correlação *in vitro-in vivo* para medicamentos de liberação imediata de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Controle da velocidade de absorção	Expectativa de CIVIV
I	Alta	Alta	Esvaziamento gástrico	É esperada se a velocidade de dissolução é menor que a velocidade de esvaziamento gástrico.
II	Baixa	Alta	Dissolução	É esperada, se a velocidade de dissolução <i>in vitro</i> é similar à velocidade de dissolução <i>in vivo</i> .
III	Alta	Baixa	Permeabilidade	A velocidade de absorção é determinante e a CIVIV é limitada ou não ocorre conforme a velocidade de dissolução.
IV	Baixa	Baixa	Caso a caso	A CIVIV não é esperada ou é limitada.

Fontes: AMIDON *et al.*, 1995; EMAMI, 2006.

Para fármacos que apresentam classificação biofarmacêutica I, o fator limitante para a absorção do fármaco é o esvaziamento gástrico, caso os fármacos apresentem dissolução de 85% do valor rotulado em, no máximo, 15 minutos. Os fármacos classe I, são fortes candidatos a bioisemulação, aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares (ANVISA, 2011; EMAMI, 2006).

Já para fármacos Classe II, que apresentam alta absorção e número de dissolução baixo (D_n), o fator limitante é a dissolução do fármaco. Nestes casos, é essencial que os testes de dissolução *in vitro* reflitam o comportamento *in vivo*, para estabelecer uma CIVIV, podendo ser necessário adicionar tensoativos para simular as condições *in vivo* (EMAMI, 2006).

Para fármacos que apresentam rápida dissolução e a permeabilidade é o parâmetro que controla a absorção do fármaco, uma dissolução rápida é particularmente desejável de modo a aumentar o tempo de contato com a mucosa, característicos dos pertencentes à classe III.

Os fármacos com baixa solubilidade e permeabilidade (classe IV) apresentam problemas significativos para a administração oral eficaz. Independente da classificação biofarmacêutica do fármaco, métodos e especificações bem estabelecidos para os testes de dissolução são ferramentas chave para avaliação da absorção oral e bioequivalência (EMAMI, 2006).

Os fatores que afetam a absorção estão relacionados ao fármaco, à forma farmacêutica e ao trato gastrointestinal, incluindo polimorfismo, estabilidade, distribuição de tamanho de partícula, solubilidade, velocidade de dissolução, lipofilicidade, permeabilidade, dentre outras. Tais fatores são determinantes para a liberação do fármaco sob condições que mimetizem o ambiente fisiológico ao qual o medicamento é submetido (THE UNITED, 2016).

Para substâncias de baixa solubilidade, a dissolução pode ser limitada pelo volume de líquidos intestinais e pH. Por outro lado, os sais biliares podem aumentar a solubilidade das substâncias lipofílicas e a presença de alimentos pode interferir na solubilização e na absorção. Além disso, fatores relacionados à quantidade de fármaco no lumen intestinal, a possibilidade de degradação hidrolítica, metabólica ou enzimática, a presença de micro-organismos e os fatores fisiológicos individuais também podem alterar a absorção do fármaco (LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

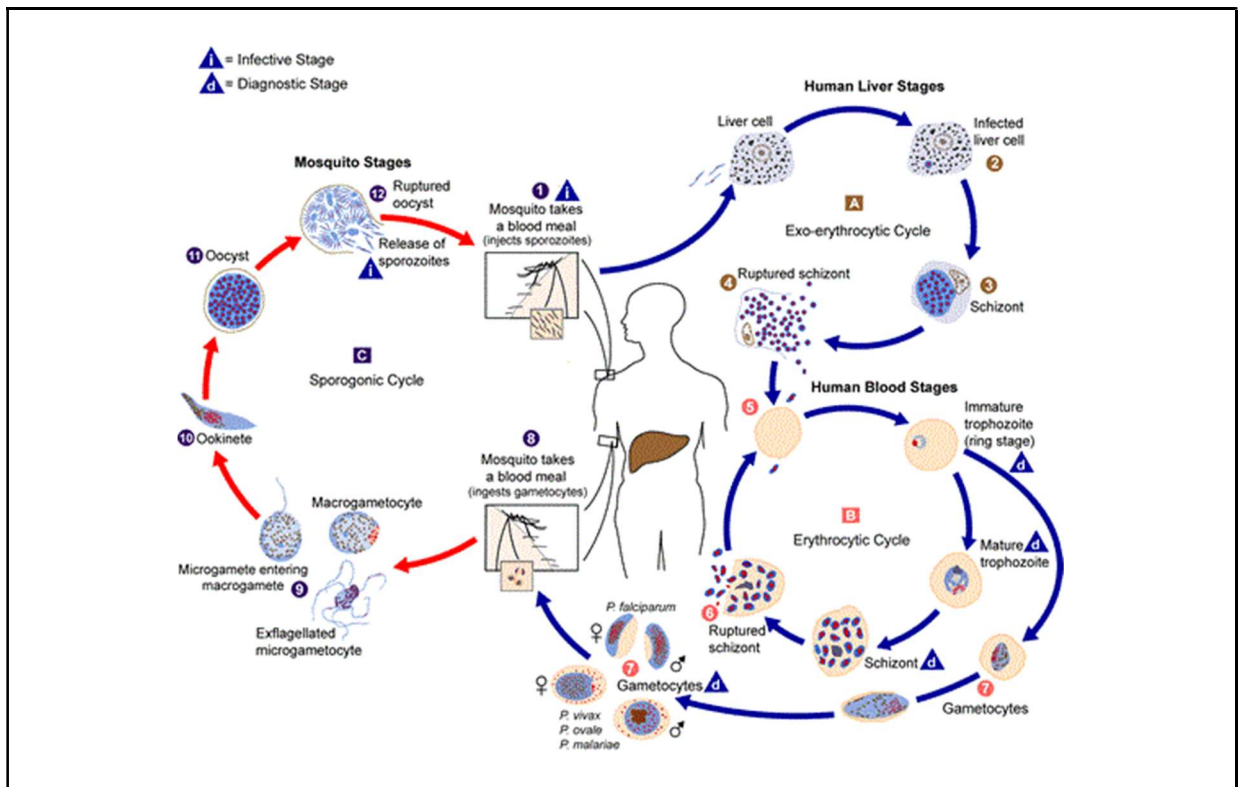
3.4 Malária

A malária é uma doença infecciosa cujo agente etiológico é um parasito do gênero *Plasmodium*. As espécies associadas à malária humana são: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. A transmissão natural da doença ocorre quando fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* parasitadas com esporozoítos em suas glândulas salivares, inoculam estas formas infectantes durante o repasto sanguíneo. A espécie mais importante é *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo. A infecção inicia-se quando os parasitas (esporozoítos) são inoculados na pele pela picada do vetor, os quais irão invadir as células do fígado, os hepatócitos nas quais se multiplicam e dão origem a milhares de novos parasitas (merozoítos), que rompem os hepatócitos e, caindo na circulação sanguínea, vão invadir as hemácias, dando início à segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea. É nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária (BRASIL, 2010).

O desenvolvimento do parasita nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitas se desenvolvem

rapidamente, enquanto outros ficam em estado de latência no hepatócito. São, por isso, denominados hipnozoítos (do grego *hipnos*, sono). Esses hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação (geralmente dentro de seis meses). Na fase sanguínea do ciclo, os merozoítos formados rompem a hemácia e invadem outras, dando início a ciclos repetitivos de multiplicação eritrocitária. Os ciclos eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. Depois de algumas gerações de merozoítos nas hemácias, alguns se diferenciam em formas sexuadas: os macrogametas (feminino) e microgametas (masculino). Esses gametas no interior das hemácias (gametócitos) não se dividem e, quando ingeridos pelos insetos vetores, irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasita. O ciclo de vida do *Plasmodium* é representado na **Figura 7** (NEVES, 2012; MINISTÉRIO, 2010).

Figura 7 - Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* causadoras de malária.



Fonte: FRANÇA et al., 2008.

Mundialmente, o número de casos de malária apresentou uma redução de 262 milhões de casos ao ano em 2000 para 214 milhões em 2015, equivalente a um percentual de 18%. A maioria dos casos em 2015 foram reportados no continente

africano (88%), seguido do sudeste asiático (10%) e região do Mediterrâneo (2%). O número de mortes por malária em todas as idades também apresentou uma redução significativa com declínio de 48%. A maioria das mortes em 2015 ocorreu no continente africano (90%), seguido do sudeste asiático (7%) e região do Mediterrâneo (2%). Esse progresso só foi possível graças à implementação maciça de ferramentas de prevenção e tratamento, rápida expansão de testes em diagnóstico e disponibilidade de medicamentos antimaláricos, em especial o tratamento pelas terapias de combinação com artemisinina (*Artemisinin based combination therapy* - ACT), direcionadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015).

No Brasil, o número de casos apresentou uma redução de 613.241 para 143.415, no período entre 2000 e 2014, equivalente a 75% de declínio. O *Plasmodium vivax* é a espécie causadora de quase 80% dos casos e foram notificadas 36 mortes relacionadas à doença (WHO, 2015).

O controle da malária envolve as seguintes intervenções: gestão dos pacientes (diagnóstico e tratamento); prevenção da infecção por meio do controle do vetor (uso de mosquiteiro e inseticidas) e tratamento da doença (administração de antimaláricos). A quimioterapia é fundamental no tratamento dos pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial da malária, pois interrompe o ciclo de vida do parasita, impedindo as manifestações clínicas da infecção. Diversos medicamentos são utilizados no tratamento das diferentes formas de malária em humanos, atuando em pelo menos duas etapas do ciclo de vida do plasmódio. São empregados em associações medicamentosas, nas quais um possui ação esquizotocida sanguínea ou/e gametocitocida, e no caso do *P. vivax*, ação hipnozoitocida. No Brasil, são disponibilizados a quinina, doxiciclina, mefloquina, lumefantrina, derivados da artemisinina, cloroquina e a primaquina (WHO, 2015).

De acordo com o Ministério da Saúde e OMS, são empregados cloroquina e primaquina no tratamento da malária pelo *P. vivax* durante 7 dias. Para o tratamento da doença causada por *P. falciparum*, são recomendados como tratamento de primeira escolha a associação de arteméter + lumefantrina e primaquina ou artesunato + mefloquina e primaquina.

Apesar da eficácia destes medicamentos, estudos demonstraram o surgimento de cepas de *P. vivax* resistentes à cloroquina, responsável pela recrudescência. No Brasil, foi reportado em 2013, pelo menos um caso de *Plasmodium vivax* resistente à cloroquina. A resistência do *Plasmodium* aos medicamentos antimaláricos é um dos principais obstáculos na luta contra a doença, uma vez que dificulta o desenvolvimento de esquemas terapêuticos eficazes, aumentando o custo global do controle da doença e promove o desenvolvimento de epidemias (WHO, 2015; MINISTÉRIO, 2010).

Na América do Sul, os estudos realizados entre 2005 e 2011 no Brasil, Colômbia, Equador e Suriname identificaram taxas de insucesso de tratamento inferiores a 5% após o tratamento com arteméter e lumefantrina em dose fixa combinada (WHO, 2015).

O tratamento da malária visa atingir o parasita em pontos chave de seu ciclo evolutivo, os quais podem ser resumidos em: interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; destruição de formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando recaídas tardias; interrupção da transmissão do parasita, pelo uso de fármacos que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitas (gametócitos). Para atingir esses objetivos, diversos fármacos são utilizados, cada um deles agindo de forma específica, para impedir o desenvolvimento do parasita no hospedeiro (MINISTÉRIO, 2010).

Durante o tratamento é necessário acompanhar o paciente porque a cura clínica e mesmo o desaparecimento total dos parasitas do sangue não significa necessariamente uma cura parasitológica, pois, se não houver a eliminação dos hipnozoítos do *P. vivax* ou ainda se o paciente portar parasitas de malária causada por *P. falciparum* resistentes ao medicamento, poderá ocorrer novo episódio, sem que o paciente tenha voltado para área de transmissão. Nos casos de malária causada por *P. falciparum*, este acompanhamento deve ser semanal e pode variar de 28 a 42 dias, dependendo da meia-vida de eliminação do fármaco utilizado para o

tratamento, e, no caso de malária causada por *P. vivax*, o acompanhamento deve ser mensal e se possível por seis a doze meses (MINISTÉRIO, 2010).

Os antimaláricos podem ser classificados segundo suas características químicas e segundo o local de ação no ciclo biológico do parasita:

a) pelo seu grupo químico em arilaminoálcoois (lumefantrina, quinina, mefloquina e halofantrina), 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina), 8-aminoquinolinas (primaquina), peróxido de lactona sesquiterpênica (derivados da artemisinina), naftoquinonas (atovaquona) e antibióticos (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina);

b) pelo seu alvo de ação no ciclo biológico do parasita em esquizonticidas teciduais ou hipnozoiticidas (cura radical do *P. vivax*), esquizonticidas sangüíneos (promovem a cura clínica), gametocitocidas (bloqueiam a transmissão) e esporonticidas (impedem a infecção pelos esporozoítos) (MINISTÉRIO, 2010).

O tratamento adequado e oportuno tanto previne a ocorrência de casos graves e, conseqüentemente, a morte por malária, como elimina fontes de infecção para os mosquitos, contribuindo para a redução da transmissão da doença (MINISTÉRIO, 2010).

A malária não complicada apresenta período de incubação entre 7 e 14 dias, podendo, contudo, chegar a vários meses em condições especiais, no caso de *P. vivax* e *P. malariae*. No momento de crise aguda, a doença se caracteriza por episódios de calafrios, febre e sudorese, com duração variável de 6 a 12 horas e pode cursar com temperatura igual ou superior a 40 °C. Em geral, esses paroxismos são acompanhados por cefaléia, mialgia, náuseas e vômitos. Após os primeiros paroxismos, a febre pode passar a ser intermitente. Os sintomas e sinais de malária grave são prostração, alteração da consciência, dispnéia ou hiperventilação, convulsões, hipotensão arterial ou choque, edema pulmonar, hemorragias, icterícia, hemoglobinúria, hiperpirexia (superiores a 41 °C), oligúria acompanhados de alterações laboratoriais de anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica, insuficiência renal, hiperlactatemia e hiperparasitemia (MINISTÉRIO, 2010).

O diagnóstico da malária deve ser realizado o mais precocemente com ampla avaliação das características clínicas e laboratoriais. O diagnóstico laboratorial baseia-se no encontro de parasitos no sangue pela microscopia da gota espessa de sangue, colhida por punção digital e corada pelo método de Walker. Neste teste é possível diferenciar as espécies de *Plasmodium*, o estágio de evolução e a densidade de parasitemia em relação aos campos avaliados. Os testes rápidos imunocromáticos baseiam-se na detecção de antígenos dos parasitos por anticorpos monoclonais, que são revelados por método imunocromatográfico; no entanto, estes testes não permitem a distinção entre as espécies de *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*, não medem o nível de parasitemia e não detectam infecções mistas (MINISTÉRIO, 2010).

3.5 Associação de arteméter e lumefantrina

Artemeter-lumefantrina é uma associação de dose fixa combinada (20 mg de arteméter e 120 mg de lumefantrina), que foi inicialmente desenvolvida na China e, atualmente, é produzida principalmente pela indústria farmacêutica Novartis (Coartem® comprimidos e comprimidos dispersíveis). É utilizada no tratamento de malária não complicada, altamente eficaz e bem tolerada. Foi observada taxa de cura de até 95%, mesmo em áreas em que o parasita apresenta resistência a múltiplos fármacos (ANVISA, 2014).

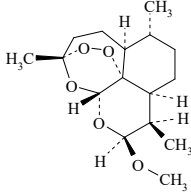
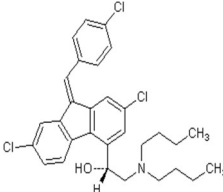
A associação em dose fixa é indicada para o tratamento de malária aguda não complicada, causada por *P.falciparum*. A artemisinina é um composto derivado da planta *Artemisia annua*, ou *QingHao* como é conhecida pelos chineses, e tem sido usada há séculos na medicina tradicional no tratamento de febre. A terapia de combinação com artemisinina (ACT - *artemisinin based combination therapy*) é uma combinação de dois ou mais fármacos que tem diferentes modos de ação e alvos diferentes, sendo que um deles é um derivado de artemisinina (BOEHM *et al.*, (2007).

Em 2015, o prêmio nobel de medicina e fisiologia foi compartilhado e um dos pesquisadores agraciados foi a chinesa Youyou Tu da Academia de Medicina Tradicional Chinesa, reverenciada pela extração da artemisinina de ervas medicinais

na década de 70, tendo seus derivados amplamente utilizados na terapêutica da malária nos dias de hoje.

O arteméter é um derivado acetal quiral semissintético da substância encontrada na natureza como artemisinina. A lumefantrina, também conhecida como benflumetol, é uma mistura racêmica de derivado sintético do fluoreno. Como outros antimaláricos (quinina, mefloquina, halofantrina), a lumefantrina pertence à família dos arilamino-álcoois. Os isômeros dextrógiro e levógiro não apresentam diferença significativa na atividade antimalárica, quando se avaliam os enantiômeros isoladamente ou em mistura racêmica (**Tabela 3**) (THE MERCK, 2006).

Tabela 3 - Características físico-químicas dos fármacos.

Características Físico-químicas	Arteméter (DCB: 00885)	Lumefantrina (DCB: 05462)
Fórmula molecular	$C_{16}H_{26}O_5$	$C_{30}H_{32}Cl_2NO$
Formula estrutural		
Massa molecular (g/mol)	298,38	528,94
Nome químico	[3R-(3α, 5aβ, 6β, 8aβ, 9α, 10α, 12β, 12aR)]-decaidro-10-metoxi-3,6,9-trimetil-3,12-epóxi-12H-pirano[4,3-j]-1,2-benzodioxepina	(1RS)-2-(dibutilamino)-1-[(9Z)-2,7-dicloro-9-[(4-clorofenil)metilideno]-9H-fluoren-4-il]etanol
Características físicas	Pó cristalino e branco	Pó amarelo fino e cristalino
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água, muito solúvel em diclorometano e acetona e facilmente solúvel em etanol absoluto e acetato de etila.	Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em clorofórmio e em acetato de etila, solúvel em diclorometano, pouco solúvel em metanol e etanol.
pKa (faixa de 0 a 14)	-	9,78
Log P	3,53	9,19

Fontes: ANVISA, 2012; FARMACOPEIA, 2010; THE INTERNATIONAL, 2015

3.5.1 Propriedades farmacocinéticas

Arteméter é absorvido rapidamente com concentrações plasmáticas máximas atingidas cerca de duas horas após a administração. É rapidamente eliminado,

apresentando meia-vida de duas horas e sendo convertido em diidroartemisinina (DHA) em velocidade similar. O arteméter é rápida e amplamente metabolizado, apresentando considerável metabolismo de primeira passagem. O arteméter é transformado no principal metabólito biologicamente ativo, a diidroartemisinina pelo processo de desmetilação, principalmente pela enzima CYP3A nos microsomas hepáticos humanos (EZZET *et al.*, 1998; WHITE *et al.*, 1999).

O modelo bicompartimental com cinética de primeira ordem e eliminação do compartimento central foi utilizado para estimar os parâmetros para lumefantrina e o modelo monocompartimental para o arteméter e a DHA (**Tabela 4**) (EZZET *et al.*, 1998).

Tabela 4 - Parâmetros estimados para os modelos farmacocinético de arteméter, diidroartemisinina e lumefantrina.

Parâmetro	Lumefantina		Arteméter		Diidroartemisinina	
	Estimado	Erro padrão	Estimado	Erro padrão	Estimado	Erro padrão
Ka (h ⁻¹)	0,13	0,017	0,37	-	0,37	-
Cl (L h ⁻¹)	15,0	1,6	180	-	169	-
β (h ⁻¹)	0,0065	0,002				
k ₂₁ (h ⁻¹)	0,013	0,003				
log(V) (L)	5,37	0,13	5,38	-	4,66	-

Fonte: EZZET *et al.*, 1998; STORPIRTIS, 2011.

Ka: constante de absorção; Cl: clearance; β: constante de velocidade de eliminação (modelo bicompartimental); K₂₁: constante de velocidade de distribuição do fármaco do compartimento periférico para o compartimento central; V: volume de distribuição.

O pico de concentração plasmática da lumefantrina é atingido lentamente (oito horas mais duas horas de tempo de latência) e a meia-vida de eliminação terminal foi estimada em quatro dias e meio. Entretanto, as concentrações plasmáticas persistem por 20 dias. A lumefantrina é altamente lipofílica e sua absorção é aumentada com a ingestão de alimentos.

O consumo de alimentos aumenta a absorção do arteméter e da lumefantrina: em voluntários saudáveis, a biodisponibilidade relativa do arteméter aumentou mais que duas vezes e a da lumefantrina, 16 vezes, em comparação com os valores em jejum. Os dados de interação com alimentos indicam que a absorção da lumefantrina em jejum é muito baixa. *In vitro*, o arteméter e a lumefantrina apresentam alta taxa de ligação com proteínas plasmáticas humanas (95,4% e 99,7%, respectivamente). A diidroartemisinina também se liga às proteínas plasmáticas (47%-76%) (EZZET *et al.*, 1998, WHITE *et al.*, 1999).

3.5.2 Propriedades farmacodinâmicas

O sítio de ação antiparasitária dos dois fármacos é o vacúolo digestivo do parasita da malária, onde eles interferem na conversão do grupo heme, um intermediário tóxico produzido durante a degradação da hemoglobina à hemozoína. Considera-se que a lumefantrina interfira no processo de polimerização e que o arteméter dê origem a metabólitos reativos a partir da reação de seu grupo peróxido com o ferro do grupo heme.

4 CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES SECUNDÁRIOS DE ARTEMÉTER E LUMEFANTRINA

4.1 Materiais

4.1.1 Substâncias químicas de referências e insumos farmacêuticos ativos

- Arteméter substância química de referência (SQR) disponibilizada pela Farmacopeia Americana (USP) lote H0M313 e teor de 99,30%.
- Arteméter insumo farmacêutico ativo (IFA), Dafra Pharma - Turnhout, Bélgica, lote 0601010-4087.
- Lumefantrina substância química de referência (SQR) disponibilizada pela Farmacopeia Americana (USP) lote G0L394 e teor de 99,90%.
- Lumefantrina insumo farmacêutico ativo (IFA), Dafra Pharma - Turnhout, Bélgica, lote 06032403.

4.1.2 Reagentes

- Água ultrapura.
- Solventes e reagentes grau analítico: acetato de etila, acetona, acetonitrila, ácido acético glacial, ácido perclórico, anidrido acético, biftalato de potássio, clorofórmio, diclorometano, etanol, etanol absoluto, sulfato de hidrazina, hidrazina, iodeto de potássio, metenamina, tolueno, hidróxido de amônio, acetato de amônio, tioacetamida, nitrato de chumbo, ácido clóridrico, hidróxido de sódio.
- Solventes e reagentes grau cromatográfico: metanol, acetonitrila e ácido trifluoroacético.

4.1.3 Materiais e vidrarias

- Balões volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2000 mL.
- Buretas de 25 mL.

- Coluna C₁₈ de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) - Purospher® STR RP- endcapped Lote HX248565, Alemanha.
- Coluna cromatográfica C₁₈ de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) - Agilent, XDB PN 7995118-585, Lote B 05108, USA.
- Coluna cromatográfica C₁₈ de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) - Xterra®, Waters, PN 186000496, Lote 015534195118-13.
- Cromatoplaça sílica gel.
- Cuba cromatográfica.
- Erlenmeyeres de 10 e 250 mL.
- Filtros de seringa de PVDF com 0,45 µm de tamanho de poro.
- Frascos tipo *vial* de 12 x 32 mm com tampa de rosca e septos de silicone.
- Hastes para suporte e garras.
- Kit para filtração a vácuo.
- Membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,22 µm, SARTORIUS.
- Micropipetas automáticas.
- Nebulizador.
- Pipetas volumétrica.
- Tubos de ensaio com tampa.
- Tubos de nessler.
- Vidraria de uso laboratorial.

4.1.4 Equipamentos

- Aparelho de ultrassom UNIQUE 1400.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP211D.
- Banho-maria FULL GAUGE TIC-17C.
- Bomba de vácuo LABOPORT KNF N842.

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência AGILENT 1200, com forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência THERMO Surveyor Finnigan equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível.
- Equipamento: Analisador de Partículas por Difração a Laser LS 13320, Beckman Coulter.
- Equipamento para determinação de ponto de fusão METTLER TOLEDO FP62.
- Espectrofotômetro Shimadzu ultravioleta-visível (UV-Vis) UV1800 com programa UV Probe versão 2.33.
- Espectrômetro SHIMADZU FTIR IR Prestige-21 com *software* IR Solution.
- Estufa NABERTHERM TR 60.
- Mufla NABERTHERM , Alemanha
- Polarímetro Bellingham Stanley, ADP220
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE DIRECT Q3.
- Titulador automático METTLER TOLEDO DL53.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização de arteméter insumo farmacêutico ativo como padrão secundário

4.2.1.1 Propriedades físico-químicas

O ensaio de solubilidade do insumo farmacêutico ativo (IFA) arteméter foi realizado nos solventes água ultrapura, diclorometano, acetona, etanol absoluto e acetato de etila descritos na monografia oficial da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), em temperatura de 25 °C. Foram transferidos 10 mg de IFA para erlenmeyer e adicionados volumes crescentes dos solventes até que fosse verificada completa solubilização e caracterizada a solubilidade conforme tabela descritiva do primeiro suplemento da Farmacopeia Brasileira 5ª Edição.

Para a determinação do intervalo de fusão, transferiu-se determinada quantidade de IFA para capilar de vidro borossilicato fechado em uma das extremidades e procedeu-se a avaliação em equipamento específico.

A avaliação do poder rotatório específico foi realizada em polarímetro, em comprimento de onda de 589 nm, a 20 °C utilizando caminho óptico de 1,0 dm. Transferiu-se, em triplicata, 1,0 g de insumo farmacêutico ativo arteméter, previamente dessecado a 60 °C sob vácuo, para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com etanol absoluto. Durante a leitura, utilizou-se etanol absoluto como branco.

4.2.1.2 Ensaio de identificação

Os espectros na região do infravermelho, na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , foram obtidos para o padrão e a amostra de arteméter insumo farmacêutico ativo. Os espectrogramas foram avaliados quanto aos comprimentos de onda e intensidades relativas obtidos.

O ensaio colorimétrico foi realizado, transferindo-se para tubo de ensaio 30 mg da amostra de arteméter e subsequente adição de 1 mL de etanol absoluto e 0,1 g de iodeto de potássio R. A preparação foi aquecida em banho-maria a 50 °C.

4.2.1.3 Ensaio de pureza

No teste de cromatografia em camada delgada, utilizou-se sílica-gel G, como fase estacionária, e uma mistura de tolueno, acetato de etila e ácido acético glacial na proporção 75:17:8 (v:v:v), como fase móvel. Foram preparadas amostras nas concentrações de 10 mg/mL (*solução 1*), 0,05 mg/mL (*solução 2*) e 0,025 mg/mL (*solução 3*), utilizando acetona como solvente. Foram aplicados 20 μL de cada solução na cromatoplaça, utilizando micropipeta automática. A placa foi colocada em cuba contendo a fase móvel para eluição cromatográfica. Após o término, a placa foi seca ao ar, nebulizou-se solução de ácido sulfúrico a 5% em etanol e aqueceu-se a 120 °C por 5 minutos. Foi feita a avaliação das manchas obtidas.

No teste de substâncias relacionadas por cromatografia a líquido de alta eficiência, os parâmetros cromatográficos foram utilizados conforme o método para quantificação do fármaco, descrito no item 4.2.1.4. Foram preparadas as amostras nas concentrações de 8,0 mg/mL (*solução 1*) e 0,04 mg/mL (*solução 2*), diluídas em fase móvel.

O teste de perda por dessecação foi determinado em 1 g da amostra, pesado em triplicata em estufa a 60 °C, sob pressão reduzida, por 4 horas.

O teste de cinzas sulfatadas foi realizado utilizando 1 g da amostra, tratado com ácido sulfúrico e carbonizado em mufla a 600 °C ± 50 °C em cadinho de sílica. A porcentagem de cinzas foi calculada a partir do resíduo em função do peso inicial da amostra.

4.2.1.4 Doseamento de arteméter por CLAE

O doseamento da amostra de arteméter insumo farmacêutico ativo, lote 0601010-4087, fabricante Dafra Pharma, foi realizado conforme o teste descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, empregando-se o método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência. Foi utilizado cromatógrafo Thermo Surveyor Finnigan provido de detector ultravioleta (DAD) a 216 nm, coluna C₁₈ de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm), mantida a 30 °C; fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min. A fase móvel utilizada foi mistura de acetonitrila e água (70:30, v:v). O volume de injeção foi de 20 µL. Foram obtidos os espectros na faixa de 200 a 700 nm para avaliação da pureza dos sinais obtidos.

Para expressar o resultado de teor do padrão secundário, foram preparadas seis replicatas da amostra e duplicata da substância química de referência, em dois dias diferentes e por analistas diferentes.

Solução padrão de arteméter: aproximadamente 20 mg de arteméter SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter solução a 4 mg/mL.

Solução amostra de arteméter: aproximadamente 20 mg de arteméter IFA, previamente dessecada a 60 °C por 4 horas sob vácuo, foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter solução a 4 mg/mL.

4.2.1.5 Determinação do tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partículas foi determinada pelo método de difração por raio laser utilizando o equipamento analisador de partículas Beckman Coulter LS. Foi preparada uma suspensão aquosa do fármaco, mantida em agitação durante a análise com a leitura realizada em triplicata.

4.2.2 Caracterização de lumefantrina insumo farmacêutico ativo como padrão secundário

4.2.2.1 Propriedades físico-químicas

O ensaio de solubilidade do insumo farmacêutico ativo lumefantrina foi realizado nos solventes água ultrapura, clorofórmio, acetato de etila, diclorometano, metanol e etanol, em temperatura de 25 °C. Os solventes são citados na tabela de referência da USP (*United States Pharmacopoeia* 39) e na Farmacopeia Internacional (*The International Pharmacopoeia Fifth Edition*, 2015).

Foram transferidas 10 mg da amostra para erlenmeyer e adicionados volumes crescentes dos solventes até que fosse verificada completa solubilização e determinada a solubilidade conforme tabela descritiva do primeiro suplemento da Farmacopeia Brasileira 5ª Edição.

Para a determinação do intervalo de fusão, transferiu-se determinada quantidade de amostra para capilar de vidro borossilicato fechado em uma das extremidades e procedeu-se a avaliação em equipamento específico.

4.2.2.2 Ensaios de identificação

Os espectros na região do infravermelho, na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , foram obtidos para padrão e amostra de lumefantrina insumo farmacêutico ativo. Os espectrogramas foram avaliados quanto aos comprimentos de onda e intensidades relativas obtidos.

Na análise por varredura por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, foi realizado o preparo de uma solução transferindo 20 mg da amostra para um balão volumétrico de 200 mL, completou-se o volume com metanol e deixou em banho de ultrassom por 15 minutos. Transferiu-se 10 mL da solução anterior para balão volumétrico de 50 mL. Foi realizada a varredura na faixa de 275 nm a 325 nm em espectrofotômetro para avaliação dos máximos. Este ensaio está preconizado na monografia do insumo farmacêutico ativo da Farmacopeia Internacional (THE INTERNATIONAL, 2015).

Nos testes de cromatografia em camada delgada, utilizou-se sílica-gel G como fase estacionária e mistura de éter de petróleo, acetato de etila e ácido acético glacial (40:6:10; v:v:v) como fase móvel. O preparo das soluções foi realizado utilizando acetato de etila como solvente, sendo preparadas duas soluções da amostra e do padrão nas mesmas concentrações de 10 mg/mL. Foram aplicados 10 μL de cada solução em duas cromatoplasmas, utilizando micropipeta automática, que foram colocadas em cuba contendo a fase móvel para eluição. Após o término, as cromatoplasmas foram secas ao ar; a primeira foi submetida à avaliação das manchas sob luz ultravioleta (254 nm) e a segunda foi exposta ao vapor de iodo até aparecimento das manchas. Ambos os ensaios estão descritos na monografia de lumefantrina na Farmacopeia Internacional (THE INTERNATIONAL, 2015).

4.2.2.3 Ensaios de pureza

O teste de limpidez da solução foi realizado conforme a monografia da lumefantrina da USP 39, bem como o preparo das soluções de hidrazina, de metenamina, solução opalescente primária, padrão de opalescência, amostra e suspensão de

referência. Os tubos de ensaio foram submetidos à avaliação visual, no sentido vertical sob fundo preto e luz visível.

No teste de substâncias relacionadas por cromatografia em camada delgada, utilizou-se sílica-gel G como fase estacionária e mistura de éter de petróleo, acetato de etila e ácido acético glacial (40:6:10; v:v:v) como fase móvel. O preparo das quatro soluções nas concentrações de 10 mg/mL (*solução 1*), 0,1mg/mL (*solução 2*), 0,003 mg/mL (*solução 3*), e 0,0003 mg/mL (*solução 4*), foi realizado utilizando acetato de etila como solvente. Foram aplicados 10 µL de cada solução à placa, utilizando micropipeta automática e colocadas em cuba contendo a fase móvel para eluição. Após o término, a placa foi seca ao ar e suas manchas avaliadas sob luz ultravioleta (254 nm).

O teste de perda por dessecação foi determinado em 1 g da amostra, pesado em triplicata, em estufa a 105 °C, por 3 horas.

O teste de cinzas sulfatadas foi realizado utilizando 1 g da amostra, tratado com ácido sulfúrico e carbonizado em mufla a 600 °C ± 50 °C em cadinho de sílica, A porcentagem de cinzas é calculada a partir do resíduo em função do peso inicial da amostra, conforme método geral descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição.

Para avaliação de metais pesados, foi utilizado o método II, no qual a solução do insumo farmacêutico ativo é comparada, visualmente, com as preparações padrão (10 ppm Pb) e controle (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.2.4 Doseamento

Em 2008, CÉSAR e colaboradores desenvolveram e validaram os métodos para quantificação da lumefantrina por titulação em meio não aquoso com determinação potencimétrica do ponto final e por cromatografia a líquido de alta eficiência os quais foram adotados para doseamento do fármaco e estão descritos a seguir.

4.2.2.4.1 Quantificação de lumefantrina por titulação em meio não aquoso

O doseamento realizado por titulação em meio não aquoso foi realizado em titulador automático provido de eletrodo de vidro combinado. Foram pesadas, em sextuplicata, exatamente cerca de 200 mg de amostra de lumefantrina previamente dessecada em estufa a 105 °C por 3 horas em frascos apropriados.

Foram adicionados 10 mL de anidrido acético e 40 mL de ácido acético glacial. O titulante ácido perclórico 0,1 M solução volumétrica (SV) foi padronizado com biftalato de potássio conforme método descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição e o ponto final foi determinado potenciometricamente.

4.2.2.4.2 Quantificação de lumefantrina por cromatografia a líquido de alta eficiência

O doseamento da amostra de lumefantrina insumo farmacêutico ativo, lote 06032403, fabricante Dafra Pharma foi realizado conforme as condições relacionadas na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Condições cromatográficas do método de quantificação de lumefantrina insumo farmacêutico ativo por cromatografia a líquido de alta eficiência.

Parâmetros	Especificação
Fase estacionária	Coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)
Fase móvel	Metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (80:20) (v/v)
Eluição	Isocrática
Concentração da solução padrão e da amostra (100%)	24,0 µg/mL
Fluxo	1,5 mL/minuto
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	40 °C
Comprimento de onda de detecção	335 nm
DPR (desvio padrão relativo das áreas)	≤ 2%
Número de pratos teóricos da coluna	≥ 1000
Assimetria	≤ 2
k	Entre 1 e 10

Fonte: adaptado de CÉSAR *et al.*, 2008.

Após a injeção das soluções padrão e amostra, foram registrados os cromatogramas, registradas as áreas sob os picos e realizados os cálculos. Foram obtidos os espectros na faixa de 200 a 700 nm para avaliação da pureza dos sinais obtidos. Para expressar o resultado de teor do padrão secundário, foram preparadas seis replicatas da amostra e duplicata da substância química de referência, em dois

dias diferentes e por analistas diferentes. O preparo das soluções padrão e amostra de lumefantrina foi realizado conforme descrito a seguir:

Solução padrão de lumefantrina: cerca de 15 mg de lumefantrina SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Foi adicionado 1 mL de diclorometano e o volume foi ajustado com metanol. Foram transferidos 4 mL da solução obtida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter uma solução a 24 µg/mL.

Solução amostra de lumefantrina: cerca de 15 mg de lumefantrina insumo farmacêutico ativo, previamente dessecados a 105 °C por três horas foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Foi adicionado 1 mL de diclorometano e o volume foi ajustado com metanol. Foram transferidos 4 mL da solução obtida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter uma solução a 24 µg/mL.

4.2.2.5 Determinação do tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partículas foi determinada pelo método de difração por raio laser utilizando o equipamento analisador de partículas LS. Foi preparada uma suspensão aquosa do lumefantrina, mantida em agitação durante a análise com a leitura realizada em triplicata.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização de arteméter insumo farmacêutico ativo como padrão secundário

4.3.1.1 Propriedades físico-químicas

O ensaio de solubilidade foi realizado com os solventes listados na **Tabela 6** e sua classificação foi realizada de acordo com os termos de solubilidade estabelecidos na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição. Pode-se observar que o insumo apresentou os resultados de acordo com o preconizado em sua monografia.

Tabela 6 - Testes de solubilidade para arteméter IFA realizados a 25 °C.

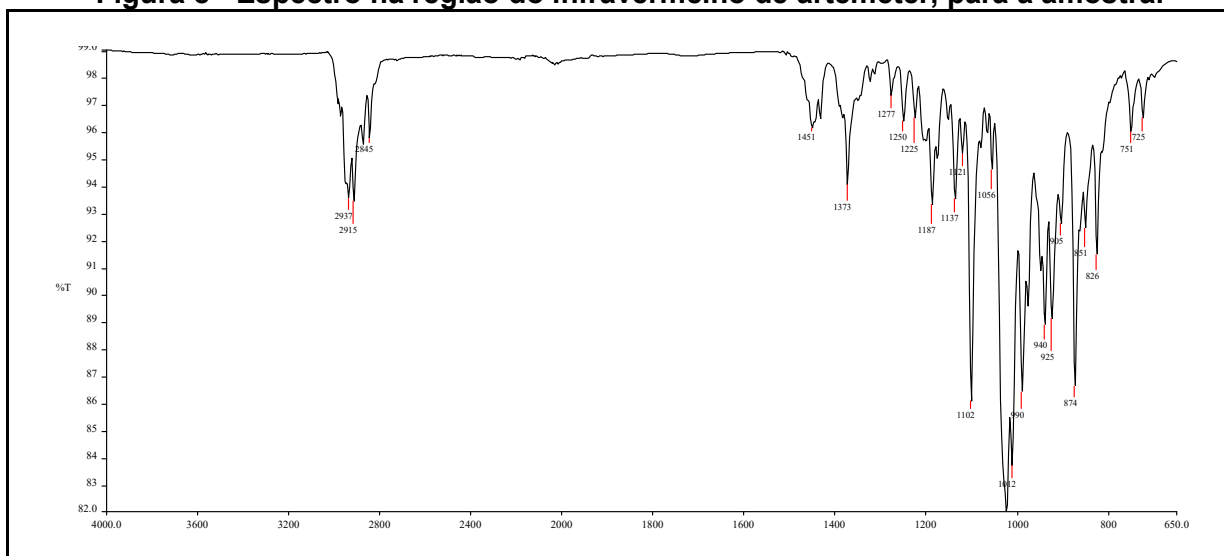
Massa de Arteméter	Solvente Utilizado	Volume gasto	Classificação
10,1 mg	Água ultrapura	>100 mL	Praticamente Insolúvel
10,0 mg	Diclorometano	10 µL	Muito solúvel
10,1 mg	Acetona	10 µL	Muito solúvel
10,0 mg	Etanol absoluto	70 µL	Facilmente solúvel
10,0 mg	Acetato de etila	60 µL	Facilmente solúvel

A temperatura de fusão do insumo farmacêutico ativo obtida em equipamento de ponto de fusão, foi 87,3 °C, estando dentro da faixa especificada de 86 °C a 90 °C.

O resultado do teste do poder rotatório específico foi + 170 °, estando dentro da faixa especificada de + 166 ° a + 173 °. O fármaco é opticamente ativo e desvia a luz plano polarizada por apresentar centros quirais em sua estrutura. Este resultado é um importante critério para identificação do arteméter e determinação de sua pureza enantiomérica.

4.3.1.2 Ensaio de Identificação

Foram obtidos os espectros na região do infravermelho, na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , para a substância química de referência e para amostra de arteméter. A sobreposição dos dois espectros demonstra que se tratam da mesma substância, uma vez que possuem bandas de absorção nos mesmos comprimentos de onda e com intensidades semelhantes (**Figura 8**).

Figura 8 - Espectro na região do infravermelho de arteméter, para a amostra.

As bandas principais foram atribuídas aos grupos funcionais na estrutura química nos números de onda de 2937 cm^{-1} e 2865 cm^{-1} , relacionados à deformação axial de C-H de alcano; 1451 cm^{-1} e 1373 cm^{-1} , à deformação angular de alcano e 1102 cm^{-1} e 1012 cm^{-1} , à deformação axial de C-O de éter.

As análises espectrométricas por infravermelho permitem distinguir substâncias, uma vez que cada tipo de ligação química apresenta uma frequência de vibração, os padrões de absorção no infravermelho de em duas moléculas de estruturas diferentes nunca são exatamente idênticos (PAVIA, 2010). Os espectros no infravermelho da SQR e da amostra de arteméter coincidiram pico a pico, desta forma, pode-se concluir que se tratam da mesma substância química, uma evidência conclusiva sobre a identidade da substância.

No ensaio colorimétrico, utilizando iodeto de potássio, foi observada a formação de uma coloração amarela, e desta forma, apresentado resultado positivo.

4.3.1.3 Ensaios de Pureza

Para avaliação da presença de impurezas orgânicas, foram realizados dois ensaios cromatográficos de substâncias relacionadas (CCD e CLAE). No ensaio por CCD, a especificação do ensaio descreve que qualquer mancha secundária obtida no cromatograma com a *solução (1)*, diferente da mancha principal, não é mais intensa que aquela obtida com a *solução (2)* e não mais que uma mancha é mais intensa que aquela obtida com a *solução (3)*. Na amostra, foram observadas e avaliadas a presença e a intensidade das manchas na cromatoplaça. Não foram observadas outras manchas com exceção da mancha principal da *solução (1)*. Desta forma, a amostra está de acordo com a especificação. No teste de substâncias relacionadas por cromatografia a líquido de alta eficiência, para o preparo da *solução (1)*, foram pesados exatamente 80,06 mg da amostra e diluídos com fase móvel, obtendo-se 10 mL de uma solução com concentração final de 8,01 mg/mL. Para o preparo a *solução (2)*, foram pesados 20,0 mg da amostra e diluídos com fase móvel, obtendo-se 5 mL de uma solução com concentração final de 4,00 mg/mL. Foi realizada uma diluição em fase móvel para obter uma concentração de 0,04 mg/mL. Foram

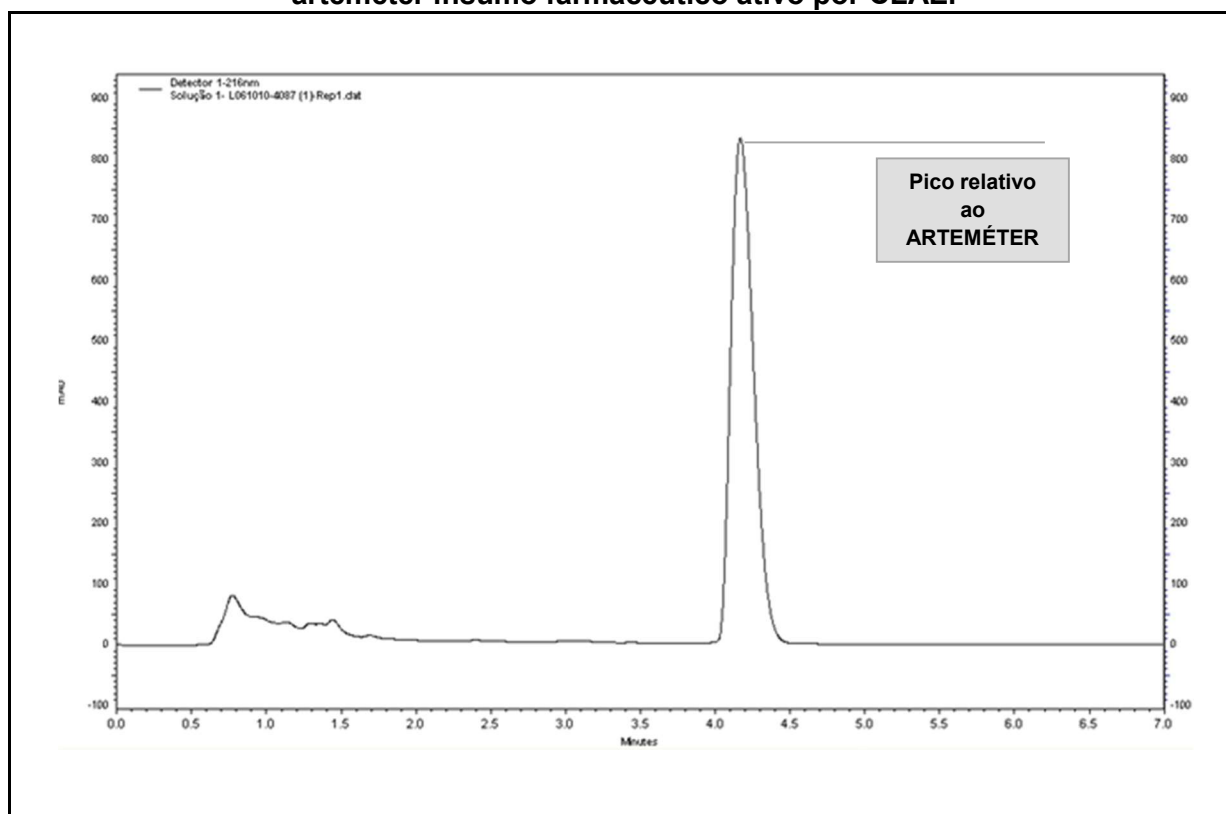
realizadas três injeções de cada solução, com um tempo de corrida de 30 minutos (Tabela 7).

Tabela 7 - Substâncias relacionadas por CLAE para o arteméter IFA.

Injeção	Área	
	Solução (1)	Solução (2)
1	8804288	51181
2	8816042	50861
3	8813969	50300
Média	8811433	50781

A especificação farmacopeica estabelece que a soma das áreas de todos os picos secundários obtidos com a *solução (1)*, exceto a do pico principal, não é maior que o dobro da área do pico principal, obtido com a *solução (2)* (1,0%) e a área de nenhum pico é maior que aquela do pico principal obtido com a *solução (2)* (0,5%). Não mais que um pico obtido com a *solução (1)* apresenta área superior à metade da área do pico principal obtido com a *solução (2)* (0,25%). Uma vez que não foram observados picos secundários no cromatograma obtido com a *solução (1)*, o teste apresentou resultado satisfatório (Figura 9).

Figura 9 - Cromatograma da *solução (1)* do teste de substâncias relacionadas de arteméter insumo farmacêutico ativo por CLAE.



A quantificação de impurezas orgânicas é um dos aspectos mais desafiadores, uma vez que podem ser oriundas de sua síntese ou de produtos de degradação orgânicas do insumo farmacêutico (BROWNE, 2009).

O método utilizado para validação do padrão secundário é por cromatografia a líquido de alta eficiência e seletivo frente a condições de degradação e possíveis produtos de degradação. Desta forma, o resultado obtido demonstra que a amostra cumpre o teste de impurezas orgânicas e está apto a ser utilizado como referência em métodos quantitativos.

O teste perda por dessecação foi determinado utilizando 1 g da amostra, pesado em triplicata em estufa a 60 °C, sob pressão reduzida, por 4 horas, apresentando resultado de 0,30%. Desta forma, a amostra está de acordo com a especificação de no máximo 0,5%. Este resultado se refere a quantidade de substâncias voláteis presentes na amostra.

O insumo farmacêutico ativo apresentou resultado satisfatório de cinzas sulfatadas, de 0,05%. Desta forma, a amostra está de acordo com a especificação de no máximo 0,1% o que permitiu determinar o teor de componentes inorgânicos na amostra.

4.3.1.4 Doseamento

O doseamento por cromatografia a líquido de alta eficiência de arteméter insumo farmacêutico ativo foi realizado conforme o teste descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Para expressar o resultado de teor (**Tabela 8**) da amostra e o valor rotulado do padrão secundário, foram analisadas seis amostras individuais e duplicata da substância química de referência, em dois dias diferentes e por analistas diferentes.

Considerando-se os dados avaliados de doseamento, o teor do padrão secundário é 99,18%, dentro das especificações da monografia.

Tabela 8 - Doseamento de arteméter IFA por CLAE.

Dia de análise e analista	Replicata	Concentração (mg/mL)	Média da área	(%)
1º dia de análise, analista 1	SQR (1)	4,09	4976681	-
	IFA (1)	3,98	4784691	99,14
	IFA (2)	3,98	4781264	99,30
	IFA (3)	3,96	4736326	98,68
	IFA (4)	3,96	4756539	99,38
	IFA (5)	3,94	4735578	99,05
2º dia de análise, analista 2	IFA (6)	3,96	4766034	99,35
	SQR (2)	4,11	4960114	-
	IFA (1)	3,96	4739660	98,82
	IFA (2)	3,94	4723462	98,49
	IFA (3)	3,96	4756955	99,24
	IFA (4)	3,92	4746007	99,99
Resultado	IFA (5)	3,92	4735709	99,39
	IFA (6)	3,96	4766982	99,31
	Média	3,95	4752434	99,18
	DPR (%)	0,5	0,44	0,39

O total das determinações de conteúdo de água, solvente orgânicos, impurezas orgânicas e inorgânicas devem totalizar 100%. Avaliando sob essa ótica, a somatória dos percentuais de doseamento do fármaco, teor de água e de cinzas sulfatadas é de 99,53%, uma diferença desprezível quando comparado a 100%.

4.3.1.5 Determinação do tamanho de partícula

De acordo com a **Tabela 9**, observa-se que o tamanho médio de partículas de arteméter é de aproximadamente 70 µm. Esta informação foi coletada com o objetivo informativo, uma vez que este lote do insumo foi utilizado para as análises de solubilidade em equilíbrio.

Tabela 9 - Tamanho médio de partículas de arteméter IFA.

% Distribuição na amostra	Tamanho de partícula
< 10%	28,79 µm
< 25%	49,63 µm
< 50%	69,25 µm
< 75%	84,00 µm
< 90%	94,42 µm

4.3.2 Caracterização e qualificação de lumefantrina insumo farmacêutico ativo como padrão secundário

4.3.2.1 Propriedades físico-químicas

O ensaio de solubilidade do insumo farmacêutico ativo lumefantrina foi realizado com os solventes listados na **Tabela 10** e sua classificação foi realizada nos termos de solubilidade estabelecidos na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição.

Tabela 10 - Testes de solubilidade para lumefantrina IFA, realizados a 25°C.

Solvente	Volume necessário	Classificação
Água ultrapura	Não solubilizou em 100 mL	Praticamente Insolúvel
Clorofórmio	80 µL	Facilmente solúvel
Acetato de etila	40 µL	Facilmente solúvel
Diclorometano	5 µL	Solúvel
Etanol	5 mL	Pouco solúvel
Metanol	7 mL	Pouco solúvel

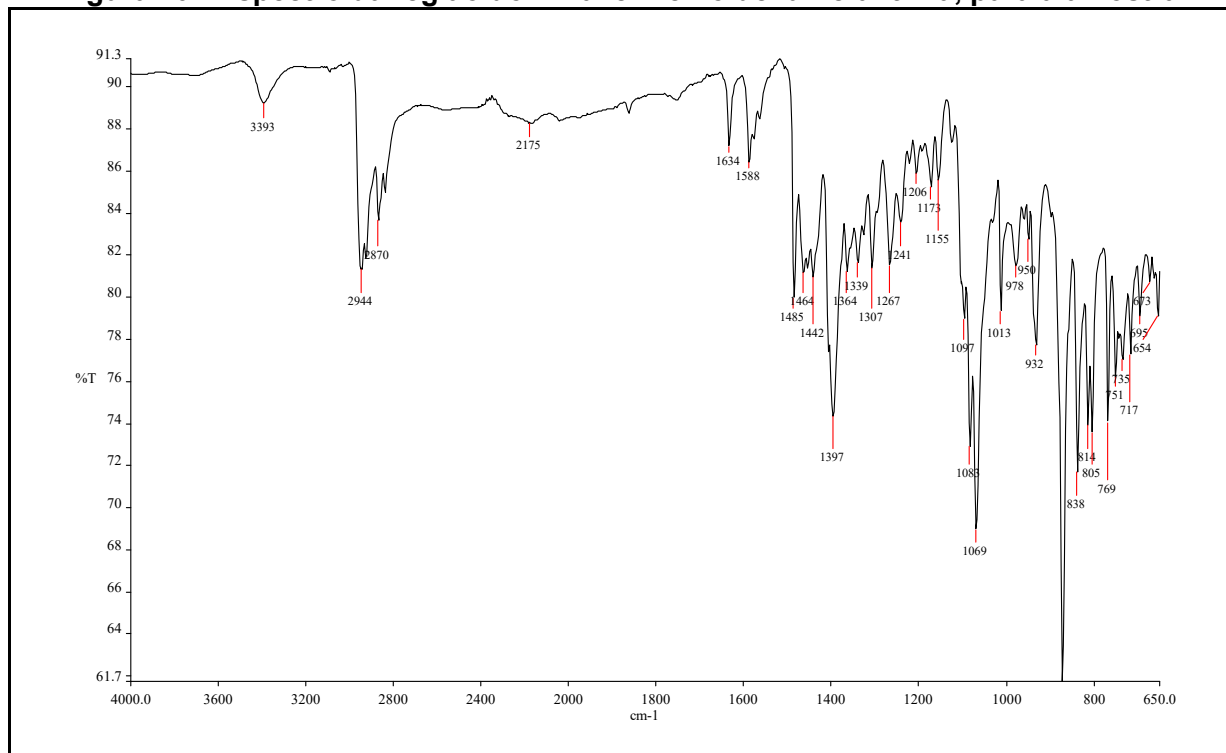
A temperatura de fusão do insumo farmacêutico foi obtida em equipamento de ponto de fusão. O resultado obtido foi 130,3° C, estando dentro da faixa especificada de 128 °C a 132 °C.

4.3.2.2 Ensaio de Identificação

Foram obtidos os espectros na região do infravermelho, na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , para a substância química de referência e para amostra de lumefantrina. A sobreposição dos dois espectros demonstra que se tratam da mesma substância, uma vez que possuem bandas de absorção nos mesmos comprimentos de onda e com intensidades semelhantes (**Figura 10**).

Foram observadas as bandas de absorção nos números de onda e respectivas atribuições na SQR e na amostra de lumefantrina a saber:

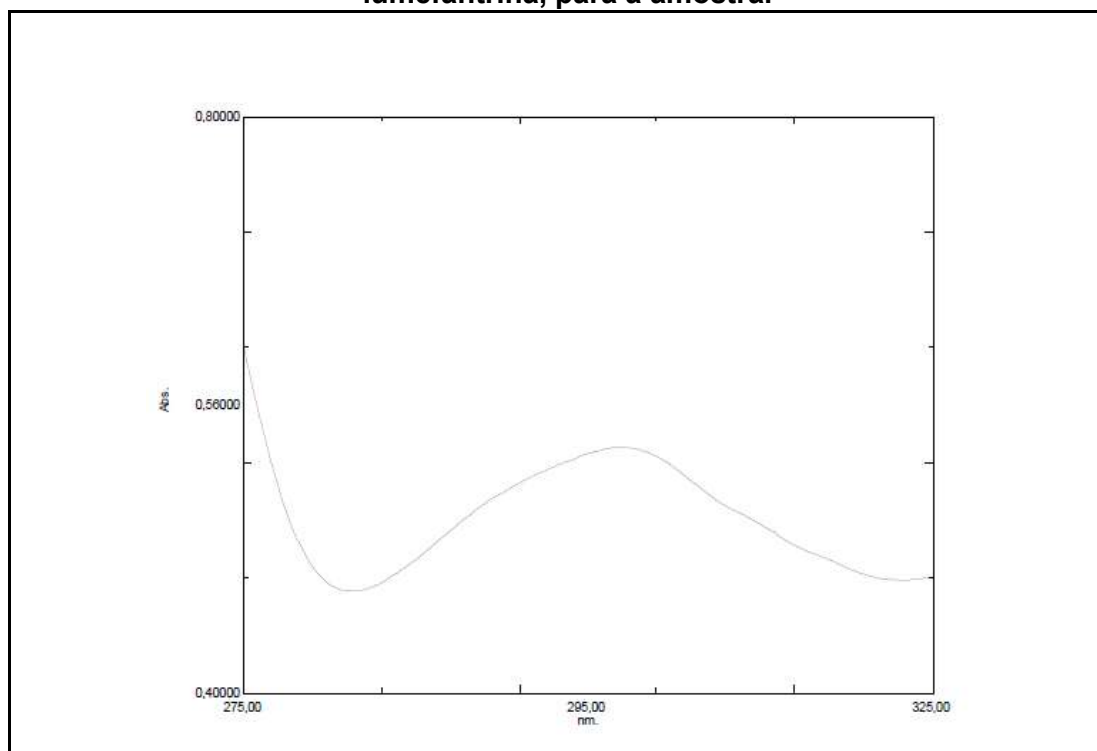
- 3393 cm^{-1} : deformação axial O-H de álcool;
- 2944 cm^{-1} e 2870 cm^{-1} : deformação axial C-H;
- 1634 cm^{-1} : deformação axial C=C de alqueno;
- 1588 cm^{-1} : deformação axial C=C de aromático;
- 1485 cm^{-1} e 1464 cm^{-1} : deformação angular C-H de alcano;
- 1083 cm^{-1} : deformação axial C-O de álcool;
- 1067 cm^{-1} : deformação axial C-N;
- 838 cm^{-1} : deformação angular C-H de aromático; e
- 769 e 751 cm^{-1} : deformação axial C-Cl.

Figura 10 - Espectro da região do infravermelho de lumefantrina, para a amostra.

Os espectros de infravermelho da SQR e da amostra de lumefantrina apresentaram máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas, bem como a avaliação dos números de ondas típicos dos grupos funcionais presentes no fármaco, obtidos em literatura referendada. Desta forma, podemos confirmar que a amostra é lumefantrina.

O espectro na região do ultravioleta, na faixa de 275 a 325 nm da solução da amostra a 0,002% (p/v). Foi observado máximo de absorção em 303 nm (**Figura 11**). A molécula de lumefantrina apresenta grupos cromóforos que absorvem tipicamente nesses comprimentos de que apresentam grande intensidade de absorção em decorrência da conjugação no sistema aromático. Esse fato ocorre porque o aumento da conjugação diminui a energia necessária para a excitação eletrônica contribuindo a absorção em comprimentos de onda maiores (PAVIA, 2010).

Figura 11 - Espectro da região do ultravioleta, na faixa de 276 nm a 325 nm de lumefantrina, para a amostra.



Foram realizados dois ensaios por cromatografia em camada delgada, a primeira cromatoplaça foi submetida a avaliação das manchas sob luz ultravioleta (254 nm) e a segunda foi exposta ao vapor de iodo até aparecimento das manchas. Ambos ensaios apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que a mancha principal obtida com a solução amostra corresponde em posição, cor e intensidade àquela obtida com a solução padrão.

4.3.2.3 Ensaios de pureza

No ensaio de limpidez da solução, os tubos de ensaio foram submetidos a avaliação visual. A solução amostra apresentou a mesma limpidez do diclorometano e opalescência menor do que a suspensão de referência.

Foi realizado o teste de substâncias relacionadas por cromatografia em camada delgada, descrito na Farmacopeia Internacional. Ao se avaliar a cromatoplaça sob luz ultravioleta a 254 nm, não foram observadas manchas secundárias no cromatograma da *solução (1)*. Podemos concluir que o resultado obtido está de

acordo com a especificação, que descreve que qualquer mancha secundária obtida no cromatograma com a *solução (1)*, diferente da mancha principal, não é mais intensa que aquela obtida com a *solução (3)* (0,5%) e nenhuma das duas manchas é mais intensa do que aquela obtida com a *solução (4)* (0,1%).

O teste de perda por dessecação foi determinado em 1 g da amostra, em estufa a 105 °C, por 3 horas, em triplicata, conforme método geral 5.2.9 da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Determinação da perda por dessecação (%) de lumefantrina IFA.

Replicata	Peso da amostra (g)	Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes do teste (g)	Peso do pesa-filtro contendo a amostra após o teste (g)	Perda por dessecação (%)
1	1,00461	58,37192	58,37060	0,13
2	1,00503	58,37348	58,37200	0,15
3	1,00482	58,37270	58,37130	0,14
			Média	0,14

O insumo farmacêutico ativo lumefantrina apresentou resultado satisfatório (0,14%) no teste de perda por dessecação, de acordo com a especificação máxima de 0,50%.

O teste de cinzas sulfatadas foi realizado utilizando 1 g da amostra em cadinho de sílica e o insumo farmacêutico ativo apresentou resultado de cinzas sulfatadas de 0,05% dentro do limite especificado de no máximo 0,1%.

O ensaio limite para de metais pesados (método II) e a amostra de lumefantrina apresentou resultado satisfatório, menor que 10 ppm. A seleção do método II no ensaio limite, é que a lumefantrina apresenta cor amarela requer uma amostra controle para avaliação visual comparativa.

4.3.2.4 Doseamento

Os métodos desenvolvidos e validados por César e colaboradores (2008) por titulação em meio não aquoso com determinação do ponto final potenciométrica e cromatografia a líquido de alta eficiência foram aplicados para quantificação da amostra e sua qualificação como padrão secundário.

4.3.2.4.1 Quantificação de lumefantrina por titulação em meio não aquoso

No doseamento do insumo farmacêutico ativo por titulação em meio não aquoso e com determinação potenciométrica do ponto final, a amostra foi previamente dessecada a 105 °C por 3 horas. O titulante ácido perclórico 0,1 M SV foi padronizado com biftalato de potássio, tendo como fator de correção 1,0018.

Foram realizadas seis determinações em dois dias diferentes e executadas por dois analistas diferentes e o teor do padrão secundário (n=12) foi 100,36% e DPR 0,27%. Os dados das massas pesadas e dos resultados de teor individuais encontrados estão listados na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Doseamento de lumefantrina IFA por titulação potenciométrica.

Dia de análise e analista	Replicata	Massa pesada (mg)	(%)
1º dia de análise, analista 1	1	200,06	99,99
	2	199,10	100,70
	3	199,90	100,32
	4	200,05	100,27
	5	200,10	100,33
	6	200,10	100,33
2º dia de análise, analista 2	1	200,02	100,01
	2	200,01	100,53
	3	199,98	100,52
	4	199,90	100,03
	5	199,95	100,86
	6	200,15	100,47
Resultado		Média DPR(%)	100,36 0,27

4.3.2.4.2 Quantificação de lumefantrina por cromatografia a líquido de alta eficiência

O doseamento da amostra de lumefantrina insumo farmacêutico ativo por CLAE, fabricante Dafra Pharma, foi realizado conforme método descrito no item 4.2.2.4.2.

O teor encontrado (n=12) foi 100,43% e DPR 0,28%, obtidos por análises realizadas com seis replicatas da amostra de lumefantrina previamente dessecadas a 105 °C por 3 horas e duplicata da substância química de referência, em dois dias diferentes e por analistas diferentes (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Resultado do doseamento de lumefantrina IFA por CLAE.

Dia de análise e analista	Replicata	Concentração (µg/mL)	Média da área	(%)
1º dia de análise, analista 1	SQR (1)	23,91	329,8	-
	IFA (1)	24,35	331,1	100,05
	IFA (2)	24,37	331,7	100,16
	IFA (3)	23,82	325,2	100,44
	IFA (4)	24,16	329,4	100,32
	IFA (5)	23,86	326,4	100,67
2º dia de análise, analista 2	IFA (6)	24,24	331,3	100,56
	SQR (2)	23,59	320,3	-
	IFA (1)	24,14	330,4	100,69
	IFA (2)	24,37	331,3	100,06
	IFA (3)	23,68	322,5	100,21
	IFA (4)	24,16	330,6	100,68
Resultado (IFA)	IFA (5)	23,82	326,7	100,90
	IFA (6)	23,70	323,6	100,49
	Média	24,06	328,3	100,43
	DPR (%)	1,10	1,01	0,28

Considerando-se que dos dados de doseamento obtidos por titulação potenciométrica e CLAE seguem a distribuição normal, foi aplicado o teste *t* de *Student* para avaliar a diferença dentre as médias obtidas, utilizando-se o *software* Microsoft Excel® 2007. O *t* calculado de apresentou valor de - 0,6474, sendo inferior ao *t* tabelado de 2,0739 ($\alpha = 0,05$; G.L. = 12) o que permite concluir que não há uma diferença significativa entre as médias obtidas pelos métodos cromatográfico e titulométrico utilizados para quantificação da lumefantrina. Desta forma, será adotado como valor rotulado o teor determinado por cromatografia a líquido de alta eficiência (n=12) de 100,43%. Tanto o valor médio quanto os valores individuais encontrados estão contidos no intervalo farmacopeico especificado de, no mínimo 98,5% e, no máximo 101,0% em relação à substância dessecada.

4.3.2.5 Determinação do tamanho de partícula

De acordo com a **Tabela 14**, observa-se que o tamanho médio de partículas de lumefantrina IFA lote 06032403 é de aproximadamente 60 µm. Esta informação foi coletada com o objetivo informativo, uma vez que este insumo foi utilizado para as análises de solubilidade em equilíbrio.

Tabela 14 - Tamanho médio de partículas de lumefantrina IFA.

% Distribuição na amostra	Tamanho de partícula
< 10%	16,14 µm
< 25%	36,17 µm
< 50%	57,12 µm
< 75%	75,00 µm
< 90%	86,21 µm

4.4 Conclusões

- O insumo farmacêutico ativo arteméter cumpriu com os requisitos farmacopeicos de identidade, impurezas orgânicas e inorgânicas apresentou teor de 99,18%, determinado por cromatografia a líquido de alta eficiência.
- O insumo farmacêutico ativo lumefantrina, cumpriu com os requisitos estabelecidos de identidade, impurezas orgânicas e inorgânicas. A quantificação do fármaco foi realizada por métodos cromatográfico e titulométrico, cujos resultados obtidos não apresentaram diferença significativa, estatisticamente avaliados pelo teste *t* de *Student*. Após a conclusão sobre a adequabilidade dos ensaios, foi proposta uma minuta de monografia para a lumefantrina insumo farmacêutico ativo a ser publicada na Farmacopeia Brasileira (**APÊNDICE A**).

5 CAPÍTULO II: OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DOSEAMENTO DE ARTEMETER E LUMEFANTRINA EM INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS E EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA

5.1 Materiais

5.1.1 Substâncias químicas de referências e insumos farmacêuticos ativos

- Arteméter substância química de referência (SQR) disponibilizada pela Farmacopeia Americana (USP) lote H0M313 e teor de 99,30%.
- Arteméter insumo farmacêutico ativo (IFA), Dafra Pharma - Turnhout, Bélgica, lote 0601010-4087.
- Lumefantrina substância química de referência (SQR) disponibilizada pela Farmacopeia Americana (USP) lote G0L394 e teor de 99,90%.
- Lumefantrina insumo farmacêutico ativo (IFA), Dafra Pharma - Turnhout, Bélgica, lote 06032403.

5.1.2 Reagentes

- Água ultrapura.
- Solventes e reagentes grau analítico: acetato de etila, acetato de sódio, acetona, acetonitrila, ácido acético glacial, clorofórmio, diclorometano, etanol, etanol absoluto, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de potássio monobásico, laurilsulfato de sódio, acetato de sódio triidratado, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio monobásico, laurilsulfato de sódio, polissorbato 80.
- Solventes e reagentes grau cromatográfico: metanol, acetonitrila e ácido trifluoroacético, trietilamina.

5.1.3 Materiais e vidrarias

- Balões volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2000 mL.

- Buretas de 25 mL.
- Coluna C₁₈ de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) - Purospher® STAR RP- endcapped Lote HX248565, Alemanha.
- Coluna C₁₈ de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) - Phenomenex Luna, Lote 5291-103.
- Coluna cromatográfica C₁₈ de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) - Agilent, XDB PN 7995118-585, Lote 51210749, USA.
- Coluna cromatográfica C₁₈ de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) - Xterra®, Waters, PN 186000496, Lote 015534195118-13.
- Coluna cromatográfica C₁₈ de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) - Agilent, BDS PN 79826BP-584, Lote B 05108, USA.
- Coluna cromatográfica C₁₈ de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm) - Merck, LiChrospher®, Lote 497117, Alemanha
- Erlenmeyeres de 10 e 250 mL.
- Filtros de seringa de PVDF com 0,45 µm de tamanho de poro.
- Frascos tipo *vial* de 12 x 32 mm com tampa de rosca e septos de silicone.
- Hastes para suporte e garras.
- Kit para filtração a vácuo.
- Micropipetas automáticas.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 4, 5 e 10 mL.
- Tubos de ensaio com tampa.
- Vidraria de uso laboratorial.

5.1.4 Equipamentos

- Aparelho de ultrassom UNIQUE 1400.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP211D.

- Banho-maria FULL GAUGE TIC-17C.
- Bomba de vácuo LABOPORT KNF N842.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência THERMO Surveyor Finnigan equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível.
- Centrífuga Hettich Universal.
- Espectrômetro SHIMADZU FTIR IR Prestige-21 com *software* IR Solution.
- Estufa NABERTHERM TR 60.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE DIRECT Q3.

5.2 Métodos

Este capítulo engloba as validações dos métodos utilizados para doseamento de arteméter e lumefantrina nos estudos de solubilidade, dissolução e validação dos padrões secundários (**Tabela 15**).

As validações para os quatro métodos foram imprescindíveis para que as faixas de trabalho fossem abrangidas, além da necessidade de atender aos parâmetros requeridos pelos guias de validação analítica. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Thermo Surveyor Finnigan provido de detector ultravioleta com arranjo de diodos.

Os parâmetros estudados foram linearidade, seletividade, precisão exatidão e robustez.

Tabela 15 - Métodos e respectivas finalidades.

Analito(s)	Finalidade
Arteméter	Quantificação do fármaco em insumo farmacêutico e nos estudos de solubilidade.
Lumefantrina	Quantificação do fármaco em insumo farmacêutico, no estudo de solubilidade e para elaboração da monografia.
Arteméter e lumefantrina comprimidos	Teste quantitativos para a doseamento dos fármacos em comprimidos de dose fixa combinada.
	Teste quantitativos para a avaliação da performance dos fármacos e forma farmacêutica nos testes de dissolução e solubilidade.

5.2.1 Condições analíticas

5.2.1.1 Quantificação de arteméter por CLAE

Os parâmetros cromatográficos utilizados para doseamento de arteméter insumo farmacêutico ativo foram selecionados conforme estabelecido na monografia da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (**Tabela 16**).

Para calcular o fator de retenção, o tempo morto (t_0) foi determinado injetando-se no cromatógrafo solução de uracila a 10 µg/mL (p/v) em fase móvel.

Tabela 16 - Condições cromatográficas do método de doseamento de arteméter insumo farmacêutico ativo por CLAE.

Parâmetros	Especificação
Fase estacionária	Coluna C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)
Fase móvel	Acetonitrila e água (70:30; v/v)
Eluição	Isocrática
Concentração da solução padrão e da amostra (100%)	80 µg/mL
Fluxo	1,0 mL/minuto
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	30 °C
Comprimento de onda de detecção	216 nm
DPR (desvio padrão relativo das áreas)	≤ 2%
Número de pratos teóricos da coluna	≥ 1000
Assimetria	≤ 2
k	Entre 1 e 10

Fonte: FARMACOPEIA, 2010; SNYDER, 1997.

Solução padrão de arteméter: aproximadamente 20 mg de arteméter SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter solução a 4 mg/mL. Transferiram-se 2 mL da solução preparada anteriormente para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado, obtendo-se concentração de 0,08 mg/mL.

Solução amostra de arteméter: aproximadamente 20 mg de arteméter insumo farmacêutico ativo, previamente dessecados em estufa à vácuo a 60 °C por 4 horas, foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter solução a 4 mg/mL. Transferiram-se 2 mL da solução preparada anteriormente para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado, obtendo-se concentração de 0,08 mg/mL.

5.2.1.2 Quantificação de lumefantrina por CLAE

Em 2008, CÉSAR e colaboradores desenvolveram e validaram os métodos para doseamento da lumefantrina por cromatografia a líquido de alta eficiência (**Tabela 17**). Para calcular o fator de retenção, o tempo morto (t_0) foi determinado injetando-se no cromatógrafo solução de uracila a 10 µg/mL em fase móvel.

Tabela 17 - Condições cromatográficas do método de doseamento de lumefantrina insumo farmacêutico ativo por CLAE.

Parâmetros	Especificação
Fase estacionária	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)
Fase móvel	Metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20; v/v)
Eluição	Isocrática
Concentração da solução padrão e da amostra (100%)	24,00 µg/mL
Fluxo	1,5 mL/minuto
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	40 °C
Comprimento de onda de detecção	335 nm
DPR (desvio padrão relativo das áreas)	≤ 2%
Número de pratos teóricos da coluna	≥ 1000
Assimetria	≤ 2
k	Entre 1 e 10

Fonte: adaptado de CÉSAR *et al.*, 2008; SNYDER, 1997.

Solução padrão de lumefantrina: cerca de 15 mg de lumefantrina SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Foi adicionado 1 mL de diclorometano e o volume foi ajustado com metanol. Foram transferidos 4 mL da solução obtida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter uma solução a 24 µg/mL.

Solução amostra de lumefantrina: cerca de 15 mg de lumefantrina insumo farmacêutico ativo, previamente dessecados a 105 °C por 3 horas foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Foi adicionado 1 mL de diclorometano e o volume foi ajustado com metanol. Foram transferidos 4 mL da solução obtida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter uma solução a 24 µg/mL.

5.2.1.3 Quantificação de arteméter e lumefantrina por CLAE

Em 2011, UMAPATHI e colaboradores propuseram uma metodologia para quantificação simultânea de arteméter e lumefantrina em dose fixa combinada por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção UV. Este método foi

otimizado, com a avaliação de diferentes proporções de solventes da fase móvel, temperatura, comprimento de onda e fluxo. Os parâmetros fator de retenção (k) dos picos, assimetria, pureza e resolução (R) foram utilizados como critério de seleção condições cromatográficas ideais (**Tabela 18**). Para calcular o fator de retenção, o tempo morto (t_0) foi determinado injetando-se no cromatógrafo solução de uracila a 10 µg/mL (p/v) em fase móvel.

Tabela 18 - Condições cromatográficas da quantificação de arteméter e lumefantrina por CLAE.

Parâmetros	Especificação
Fase estacionária	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,0 mm; 5 µm)
Fase móvel	Acetonitrila e trietilamina 0,50% (v/v) (80:20; v/v)
Eluição	Isocrática
Concentração da solução padrão e da amostra (100%) para doseamento e uniformidade de conteúdo	20,00 µg/mL (ART) + 120,00 µg/mL (LMF)
Concentração da solução padrão e da amostra (100%) para dissolução	22,22 µg/mL (ART) + 133,33 µg/mL (LMF)
Fluxo	1,2 mL/minuto
Volume de injeção	25 µL
Temperatura da coluna	40 °C
Comprimento de onda de detecção	210 nm - ARTEMÉTER 390 nm - LUMEFANTRINA
DPR (desvio padrão relativo das áreas)	≤ 2%
Número de pratos teóricos da coluna	≥ 1000
Assimetria	≤ 2
k	Entre 1 e 10

Fonte: adaptado de UMAPATHI *et al.*, 2011.

Solução padrão estoque de arteméter (SPE-ART): foram transferidos 20 mg de arteméter SQR para balão volumétrico de 100 mL, adicionado 1 mL de clorofórmio e submetidos a banho de ultrassom por 10 minutos. Transcorrido o tempo especificado, o volume foi ajustado com acetonitrila obtendo uma solução de concentração equivalente a 200 µg/mL.

Solução padrão estoque de lumefantrina (SPE-LMF): foram transferidos 30 mg de lumefantrina para balão volumétrico de 25 mL, adicionados 4 mL de clorofórmio e submetidos a banho de ultrassom por 10 minutos. Transcorrido o tempo especificado, o volume foi ajustado com acetonitrila obtendo uma solução de concentração equivalente a 1.200 µg/mL.

Solução padrão mista de arteméter e lumefantrina: foram transferidos 5 mL da SPE-ART e 5 mL da SPE-LMF para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com fase móvel preparada conforme **Tabela 18**, obtendo uma solução de

concentração de arteméter e lumefantrina equivalente a 20 e 120 µg/mL respectivamente.

Solução amostra de arteméter e lumefantrina comprimidos (doseamento): foi pesada exatamente quantidade de pó dos comprimidos equivalente a meio peso médio (10 mg de arteméter e 60 mg de lumefantrina) e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se 5 mL de clorofórmio e submeteu-se a banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi ajustado com acetonitrila, a amostra foi homogeneizada e filtrada. Transferiram-se 5 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com fase móvel.

Solução amostra de arteméter e lumefantrina comprimidos (dissolução): transcorrido o tempo de coleta, foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada cuba de dissolução, filtradas e submetidas às análise cromatográficas.

5.2.2 Validação dos métodos

5.2.2.1 Linearidade

Foram preparadas soluções padrão estoque (*SPE*), em triplicata, e, a partir de cada solução estoque, foram realizadas as diluições para se obter cinco níveis de concentração, igualmente espaçados (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Métodos e intervalos avaliados da linearidade.

Método	Intervalo	Delineamento
Quantificação de arteméter insumo farmacêutico ativo	48,00 a 112,00 µg/mL (60,0 a 140,0%)	Tabela 20
Quantificação de lumefantrina insumo farmacêutico ativo	19,20 a 28,80 µg/mL (80,0 a 120,0%)	Tabela 21
Doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos	Arteméter: 16,00 a 24,00 µg/mL (80,0 a 120,0%) Lumefantrina: 96,00 a 144,0 µg /mL (80,0 a 120,0%)	Tabela 22
Teste de dissolução de arteméter e lumefantrina comprimidos	Arteméter: 8,89 a 26,66 µg/mL (40,0 a 120,0%) Lumefantrina: 53,33 a 160,00 µg/mL (40,0 a 120,0%)	Tabela 23

Tabela 20 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de doseamento de arteméter por CLAE.

Intervalo (%)	Volume da SPE (mL)	Fase móvel q.s.p (mL)	Concentração de arteméter (µg/mL)
60,0	7,5	25	48,00
80,0	10,0	25	64,00
100,0	12,5	25	80,00
120,0	15,0	25	96,00
140,0	17,5	25	112,00

Preparo da SPE: Foram transferidos 16,0 mg de arteméter, exatamente pesados, para a balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com fase móvel.

Tabela 21 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.

Intervalo (%)	Volume da SPE (mL)	Fase móvel q.s.p (mL)	Concentração de lumefantrina (µg/mL)
80,0	3,2	50	19,20
90,0	3,6	50	21,60
100,0	4,0	50	24,00
110,0	4,4	50	26,40
120,0	4,8	50	28,80

Preparo da SPE: Foram transferidos 30,0 mg de lumefantrina para cada balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 2 mL de diclorometano e completou-se o volume utilizando metanol.

Tabela 22 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de doseamento de arteméter e lumefantrina por CLAE.

Intervalo (%)	Volume da SPE-ART (mL)	Volume da SPE-LMF (mL)	Fase móvel q.s.p (mL)	Concentração de arteméter (µg/mL)	Concentração de lumefantrina (µg/mL)
80,0	4,0	4,0	50	16,00	96,00
90,0	4,5	4,5	50	18,00	108,00
100,0	5,0	5,0	50	20,00	120,00
110,0	5,5	5,5	50	22,00	132,00
120,0	6,0	6,0	50	24,00	144,00

Preparo de SPE: item 5.2.1.3

Tabela 23 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de dissolução de arteméter e lumefantrina por CLAE.

Intervalo (%)	Volume da SPE-ART (222,20 µg/mL) (mL)	Volume da SPE-LMF (1333,30 µg/mL) (mL)	Fase móvel q.s.p (mL)	Concentração de arteméter (µg/mL)	Concentração de lumefantrina (µg/mL)
40,0	2,0	2,0	50	8,89	53,33
60,0	3,0	3,0	50	13,33	80,00
80,0	4,0	4,0	50	17,78	106,66
100,0	5,0	5,0	50	22,22	133,33
120,0	6,0	6,0	50	26,66	160,00

Preparo de SPE: item 5.2.1.3, sendo que as massas utilizadas de arteméter e lumefantrina foram 22,22mg e 33,33mg, respectivamente.

Foram preparadas as soluções pela diluição das soluções padrão estoque utilizando-se uma bureta de 10 mL. Cada solução padrão estoque deu origem a cinco soluções totalizando quinze soluções. As soluções foram preparadas aleatoriamente, em seguida foram filtradas, transferidas para *vials* e injetadas cinco vezes, também aleatoriamente no cromatógrafo.

Os resultados de área em função da concentração obtidos nos cromatogramas e a presença de valores dispersos (*outliers*) foram avaliados pelo teste de resíduo padronizado de *Jackknife* ($\alpha = 0,05$). Neste teste, é permitida a exclusão de 22% dos dados originais da curva e caso o ponto for a terceira e última replicata do nível de concentração, não pode ser excluído (SOUZA, 2007). Para avaliar a correlação linear entre as área e concentrações dos analitos, foi empregada a regressão linear simples pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) (ANVISA, 2015a).

O MMQO parte das premissas que de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, possuem variância constante ao longo do eixo das abscissas e são independentes.

Para avaliação das premissas, foram realizados os testes estatísticos *Ryan-Joiner* para avaliação da normalidade, *Levene* modificado por *Brown e Forsythe* para avaliar homoscedasticidade e *Durbin-Watson* para avaliação da independência dos resíduos da regressão. Foi aplicada a *Análise de variância* (ANOVA) para avaliar se a regressão é significativa. Foram empregadas em planilhas do *software* Microsoft Excel[®] desenvolvidas por SOUZA e colaboradores (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007).

A curva de calibração foi construída plotando-se os valores das médias das áreas sob o pico do analito para cada nível de concentração após tratamento de *outliers*, em função da concentração. Foram determinados equação da reta e coeficiente de determinação (R^2).

5.2.2.2 Seletividade

A seletividade do método analítico demonstra a capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas e componentes da matriz. Para comprovar a capacidade dos métodos em separar o fármaco de possíveis produtos de degradação, as amostras foram expostas as condições de degradação forçada (ANVISA, 2015a,b).

As amostras foram submetidas à hidrólise ácida (ácido clorídrico 0,1 M), hidrólise alcalina (hidróxido de sódio 0,1 M), oxidação (peróxido de hidrogênio 3% v/v), fotólise (câmara de fotoestabilidade), calor (estufa a 50 °C) e íons metálicos durante 7 dias, misturadas em iguais proporções (ANVISA, 2015b).

Para comprovação da seletividade, foram avaliadas purezas espectrais do picos de interesse relativos aos analitos, obtidos nos cromatogramas com auxílio do detector DAD. Os testes foram realizadas com as soluções amostra, padrão, diluente, fase móvel e naquelas obtidas por degradação conforme as **Tabela 24, 25 e 26**.

5.2.2.2.1 Seletividade de arteméter

Tabela 24 - Condições de degradação para avaliação da seletividade do método de doseamento de arteméter por CLAE.

Analito	Condição de degradação	Procedimento
(1) 12,5 mL da SPE de arteméter (2) 12,5 mL SE de arteméter IFA	Hidrólise alcalina	Adição de 5 mL de hidróxido de sódio 0,1 M à amostra e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz
(1) 12,5 mL da SPE de arteméter (2) 12,5 mL SE de arteméter IFA	Hidrólise ácida	Adição de 5 mL de ácido clorídrico 0,1 M à amostra, e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz
(1) 12,5 mL da SPE de arteméter (2) 12,5 mL SE de arteméter IFA	Oxidação	Adição de 5 mL de peróxido de hidrogênio a 3% à amostra, e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz
(1) 12,5 mL da SPE de arteméter (2) 12,5 mL SE de arteméter IFA	Fotólise	Armazenamento em câmara de fotoestabilidade em temperatura ambiente por 7 dias
8 mg de arteméter SQR 8 mg de arteméter IFA	Calor	Armazenamento por 7 dias em estufa a 50 °C
(1) 12,5 mL da SPE de arteméter (2) 12,5 mL SE de arteméter IFA	Íons metálicos	Adição de 5 mL de sulfato de cobre 0,1 M à amostra, e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz

Decorrido o tempo especificado, as soluções degradadas foram transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL, completou-se o volume com fase móvel, e, juntamente com o diluente, a fase móvel e as soluções padrão e amostra controle foram analisadas conforme o procedimento descrito no item 5.2.1.1.

5.2.2.2.2 Seletividade de lumefantrina

Tabela 25 - Condições de degradação para avaliação da seletividade do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.

Analito	Condição de Degradação	Procedimento
(1) 4 mL da SPE de lumefantrina (2) 4 mL da SE de lumefantrina IFA	Hidrólise alcalina	Adição de 4 mL de NaOH 0,1 M à amostra e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz
(1) 4 mL da SPE de lumefantrina (2) 4 mL da SE de lumefantrina IFA	Hidrólise ácida	Adição de 4 mL de HCl 0,1 M à amostra, e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz
(1) 4 mL da SPE de lumefantrina (2) 4 mL da SE de lumefantrina IFA	Oxidação	Adição de 4 mL de H ₂ O ₂ 3% (v/v) à amostra, e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz
(1) 4 mL da SPE de lumefantrina (2) 4 mL da SE de lumefantrina IFA	Fotólise	Armazenamento em câmara de fotoestabilidade em temperatura ambiente por 7 dias
15 mg de lumefantrina SQR 15 mg de lumefantrina IFA	Calor	Armazenamento por 7 dias em estufa a 50 °C
(1) 4 mL da SPE de lumefantrina (2) 4 mL da SE de lumefantrina IFA	Íons metálicos	Adição de 4 mL de CuSO ₄ 0,1 M à amostra, e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz

Em todas as condições relacionadas, as soluções degradadas foram transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com fase móvel. Foram preparadas, paralelamente, soluções branco (sem o fármaco) submetidas ao mesmo procedimento de degradação. Decorrido o tempo especificado, as amostras descritas na **Tabela 25**, juntamente com o diluente, a fase móvel e as soluções padrão e amostra não submetidas a degradação foram analisadas conforme o procedimento descrito no item 5.2.1.2.

5.2.2.2.3 Seletividade de arteméter e lumefantrina

Tabela 26 - Condições de degradação para avaliação da seletividade do método de doseamento de arteméter e lumefantrina por CLAE.

Analito	Condição de Degradação	Procedimento
(1) 5 mL da SPE - ART (2) 5 mL da SPE - LMF	Hidrólise alcalina	Adição de 5 mL de NaOH 0,1 M às amostras e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz.
(1) 5 mL da SPE - ART (2) 5 mL da SPE - LMF	Hidrólise ácida	Adição de 5 mL de HCl 0,1 M às amostras e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz.
(1) 5 mL da SPE - ART (2) 5 mL da SPE - LMF	Oxidação	Adição de 5 mL de H ₂ O ₂ a 3% às amostras e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz.
(1) 5 mL da SPE - ART (2) 5 mL da SPE - LMF	Fotólise	Armazenamento em câmara de fotoestabilidade em temperatura ambiente por 7 dias.
(1) 20 mg de arteméter (2) 30 mg de lumefantrina	Calor	Armazenamento por 7 dias em estufa a 50 °C.
(1) 5 mL da SPE - ART (2) 5 mL da SPE - LMF	Íons metálicos	Adição de 5 mL de CuSO ₄ 0,1 M à amostra e repouso em temperatura ambiente por 7 dias, protegido da luz.

Decorrido o tempo especificado, as soluções degradadas foram transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com fase móvel. Foram preparadas, paralelamente, soluções sem fármacos (branco) e que foram submetidas ao mesmo procedimento de degradação. As amostras descritas na **Tabela 26**, juntamente com o diluente, a fase móvel, os meios de dissolução pH 1,20 + 1% de polissorbato 80 e pH 6,80 + 1% de laurilsulfato de sódio, placebo, soluções padrão e amostra não submetidas a degradação foram analisadas conforme o procedimento descrito no 5.2.1.3.

5.2.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada por meio da repetitividade e da precisão intermediária (**Tabela 27**). No estudo da repetitividade dos métodos de doseamento de arteméter e lumefantrina insumos farmacêuticos ativos, foram realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três replicatas, individualmente preparadas pelo mesmo analista, mesma instrumentação e dentro de um curto intervalo de tempo, em uma única corrida analítica. Para avaliação da precisão intermediária, foram avaliadas três concentrações (baixa, média e alta), com três replicatas, individualmente preparadas por segundo analista em dias diferentes. Para avaliação da precisão intermediária e repetitividade dos testes de teor e de dissolução de arteméter e lumefantrina com comprimidos, foram realizadas seis determinações em dois dias diferentes e executadas por dois analistas diferentes em 100% (cem por cento) da concentração do teste, individualmente preparadas (ANVISA, 2003; THE UNITED, 2016).

Tabela 27 - Métodos e níveis estudados no parâmetro precisão.

Método	Concentrações e Níveis
Quantificação de arteméter insumo farmacêutico ativo	Baixa: 48,00 µg/mL (60%) Média: 80,00 µg/mL (100%) Alta: 112,00 µg/mL (120%)
Quantificação de lumefantrina insumo farmacêutico ativo	Baixa: 19,20 µg/mL (80%) Média: 24,00 µg/mL (100%) Alta: 28,80 µg/mL (120%)
Doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos	Arteméter: 20,00 µg/mL (100%) Lumefantrina: 120,00 µg/mL (100%)
Dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos	Arteméter: 22,22 µg/mL (100%) Lumefantrina: 133,33 µg/mL (100%)

Após a avaliação das áreas dos cromatogramas, foi avaliada a dispersão dos resultados, pelo cálculo do desvio padrão relativo, utilizando a fórmula “ $DPR=(DP/CMD) \times 100$ ”, em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada, o qual não deve ser superior a 5,0%. Para a demonstração da precisão intermediária, foi utilizado o teste *t* de *Student*, para a avaliação das diferenças estatísticas das médias para cada nível. Para os testes de dissolução, são recomendados desvios de no máximo 2,0% (THE UNITED, 2016).

5.2.2.4 Exatidão

A exatidão de cada método foi determinada após a realização da avaliação da linearidade e da seletividade de cada método. Foram realizadas nove determinações da substância química de referência, em três concentrações: baixa, média e alta, em triplicata (**Tabela 28**).

Tabela 28 - Métodos e intervalos estudados no parâmetro exatidão.

Método	Concentrações (µg/mL)	
Quantificação de arteméter insumo farmacêutico ativo	Baixa: 48,00 (60,0%)	
	Média: 80,00 (100,0%)	
	Alta: 112,00 (140,0%)	
Quantificação de lumefantrina insumo farmacêutico ativo	Baixa: 19,20 (80,0%)	
	Média: 24,00 (100,0%)	
	Alta: 28,80 (120,0%)	
Doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos	Arteméter: Baixa: 16,00 (80,0%) Média: 20,00 (100,0%) Alta: 24,00 (120,0%)	Lumefantrina: Baixa: 96,00 (80,0%) Média: 120,00 (100,0%) Alta: 144,00 (120,0%)
	Arteméter: Baixa: 8,89 (40,0%) Média: 17,78 (80,0%) Alta: 26,66 (120,0%)	Lumefantrina: Baixa: 53,33 (40,0%) Média: 106,66 (80,0%) Alta: 160,00 (120,0%)

Nos testes de exatidão dos métodos de doseamento nos comprimidos, foi adicionado placebo às soluções. A mistura foi preparada considerando os excipientes descritos na bula do Coartem[®], a qual descreve apenas composição qualitativa dos componentes.

Foi necessário realizar uma estimativa, tendo como base a composição usual dos excipientes na forma farmacêutica comprimidos (**Tabela 29**) (ROWE, 2012). O peso médio dos comprimidos de Coartem[®] foi 240 mg, sendo 120,0 mg de lumefantrina e 20,0 mg de arteméter, conseqüentemente cada comprimido continha cerca de 100,0 mg de excipientes.

Tabela 29 - Composição percentual estimada dos excipientes de Coartem® para avaliação da exatidão dos métodos de doseamento e dissolução.

Excipiente	Concentração na formulação (%)
Celulose microcristalina	81,5
Hidroxipropilmetilcelulose	5,0
Croscarmelose sódica	5,0
Estearato de magnésio	5,0
Polisorbato 80	3,0
Dióxido de sílica coloidal	0,5

Após a avaliação das áreas sob os picos dos cromatogramas, foi avaliada a dispersão dos resultados e o cálculo da concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

Para cada nível de concentração, foram calculados os desvios padrão relativos (% DPR), e avaliado se os resultados individuais e médios se apresentaram dentro dos limites especificados de 2,0%, ou seja, se a recuperação obtida foi entre 98,0 e 102,0% (GREEN, 1996; THE UNITED, 2016).

5.2.2.5 Robustez

A robustez foi avaliada variando-se deliberadamente algumas condições cromatográficas com a avaliação do impacto das modificações nos resultados do teor e nos parâmetros cromatográficos. As amostras preparadas foram injetadas em triplicada e obtiveram-se os valores de fator de retenção, assimetria, tempo de retenção, número de pratos teóricos, área e pureza do pico relativo aos analitos.

A partir da área obtida na condição nominal, foram calculados os teores nas condições alteradas. Foram realizadas análises nas condições normais e alteradas para os parâmetros relacionados na **Tabela 30**.

Tabela 30 - Parâmetros para a avaliação da robustez.

Método	Parâmetros	Delineamento experimental
Quantificação de arteméter insumo farmacêutico ativo	Estabilidade das soluções analíticas	Tabela 31
Quantificação de lumefantrina insumo farmacêutico ativo	Tempo de solubilização Variação na composição da fase móvel Coluna cromatográfica	Tabela 32
Doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos	Temperatura da coluna Fluxo da fase móvel (mL/minuto)	Tabela 33
Dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos	Desaeração do meio de dissolução Filtração	Tabela 34

Tabela 31 - Parâmetros para a avaliação da robustez do método de doseamento de arteméter por CLAE.

Parâmetros	Variação	Valor Inferior	Valor nominal	Valor Superior
Estabilidade das soluções analíticas	-	-	-	24 horas 48 horas
Variação na composição da fase móvel (acetonitrila e água) (v/v)	(± 16,6%)	60:40	70:30	80:20
Coluna cromatográfica Coluna C ₁₈ 150mm x 4,6 mm; 5 µm	-	-	Purospher® STAR RP- endcapped Lote HX248565, Alemanha.	Phenomenex Luna, Lote 5291-103
Temperatura da coluna	± 5 °C	25 °C	30 °C	35 °C
Fluxo da fase móvel (mL/minuto)	0,2 (± 20%)	0,8	1,0	1,2

Tabela 32 - Parâmetros para a avaliação da robustez do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.

Parâmetros	Variação	Valor Inferior	Valor nominal	Valor Superior
Estabilidade das soluções analíticas	-	-	-	24 horas 48 horas
Tempo de solubilização da lumefantrina em banho de ultrassom	-	10 minutos	-	20 minutos
Variação na composição da fase móvel (metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v))	(± 12,5%)	70:30	80:20	90:10
Coluna cromatográfica Coluna C ₁₈ 250mm x 4,6 mm; 5 µm	-	-	Agilent, XDB PN 7995118-585, Lote B 05108, USA	Xterra® PN 186000496, Lote 015534195118-13
Temperatura da coluna	10 °C (± 25%)	30 °C	40 °C	50 °C
Fluxo da fase móvel (mL/minuto)	0,3 (± 25%)	1,2	1,5	1,8

Tabela 33 - Parâmetros para a avaliação da robustez do método de doseamento de arteméter e lumefantrina por CLAE.

Parâmetros	Variação	Valor Inferior	Valor nominal	Valor Superior
Estabilidade das soluções analíticas	-	-	-	24 horas 48 horas
Variação na composição da fase móvel (acetonitrila e trietilamina 0,50% (v/v))	(± 10%)	70:30	80:20	90:10
Coluna cromatográfica Coluna C ₁₈ 250mm x 4,0 mm; 5 µm	-	-	Agilent, BDS PN 79826BP-584, Lote B 05108, USA.	Merck, LiChrospher®, Lote 497117, Alemanha
Temperatura da coluna	± 10 °C	30 °C	40 °C	50 °C
Fluxo da fase móvel (mL/minuto)	0,2	1,0	1,2	1,4

Tabela 34 - Parâmetros para a avaliação da robustez do método de dissolução arteméter e lumefantrina por CLAE.

Parâmetros	Variação	Valor nominal
Desaeração	Filtração a vácuo	Não desaerado
Filtração	Centrifugação por 5 minutos	Filtro 0,45 µm, PVDF

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Validação do doseamento de arteméter insumo farmacêutico ativo por CLAE

5.3.1.1 Linearidade

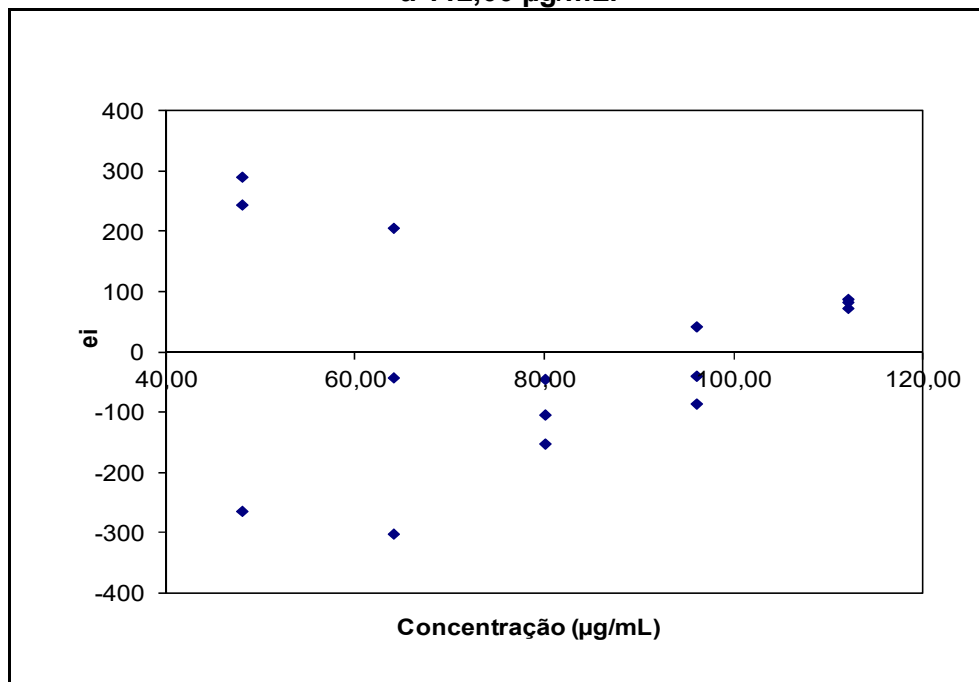
A linearidade do método de doseamento da arteméter foi avaliada com a análise de três curvas analíticas, na faixa de 48,00 µg/mL a 112,00 µg/mL correspondendo a 60,0% e 140,0%, respectivamente, da concentração de trabalho (80,00 µg/mL). Os resultados de concentração de arteméter e respectivas áreas nos cinco níveis (n=15) igualmente espaçados são mostrados na **Tabela 35**.

Tabela 35 - Concentrações e média das áreas dos picos relativos ao arteméter, da curva analítica do método de doseamento por CLAE.

Concentração (µg/mL) de arteméter	48,00 (60,0%)	64,00 (80,0%)	80,00 (100,0%)	96,00 (120,0%)	112,00 (140,0%)
Média das áreas da 1ª pesagem	70115	89606	109381	129246	149064
Média das áreas da 2ª pesagem	70161	89854	109322	129118	149069
Média das áreas da 3ª pesagem	69607	89347	109274	129164	149054

Foram aplicados os testes estatísticos para avaliar as premissas da regressão linear simples. O diagnóstico de *outliers* foi realizado pelo resíduo padronizado de *Jackknife* (**Figura 12**), no qual se avalia o valor de J_{ei} . Não foram detectados *outliers*, mantendo-se número total de dados.

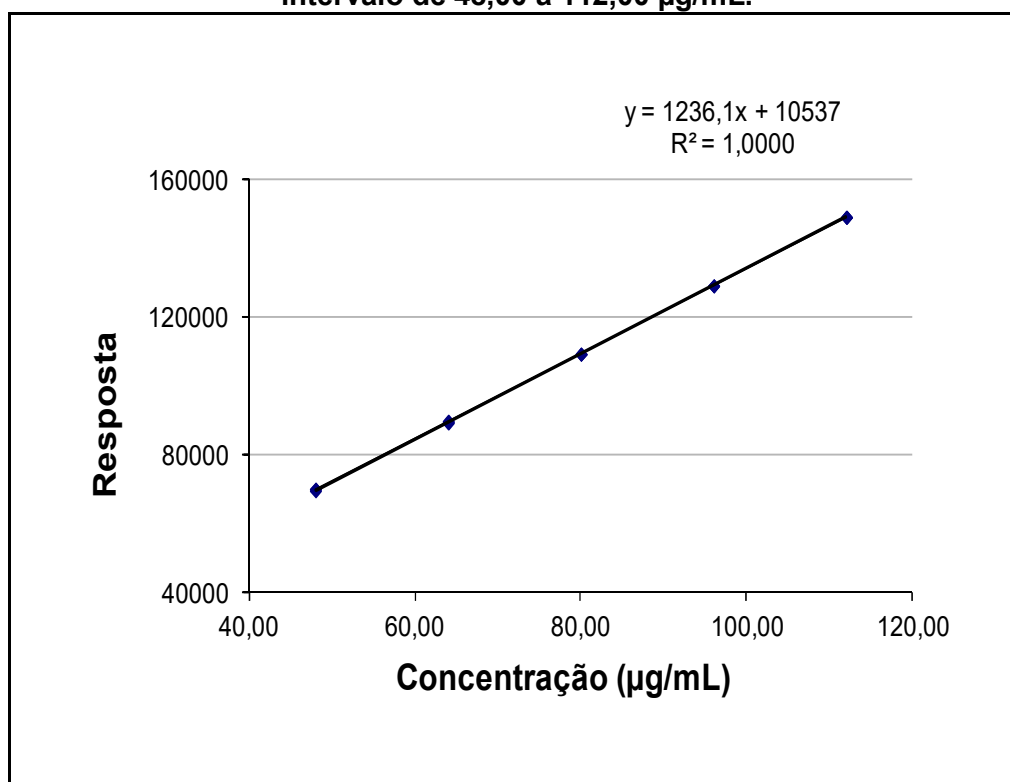
Figura 12 - Distribuição de resíduos obtidos no teste de *Jacknife* do método de doseamento de arteméter por CLAE, no intervalo de 48,00 a 112,00 µg/mL.



Para avaliar se os resíduos seguem a distribuição normal, foi aplicado o teste de *Ryan-Joiner*, que correlaciona os resíduos ordenados com os percentis da normal. Os resíduos seguem a normal se $R_{eq} \geq R_{crítico}$, e como $R_{eq} = 0,9893$ e o $R_{crítico} = 0,9383$ para $\alpha = 0,05$, pode-se concluir que os resíduos seguem a distribuição normal. O teste de *Durbin-Watson* foi aplicado para avaliar a presença de correlação entre os resíduos. O valor de d encontrado de 2,001 está contido no intervalo entre d_u e $4-d_u$, e dessa forma, pode-se concluir que não há autocorrelação, ou seja, os resíduos são independentes. Realizou-se o teste de *Brown-Forsythe* para avaliar se os resíduos são homocedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X_i .

Foi verificado que há homocedasticidade, visto que $t_L \leq t_{crítico}$. Realizou-se a análise de variância (ANOVA) e pode-se concluir que a regressão é estatisticamente significativa em nível de significância de 5% e que não há desvio de linearidade, ou seja, o método demonstrou ser linear nas concentrações entre 48,00 e 112,00 µg/mL. Foi aplicado o MMQO, utilizando-se o *software* Microsoft Excel® 2007, obtendo-se coeficiente de determinação (R^2) de 1,0000 e a equação da reta $y = 1236,1 x - 10537$ (**Figura 13**).

Figura 13 - Curva analítica do doseamento de arteméter por CLAE, no intervalo de 48,00 a 112,00 µg/mL.



5.3.1.2 Seletividade

Os percentuais de fármaco em cada amostra degradada estão apresentados na **Tabela 36**.

Tabela 36 - Teor de arteméter sob diferentes condições de estresse.

Condições	Amostra (%)
Hidrolise alcalina	91,14
Hidrolise ácida	< 40,00
Oxidação	88,76
Fotólise	< 40,00
Calor	< 40,00
Íons metálicos	< 40,00

De acordo com os dados obtidos experimentalmente, ocorreu degradação significativa nas condições de hidrólise ácida, íons metálicos e fotólise, com valores superiores 65% de degradação, quando comparados com amostra sem degradação (**Figura 14**). Arteméter sofre degradação oxidativa em aproximadamente 10% de extensão (**Figura 15**). No cromatograma é possível avaliar a presença de possíveis produtos de degradação bem separados do arteméter que apresenta tempo de retenção de aproximadamente 4 minutos.

Figura 14 - Cromatograma da solução de arteméter a 80,00 µg/mL.

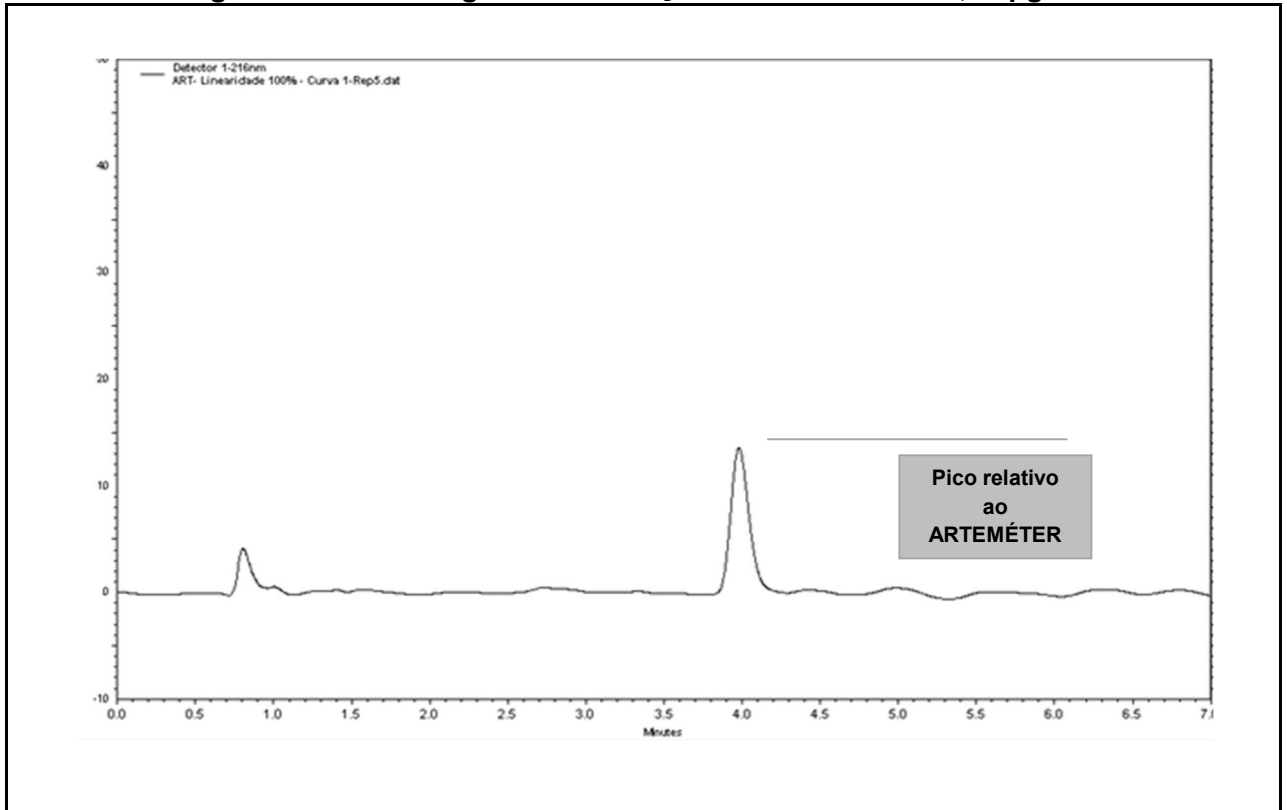
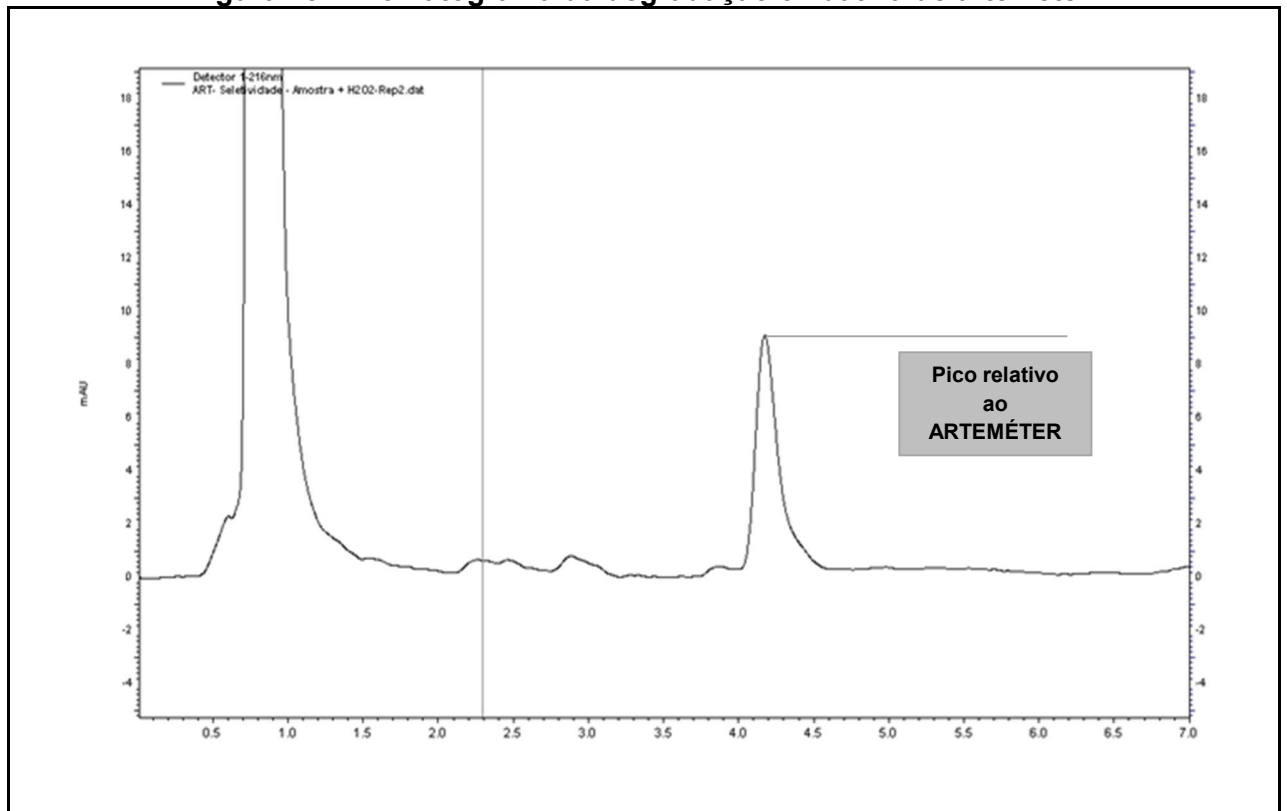
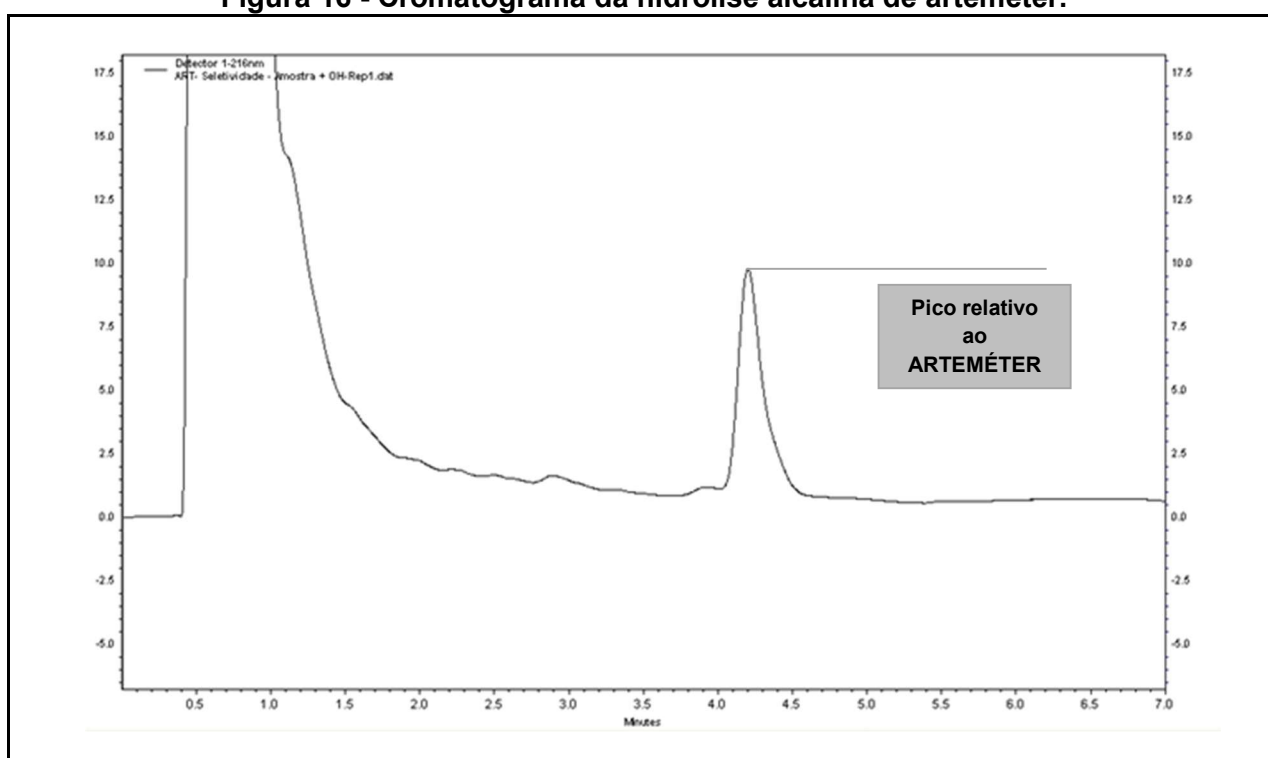


Figura 15 - Cromatograma da degradação oxidativa de arteméter.



Ocorreu uma redução de aproximadamente 10% na condição de hidrólise alcalina (**Figura 16**). Em todas as condições analisadas, os resultados de pureza dos picos atribuídos ao arteméter apresentaram resultados superiores a 0,99 o que demonstra a seletividade do método, uma vez que possíveis produtos de degradação gerados pelas condições de estresse não são co-eluídos com arteméter, apresentado resolução superior a 2,0 (UNITED, 1994). Nas outras condições de degradação, não foram observados picos de substâncias relacionadas nos cromatogramas obtidos.

Figura 16 - Cromatograma da hidrólise alcalina de arteméter.



5.3.1.3 Precisão

A análise estatística dos dados obtidos nos estudos de precisão está apresentada nas **Tabelas 37 e 38**. Os valores de desvio padrão relativos foram calculados e o limite especificado de no máximo de 5,0% foi atendido para todos os níveis avaliados, em termos de repetitividade (ANVISA, 2003).

Tabela 37 - Repetitividade do método de doseamento de arteméter por CLAE.

	Nível	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)
1º dia de análise, analista 1	Baixo, 80%	100,36	100,77	0,37
		101,09		
		100,86		
	Médio, 100%	100,07	99,96	0,13
		99,99		
		99,82		
Alto, 120%	100,14	100,13	0,02	
	100,14			
	100,11			
2º dia de análise, analista 2	Baixo, 80%	100,77	100,52	0,28
		100,22		
		100,57		
	Médio, 100%	100,22	100,07	0,13
		99,97		
		100,02		
Alto, 120%	100,09	100,07	0,02	
	100,06			
	100,06			

Tabela 38 - Precisão intermediária do método de doseamento de arteméter por CLAE.

Parâmetro	Nível baixo (60,0%)		Nível médio (100,0%)		Nível alto (140,0%)	
	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2
Média	100,7695	100,5210	99,9597	100,0686	100,0728	100,0686
Variância	0,1400	0,0788	0,0166	0,0179	0,0004	0,0179
t calculado	0,9203		-1,0159		0,0536	
t tabelado	2,7764					

Pode-se verificar que as médias dos resultados obtidos em cada nível para as amostras individualmente preparadas, em dois dias diferentes, realizada por analistas distintos nas mesmas concentrações não são estatisticamente diferentes. O t calculado para os níveis baixo, médio e alto foram de 0,9203, -1,0159 e 0,0536 respectivamente, inferiores ao t tabelado ($\alpha = 0,05$ e G.L. = 4).

Desta forma, pode-se concluir que não há diferença entre as médias dos teores obtidos e o método de doseamento da arteméter por CLAE na faixa de 60,0 a 140,0% apresenta precisão adequada, avaliada pelos parâmetros de repetitividade e precisão intermediária.

5.3.1.4 Exatidão

Foram realizadas nove determinações, em três níveis de concentração, sendo baixa, média e alta, em triplicata, preparadas de forma independente e os resultados estão descritos na **Tabela 39**.

Tabela 39 - Exatidão do método de doseamento de arteméter por CLAE.

Nível	Replicata	Conc. teórica (µg/mL)	Conc. experimental (µg/mL)	Valor de exatidão	Médias (%)
60,0% (48,00 µg/mL)	1	48,10	48,18	100,17	100,35
	2	48,15	48,47	100,66	
	3	48,05	48,16	100,23	
100,0% (80,00 µg/mL)	1	80,12	80,33	100,26	100,08
	2	80,00	79,93	99,91	
	3	80,05	80,10	100,06	
140,0% (112,00 µg/mL)	1	112,12	112,11	99,99	100,04
	2	112,00	112,06	100,05	
	3	112,06	112,13	100,06	

Considerando-se que todos os valores de recuperação individuais e médios para os três níveis de concentração estão contidos no intervalo de 98,0 a 102,0%, pode-se concluir que o método de doseamento de arteméter por CLAE apresenta exatidão adequada (GREEN, 1996).

5.3.1.5 Robustez

No parâmetro robustez, o analito foi submetido às variações descritas no item 5.2.2.4 e os resultados estão demonstrados na **Tabela 40**. Para todas as variáveis testadas foi utilizada a coluna C₁₈ 150 mm x 4,6 mm; 5 µm - Agilent, com exceção da variável relacionada a alteração da coluna. A amostra utilizada em todos os experimentos foi preparada imediatamente antes do uso, na concentração de 80 µg/mL.

Tabela 40 - Robustez do método de doseamento de arteméter por CLAE.

Variáveis	Parâmetros Avaliados						
	k	Assimetria	Pratos teóricos	Tempo de retenção	Área	Pureza	Teor (%)
Condições nominais	4,23565	1,15607	5679	4,07	109300	0,994201	-
Estabilidade das soluções (24 h)	4,30206	1,14654	5668	4,13	109970	0,999813	100,61
Estabilidade das soluções (48 h)	4,30206	1,44734	2931	4,13	109460	0,980710	100,15
Composição da fase móvel acetonitrila: água (60:40; v/v)	8,26950	1,11654	6422	7,21	114351	0,998410	104,62
Composição da fase móvel acetonitrila: água (80:20; v/v)	2,66538	1,26215	4067	2,85	111334	0,999540	101,86
Temperatura da coluna: 35 °C	3,88464	1,15371	5285	3,80	111407	0,997443	101,93
Temperatura da coluna: 25 °C	4,63410	1,14345	5844	4,38	110425	0,990107	101,03
Fluxo da fase móvel: 0,8 mL/min	4,95973	1,14474	6542	4,64	121428	0,998502	111,10
Fluxo da fase móvel: 1,2 mL/min	3,81148	1,17528	5315	3,74	99265	0,995290	90,82
Coluna Merck, LiChrospher®, Lote 497117, Alemanha, 150 mm x 4,6 mm; 5 µm	4,30634	1,47966	2942	4,13	109142	0,999469	99,86

Avaliando os parâmetros cromatográficos fator de retenção, assimetria, tempo de retenção, número de pratos teóricos, área, pureza do pico e o teor calculado, verifica-se que a solução amostra na concentração de 80 µg/mL pode ser utilizada

em até 48 horas, uma vez que não foram observadas variações significativas quando comparadas a condição nominal e de 24 horas. A composição da fase móvel composta por 60% de acetonitrila, apresentou diminuição da força eluente e conseqüentemente um aumento do tempo de retenção do pico relativo ao arteméter em 3 minutos, acompanhando também pelo aumento do fator de retenção. Como esperado, o aumento da concentração de acetonitrila reduziu o tempo e o fator de retenção do arteméter quando comparado a condição nominal. O aumento do fluxo acompanha o mesmo comportamento observado pelo aumento da concentração de acetonitrila na fase móvel. Desta forma, podemos concluir que o método não é robusto e se faz necessário o controle dos parâmetros cromatográficos, durante todas as análises.

5.3.2 Validação do doseamento de lumefantrina insumo farmacêutico ativo por CLAE

5.3.2.1 Linearidade

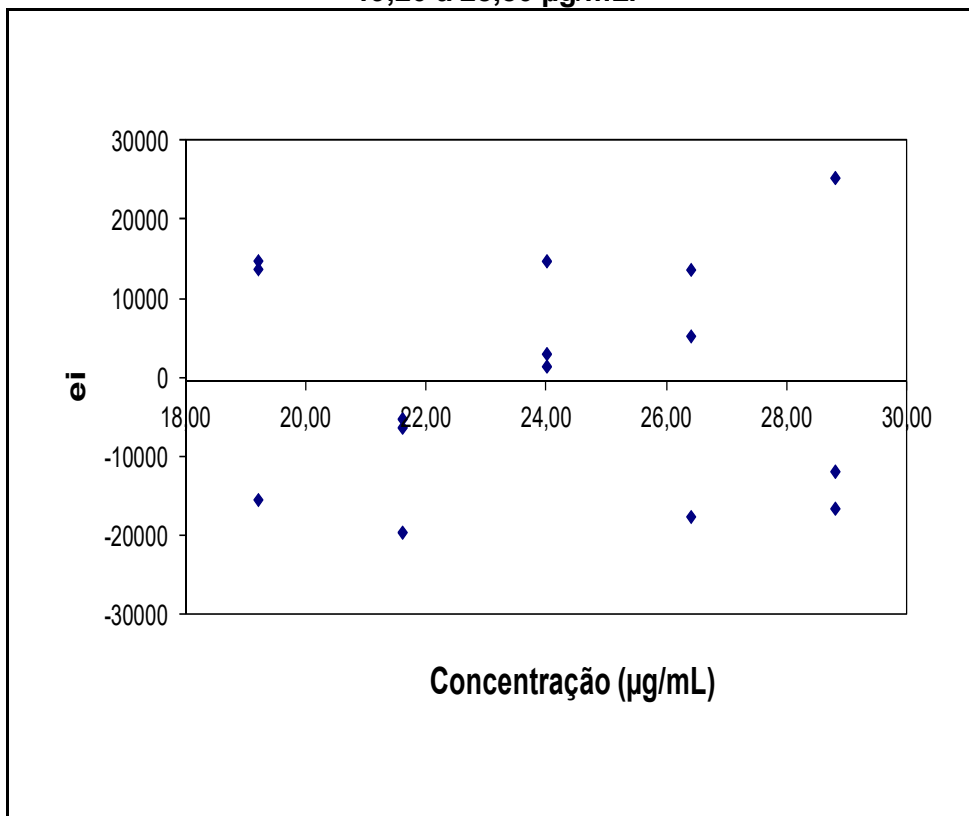
A linearidade do método de doseamento da lumefantrina foi avaliada com a análise de três curvas analíticas, na faixa de 19,20 µg/mL a 28,80 µg/mL correspondendo a 80,0% e 120,0%, respectivamente, da concentração de trabalho (24,00 µg/mL). Os resultados de concentração de lumefantrina e respectivas áreas nos cinco níveis (n=15) igualmente espaçados são reportados na **Tabela 41**.

Tabela 41 - Concentrações e média das áreas dos picos relativos à lumefantrina, da curva analítica do método de doseamento por CLAE.

Concentração (µg/mL) de lumefantrina	19,20 (80,0%)	21,60 (90,0%)	24,00 (100,0%)	26,40 (110,0%)	28,80 (120,0%)
Áreas da 1ª pesagem	1828075	2140170	2448689	2754384	2754384
Áreas da 2ª pesagem	1857254	2139075	2462002	2731528	2731528
Áreas da 3ª pesagem	1858301	2125809	2450262	2762785	2762785

Foram aplicados os testes estatísticos para avaliar as premissas da regressão linear simples. O diagnóstico de *outliers* foi realizado pelo resíduo padronizado de *Jackknife* (**Figura 17**), no qual se avalia o valor de J_{ei} . Não foram detectados *outliers*, mantendo-se assim o número total de dados.

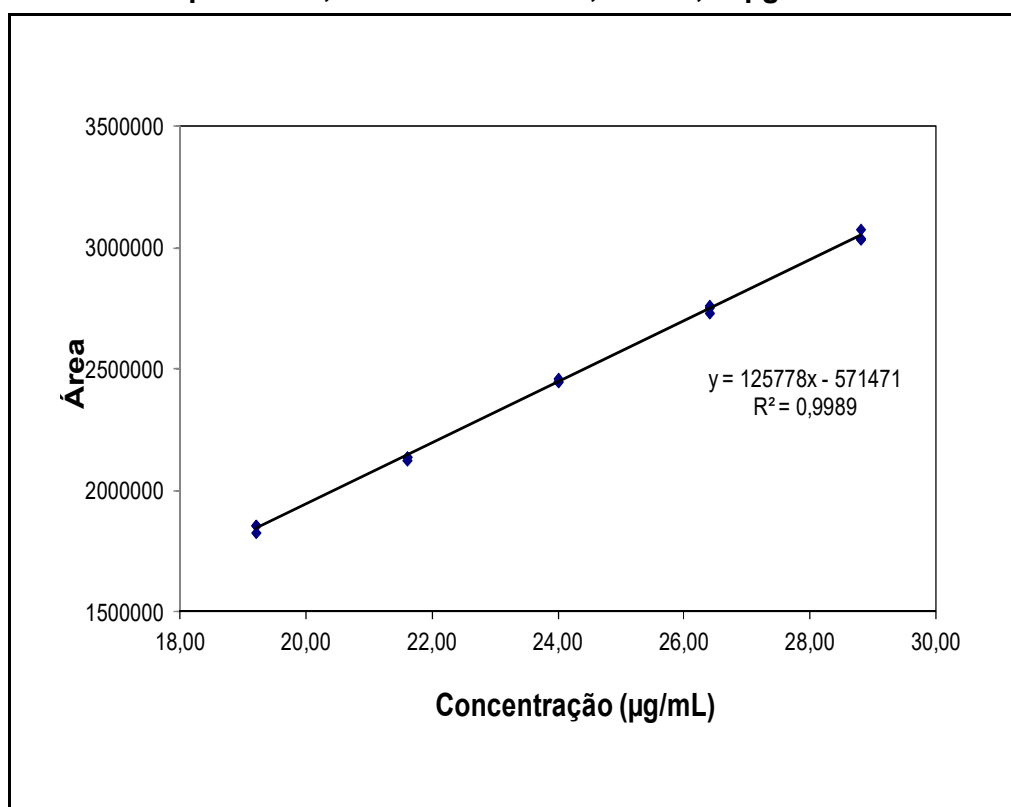
Figura 17 - Distribuição de resíduos obtidos no teste de *Jacknife* do método de doseamento de lumefantrina por CLAE, no intervalo de 19,20 a 28,80 $\mu\text{g/mL}$.



Para avaliar se os resíduos seguem a distribuição normal, foi aplicado o teste de *Ryan-Joiner*, que correlaciona os resíduos ordenados com a percentis da normal. Os resíduos seguem a normal se $R_{eq} \geq R_{crítico}$, e como $R_{eq} = 0,9722$ e o $R_{crítico} = 0,9383$ para $\alpha = 0,050$, pode-se concluir que os resíduos seguem a distribuição normal. O teste de *Durbin-Watson* foi aplicado para avaliar a presença de correlação entre os resíduos. O valor de d encontrado de 2,100 está contido no intervalo entre d_u e $4-d_u$, e dessa forma, pode-se concluir que não há autocorrelação, ou seja, os resíduos são independentes. Realizou-se o teste de *Brown-Forsythe* para avaliar se os resíduos são homocedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X_i . Foi verificado que há homocedasticidade, visto que $t_L \leq t_{crítico}$. Uma vez que os tratamentos estatísticos para verificação das premissas foram realizados e apresentaram resultados satisfatórios, procedeu-se a avaliação do desvio da linearidade e significância da regressão (ANOVA). Com os resultados obtidos, é possível concluir que a regressão é estatisticamente significativa em nível de

significância de 5% e que não há desvio de linearidade, ou seja, o método demonstrou ser linear nas concentrações entre 19,20 e 28,80 µg/mL. Foi aplicado o MMQO, utilizando-se o *software* Microsoft Excel® 2007, obtendo-se coeficiente de determinação (R^2) de 0,9989 e a equação da reta $y = 125778x - 571471$ (Figura 18).

Figura 18 - Curva analítica do método de doseamento de lumefantrina por CLAE, no intervalo de 19,20 a 28,80 µg/mL.



5.3.2.2 Seletividade

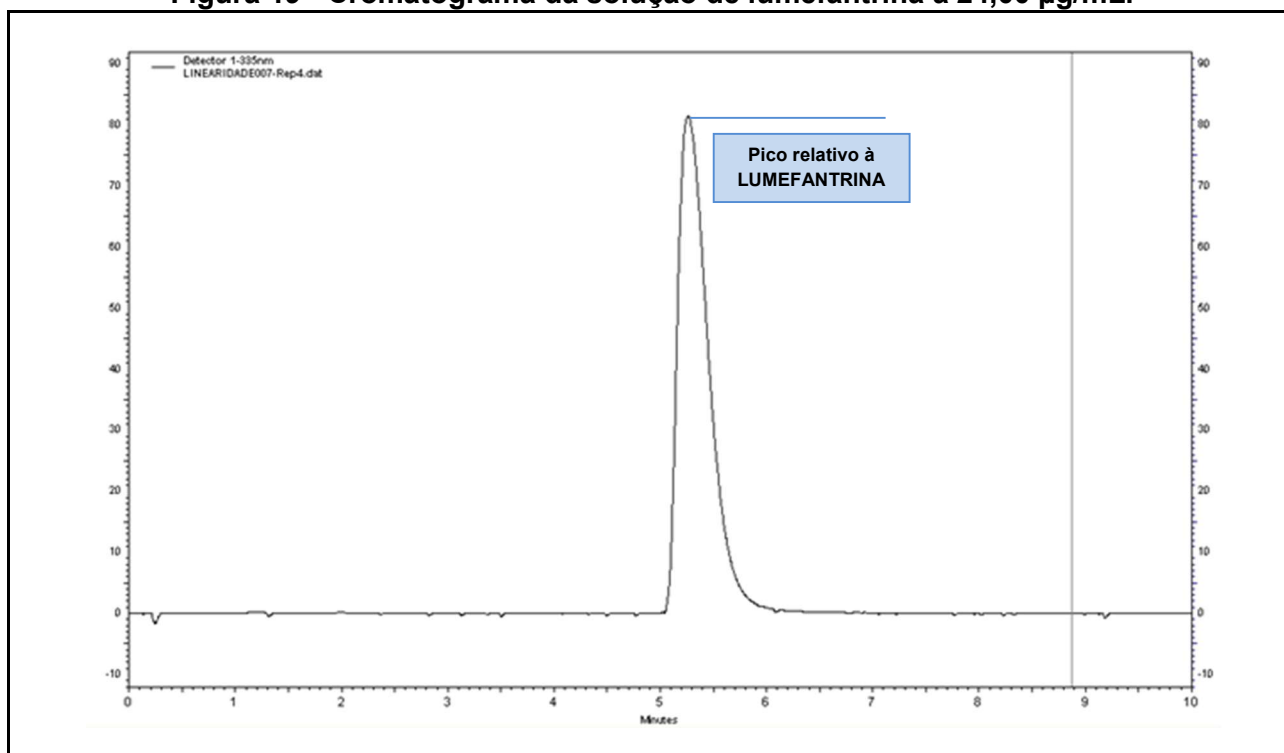
Os percentuais de fármaco em cada amostra submetida a degradação estão apresentados na **Tabela 42**.

Tabela 42 - Teor de lumefantrina sob diferentes condições de estresse.

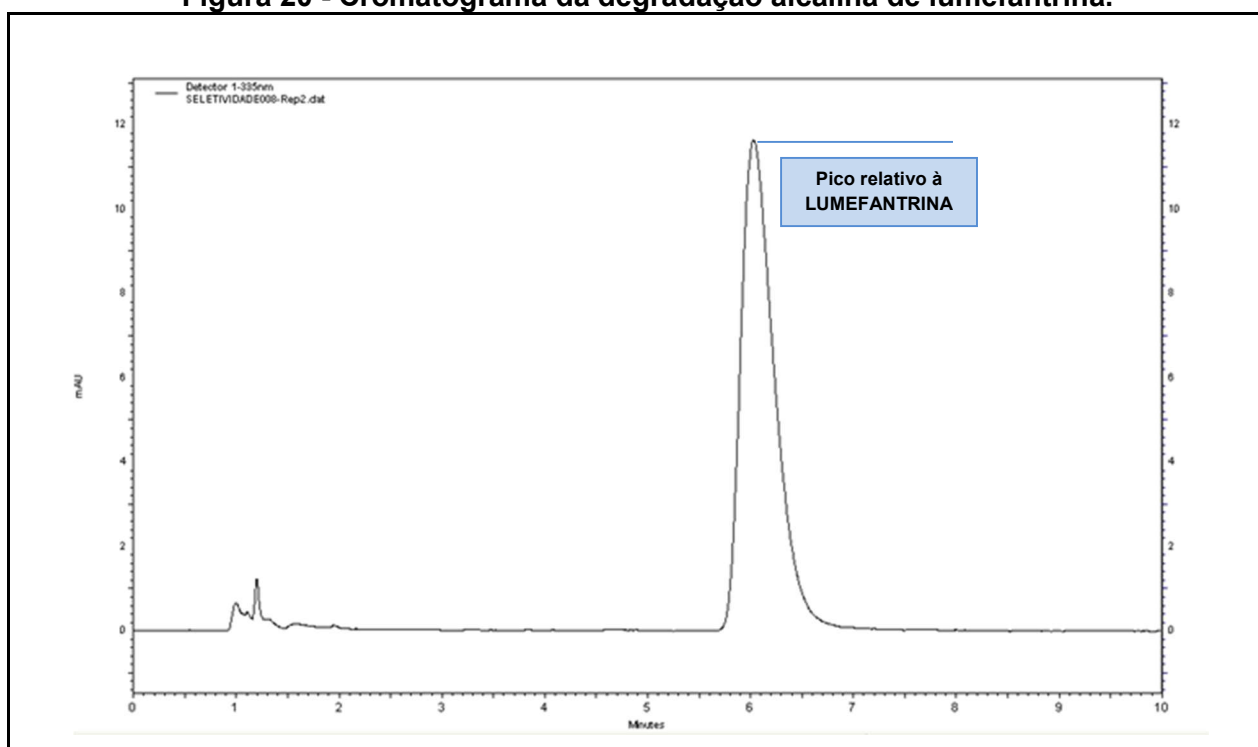
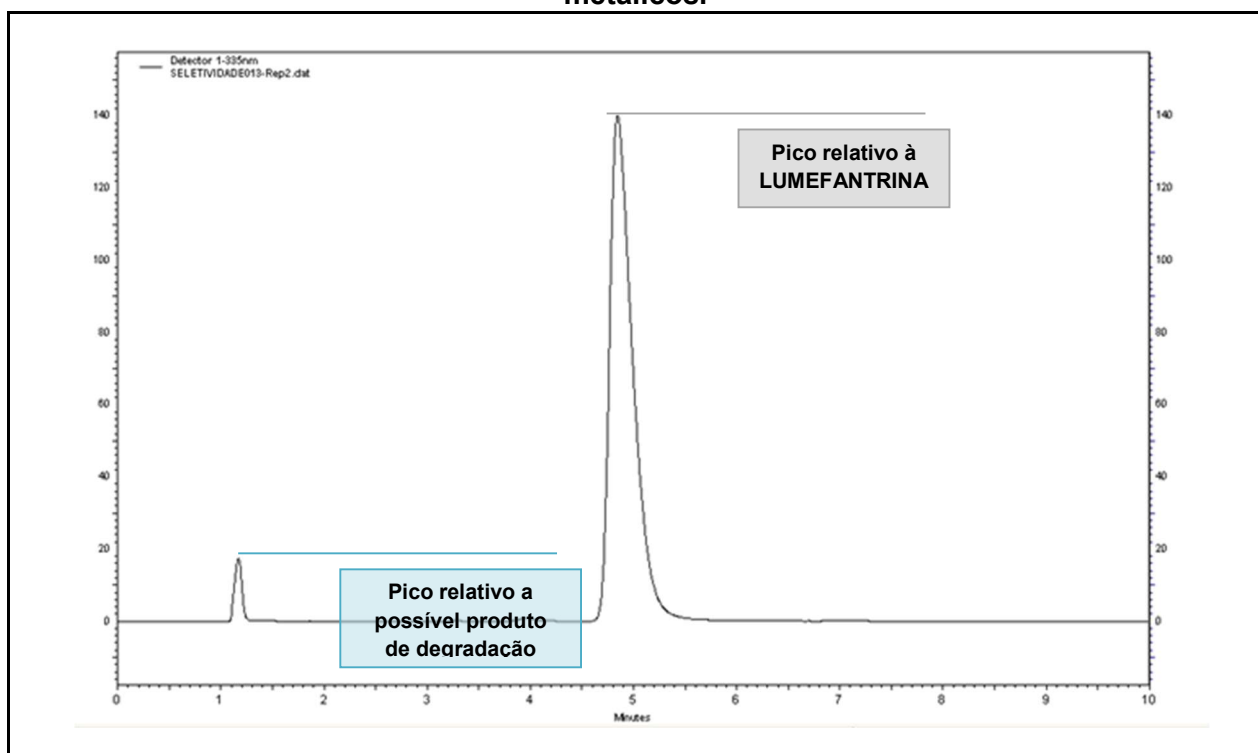
Condições	Amostra (%)
Hidrolise alcalina	< 80,00
Hidrolise ácida	96,59
Oxidação	< 80,00
Fotólise	98,41
Calor	92,87
Íons metálicos	< 80,00

De acordo com os dados obtidos experimentalmente, tanto para o padrão quanto para a amostra, foi possível verificar que ocorreu degradação significativa nas condições de hidrólise alcalina, íons metálicos e oxidação com peróxido de hidrogênio, enquanto nas condições de hidrólise ácida e calor seco, ocorreu degradação em menor intensidade, podemos observar na **Figura 19**, que na concentração a 24 µg/mL aparece apenas o pico referente à lumefantrina.

Figura 19 - Cromatograma da solução de lumefantrina a 24,00 µg/mL.



A lumefantrina sofre degradação em meio alcalino (**Figura 20**), tendo em vista a redução do teor do fármaco na amostra. Não foram observados sinais no cromatograma que possam ser atribuídos a possíveis produtos de degradação. O sinal que aparece no tempo de retenção de 1,2 minutos pode ser atribuído à solução de degradação, uma vez que foi identificada no cromatograma contendo o branco submetido as mesmas condições de degradação. A lumefantrina sofre degradação em aproximadamente 30% na presença de íons metálicos (**Figura 21**). Foram observados picos nos tempos de retenção de aproximadamente 1,0; 1,5 e 2,0 minutos e que podem atribuídos a possíveis produtos de degradação. As amostras sem lumefantrina (branco) submetidas à degradação não apresentaram picos nos mesmos tempos de retenção.

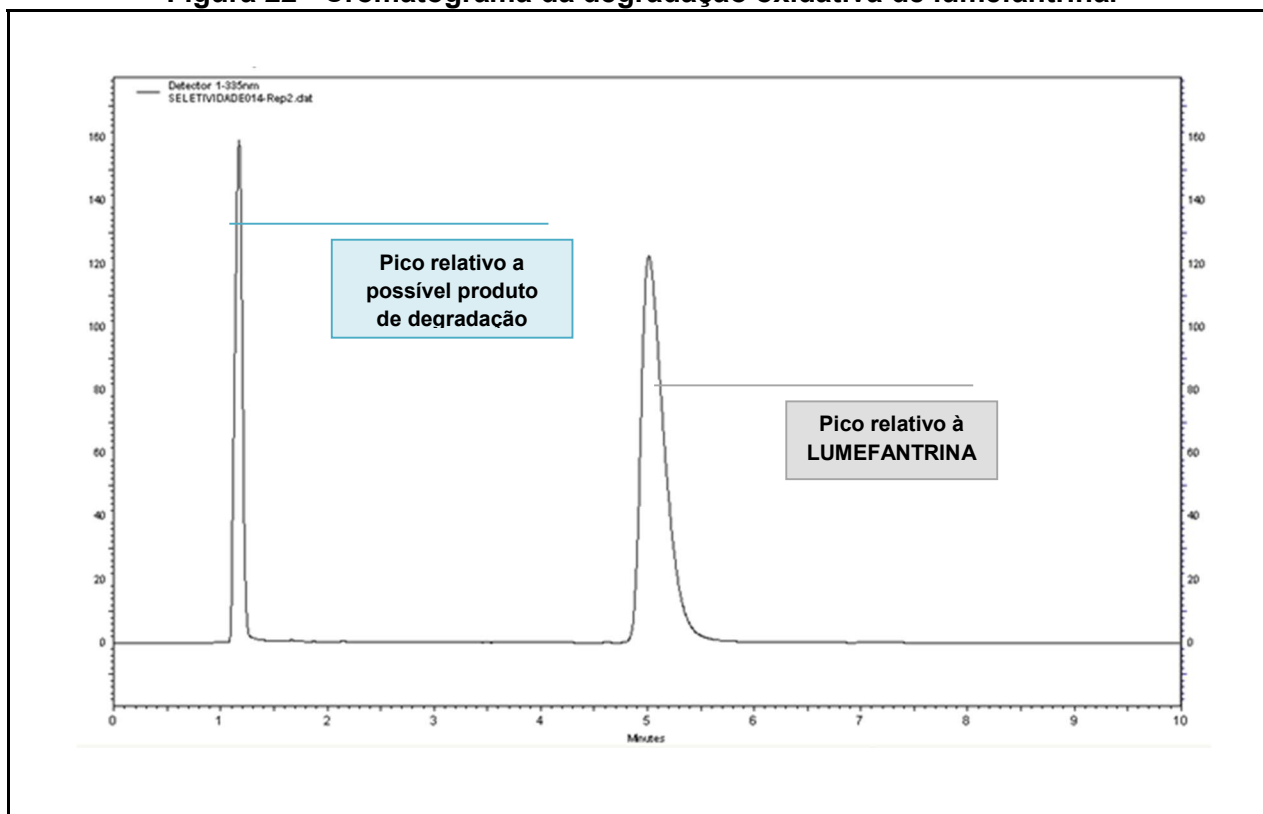
Figura 20 - Cromatograma da degradação alcalina de lumefantrina.**Figura 21 - Cromatograma da degradação de lumefantrina na presença de íons metálicos.**

Um dos produtos obtidos na degradação oxidativa (**Figura 22**), com tempo de retenção de 1,0 minuto, apresenta o mesmo tempo de retenção de um dos produtos

obtidos na degradação na presença de íons metálicos e podem se tratar da mesma substância.

Entretanto, seria necessário um estudo de elucidação estrutural detalhado para confirmação da referida hipótese, o que não é escopo deste trabalho.

Figura 22 - Cromatograma da degradação oxidativa de lumefantrina.



Em todas as condições analisadas, os resultados de pureza dos picos atribuídos a lumefantrina apresentaram resultados superiores a 0,99 o que demonstra a seletividade do método, uma vez que os possíveis produtos de degradação gerados pelas condições de estresse não são co-eluídos com a lumenfantrina.

5.3.2.3 Precisão

A análise estatística dos dados obtidos nos estudos de precisão estão relacionadas nas **Tabelas 43 e 44**.

Tabela 43 - Repetitividade do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.

	Nível	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)
1º dia de análise, analista 1	Baixo, 80%	101,91	100,22	1,83
		100,47		
		98,27		
	Médio, 100%	100,11	100,76	1,27
		99,95		
		102,24		
Alto, 120%	98,35	99,35	1,48	
	101,03			
	98,66			
2º dia de análise, analista 2	Baixo, 80%	101,05	99,30	1,59
		98,01		
		98,82		
	Médio, 100%	99,85	100,86	1,56
		100,04		
		102,68		
Alto, 120%	98,37	98,76	1,14	
	100,03			
	97,88			

Os valores de desvio padrão relativos foram calculados e o limite especificado de DPR máximo de 5% foi atendido para todos os níveis avaliados, em termos de repetitividade (ANVISA, 2003).

Tabela 44 - Precisão intermediária do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.

Parâmetro	Nível baixo, 80%		Nível médio, 100%		Nível alto, 120%	
	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2
Média	100,2177	99,2971	100,7635	100,8574	99,3466	98,7607
Variância	3,3507	2,4806	1,6384	2,4884	2,1477	1,2610
t calculado	0,6603		-0,0801		0,5496	
t tabelado	2,7764					

Pode-se verificar que as médias dos resultados obtidos em cada nível para as amostras individualmente preparadas, em dois dias diferentes, realizada por analistas distintos nas mesmas concentrações não são estatisticamente diferentes. O *t* calculado para os níveis baixo, médio e alto foram de 0,6603, -0,0801 e 0,5496 respectivamente, inferiores ao *t* tabelado. ($\alpha = 0,05$, 4 graus de liberdade).

Desta forma, podemos concluir que não há diferença entre as médias dos teores obtidos e o método de doseamento da lumefantrina por CLAE na faixa de 80,0 a 120,0% apresenta precisão adequada, avaliada pelos parâmetros de repetitividade e precisão intermediária.

5.3.2.4 Exatidão

Foram realizadas nove determinações da substância química de referência, em três níveis de concentração, sendo baixa, média e alta, em triplicata, preparadas de forma independente e os resultados estão descritos na **Tabela 45**.

Tabela 45 - Exatidão do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.

Nível	Replicata	Conc. teórica (µg/mL)	Conc. experimental (µg/mL)	Porcentagem de recuperação	Médias (%)
80,0% (19,20 µg/mL)	1	19,20	19,37	100,89	100,40
	2	19,21	19,25	100,21	
	3	19,20	19,22	100,10	
100,0% (24,00 µg/mL)	1	24,00	24,28	101,17	99,87
	2	24,00	23,88	99,50	
	3	23,89	23,64	98,95	
120,0% (28,80 µg/mL)	1	28,80	28,73	99,76	100,28
	2	28,78	28,78	100,00	
	3	28,00	28,30	101,07	

Considerando-se que todos os valores de recuperação individuais e médios para os três níveis de concentração estão contidos no intervalo de 98,0 a 102,0%, podemos concluir que o método de doseamento de lumefantrina por CLAE apresenta exatidão adequada (GREEN, 1996).

5.3.2.5 Robustez

No parâmetro robustez, o analito foi submetido às variações descritas no item 5.2.2.4 e os resultados estão demonstrados na **Tabela 46**.

Tabela 46 - Robustez do método de doseamento de lumefantrina por CLAE.

Variáveis	Parâmetros Avaliados						
	k	Assimetria	Tempo de retenção	Pratos teóricos	Área	Pureza	Teor (%)
Condições nominais	1,9074	1,5691	5,27	1638	2355393	0,9990	-
Estabilidade das soluções (24 h)	1,8870	1,8885	5,92	1614	2334953	0,9995	99,13
Estabilidade das soluções (48 h)	1,8862	1,8818	5,92	1613	2344761	0,9993	99,55
Tempo de banho de ultrassom (10 min)	2,0415	1,5618	5,25	1606	2361720	0,9989	100,27
Tempo de banho de ultrassom (20 min)	1,9082	1,5756	5,28	1613	2339600	0,9994	99,33
Composição da fase móvel (metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) 90:10; v/v)	0,4529	1,8946	2,98	1674	2439720	0,9973	103,58
Composição da fase móvel (metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) 70:30; v/v)	2,1057	0,9765	6,37	2314	2331959	0,9993	99,01
Temperatura da coluna: 50 °C	2,6894	1,9035	7,56	1150	2236637	0,9991	94,96
Temperatura da coluna: 30 °C	1,3415	1,8732	4,80	2022	2343124	0,9995	99,48
Fluxo da fase móvel: 1,8 mL/min	1,6098	1,8583	5,35	1555	2105511	0,9990	89,39
Fluxo da fase móvel: 1,2 mL/min	2,2358	1,9123	6,63	1698	2639174	0,9996	112,05
Coluna Xterra® C ₁₈ 250mm x 4,6 mm; 5 µm	1,9109	1,5667	5,26	1639	2376430	0,9993	100,89

Para todas as variáveis testadas foi utilizada a Coluna C₁₈ 250 mm x 4,6 mm; 5 µm - Agilent, XDB PN 7995118-585, Lote B 05108, USA, com exceção da variável relacionada a alteração da coluna. A amostra utilizada em todos os experimentos foi preparada imediatamente antes do uso na concentração de 24,00 µg/mL.

Avaliando os parâmetros cromatográficos fator de retenção, assimetria, tempo de retenção, número de pratos teóricos, área, pureza do pico e o teor calculado, verificamos que a solução amostra diluída na concentração de 24 µg/mL pode ser utilizada em até 48 horas, uma vez que não foram observadas variações significativas do teor. Pode-se afirmar que o mesmo comportamento foi identificado para o tempo de solubilização da lumefantrina em banho de ultrassom e a variação da coluna cromatográfica. A composição da fase móvel composta por 70% de metanol apresentou diminuição da força eluente e conseqüentemente um aumento do tempo de retenção do pico relativo à lumefantrina. Os parâmetros composição da fase móvel, temperatura da coluna e fluxo de fase móvel devem ser rigorosamente controlados, uma vez que foi observada uma variação elevada do tempo de retenção, fator de retenção e área do pico de lumefantrina.

5.3.3 Validação do método analítico para doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE

5.3.3.1 Linearidade

A linearidade do método de doseamento dos fármacos foi avaliada com a análise de três curvas analíticas, no intervalo de 80,0 a 120,0%, equivalente as concentrações de 16,00 µg/mL a 24,00 µg/mL para arteméter e 96,00 µg/mL a 144,00 µg/mL para lumefantrina. Os resultados de concentração e respectivas áreas estão reportadas nos cinco níveis (n=15) igualmente espaçados (**Tabelas 47 e 48**).

Tabela 47 - Concentrações e médias das áreas dos picos relativos ao arteméter, da curva analítica do método de doseamento de comprimidos por CLAE.

Concentração (µg/mL) de arteméter	16,00 (80,0%)	18,00 (90,0%)	20,00 (100,0%)	22,00 (110,0%)	24,00 (120,0%)
Áreas da 1ª pesagem	61253	66562	73101	78739	85952
Áreas da 2ª pesagem	61935	67569	72653	78205	86098
Áreas da 3ª pesagem	60826	66751	73606	77480(*)	85493

(*)outlier

Tabela 48 - Concentrações e médias das áreas dos picos relativos à lumefantrina, da curva analítica do método de doseamento de comprimidos por CLAE.

Concentração (µg/mL) de lumefantrina	96,00 (80,0%)	108,00 (90,0%)	120,00 (100,0%)	132,00 (110,0%)	144,00 (120,0%)
Áreas da 1ª pesagem	2481389	2817858	3152687	3471698	3790973
Áreas da 2ª pesagem	2471496	2831063	3148593	3438198	3790973
Áreas da 3ª pesagem	2491268	2873762(*)	3165158	3411274(*)	3763039

(*)outliers

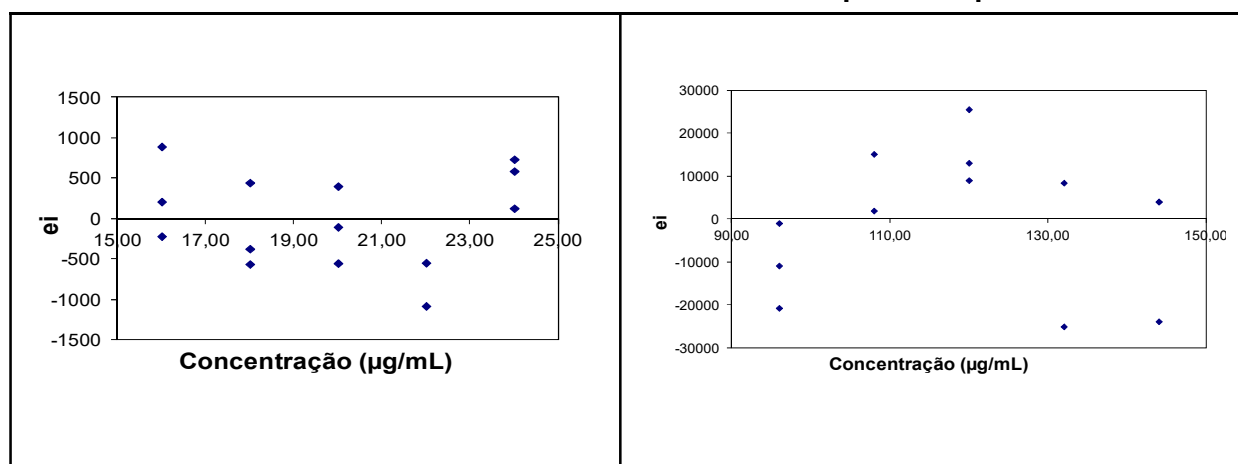
Foram aplicados os testes estatísticos para avaliar as premissas da regressão linear simples (Tabela 49).

Tabela 49 - Premissas necessárias à utilização dos MMQO.

Analito		Arteméter		Lumefantrina	
Premissa	Especificação	Resultado	Conclusão	Resultado	Conclusão
Teste de outliers pelo método <i>Jackknife</i>	$ J_{ei} > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Apenas um ponto apresentou $J_{ei} > J_{crítico}$	Exclusão de um ponto, considerado outlier(*) (Figura 23A)	Dois pontos apresentaram $J_{ei} > J_{crítico}$	Exclusão de 2 pontos, considerados outliers(*) (Figura 23B)
Avaliação da normalidade pelo teste de Ryan-Jones	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9868$ $R_{crítico} = 0,9351$	Os resíduos seguem a distribuição normal	$R_{eq} = 0,9708$ $R_{crítico} = 0,9315$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de <i>Durbin-Watson</i>	$d_u < d_{calculado} < 4-d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u = 1,3493$ $d_{cal} = 1,3850$ $4-d_u = 2,6507$	Não há correlação entre os resíduos	$d_u = 1,3394$ $d_{cal} = 1,3404$ $4-d_u = 2,6605$	Não há correlação entre os resíduos
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de <i>Brown-Forsythe</i> ou <i>Levene modificado</i>	$t_t \leq t_{crítico}$ para $\alpha = 0,05$	$t_t = 0,7418$ $t_{crítico} = 2,179$	Há homocedasticidade entre os resíduos.	$t_t = 0,3929$ $t_{crítico} = 2,201$	Há homocedasticidade entre os resíduos.
Análise de variância (nível de significância de 0,05)	$R^2 > 0,98$	$y = 3040 x - 12401$ (Figura 24A) $R^2 = 0,9959$	Não há desvio da linearidade no intervalo entre 16,00 e 24,00 µg/mL.	$Y = 26972 x - 97087$ (Figura 24B) $R^2 = 0,9972$	Não há desvio da linearidade no intervalo entre 96,00 e 144,00 µg/mL.

Fonte: tabela construída com base nas informações disponíveis em SOUZA, 2007.

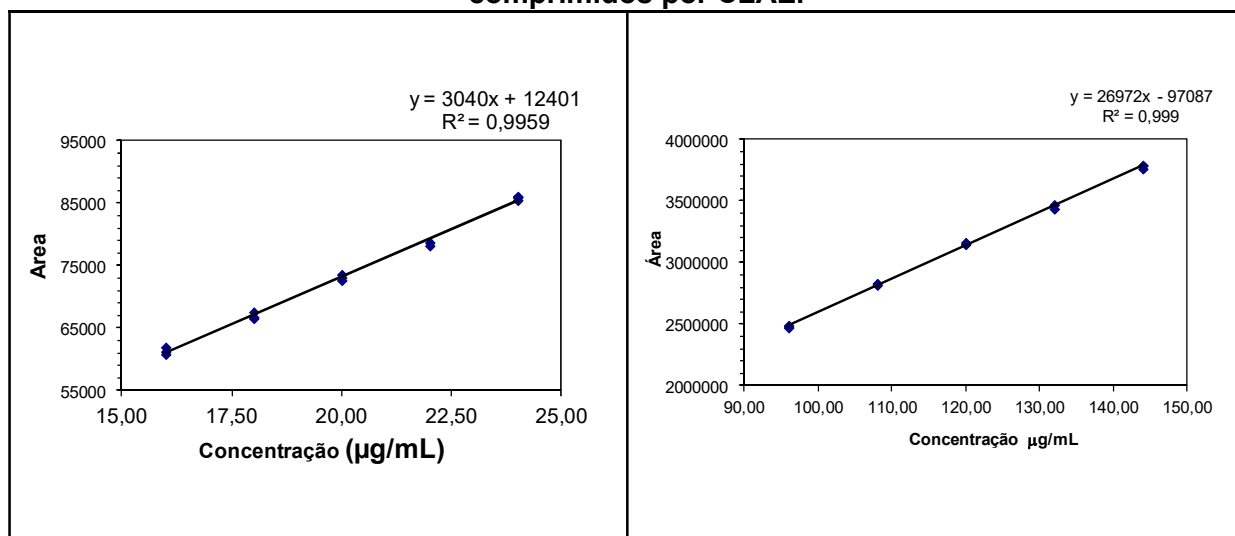
Figura 23 - Distribuições de resíduos obtidos no teste de *Jackknife* do método de doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos por CLAE.



A - Para arteméter, no intervalo de 16,00 a 24,00 µg/mL.

B - Para lumefantrina, no intervalo de 96,00 a 144,00 µg/mL.

Figura 24 - Curvas analíticas do método de doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos por CLAE.



A - Para arteméter, no intervalo de 16,00 a 24,00 µg/mL.

B - Para lumefantrina, no intervalo de 96,00 a 144,00 µg/mL.

5.3.3.2 Seletividade

Os percentuais de fármaco em cada amostra degradada estão apresentados na **Tabela 50**.

Tabela 50 - Teor das amostras sob diferentes condições de estresse.

Condições	Arteméter (%)	Lumefantrina (%)
Hidrolise alcalina	84,20	< 80,00
Hidrolise ácida	< 80,00	97,44
Oxidação	99,53	N.D.
Fotólise	< 80,00	82,37
Calor	< 80,00	94,90
Íons metálicos	N.D.	< 80,00

N.D.: não detectado

Arteméter sofre degradação alcalina em aproximadamente 15% de extensão, quando se compara a amostra não degradada (**Figuras 25 e 26**).

No cromatograma é possível avaliar a presença de possíveis produtos de degradação bem separados do arteméter que apresenta tempo de retenção de aproximadamente 3 minutos.

Figura 25 - Cromatograma da solução de arteméter a 20,00 µg/mL e lumefantrina a 120,00 µg/mL em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).

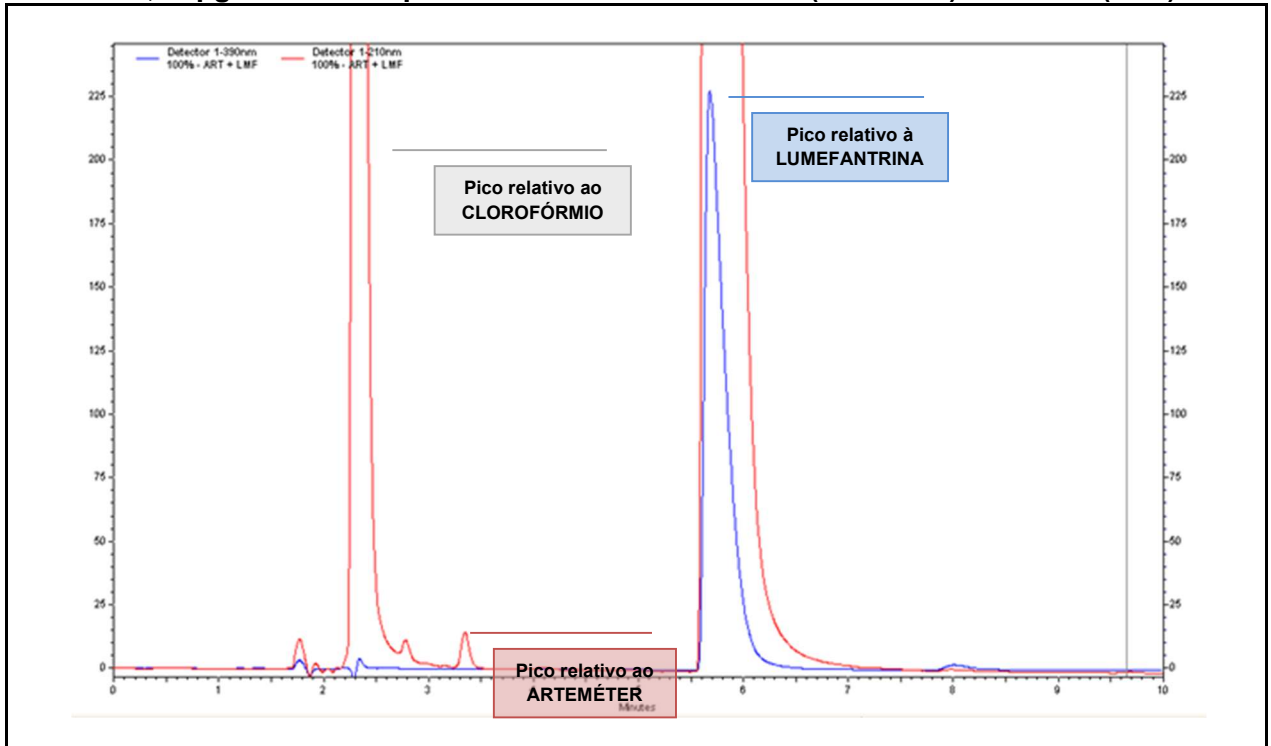
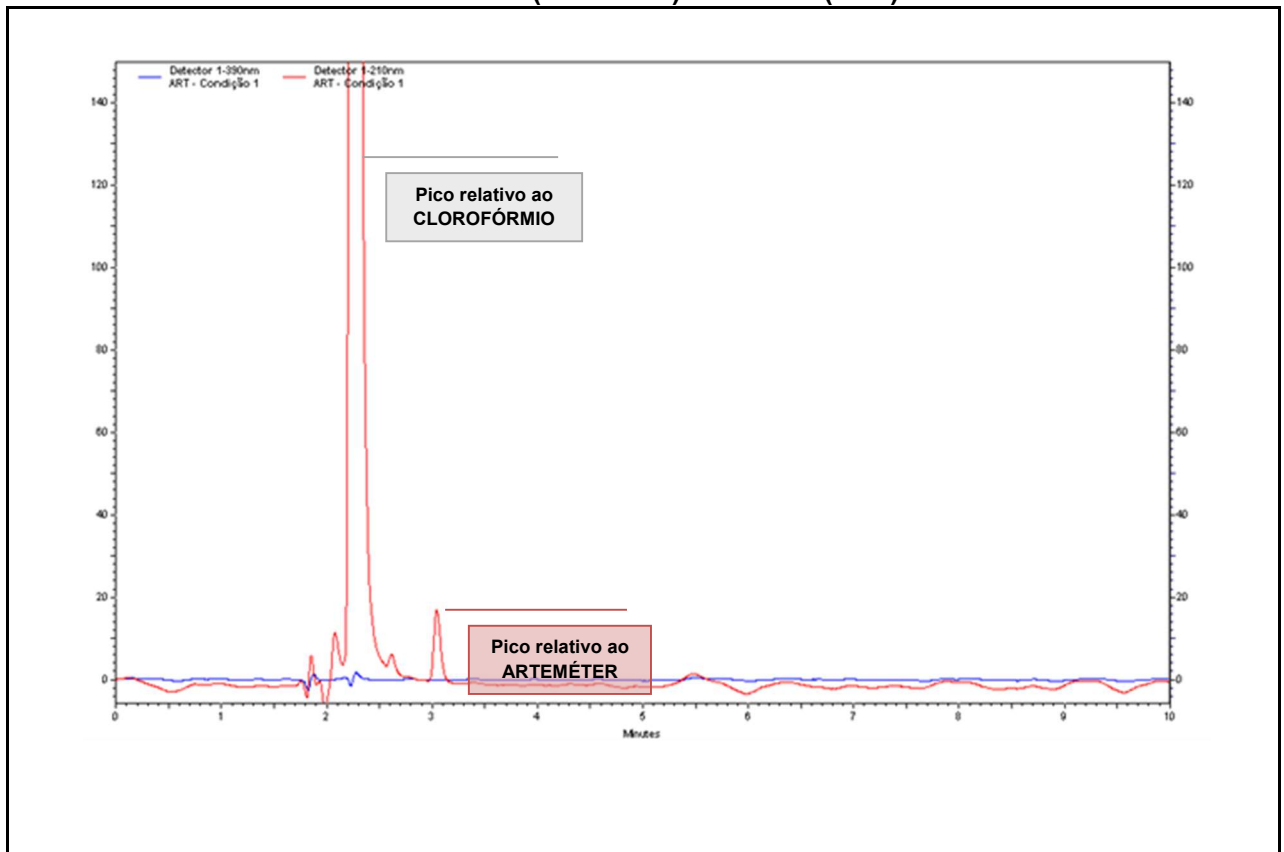
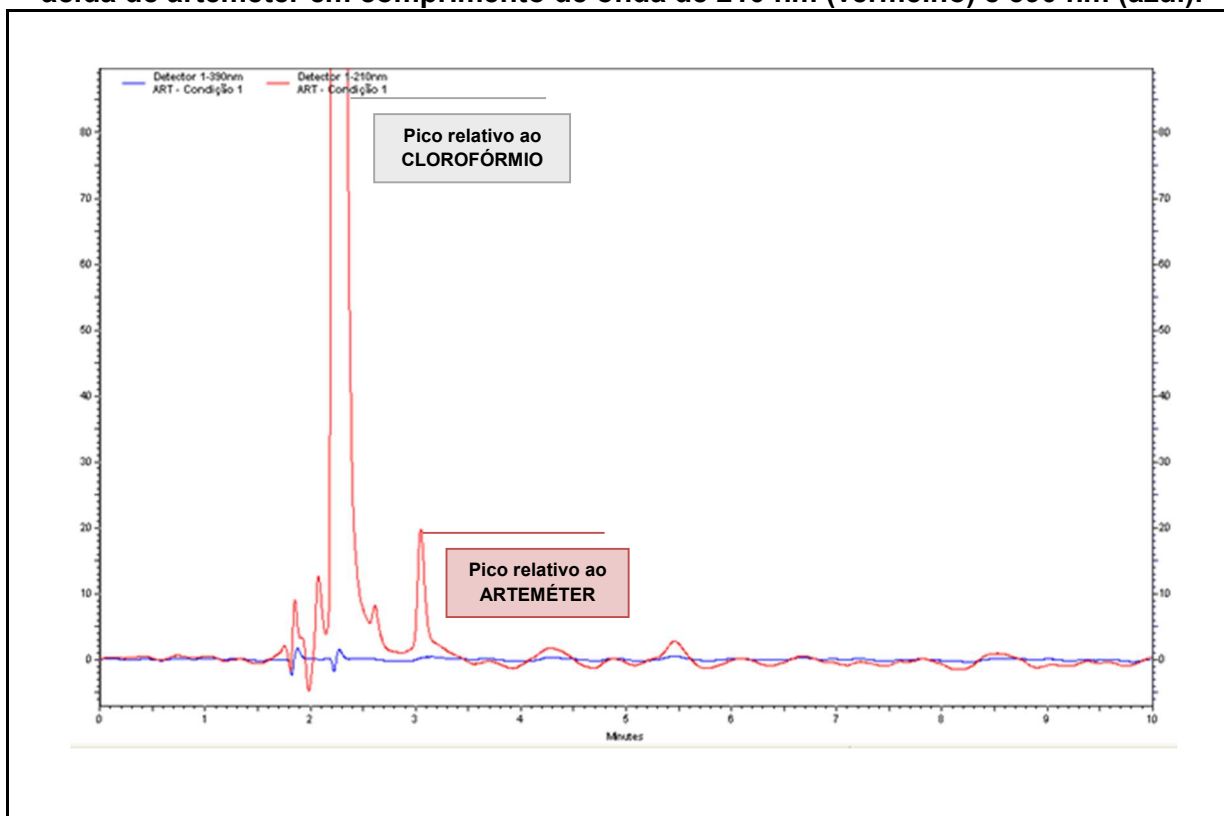


Figura 26 - Cromatograma da degradação alcalina de arteméter em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).



Ocorreu uma redução de aproximadamente 10% na concentração de arteméter, na condição de hidrólise ácida (**Figura 27**). No cromatograma é possível avaliar a presença de um produto de degradação bem separado, apresentando tempo de retenção de 2 minutos.

Figura 27 - Cromatogramas obtidos a partir da condição de degradação de hidrólise ácida de arteméter em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).



Na **Figura 28**, pode-se observar que nas amostras submetidas à degradação por íons metálicos, o pico relativo a arteméter não foi observado. As soluções do diluente (**Figura 29**), placebo (**Figura 30**) e lumefantrina (**Figura 31**) com concentração de 120,00 µg/mL não apresentam sinais nos referidos cromatogramas no tempo de retenção relativo ao arteméter. Em todas as condições analisadas, os resultados de pureza dos picos atribuídos ao arteméter apresentou resultados superiores a 0,99 o que demonstra a seletividade do método, uma vez que possíveis produtos de degradação gerados pelas condições de estresse não são co-eluídos com arteméter.

Figura 28 - Cromatograma da degradação de arteméter na presença de íons metálicos em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).

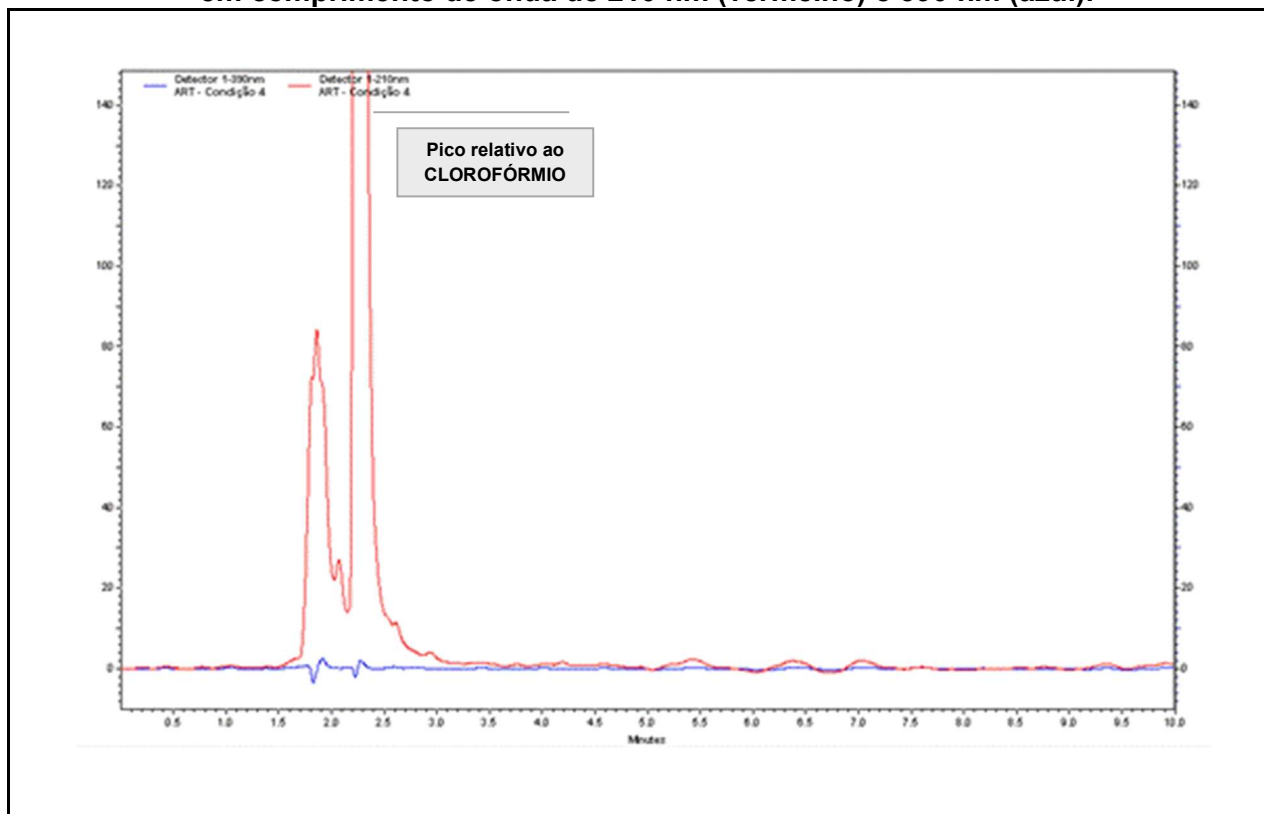


Figura 29 - Cromatograma do diluente em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).

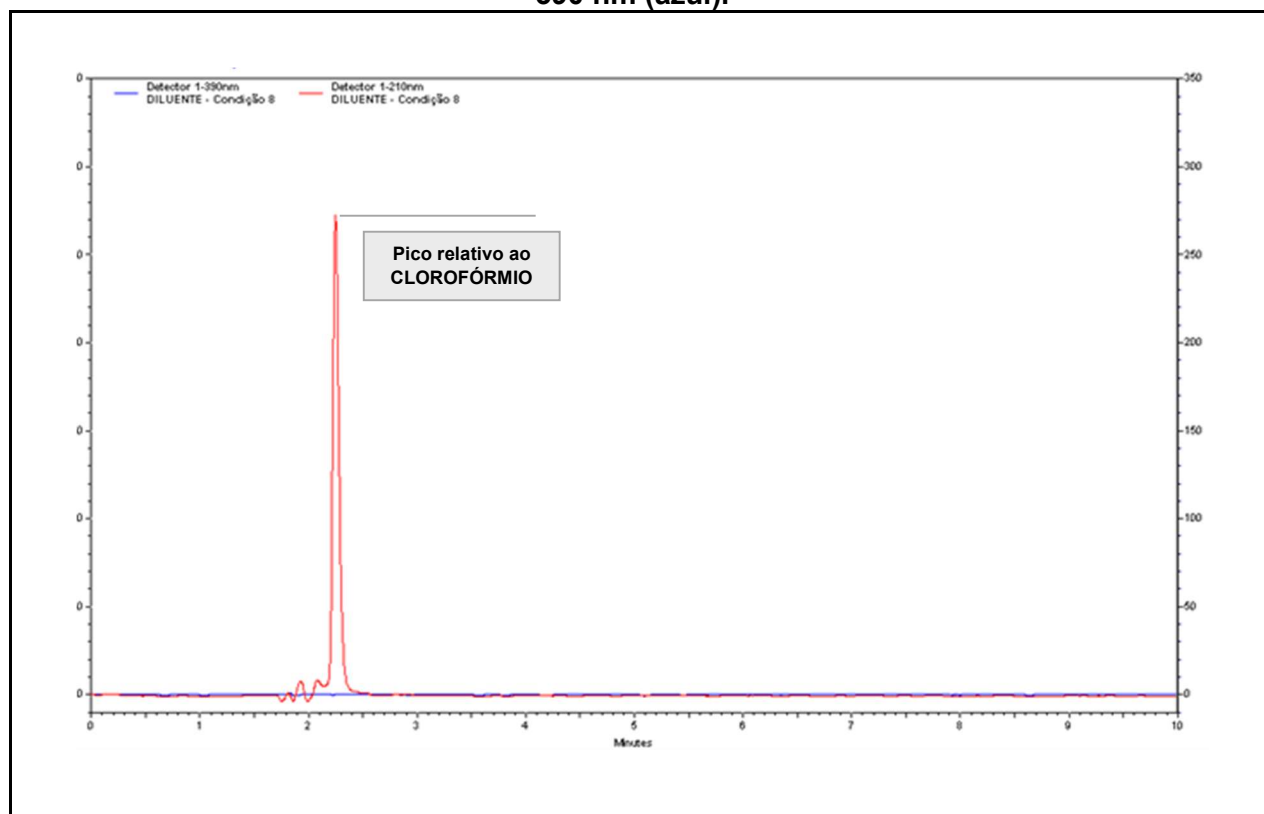


Figura 30 - Cromatograma do placebo em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).

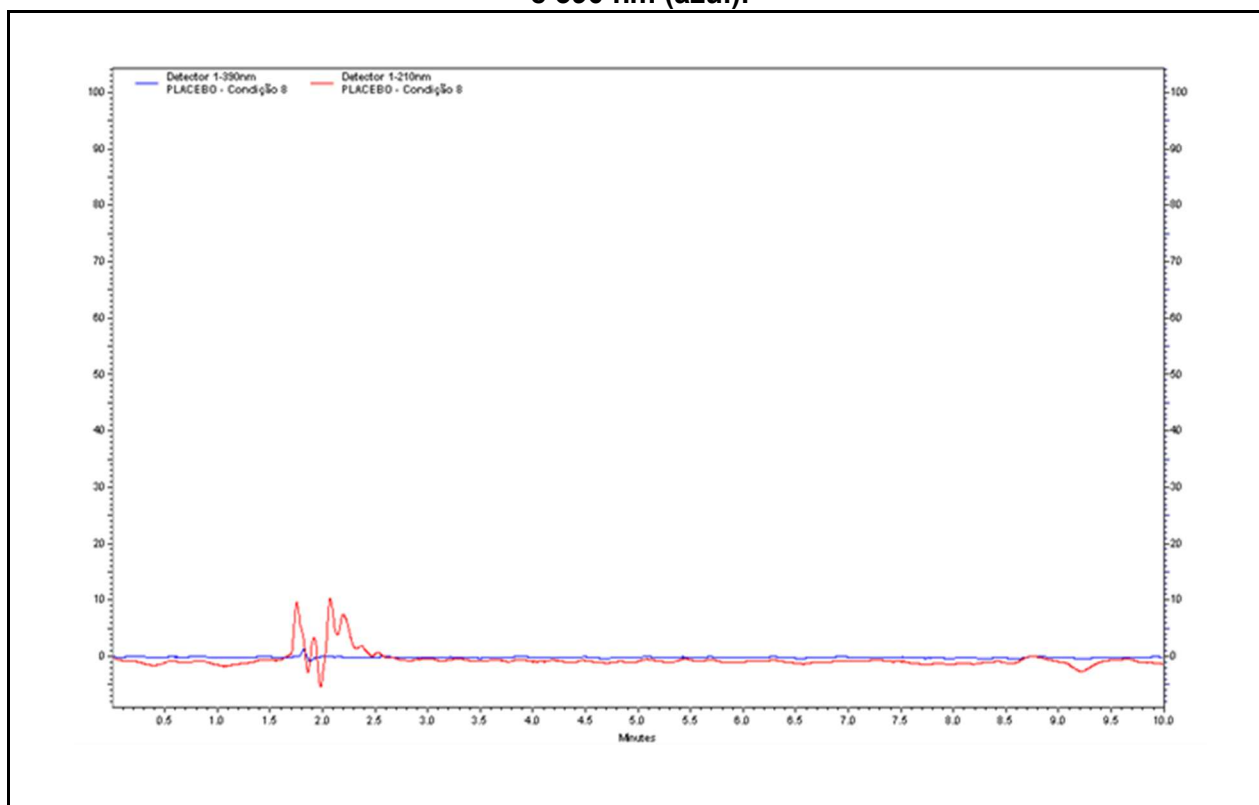
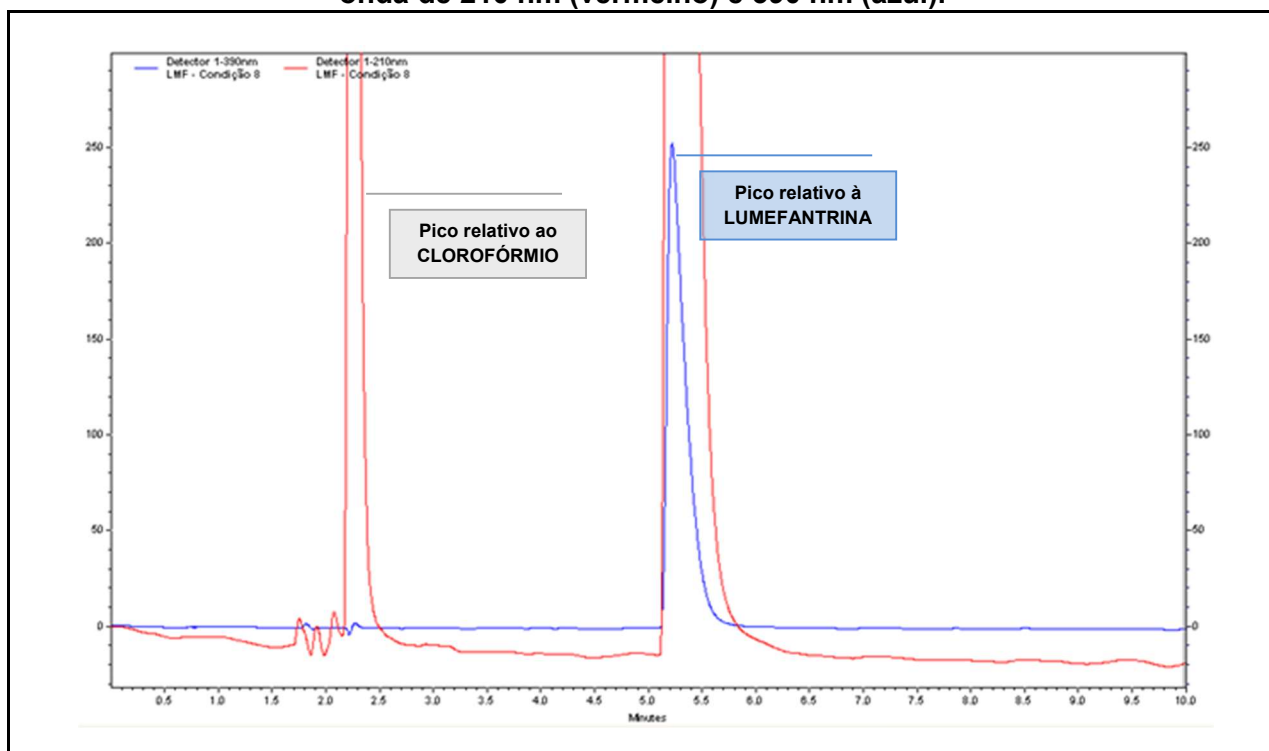
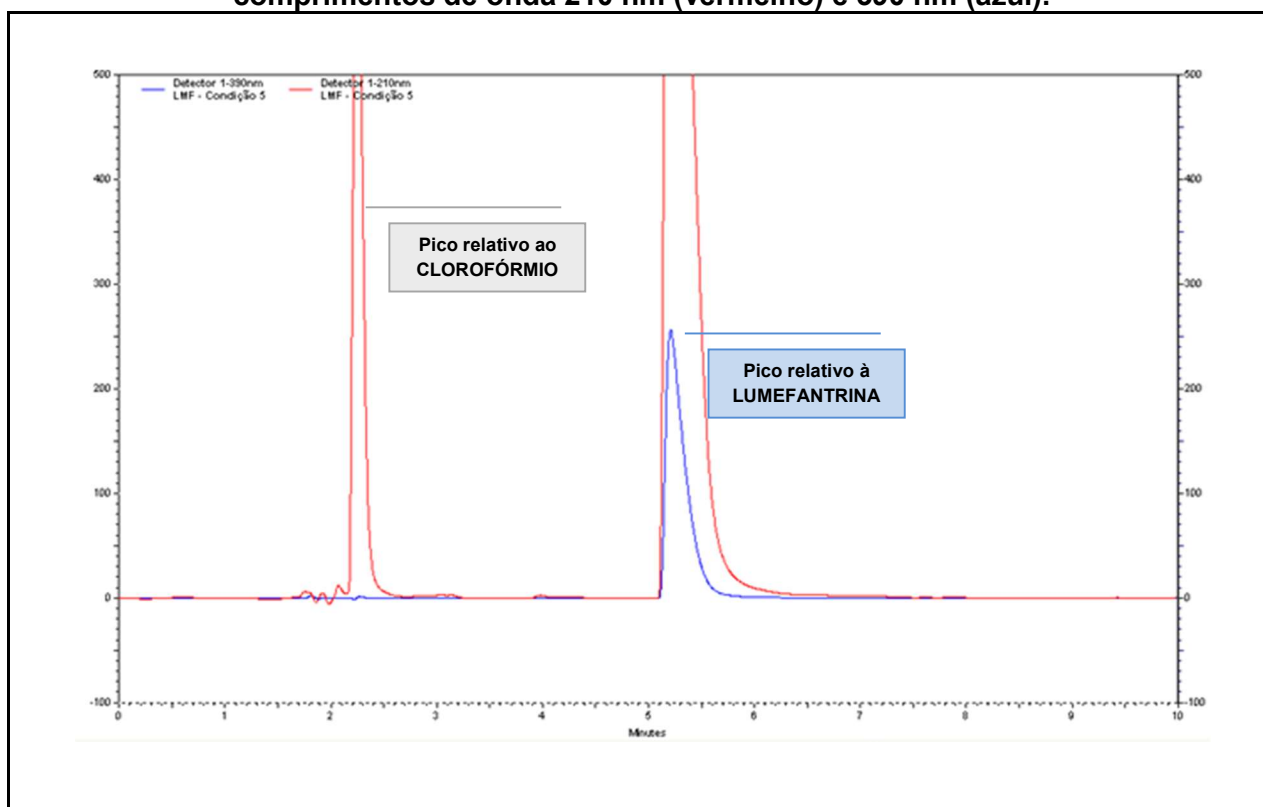


Figura 31 - Cromatograma de solução de lumefantrina a 120 µg/mL em comprimento de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).



A lumefantrina apresentou degradação significativa nas condições de hidrólise alcalina, íons metálicos e oxidação com peróxido de hidrogênio, enquanto nas condições de hidrólise ácida e calor seco, ocorreu degradação, mas em menor intensidade. O perfil de degradação da lumefantrina é condizente com aquele obtido na seletividade do método de doseamento de lumefantrina IFA. Não foram observados picos no cromatogramas nos tempos de retenção relativos ao arteméter no comprimento de onda de 210 nm e o pico referente a lumefantrina apresentou pureza superior a 0,99 (**Figura 32**) nas condições de calor seco.

Figura 32 - Cromatograma da degradação em calor seco da lumefantrina nos comprimentos de onda 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).



A degradação de lumefantrina na presença de íons metálicos ocorreu em aproximadamente 20% (**Figura 33**). Amostras de arteméter preparadas na concentração de 20 µg/mL (**Figura 34**) sem adição de lumefantrina (branco) não apresentaram sinais cromatograficos em 390 nm que possam ser atribuídos a lumefantrina.

Figura 33 - Cromatogramas da degradação de lumefantrina na presença de íons metálicos nos comprimentos de onda 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).

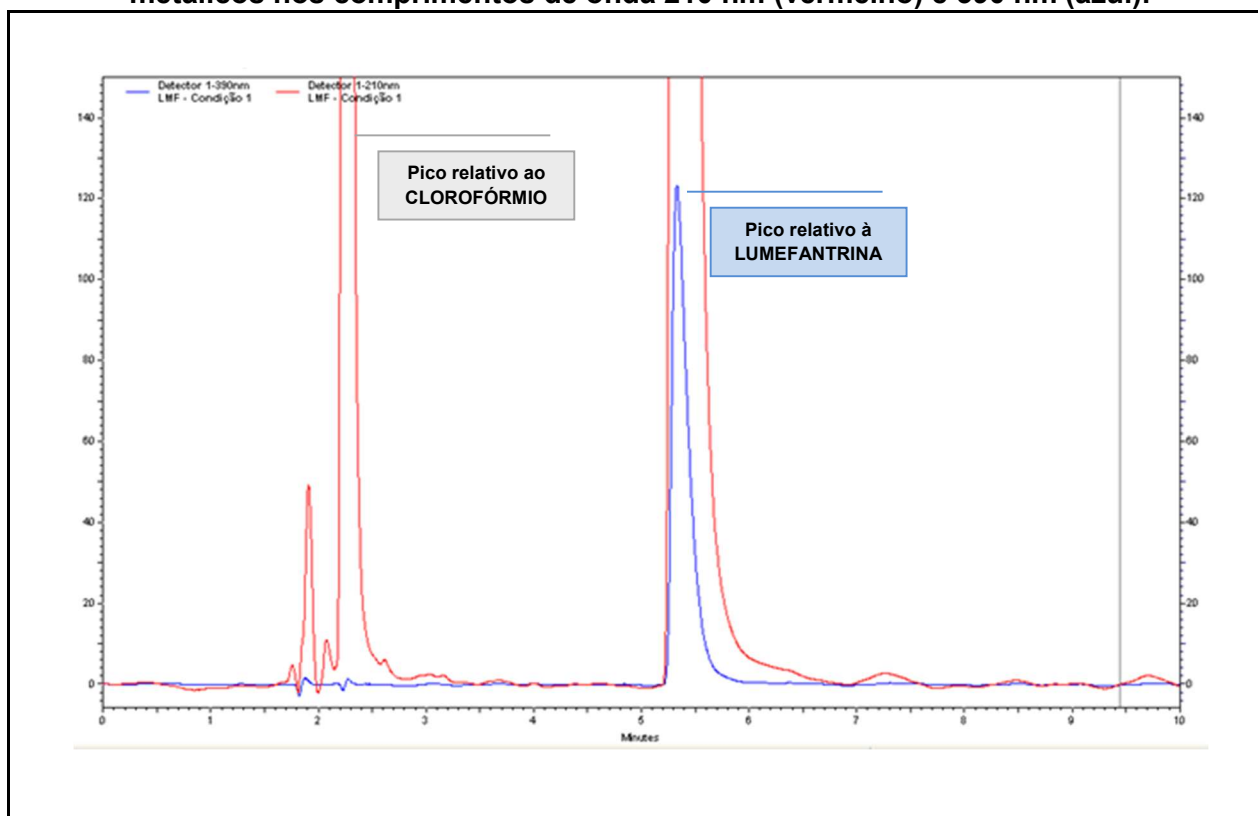
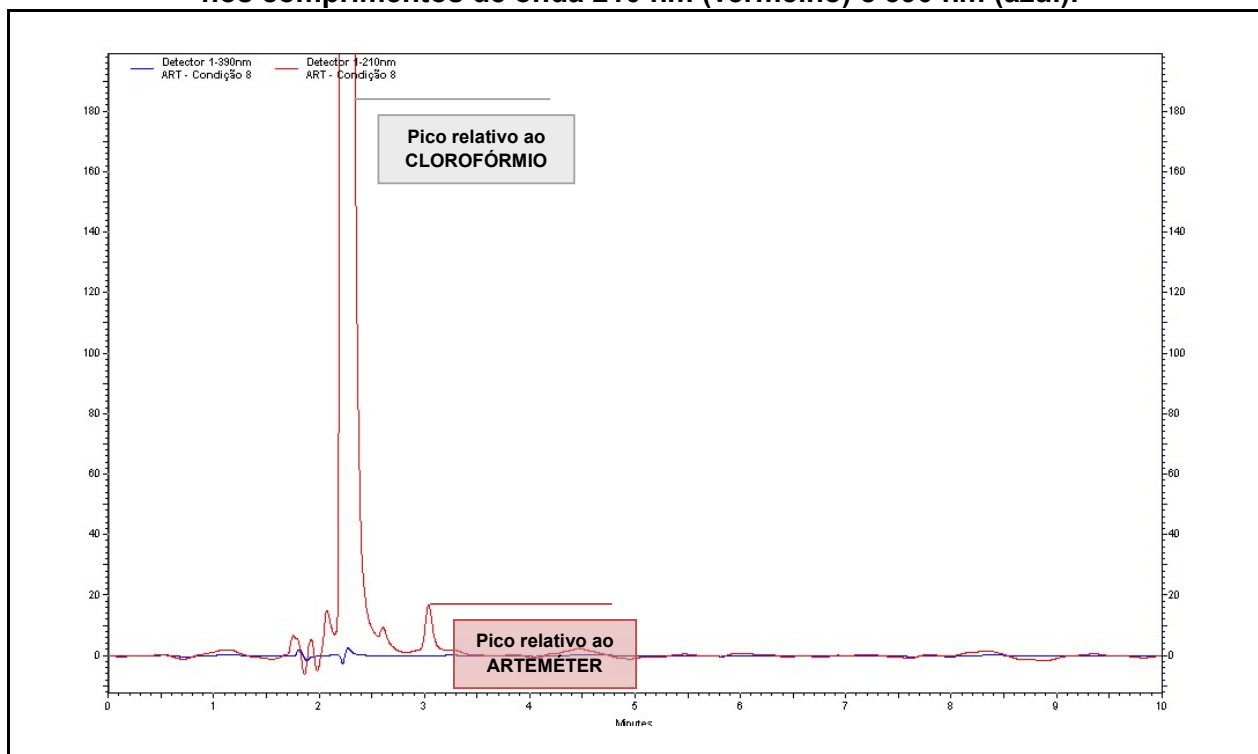


Figura 34 - Cromatograma da solução de arteméter a 20 µg/mL, preparado isolamente, nos comprimentos de onda 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).



Em todas as condições analisadas, os resultados de pureza dos picos atribuídos a lumefantrina apresentou resultados superiores a 0,99 o que demonstra a seletividade do método, uma vez que os possíveis produtos de degradação gerados pelas condições de estresse não foram co-eluídos com a lumefantrina em 390 nm e ainda, não interferiram nos resultados do arteméter, que foi detectado em 210 nm.

5.3.3.3 Precisão

A análise estatística dos dados obtidos nos estudos de precisão estão relacionadas nas Tabelas 51 e 52.

Tabela 51 - Repetitividade do método de doseamento dos fármacos em comprimidos por CLAE.

	ARTEMÉTER			LUMEFANTRINA		
	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)
1º dia de análise, analista 1	100,02	100,19	0,70	98,74	98,92	1,30
	100,26			98,64		
	99,33			97,09		
	101,18			98,98		
	99,57			101,12		
	100,79			98,95		
2º dia de análise, analista 2	100,23	10,95	0,45	100,06	99,55	0,53
	101,48			99,76		
	101,26			100,10		
	101,10			99,50		
	100,66			99,10		
	100,96			98,78		

Os valores de desvio padrão relativos foram calculados e o limite especificado de no máximo de 5,0% foi atendido para o nível de 100,0% , em termos de repetitividade.

Tabela 52 - Precisão intermediária do método de doseamento dos fármacos em comprimidos por CLAE.

Parâmetro	ARTEMÉTER		LUMEFANTRINA	
	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2
Média	100,9468	100,1931	99,5495	98,9203
Variância	0,2018	0,4970	0,28316	1,65874
t calculado	2,2086		1,1059	
t tabelado	2,2281			

Pode-se verificar que as médias dos resultados obtidos as seis determinações a 100,0% para as amostras individualmente preparadas, em dois dias diferentes, realizada por analistas distintos não são estatisticamente diferentes.

O t calculado para foi inferior ao t tabelado, ($\alpha = 0,05$ e G.L = 10). Desta forma, pode-se concluir que não há diferença entre as médias dos teores obtidos e o método de doseamento em comprimidos por CLAE na faixa de 80,0 a 120,0% apresenta precisão adequada, para arteméter e lumefantrina, avaliada pelos parâmetros de repetitividade e precisão intermediária.

5.3.3.4 Exatidão

Foi aplicado o método proposto na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de SQR foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo fortificado), em três níveis de concentração, sendo baixa, média e alta, em triplicata, preparadas de forma independente e os resultados estão descritos na **Tabela 53**.

Tabela 53 - Exatidão do método de doseamento dos fármacos em comprimidos por CLAE.

Nível	Rep.	ARTEMÉTER				LUMEFANTRINA			
		Conc. teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)	Médias (%)	Conc. teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)	Médias (%)
80,0%	1	16,02	15,82	98,77	99,22	96,12	95,58	99,44	99,25
	2	16,30	16,13	98,95		96,08	95,52	99,41	
	3	16,09	16,08	99,94		96,54	95,48	98,90	
100,0%	1	20,03	19,92	99,46	98,62	120,15	118,53	98,65	99,68
	2	20,38	19,99	98,11		122,25	120,74	98,77	
	3	20,11	19,77	98,30		120,68	122,64	101,62	
120,0%	1	24,03	24,03	99,99	99,11	144,18	143,89	99,80	99,45
	2	24,45	24,06	98,39		146,70	144,56	98,54	
	3	24,14	23,88	98,94		144,81	144,81	100,00	

Considerando-se que todos os valores de recuperação individuais e médios para os três níveis de concentração estão contidos no intervalo de 98,0 a 102,0%, podemos concluir que o método de doseamento apresenta exatidão adequada (GREEN, 1996).

5.3.3.5 Robustez

No parâmetro robustez, a amostra foi submetida às variações descritas no 5.2.2.4 e os resultados estão demonstrados nas **Tabela 54 e 55**.

Para todas as variáveis testadas foi utilizada a coluna C_{18} 150,mm x 4,0 mm; 5 μm - Agilent, com exceção da variável relacionada a alteração da coluna.

Tabela 54 - Robustez do método de doseamento de arteméter em comprimidos por CLAE.

Variáveis	Parâmetros Avaliados						
	k	Assimetria	Pratos teóricos	Tempo de retenção	Área	Pureza	Teor (%)
Condições nominais	1,0812	0,8918	7082	3,63	73218	0,994581	-
Estabilidade das soluções (24 h)	1,0799	0,8617	7576	3,61	69767	0,994697	95,29
Estabilidade das soluções (48 h)	1,0700	0,8894	7451	3,62	67059	0,994109	91,59
Composição da fase móvel (70:30; v/v)	1,0213	2,0911	4887	4,63	59821	0,993187	81,70
Composição da fase móvel (90:10; v/v)	0,8893	1,4558	8266	2,52	70148	0,894109	95,81
Temperatura da coluna: 50 °C	0,7503	1,2626	8121	3,40	70410	0,990214	96,16
Temperatura da coluna: 30 °C	1,0240	2,3322	12604	4,93	75719	0,999125	103,42
Fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min	1,0240	2,3322	10120	4,93	75719	0,994719	103,42
Fluxo da fase móvel: 1,4 mL/min	0,8746	0,9200	7192	2,38	74656	0,890000	101,96
Coluna Merck, LiChrospher®, Lote 497117, Alemanha 150 mm x 4,0 mm; 5 µm	1,1800	0,8700	7451	4,12	67059	0,993581	91,59

Tabela 55 - Robustez do método de doseamento de lumefantrina em comprimidos por CLAE.

Variáveis	Parâmetros Avaliados						
	k	Assimetria	Pratos teóricos	Tempo de retenção	Área	Pureza	Teor (%)
Condições nominais	1,3901	1,89845	3629	4,64	3144033	0,994482	-
Estabilidade das soluções (24 h)	2,0712	1,43184	3665	4,71	3068818	0,994598	97,61
Estabilidade das soluções (48 h)	2,0801	1,43322	3658	4,71	3091737	0,994010	98,34
Composição da fase móvel (70:30)	2,5035	3,90778	2482	7,33	3119743	0,993088	99,23
Composição da fase móvel (90:10)	1,4211	1,93063	3509	3,63	3016744	0,894020	95,95
Temperatura da coluna: 50°C	1,2500	2,00580	3462	4,36	3119408	0,990115	99,22
Temperatura da coluna: 30°C	1,9801	3,11680	5195	6,18	3101763	0,999025	98,66
Fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min	1,9800	3,20545	5195	6,18	3001763	0,994620	95,47
Fluxo da fase móvel: 1,4 mL/min	1,3214	2,17000	3550	3,62	3128400	0,889911	99,50
Coluna Merck, LiChrospher®, Lote 497117, Alemanha 150 mm x 4,0 mm; 5 µm	1,3901	1,89845	1547	4,87	3014770	0,993482	95,89

Para o arteméter, avaliando os parâmetros cromatográficos fator de retenção, assimetria, tempo de retenção, número de pratos teóricos, área, pureza do pico e o teor calculado, verifica-se que a solução amostra na concentração de 20,00 µg/mL não foi estável, devendo ser preparada no momento do uso já que foi observado uma redução de teor de aproximadamente 10% neste período.

A composição da fase móvel composta por 70% (v/v) de acetonitrila, apresentou diminuição da força eluente e consequentemente um aumento do tempo de retenção do pico relativo ao arteméter em 4,6 minutos. O redução do fluxo acompanhou o mesmo comportamento observado pelo aumento da diminuição de acetonitrila na fase móvel. O aumento da temperatura para 50 °C e do fluxo para 1,4 mL/min apresentaram impacto direto no fator de retenção do arteméter.

Avaliando os parâmetros cromatográficos fator de retenção, assimetria, tempo de retenção, número de pratos teóricos, área, pureza do pico e o teor calculado,

verifica-se que a solução amostra na concentração de 120,00 µg/mL foi estável e pode ser utilizada em até 48 horas. A composição da fase móvel composta por 70% (v/v) de acetonitrila, apresentou diminuição da força eluente e conseqüentemente um aumento do tempo de retenção do pico relativo a lumefantrina em 7,33 minutos, com alargamento do pico.

5.3.4 Validação do métodos analítico para dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE

5.3.4.1 Linearidade

A linearidade do método de dissolução de arteméter e lumefantrina foi avaliada com a análise de três curvas analíticas, no intervalo de 40,0 a 120,0%, equivalente as concentrações de 8,89 µg/mL a 26,66 µg/mL para arteméter e 53,33 µg/mL a 160,00 µg/mL para lumefantrina.

Os resultados de concentração e respectivas áreas estão reportadas nos cinco níveis (n=15) igualmente espaçados (**Tabelas 56 e 57**).

Tabela 56 - Concentrações e médias das áreas dos picos relativos ao arteméter da curva analítica do método de dissolução por CLAE.

Concentração (µg/mL) de arteméter	8,89 (40,0%)	13,33 (60,0%)	17,78 (80,0%)	22,22 (100,0%)	26,66 (120,0%)
Áreas da 1ª pesagem	34034	49293	64187	79350	95479
Áreas da 2ª pesagem	34413	50039	64588	78787	95640
Áreas da 3ª pesagem	33796	49433	64036	78820	94969

Tabela 57 - Concentrações e médias das áreas dos picos relativos à lumefantrina, da curva analítica do método de dissolução por CLAE.

Concentração (µg/mL) de lumefantrina	53,33 (40,0%)	80,00 (60,0%)	106,66 (80,0%)	133,33 (100,0%)	160,00 (120,0%)
Áreas da 1ª pesagem	1281266	2087302	2659790	3506678	4199583
Áreas da 2ª pesagem	1281696	2097084	2649602	3512840	4199583
Áreas da 3ª pesagem	1280879	2128712	2666288	3605645	4198821

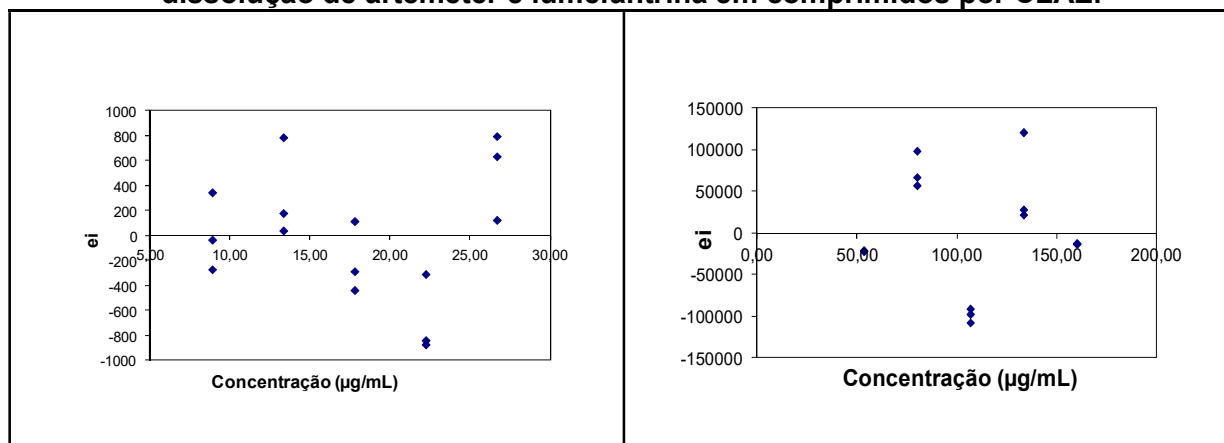
Foram aplicados os testes estatísticos para avaliar as premissas da regressão linear simples (**Tabela 58**).

Tabela 58 - Premissas necessárias à utilização dos MMQO.

Analito		Arteméter		Lumefantrina	
Premissa	Especificação	Resultado	Conclusão	Resultado	Conclusão
Teste de <i>outliers</i> pelo método <i>Jackknife</i>	$ J_{ei} > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Nenhum ponto apresentou $J_{ei} > J_{crítico}$	Não foram identificados <i>outliers</i> (Figura 35A)	Nenhum ponto apresentou $J_{ei} > J_{crítico}$	Não foram identificados <i>outliers</i> (Figura 35B)
Avaliação da normalidade pelo teste de Ryan-Jones	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9839$ $R_{crítico} = 0,9383$	Os resíduos seguem a distribuição normal	$R_{eq} = 0,9772$ $R_{crítico} = 0,9383$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de <i>Durbin-Watson</i>	$d_u < d_{calculado} < 4-d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u = 1,3596$ $d_{cal} = 1,3900$ $4-d_u = 2,6404$	Não há correlação entre os resíduos	$d_u = 1,3596$ $d_{cal} = 1,3850$ $4-d_u = 2,6403$	Não há correlação entre os resíduos
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de <i>Brown-Forsythe</i> ou <i>Levene modificado</i>	$t_L \leq t_{crítico}$ para $\alpha = 0,05$	$t_L = 1,810$ $t_{crítico} = 2,160$	Há homocedasticidade entre os resíduos.	$t_L = 0,3420$ $t_{crítico} = 2,160$	Há homocedasticidade entre os resíduos.
Análise de variância (nível de significância de 0,05)	$R^2 > 0,98$	$y = 3420,2x - 3659,8$ (Figura 36A) $R^2 = 0,9995$	Não há desvio da linearidade no intervalo entre 8,89 e 26,66 $\mu\text{g/mL}$.	$y = 27235x - 152299$ (Figura 36B) $R^2 = 0,9959$	Não há desvio da linearidade no intervalo entre 53,33 e 160,00 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: tabela construída com base nas informações disponíveis em SOUZA, 2007.

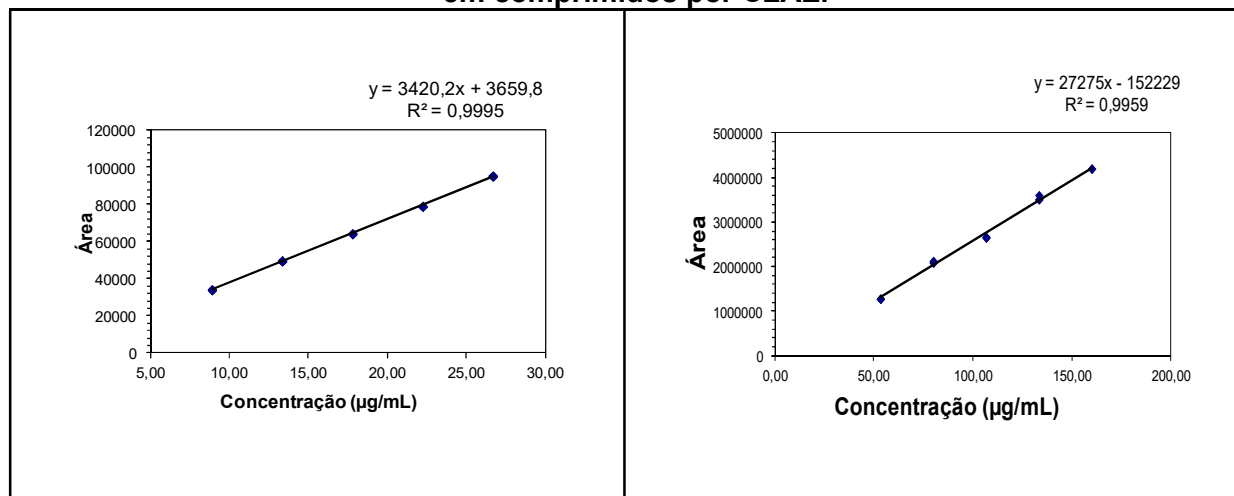
Figura 35 - Distribuições de resíduos obtidos no teste de *Jackknife* dos métodos de dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos por CLAE.



A - Para arteméter, no intervalo de 8,89 a 26,66 $\mu\text{g/mL}$.

B - Para lumefantrina, no intervalo de 53,33 a 160,00 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 36 - Curvas analíticas dos métodos de dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos por CLAE.



A - Para arteméter, no intervalo de 8,89 a 26,66 $\mu\text{g/mL}$.

B - Para lumefantrina, no intervalo de 53,33 a 160,00 $\mu\text{g/mL}$.

5.3.4.2 Seletividade

Foram analisadas soluções tampão de pH 6,80 + 1% de laurilsulfato de sódio (**Figura 37**) tampão de pH 1,20 + 1% de polissorbato 80 (**Figura 38**),

Figura 37 - Cromatograma do meio de dissolução pH 6,80 + 1,00%LSS em comprimentos de onda de 210 nm (vermelho) e 390 nm (azul).

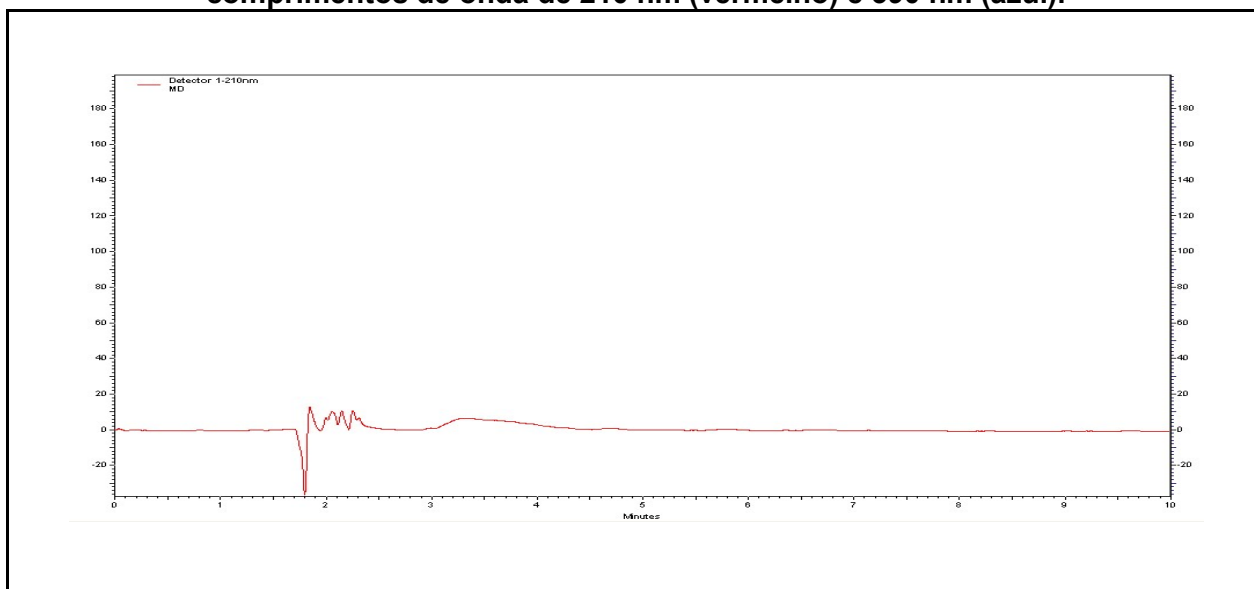
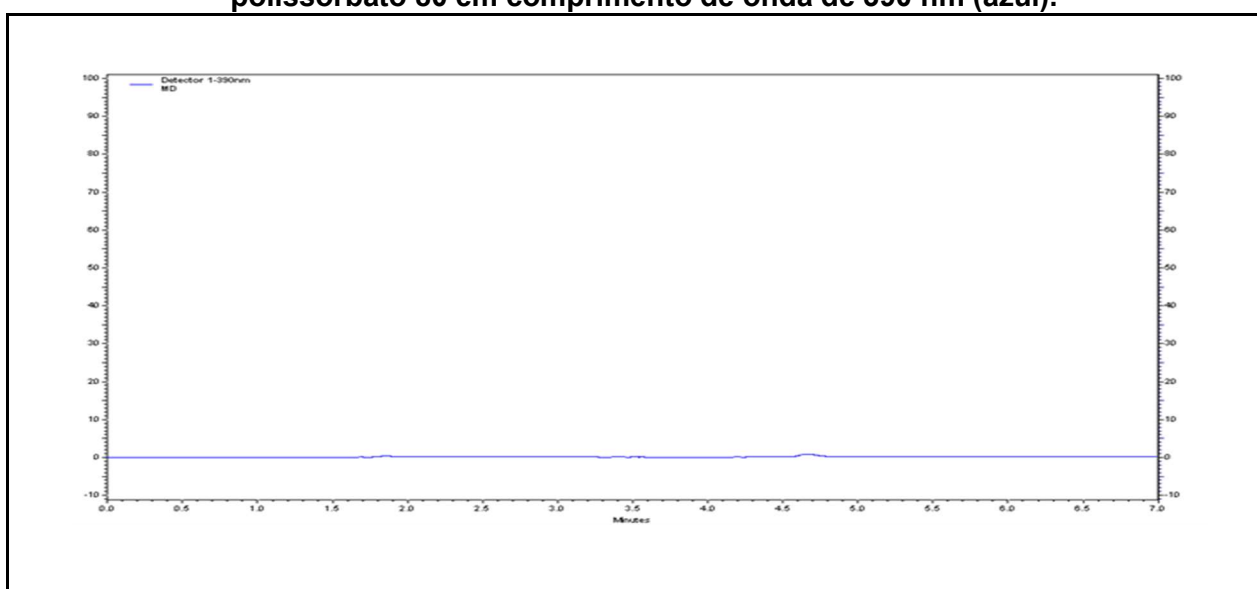


Figura 38 - Cromatograma obtido a partir da análise da solução tampão pH 1,20 + 1% de polissorbato 80 em comprimento de onda de 390 nm (azul).



Não foram observados picos no tempo de retenção relativo aos fármacos, garantindo a seletividade do método para a aplicação no teste de dissolução.

5.3.4.3 Precisão

A análise estatística dos dados obtidos nos estudos de precisão estão relacionadas nas Tabelas 59 e 60.

Tabela 59 - Repetitividade do método de dissolução dos fármacos em comprimidos por CLAE.

	ARTEMÉTER			LUMEFANTRINA		
	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)
1º dia de análise, analista 1	99,32	99,74	0,51	98,65	98,83	0,19
	98,99					
	99,69					
	99,92					
	100,20					
	100,29					
	100,39					
2º dia de análise, analista 2	100,45	100,20	0,28	99,97	99,12	0,72
	99,91					
	100,48					
	100,11					
	99,87					
	99,01					
	98,69					

Os valores de desvio padrão relativos foram calculados e o limite especificado de no máximo de 5,0% foi atendido para o nível de 100,0% , em termos de repetitividade.

Tabela 60 - Precisão intermediária do método de dissolução dos fármacos em comprimidos por CLAE.

Parâmetro	ARTEMÉTER		LUMEFANTRINA	
	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2	1º dia de análise, analista 1	2º dia de análise, analista 2
Média	99,74	100,20	98,82	99,12
Variância	0,256698214	0,076135784	0,036973	0,511942
t calculado	1,8125		0,97287	
t tabelado	2,2281			

Pode-se verificar que as médias dos resultados obtidos as seis determinações a 100,0% para as amostras individualmente preparadas, em dois dias diferentes, realizada por analistas distintos não são estatisticamente diferentes. O *t* calculado para arteméter e lumefantrina foram **1,8126** e **0,9729** respectivamente, inferior ao tabelado ($\alpha = 0,05$ e G.L = 10).

Desta forma, pode-se concluir que não há diferença entre as médias e o método de dissolução apresenta precisão adequada, avaliada pelos parâmetros de repetitividade e precisão intermediária.

5.3.4.4 Exatidão

Foi aplicado o método proposto na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de SQR foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo fortificado), em três níveis de concentração, preparadas de forma independente (**Tabela 61**).

Tabela 61 - Exatidão do método de dissolução dos fármacos em comprimidos por CLAE.

Nível	Rep.	ARTEMÉTER				LUMEFANTRINA			
		Conc. teórica (µg/mL)	Conc. experimental (µg/mL)	Exatidão (%)	Médias (%)	Conc. teórica (µg/mL)	Conc. experimental (µg/mL)	Exatidão (%)	Médias (%)
40,0%	1	8,89	8,90	100,11		53,54	53,90	100,67	
	2	8,92	8,96	100,45	100,67	53,78	53,96	100,33	100,19
	3	8,88	9,01	101,46		53,24	53,01	99,57	
80,0%	1	17,78	18,00	101,24		107,08	108,00	100,86	
	2	17,84	18,03	101,07	101,33	107,56	108,03	100,44	100,90
	3	17,76	18,06	101,69		106,48	107,99	101,42	
120,0%	1	26,67	26,90	100,86		160,62	160,98	100,22	
	2	26,76	26,80	100,15	100,65	161,34	160,34	99,38	100,01
	3	8,89	8,90	100,11		159,72	160,40	100,43	

Considerando-se que todos os valores de recuperação individuais e médios para os três níveis de concentração estão contidos no intervalo de 98,0 a 102,0%, podemos concluir que o método de dissolução por CLAE apresenta exatidão adequada (GREEN, 1996) para ambos fármacos.

5.3.4.5 Robustez

No parâmetro robustez, os resultados para arteméter e lumefantrina estão demonstrados na **Tabela 62** e **63** respectivamente.

Tabela 62 - Robustez do método de dissolução de arteméter em comprimidos por CLAE.

Variáveis	Parâmetros Avaliados						
	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6	Média
Não desaerado	88,91	89,21	88,00	90,08	89,17	91,20	88,91
Filtração a vácuo da solução pré-aquecida a 41 °C.	89,27	91,47	90,19	92,68	91,52	90,03	89,27
Filtração em 0,45 µm, PVDF	89,10	87,00	86,20	86,00	87,30	87,78	89,10
Centrifugação e análise do sobrenadante	87,10	86,78	87,87	86,34	87,71	86,09	87,10

Tabela 63 - Robustez do método de dissolução de lumefantrina em comprimidos por CLAE.

Variáveis	Parâmetros Avaliados						
	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6	Média
Não desaerado	86,77	89,65	89,59	87,75	87,84	88,65	86,77
Filtração a vácuo da solução pré-aquecida a 41 °C.	87,36	93,03	91,38	90,19	87,93	87,93	87,36
Filtração em 0,45 µm, PVDF	87,04	86,45	86,39	88,91	89,02	87,92	87,04
Centrifugação e análise do sobrenadante	88,23	85,82	85,55	90,61	89,97	89,06	88,23

Não houve diferença estatística significativa entre os resultados das variações de aeração do meio e filtração da amostra, pela após avaliação pelo teste *t* de *Student*, considerando $\alpha = 0,05$ e 10 graus de liberdade. Desta forma, foi demonstrado que o meio de dissolução pode ser utilizado sem desaeração e que o processo de filtração não interfere na quantidade do fármaco.

5.4 Conclusões

- O método de doseamento de arteméter descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, foi validado na faixa de concentração de 48,00 a 112,00 µg/mL, apresentou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez adequadas e pode ser aplicado para doseamento de arteméter em amostras de insumos farmacêuticos ativos e estudos de solubilidade em equilíbrio.
- O método de doseamento de lumefantrina desenvolvido por César e colaboradores, foi revalidado com a inclusão dos testes de seletividade e utilizando o intervalo de 80,0 a 120,0%, equivalente a 19,20 a 18,80 µg/mL, em cinco níveis igualmente espaçados. O método apresentou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez adequadas e pode ser aplicado para quantificação de lumefantrina em amostras de insumos farmacêuticos ativos e estudos de solubilidade em equilíbrio.
- O método de doseamento de arteméter e lumefantrina em comprimidos desenvolvido por Umapathi e colaboradores, foi otimizado, com a seleção de 2 comprimentos de onda distintos para detecção do arteméter e da lumefantrina em uma mesma corrida analítica. Foi realizada a validação do teor no intervalo de 16,00 a 24,00 µg/mL para o arteméter e 96,00 a 144,00 µg/mL para a lumefantrina. O método foi validado para quantificação simultânea dos fármacos em comprimidos,

apresentando linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez adequadas. A dissolução dos dois componentes foi validada nas faixas de 8,89 a 26,66 µg/mL e 53,33 a 160,00 µg/mL de arteméter e lumefantrina respectivamente, apresentando resultados satisfatórios em todos os parâmetros.

6 CAPÍTULO III: ESTUDOS DE SOLUBILIDADE, DISSOLUÇÃO E CORRELAÇÃO IN VITRO-IN VIVO

6.1 Materiais

6.1.1 Insumos farmacêuticos ativos

- Arteméter insumo farmacêutico ativo (IFA), Dafra Pharma - Turnhout, Bélgica, lote 0601010-4087, teor de 99,18%.
- Lumefantrina insumo farmacêutico ativo (IFA), Dafra Pharma - Turnhout, Bélgica, lote 06032403, teor de 100,43%.
- Coartem® Lote F0311

6.1.2 Reagentes

- Água ultrapura.
- Solventes e reagentes grau analítico: acetato de sódio triidratado, ácido clorídrico, ácido acético glacial, cloreto de potássio, hidróxido de sódio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio monobásico, laurilsulfato de sódio, polissorbato 80.

6.1.3 Materiais e vidrarias

- Balões volumétricos com capacidade de 5, 10, 25, 50, 200, 500, 1000 e 2000 mL.
- Erlenmeyers de 100 e 250 mL.
- Filtros de seringa de PVDF com 0,45 µm de tamanho de poro.
- Membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,22 µm, SARTORIUS.
- Micropipetas automáticas.
- Pipetas volumétricas de 2, 4, 5, 10 e 25 mL.
- Vidraria de uso laboratorial.

6.1.4 Equipamentos

- Aparelho de ultrassom UNIQUE 1400.
- Dissolutor Erweka DT-80.
- Incubadora com plataforma de agitação orbital Tecnal TE-4080.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP211D.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE DIRECT Q3.

6.2 Métodos

6.2.1 Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (*shake-flask*)

6.2.1.1 Seleção dos meios

A avaliação da solubilidade em equilíbrio é uma etapa chave no desenvolvimento de métodos de dissolução. A avaliação quantitativa da solubilidade do fármaco deve ser realizada na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8), considerando a temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando quantidades crescentes de substância ativa em volume fixo de, pelo menos, três diferentes meios como, por exemplo, em pH 1,2; 4,5 e 6,8 (ANVISA, 2010, 2011; FDA, 1997). Sugere-se ainda, que as condições de pH contemplem valores correspondentes ao pKa do fármaco, na faixa de $\text{pKa} \pm 1$ (FDA, 2015). O método de escolha para realização do teste é o *shake-flask* em incubadora com plataforma de agitação orbital com temperatura controlada. A composição dos meios está sumarizada na **Tabela 64**.

O teste solubilidade em equilíbrio de arteméter e lumefantrina foi realizado em meios de dissolução com pH na faixa fisiológica de 1,2; 4,5; 6,8 (ANVISA, 2010) e 7,2 (FDA, 1997a), em incubadora com plataforma de agitação orbital (*shake-flask*) com temperatura controlada em $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Figura 39**) (ANVISA, 2010, FDA, 1997a).

Tabela 64 - Preparo dos meios utilizados nos estudos de solubilidade em equilíbrio e dissolução.

Meio	Preparo
Água	-
Água + 1% de laurilsulfato de sódio	10 g de laurilsulfato de sódio em água q.s.p. 1000 mL.
Água + 1% de polissorbato 80	10 g de polissorbato 80 em água q.s.p. 1000 mL.
pH 1,2	250 mL de solução de KCl 0,2 M + 425 mL de solução de HCl 0,2 M em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH se necessário (pH 1,20 ± 0,05).
pH 1,20 + 1% de laurilsulfato de sódio	250 mL de solução de KCl 0,2 M + 425 mL de solução de HCl 0,2 M + 10 g de laurilsulfato de sódio em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH se necessário (pH 1,20 ± 0,05).
pH 1,20 + 1% de polissorbato 80	250 mL de solução de KCl 0,2 M + 425 mL de HCl 0,2 M + 10 g de polissorbato 80 em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH se necessário (pH 1,20 ± 0,05).
pH 4,50	2,99 g de acetato de sódio triidratado + 14,0 mL de ácido acético 2 M em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH, se necessário (pH 4,50 ± 0,05).
pH 4,50 + 1% laurilsulfato de sódio	2,99 g de acetato de sódio triidratado + 14,0 mL de ácido acético 2 M + 10 g de laurilsulfato de sódio em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH, se necessário (pH 4,50 ± 0,05).
pH 4,50 + 1% de polissorbato 80	,99 g de acetato de sódio triidratado + 14,0 mL de ácido acético 2 M + 10 g de polissorbato 80 em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH, se necessário (pH 4,50 ± 0,05).
Tampão pH 6,80	250 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M + 112 mL de uma solução de NaOH 0,2 M em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH, se necessário (pH 6,80 ± 0,05).
pH 6,80 + 1% laurilsulfato de sódio	250 mL de uma solução de fosfato de sódio monobásico 0,2 M + 112 mL de uma solução de NaOH 0,2 M + 10 g de laurilsulfato de sódio em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH, se necessário (pH 6,80 ± 0,05).
pH 6,80 + 1% de polissorbato 80	250 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M + 112 mL de uma solução de NaOH 0,2 M + 10 g de polissorbato 80 em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH, se necessário (pH 6,80 ± 0,05).
pH 7,20	250 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M + 173,5 mL de uma solução de NaOH 0,2 M em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH, se necessário (pH 7,20 ± 0,05).
pH 7,20 + 1% laurilsulfato de sódio	250 mL de uma solução de fosfato de sódio monobásico 0,2 M + 173,5 mL de uma solução de NaOH 0,2 M + 10 g de laurilsulfato de sódio em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH, se necessário (pH 7,20 ± 0,05).
pH 7,20 + 1% de polissorbato 80	250 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M + 173,5 mL de uma solução de NaOH 0,2 M + 10 g de polissorbato 80 em água q.s.p. 1000 mL. Ajuste de pH, se necessário (pH 7,20 ± 0,05).

q.s.p. = quantidade suficiente para

Figura 39 - Incubadora com plataforma de agitação orbital Tecnal TE-4080



6.2.1.2 Delineamento experimental

Cada experimento de solubilidade foi realizado utilizando-se as amostras de arteméter e lumefantrina, lotes 0601010-4087 e 06032403 respectivamente, em triplicata e três tipos, a saber:

- *Experimento (1)*: 250 mg de arteméter (ART);
- *Experimento (2)*: 250 mg de lumefantrina (LMF);
- *Experimento (3)*: 250 mg de arteméter e 250 mg de lumefantrina (ART + LMF).

Em cada teste, 50 mL do meio foram transferidos para o erlenmeyer e acondicionados na incubadora em uma temperatura de 37 °C. Após atingir o equilíbrio termodinâmico, foram transferidos 250 mg da amostra para cada erlenmeyer contendo o meio de dissolução (**Figura 40**).

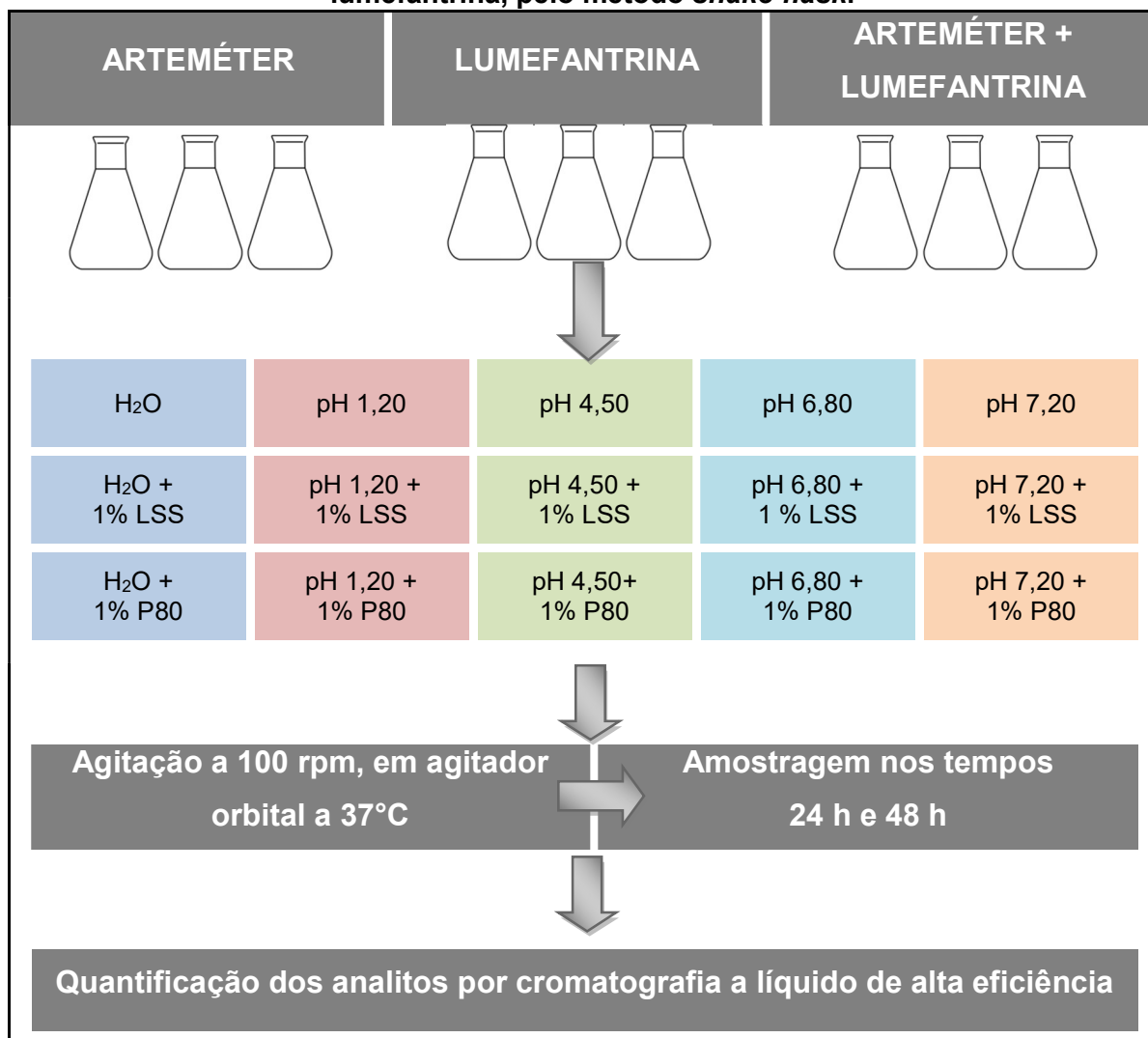
Finalizados os tempos estipulados para a coleta, de 24 e 48 horas, padronizados para garantir que foi obtida a solução saturada, foram coletadas alíquotas de 5 mL de cada amostra e em seguida, filtradas e transferidas para balão volumétrico, conforme procedimentos específicos descritos nos itens 6.2.1.3, 6.2.1.4 e 6.2.1.5.

As amostras foram submetidas às análises cromatográficas específicas para cada analito relacionadas no item 6.2.2. Um branco de cada meio utilizado no teste foi submetido às análises cromatográficas para avaliação de possíveis interferentes na quantificação do(s) analito(s).

Foi procedida a leitura do valor de pH das soluções antes do teste, após a adição do fármaco e ao final do teste em todas condições.

Um esquema completo do experimento de solubilidade em equilíbrio empregado está representado na **Figura 40**.

Figura 40 - Experimentos de solubilidade em equilíbrio para arteméter e lumefantrina, pelo método *shake-flask*.



6.2.1.3 Quantificação de arteméter

Após as coletas das amostras do *Experimento (1)*, a quantificação do arteméter foi realizada aplicando-se o método analítico descrito no **Capítulo II**.

6.2.1.3.1 Preparo das soluções padrão e amostra de arteméter

Solução padrão de arteméter: aproximadamente 20 mg de arteméter SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter solução a 4 mg/mL. Transferiram-se 2 mL da solução preparada anteriormente para balão volumétrico de 100 mL e o volume

foi ajustado com fase móvel, obtendo-se concentração de 0,08 mg/mL. Este valor foi estipulado considerando-se que uma dose de arteméter, equivalente a 20 mg, seria solubilizada em 250 mL.

Solução amostra de arteméter - Experimento (1): finalizado o tempo especificado, foi retirada alíquota de 5 mL de cada meio de dissolução. Foram transferidos 4 mL, previamente filtrados, para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi ajustado com acetonitrila.

6.2.1.4 Quantificação de lumefantrina

As soluções amostras de lumefantrina obtidas no *Experimento (2)* foram quantificadas aplicando-se o método analítico descrito no **Capítulo II**.

6.2.1.4.1 Preparo das soluções padrão e amostra de lumefantrina

A *Solução padrão de lumefantrina* foi preparada conforme descrito no **Capítulo II**, tendo como concentração final de 24 µg/mL.

Solução amostra de lumefantrina - Experimento (2): finalizado o tempo especificado, foi retirada alíquota de 5 mL de cada meio de dissolução, foram transferidos 4 mL, previamente filtrados, para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi ajustado com metanol.

6.2.1.5 Quantificação simultânea de arteméter e lumefantrina

Após a retiradas das amostras obtidas do teste realizado com os dois fármacos simultaneamente no *Experimento (3)*, a quantificação dos fármacos foi realizada conforme metodologia descrita no item 6.2.1.3.

6.2.1.5.1 Preparo das soluções padrão mistas e amostras

Solução padrão estoque de arteméter (SPE-ART): foram transferidos 20 mg de arteméter SQR para balão volumétrico de 100 mL, adicionado 1 mL de clorofórmio e

submetidos em banho de ultrassom por 10 minutos. Transcorrido o tempo especificado, o volume foi ajustado com acetonitrila obtendo uma solução de concentração equivalente a 200 µg/mL.

Solução padrão estoque de lumefantrina (SPE-LMF): foram transferidos 30 mg de lumefantrina para balão volumétrico de 25 mL, adicionados 4 mL de clorofórmio e submetidos em banho de ultrassom por 10 minutos. Transcorrido o tempo especificado, o volume foi ajustado com acetonitrila obtendo uma solução de concentração equivalente a 1.200 µg/mL.

Solução padrão mista de arteméter (20µg/mL) e lumefantrina (120µg/mL): Foram transferidos 5 mL da *SPE-ART* e 5 mL da *SPE-LMF* para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi ajustado com fase móvel preparada conforme item 6.2.1.3, obtendo uma solução de concentração de arteméter e lumefantrina equivalente a 20 e 120 µg/mL respectivamente.

Solução amostra do Experimento (3): finalizado o tempo especificado, foi retirada alíquota de 5 mL de cada meio de dissolução. Foram transferidos 4 mL, previamente filtrados, para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi ajustado com fase móvel.

A partir dos resultados obtidos nos cromatogramas foi determinada a solubilidade de em cada meio testado e calculada relação dose/solubilidade (D / S), conforme a equação a seguir (LINDENBERG *et. al.*, 2004):

$$D / S = \frac{\text{Dose(mg)}}{\text{Solubilidade} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

6.2.2 Estudos de dissolução

Para demonstrar que o meio de dissolução é o mais adequado às substâncias ativas no comprimido, foram realizadas investigações das curvas de dissolução utilizando as mesmas composições de meios de dissolução, abrangendo a faixa de pH

fisiológico sendo 1,20; 4,50; 6,80 (ANVISA, 2010) e pH 7,2 (FDA, 1997a) em temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Os meios de dissolução foram preparados conforme descrito na **Tabela 64**.

Em cada perfil de dissolução, foram empregadas doze unidades de Coartem® comprimidos, sendo uma unidade por cuba e cada cuba contendo 900 mL de meio de dissolução. Nos tempos de 5, 15, 30, 60 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada cuba, manualmente e sem reposição de meio. As velocidades de agitação foram estabelecidas de acordo com a aparelhagem utilizada, sendo 100 rpm para cestas e 50 rpm para pás (THE UNITED, 2016; ANVISA, 2010, FDA, 1997a) (**Tabela 65**). Após a coleta e filtração de cada alíquota, foram procedidas as análises cromatográficas para determinação das porcentagens dissolvidas.

O percentual dissolvido de cada fármaco foi plotado em função do tempo em minutos, para cada condição avaliada, em cinco pontos de coleta, considerando-se aceitável variação máxima de 20% nos primeiros pontos e 10% nos demais pontos (ANVISA, 2010).

Tabela 65 - Condições iniciais para avaliação da fração dissolvida *in vitro*.

Meio de dissolução	Aparelhagem	Velocidade de agitação
Água	Cestas	100 rpm
	Pás	50 rpm
pH 1,20	Cestas	100 rpm
	Pás	50 rpm
pH 4,50	Cestas	100 rpm
	Pás	50 rpm
pH 6,80	Cestas	100 rpm
	Pás	50 rpm
pH 7,20	Cestas	100 rpm
	Pás	50 rpm

Em função da baixa solubilidade obtida no estudo de solubilidade em equilíbrio, foram realizadas as avaliações dos perfis dissolução utilizando meios de dissolução contendo tensoativos em sua composição (**Tabela 66**). Todos os testes foram realizados com doze unidades (FDA, 1997a), utilizando aparelhagem pás, velocidade de rotação de 100 rpm em 900 mL de meio de dissolução, preparados conforme **Tabela 64**. Foram retiradas alíquotas de 5 mL nos tempos de coleta de 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos, manualmente e sem reposição de meio,

selecionados no mesmo intervalo utilizado no estudo *in vivo* realizado em 2009, por CÉSAR e colaboradores. Foi realizada a coleta com 5 minutos, não realizada no estudo de biodisponibilidade, com o intuito de se avaliar a possibilidade de rápida dissolução dos fármacos.

Tabela 66 - Meios de dissolução para avaliação da fração dissolvida dos fármacos *in vitro*.

Meio de dissolução
Água + 1% LSS
Água + 1% P80
pH 1,20 + 1% LSS
pH 1,20 + 1% P80
pH 4,50 + 1% LSS
pH 4,50 + 1% P80
pH 6,80 + 1% LSS
pH 6,80 + 1% P80

A utilização de tensoativos nos meios de dissolução deve ser a mínima necessária para o fármaco dissolva (THE UNITED, 2016). Após avaliação das curvas obtidas nos meios descritos na **Tabela 66**, os perfis mais adequados à correlação *in vitro-in vivo* foram identificados e, conseqüentemente, foram realizados os estudos com diminuição gradativa da concentração de tensoativo para identificar e selecionar o meio de dissolução com a menor concentração possível.

Os meios selecionados para avaliação de arteméter foram pH 6,80 com 0,25 e 0,50% de laurilsulfato de sódio e para lumefantrina, pH 1,20 com 0,25 e 0,50% de polissorbato 80. Nestes ensaios, foram mantidas as demais condições do teste de dissolução.

6.2.3 Tratamento dos dados do estudo farmacocinético

O estudo farmacocinético de arteméter e lumefantrina comprimidos em dose fixa combinada foi realizado em 2009, por CÉSAR e colaboradores e seus dados foram tratados matematicamente para obtenção da fração absorvida dos fármacos, utilizada no presente estudo de correlação *in vitro-in vivo*.

O estudo foi conduzido com seis voluntários sadios, adultos de ambos os sexos com idade entre 18 e 50 anos, com índice de massa corpórea maior do que 19 e menor do que 30. Todos os voluntários foram submetidos a exames clínicos e laboratoriais

antes dos testes, comprobatórios de bom estado geral de saúde. A etapa clínica atendeu aos critérios recomendados pela RE 1170/06 (ANVISA, 2006).

Cada voluntário recebeu quatro comprimidos de Coartem® com 200 mL de leite integral e foram coletadas 22 amostras seguintes tempos (h): 0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 8,00; 10,00; 12,00; 24,00; 36,00; 48,00; 72,00; 120,00 e 264,00. A quantificação simultânea de arteméter e lumefantrina nas amostras de plasma foi realizada por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

6.2.4 Correlação *in vitro-in vivo*

Foi realizada a correlação de nível A, ponto a ponto, entre a dissolução *in vitro* dos fármacos, a partir dos perfis de dissolução obtidos com comprimidos de Coartem® e a velocidade de entrada no organismo *in vivo* pelas frações absorvidas, obtidas por deconvolução dos dados do estudo farmacocinético.

Para arteméter, fármaco que apresenta modelo monocompartimental (WHITE *et.al.*, 1999), o modelo adequado é Wagner-Nelson, descrita na equação abaixo (EMAMI, 2006):

$$F_t = \frac{C_t + K_e \int_0^T C dt}{k_e \int_0^\infty C dt}$$

Em que: F_t é a fração dissolvida no tempo t , C_t é a concentração plasmática do fármaco no tempo t e k_e é a constante de eliminação, $\int_0^T C dt$ é a integral da concentração em função do tempo.

Para lumefantrina, fármaco que apresenta modelo bicompartimental (WHITE *et.al.*, 1999), o modelo adequado para deconvolução é Loo-Riegelman (EMAMI, 2006). Para aplicar este modelo matemático, é necessário que o fármaco seja administrado por via endovenosa e oral em um mesmo indivíduo para obtenção das concentrações plasmáticas. Este procedimento não é requerido para obter as

frações pelo o método de Wagner-Nelson, que em 1974, desenvolveu uma relação matemática para aplicação em modelos bicompartimentais, sem a necessidade da administração do fármaco por via endovenosa. Para estimativa dos valores de α (constante de velocidade de distribuição) foram utilizados os parâmetros farmacocinéticos da lumefantrina obtidos por WHITE e colaboradores em 1999 e CESAR e colaboradores em 2009, relacionados na **Tabela 67** e as equações a seguir (WAGNER, 1974):

$$T_{\text{máx}} = -\frac{1}{k_a - \alpha} \ln \left[\frac{\alpha - k_{21}}{k_a - k_{21}} \right], \text{ e}$$

$$F(t) = C_1(t) + \beta \int_0^t C_1(t) dt = C_0 \left[\frac{k_{21}}{\alpha} + \frac{1}{\alpha(k_a - \alpha)} \{k_a(\alpha - k_{21})e^{-\alpha t} - \alpha(k_a - k_{21})e^{-k_a t}\} \right]$$

Em que: $T_{\text{máx}}$ é o tempo para alcançar a concentração máxima, k_a é a constante de velocidade de absorção, k_{21} é a constante de velocidade de distribuição do fármaco do compartimento periférico para o compartimento central, α = constante de velocidade de distribuição, β é a constante de velocidade de eliminação terminal, $C_1(t)$ = concentração do compartimento central em determinado tempo e C_0 é a concentração plasmática do fármaco.

Tabela 67 - Parâmetros farmacocinéticos de lumefantrina.

Parâmetro	Estimado
k_a (h^{-1})	0,17 ¹
$T_{\text{máx}}$ (h)	5,80 ²
β (h^{-1})	0,0094 ¹
k_{21} (h^{-1})	0,015 ¹
K_{el} (h^{-1})	0,01 ²

Fonte: adaptado de WHITE, 1999¹ e CESAR et. al. 2009².

A fração absorvida foi plotada em função da fração dissolvida e foram calculados os coeficientes de correlação, utilizando *software* Microsoft Excel® 2007 para os dois fármacos.

Para o arteméter, foi realizada a avaliação da correlação com as frações dissolvidas em função do tempo obtidas nos seguintes meios dissolução: água, pH 1,20 e 4,50, tanto com 1% de laurilsulfato de sódio, quanto com 1% de polissorbato 80. Para o pH 6,80, foram avaliadas as concentrações de 1% de polissorbato 80 e de 0,25; 0,50

e 1% de laurilsulfato de sódio. Para lumefantrina, foi avaliada a correlação nos meios de dissolução com pH 1,20 contendo 0,25; 0,50 e 1% de polissorbato 80.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (*shake-flask*)

6.3.1.1 Solubilidades de arteméter - *Experimento (1)*

Após o término do teste, a solubilidade quantitativa do arteméter foi calculada para cada meio de dissolução (**Tabela 68**), no tempo de 48 horas. A partir dos valores de solubilidade encontrados e da dose de 20 mg por comprimido de arteméter, foi calculada a razão D/S.

Tabela 68 - Solubilidade de arteméter nos meios biorrelevantes e relação dose:solubilidade.

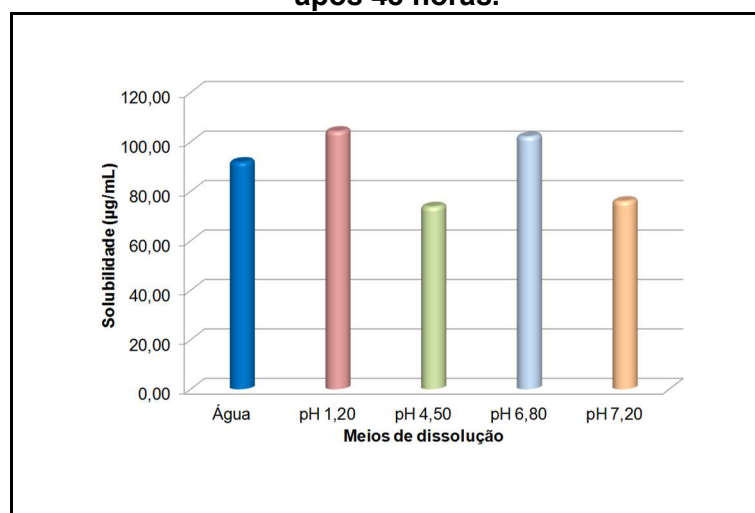
Condição	Média da solubilidade (µg/mL) (n = 3)	DPR (%)	Relação dose:solubilidade (mL)
Água	91,85	4,75	218
Água + 1% LSS	96,72	1,42	207
Água + 1% P80	597,49	0,47	33
pH 1,20	104,33	1,12	192
pH 1,20 + 1% LSS	115,77	1,30	173
pH 1,20 + 1% P80	450,33	2,45	44
pH 4,50	73,80	2,88	271
pH 4,50 + 1% LSS	3230,44	2,53	6
pH 4,50 + 1% P80	621,77	3,76	32
pH 6,80	102,18	1,26	196
pH 6,80 + 1% LSS	3067,67	1,91	7
pH 6,8 + 1% P80	659,89	2,02	30
pH 7,20	76,03	1,77	263
pH 7,20 + 1% LSS	105,42	2,91	190
pH 7,20 + 1% P80	99,81	2,13	200

As solubilidades do arteméter nos meios água, pH 1,20, pH 4,50, pH 6,80 e pH 7,20 são apresentadas na **Figura 41**. Os valores não apresentam variações significativas, o que pode estar relacionado ao fato de que o fármaco é uma molécula que não apresenta propriedades ácidas ou básicas, sem valor de pKa na faixa de 0 a 14, descrito em literatura. Além disso, nos meios água, pH 1,20 e 6,80 a relação D/S foi inferior a 250 mL, o que significa que é necessário um volume inferior a 250 mL para solubilizar o fármaco, apresentando *sink condition*. Com esse resultado, há uma

hipótese a ser confirmada de que o arteméter se dissolva nessas condições no ensaio de dissolução.

Considerando apenas o parâmetro solubilidade, o arteméter não é caracterizado como altamente solúvel, uma vez que não foram obtidos valores de relação dose/solubilidade inferiores a 250 mL em toda faixa de pH fisiológico. Em 2004, LINDERBERG e colaboradores, descreveram que arteméter é pertencente à classe II da SCB (fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade), ratificando o resultado obtido.

Figura 41 - Solubilidades de arteméter em meios biorrelevantes, obtidas pelo método de *shake-flask*, após 48 horas.

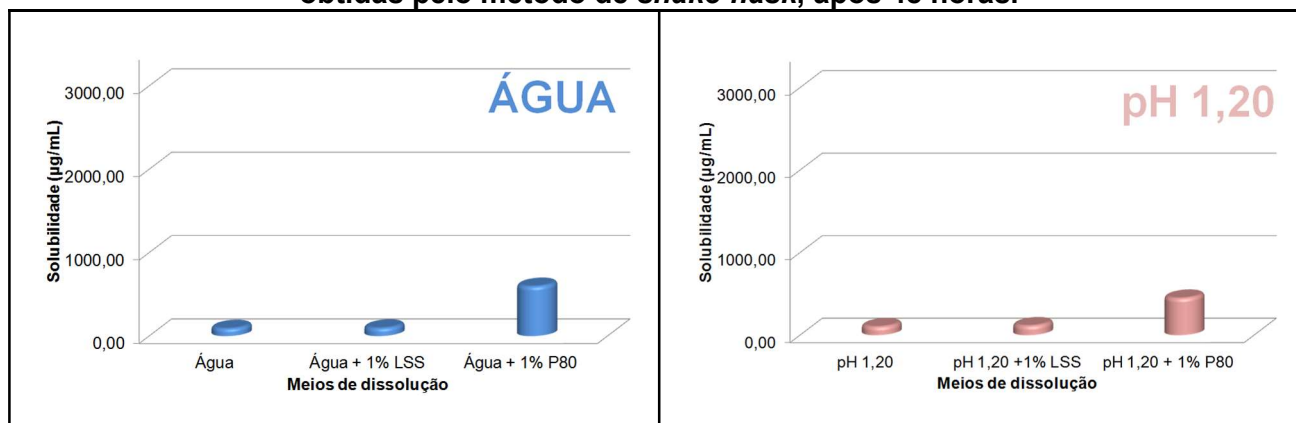


Ao se identificar a necessidade do uso de tensoativos no meio para aumentar a solubilidade do fármaco, devem ser testadas diferentes concentrações e tipos. O meio selecionado deve ter em sua composição a menor concentração para aumentar a solubilidade do fármaco e atingir *sink condition*. Tendo em vista a baixa solubilidade dos fármacos em água a 25 °C, foram selecionados os tensoativos laurilsulfato de sódio (tensoativo aniônico) e polissorbato 80 (tensoativo não iônico) para composição dos meios de dissolução, na concentração de 1%. Usualmente, concentrações superiores à concentração micelar crítica (CMC em %p/v) são utilizadas, sendo que para laurilsulfato de sódio e polissorbato 80, são de 0,18 a 0,23% e 0,02 a 0,08%, respectivamente (THE UNITED, 2016). Os tensoativos selecionados foram avaliados quanto à possibilidade de incompatibilidade com os reagentes que compõem os meios. O fosfato de potássio monobásico é incompatível

com o laurilsulfato de sódio, formando um precipitado. Desta forma, justifica-se a sua substituição pelo sal sódico correspondente (ROWE, 2012; THE UNITED, 2016).

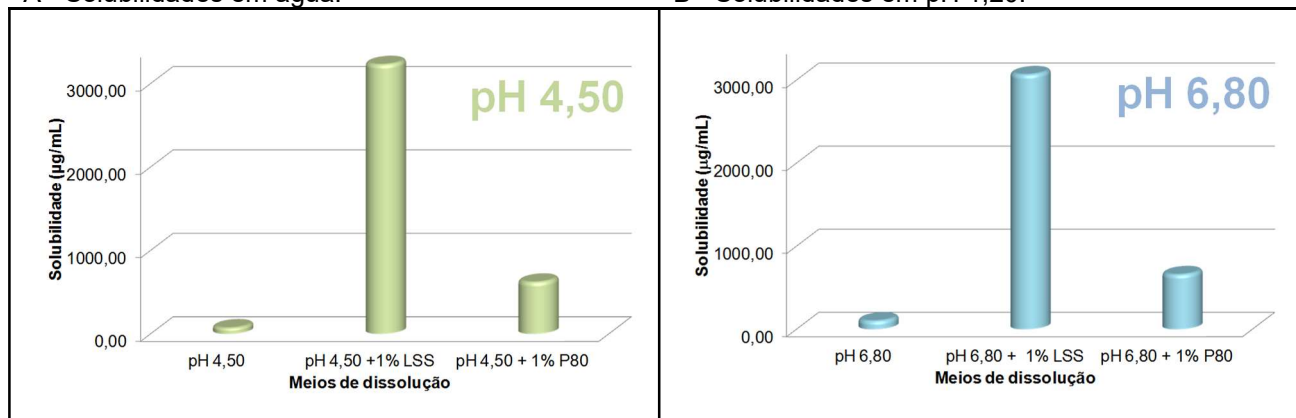
Na **Figura 42**, está demonstrada a solubilidade obtida para arteméter nos diferentes meios, com e sem adição de tensoativos. Nas Figuras **42A** e **42B**, nota-se que os valores de solubilidade de arteméter na água e no meio com pH 1,20, são aumentadas com a adição de tensoativo e que o tensoativo não iônico (polissorbato 80) apresenta um efeito de solubilização muito superior quando comparado aniônico iônico (laurilsulfato de sódio). No meio de pH 4,50 (**Figura 42C**), que simula o suco gástrico sem enzimas no estado pós-prandial e no meio pH 6,80 (**Figura 42D**), observa-se que a presença de tensoativos no meio aumenta a solubilidade do fármaco, principalmente 1% de laurilsulfato de sódio. Para o meio de pH 7,20 (**Figura 43**), a solubilidade do arteméter aumentou discretamente na presença de 1% de tensoativo.

Figura 42 - Solubilidades de arteméter em diferentes meios, com adição de tensoativos, obtidas pelo método de *shake-flask*, após 48 horas.



A - Solubilidades em água.

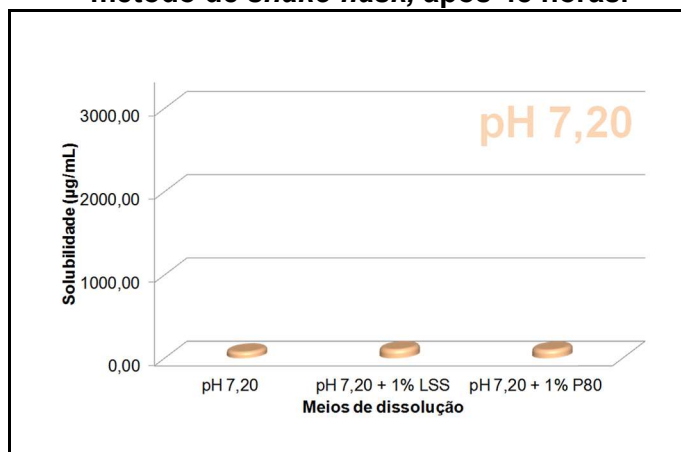
B - Solubilidades em pH 1,20.



C - Solubilidades em pH 4,50.

D - Solubilidades em pH 6,80.

Figura 43 - Solubilidades de arteméter em pH 7,20, com adição de tensoativos, obtidas pelo método de *shake-flask*, após 48 horas.



Os valores de pH dos meios no teste de solubilidade de arteméter estão apresentados na **Tabela 69** e não apresentaram variação significativa durante o estudo.

Tabela 69 - Valores de pH dos meios durante o teste de solubilidade de arteméter.

Condição	pH inicial, antes da adição do fármaco	pH inicial, após a adição do fármaco	pH, após 24 horas	pH, após 48 horas	Δ
pH 1,20	1,21	1,20	1,28	1,25	0,08
pH 1,20 + 1% LSS	1,25	1,27	1,29	1,28	0,04
pH 1,20 + 1% P80	1,17	1,19	1,21	1,20	0,04
pH 4,50	4,47	4,49	4,48	4,48	0,02
pH 4,50 + 1% LSS	4,45	4,46	4,46	4,46	0,01
pH 4,50 + 1% P80	4,48	4,50	4,45	4,45	0,05
pH 6,80	6,85	6,87	6,84	6,84	0,03
pH 6,80 + 1% LSS	6,84	6,84	6,83	6,83	0,01
pH 6,80 + 1% P80	6,85	6,86	6,87	6,86	0,02
pH 7,20	7,22	7,20	7,22	7,22	0,02
pH 7,20 + 1% LSS	7,22	7,24	7,21	7,24	0,03
pH 7,20 + 1% P80	7,23	7,26	7,26	7,25	0,03

Foram avaliadas as diferenças entre os maiores e menores valores obtidos no decorrer de cada estudo. Não houve uma variação significativa dos valores, após a adição dos fármacos.

Alterações significativas de pH podem ser indícios de degradação das substâncias, o que não foi observado neste estudo. O meio foi capaz de manter a capacidade tamponante no período de 48 horas.

6.3.1.2 Solubilidades de lumefantrina - *Experimento (2)*

Após finalização do teste pelo método de *shake-flask*, a solubilidade quantitativa de lumefantrina foi calculada para cada meio de dissolução no tempo de 48 horas (**Tabela 70**). A partir dos valores de solubilidade encontrados e da dose de 120 mg de lumefantrina por comprimido, foi calculada a razão D/S.

Tabela 70 - Solubilidade de lumefantrina nos meios biorrelevantes e relação dose:solubilidade.

Condição	Média da solubilidade (µg/mL) (n = 3)	DPR(%)	Relação dose:solubilidade (mL)
Água	5,30	0,92	22625
Água + 1% LSS	14,38	0,19	8346
Água + 1% P80	5,51	2,84	21779
pH 1,20	0,70	2,70	171010
pH 1,20 + 1% LSS	38,59	2,48	3110
pH 1,2 + 1% P80	184,75	2,99	650
pH 4,50	0,55	3,69	219657
pH 4,50 + 1% LSS	52,41	0,59	2290
pH 4,50 + 1% P80	24,33	1,98	4932
pH 6,80	2,83	0,85	42386
pH 6,80 + 1% LSS	17,66	0,58	6795
pH 6,80 + 1% P80	7,21	0,76	16638
pH 7,20	2,81	0,17	42774
pH 7,20 + 1% LSS	3,07	1,54	39064
pH 7,20 + 1% P80	3,95	0,21	30400

Em todas as condições avaliadas, incluindo aquelas com adição de tensoativo, a dose de lumefantrina não foi solubilizada em 250 mL de meio e não caracteriza *sink conditions*. A solubilidade em água de 5,30 µg/mL foi aumentada com a adição dos tensoativos (**Figuras 44 e 45A**), o que também ocorreu nos meios de pH 4,50 (**Figura 45B**) e pH 6,80 (**Figura 45C**), sendo mais significativa com o tensoativo aniônico. Considerando apenas a solubilidade como parâmetro, a lumefantrina não é caracterizado como altamente solúvel, uma vez que não foram obtidos valores de relação dose solubilidade inferiores a 250 mL em toda faixa de pH fisiológico. Em 2004, LINDERBERG e colaboradores, descreveram a que o fármaco pertence à classe IV (fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade).

A solubilidade da lumefantrina aumentou substancialmente na presença de polissorbato 80, no meio de dissolução com pH 1,20 (**Figura 45**), com o valor de 184,75 µg/mL. Neste pH, a lumefantrina está na forma ionizada, sendo que fármacos em sua forma ionizada são mais solúveis em meios aquosos (SKOOG *et. al.*, 2006), o que justifica o aumento de sua solubilidade. Entretanto, o valor encontrado para a

relação dose:solubilidade apresentou valor superior a 250 mL. Não foi observado diferença significativa nas variações de tensoativo no meio com pH 7,2. (Figura 46).

Figura 44 - Solubilidades de lumefantrina em meios biorrelevantes, obtidas pelo método de *shake-flask* após 48 horas.

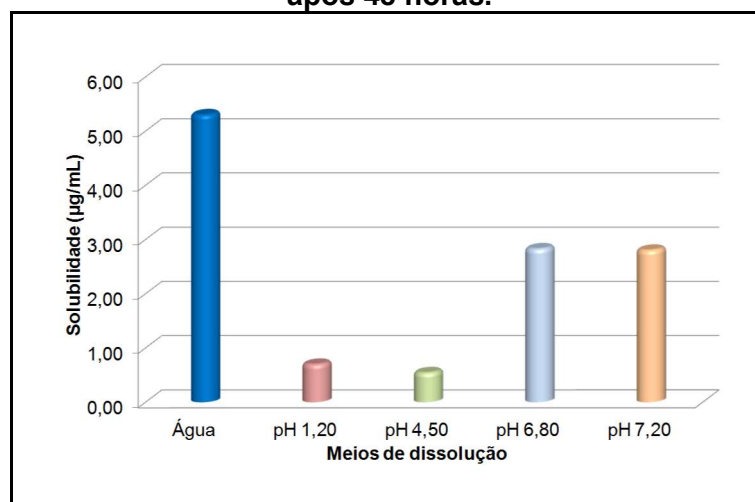
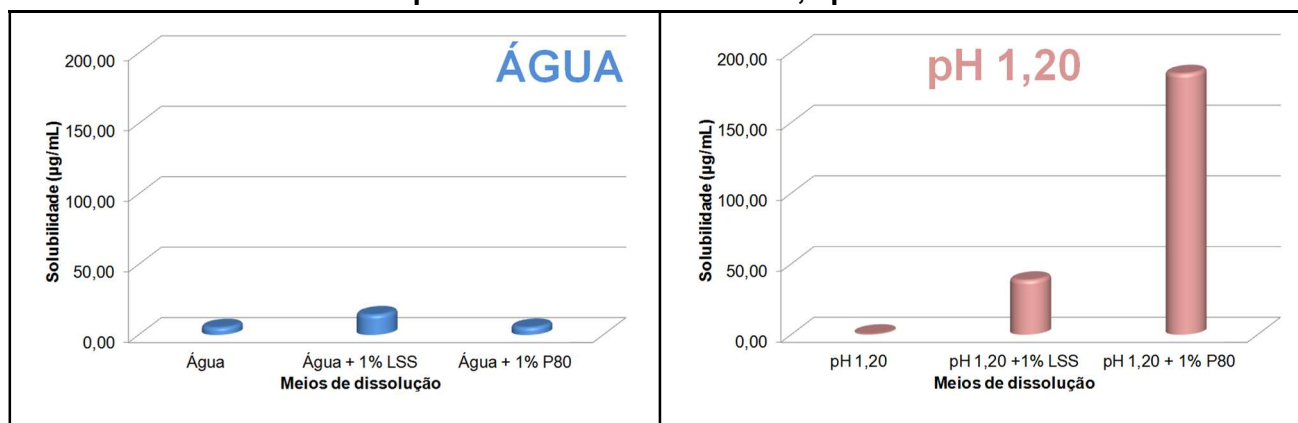
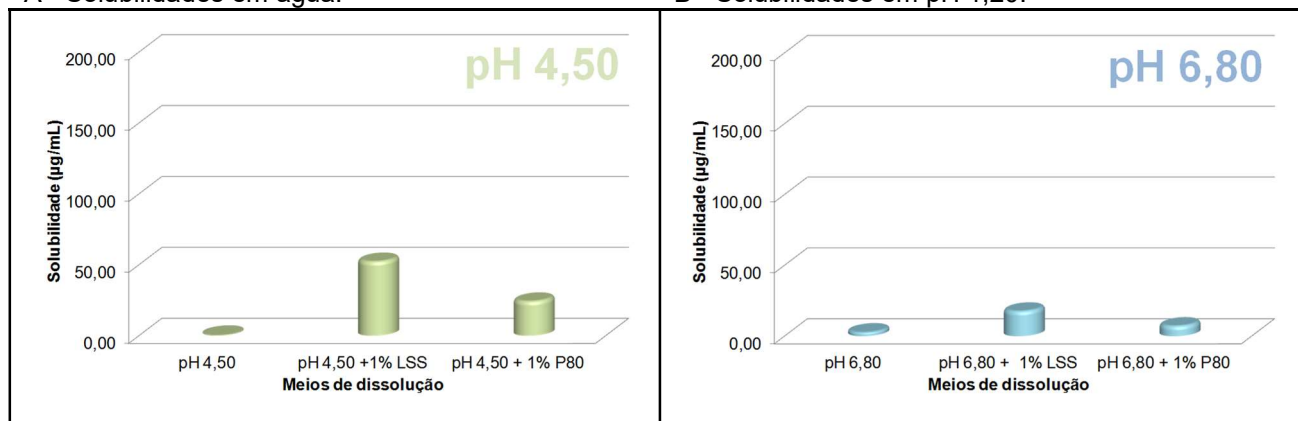


Figura 45 - Solubilidades de lumefantrina em diferentes meios, com adição de tensoativos, obtidas pelo método de *shake-flask*, após 48 horas.



A - Solubilidades em água.

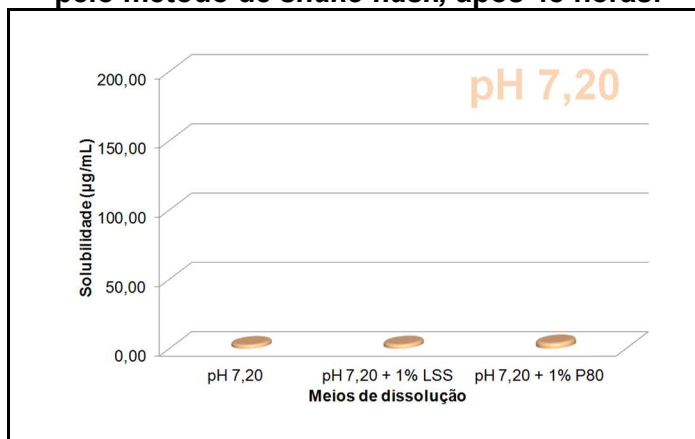
B - Solubilidades em pH 1,20.



C - Solubilidades em pH 4,50.

D - Solubilidades em pH 6,80.

Figura 46 - Solubilidades de lumefantrina em pH 7,20, com adição de tensoativos obtidas pelo método de *shake-flask*, após 48 horas.



Os valores de pH foram elencados na **Tabela 71** e não apresentaram variação significativa durante o estudo.

Tabela 71 - Valores de pH dos meios durante o teste de solubilidade de lumefantrina.

Condição	pH inicial, antes da adição do fármaco	pH inicial, após a adição do fármaco	pH, após 24 horas	pH, após 48 horas	Δ
pH 1,20	1,21	1,20	1,22	1,21	0,02
pH 1,20 + 1% LSS	1,22	1,22	1,21	1,21	0,01
pH 1,20 + 1% P80	1,20	1,21	1,17	1,19	0,04
pH 4,50	4,50	4,50	4,54	4,54	0,04
pH 4,50 + 1% LSS	4,51	4,49	4,47	4,50	0,04
pH 4,50 + 1% P80	4,52	4,51	4,50	4,51	0,02
pH 6,80	6,82	6,80	6,80	6,80	0,02
pH 6,80 + 1% LSS	6,79	6,78	6,74	6,78	0,05
pH 6,80 + 1% P80	6,82	6,81	6,82	6,81	0,01
pH 7,20	7,23	7,21	7,25	7,24	0,04
pH 7,20 + 1% LSS	7,22	7,22	7,24	7,20	0,04
pH 7,20 + 1% P80	7,25	7,23	7,19	7,18	0,07

6.3.1.3 Solubilidades de arteméter e lumefantrina - *Experimento (3)*

Após realização dos testes de solubilidade para arteméter e lumefantrina, concomitantemente, pelo método de *shake-flask*, foram calculadas as solubilidades para cada condição (**Tabela 72**).

Tabela 72 - Solubilidades de arteméter e lumefantrina nos meios biorrelevantes em teste realizado de forma combinada.

Condição	ARTEMÉTER		LUMEFANTRINA	
	Média da solubilidade (µg/mL) (n = 3)	DPR (%)	Média da solubilidade (µg/mL) (n = 3)	DPR (%)
Água	91,74	4,41	6,11	1,34
Água + 1% LSS	94,45	4,26	13,78	0,06
Água + 1% P80	599,16	0,35	6,16	0,91
pH 1,20	104,51	4,40	0,74	3,41
pH 1,20 + 1% LSS	110,23	2,71	39,75	3,18
pH 1,20 + 1% P80	435,74	0,54	180,65	0,51
pH 4,50	75,75	0,31	0,59	3,56
pH 4,50 + 1% LSS	3280,23	1,91	55,56	4,86
pH 4,50 + 1% P80	614,23	1,24	26,47	3,19
pH 6,80	108,12	2,48	2,56	8,84
pH 6,80 + 1% LSS	3272,5	0,55	16,12	1,26
pH 6,80 + 1% P80	653,37	2,51	7,27	2,48
pH 7,20	76,30	2,62	2,54	8,72
pH 7,20 + 1% LSS	106,13	4,12	3,21	1,42
pH 7,20 + 1% P80	101,10	1,33	3,07	4,79

Os valores de pH foram elencados na **Tabela 73** e não apresentaram variação significativa durante o estudo, compatíveis com os valores de pH obtidos nos estudos experimentos realizados individualmente com os fármacos.

Tabela 73 - Valores de pH dos meios durante o teste de solubilidade arteméter e lumefantrina no Experimento (3).

Condição	pH inicial, antes da adição do fármaco	pH inicial, após da adição do fármaco	pH, após 24 horas	pH, após 48 horas	Δ
pH 1,20	1,17	1,16	1,18	1,18	0,02
pH 1,20 + 1% LSS	1,20	1,19	1,21	1,19	0,02
pH 1,20 + 1% P80	1,17	1,21	1,22	1,2	0,05
pH 4,50	4,52	4,56	4,58	4,53	0,06
pH 4,50 + 1% LSS	4,52	4,56	4,56	4,56	0,00
pH 4,50 + 1% P80	4,53	4,56	4,55	4,52	0,04
pH 6,80	6,81	6,83	6,80	6,81	0,03
pH 6,80 + 1% LSS	6,81	6,83	6,80	6,81	0,03
pH 6,80 + 1% P80	6,83	6,83	6,80	6,81	0,03
pH 7,20	7,22	7,25	7,19	7,21	0,06
pH 7,2 + 1% LSS	7,23	7,25	7,19	7,21	0,06
pH 7,20 + 1% P80	7,25	7,25	7,21	7,19	0,06

Os resultados obtidos para os três maiores valores de solubilidade encontrados para cada fármaco foram submetidos à avaliação estatística, comparando-se os valores individuais obtidos para o fármaco analisado individualmente (*Experimentos (1) e (2)*) e em conjunto (*Experimento (3)*). Foi aplicado teste *t* de *Student* ($\alpha = 0,05$, G.L = 4) e estabelecida como hipótese nula (H_0), que não há diferença significativa entre os resultados e como hipótese alternativa (H_a) que há diferença significativa entre os resultados.

Para arteméter, foram avaliados os resultados de solubilidade obtidos a partir dos *Experimentos(1) e (3)* nos meios pH 4,50 + 1% LSS, pH 6,80 + 1% P80 (**Tabela 74**) e pH 6,80 + 1% LSS. Para lumefantrina, foram comparados os resultados obtidos

nos *Experimentos* (2) e (3) em pH 1,20 + 1% LSS, pH 1,20 + 1% P80 e pH 4,50 + 1% LSS (Tabela 75).

Tabela 74 - Avaliação da diferença das médias de solubilidade por teste *t* de Student para os meios que apresentaram maior solubilidade para arteméter.

Parâmetro	pH 4,50 + 1% LSS		pH 6,80 + 1% LSS		pH 6,80 + 1% P80	
	Individual	Em conjunto	Individual	Em conjunto	Individual	Em conjunto
Média	3230,4400	3280,2295	3067,6667	3272,5011	659,8924	653,3731
Variância	6666,0374	3921,6433	3446,3333	321,8054	177,2646	269,2696
<i>t</i> calculado	-0,83810403		-5,7796		0,5344	
<i>t</i> tabelado	2,7764					

Para os testes realizados com o arteméter, foi observado que não há diferença significativa nos resultados de solubilidade nos meios pH 4,50 + 1% LSS e pH 6,80 + 1% P80, ou seja a solubilidade do arteméter não é alterada quanto há lumefantrina presente no meio.

Já para o pH 6,80 + 1% LSS, apesar dos valores nominais estarem próximos, nos valores do teste *t* de Student calculados estão superiores ao tabelado, rejeitando a hipótese nula de que não há diferença significativa entre os resultados.

Tabela 75 - Avaliação da diferença das médias de solubilidade por teste *t* de Student para os meios que apresentaram maior solubilidade para lumefantrina.

Parâmetro	pH 1,20 + 1% LSS		pH 1,20 + 1% P80		pH 4,50 + 1% LSS	
	Individual	Em conjunto	Individual	Em conjunto	Individual	Em conjunto
Média	38,5871	39,7455	184,7541	180,6467	52,4056	55,5605
Variância	0,9132	1,6007	30,6083	0,8558	0,0948	7,2841
<i>t</i> calculado	-1,2654		1,2683		-2,0116	
<i>t</i> tabelado	2,7764					

Para lumefantrina, os valores de *t* calculado foram inferiores ao *t* crítico de 2,7764 ($\alpha = 0,05$, G.L.= 4), sendo comprovado que não há diferença significativa nos resultados de solubilidade para lumefantrina realizados nos *Experimentos* (2) e (3).

Assim, foi comprovado que a presença do arteméter não afeta a solubilidade da lumefantrina nos meios de pH 1,20 + 1% LSS, pH 1,20 + 1% P80 e pH 4,50 + 1% LSS por um período de 48 horas.

Em 2011, foram realizados estudos de solubilidade para arteméter e lumefantrina por UMAPATHI e colaboradores. Para o arteméter, o maior valor de solubilidade reportado, de 4107 $\mu\text{g/mL}$, foi em ácido clorídrico 0,1 M com 1% de laurilsulfato de

sódio, discrepante do valor de 99,72 µg/mL obtido no presente estudo no meio pH 1,20 + 1% de laurilsulfato de sódio.

No meio que apresentou maior valor de solubilidade (pH 4,50 + 1% LSS), equivalente a 3230,44 µg/mL, não houve uma variação significativa entre os resultados obtidos no presente estudo e naquele realizado por UMAPATHI e colaboradores (2011).

Nos estudos de solubilidade individuais de lumefantrina, para os valores de solubilidade mais elevados que foram reportados (UMAPATHI *et. al*, 2011), utilizou-se HCl 0,1 M, contendo 1% (p/v) de estearato de polioxil-40 e HCl 0,1 M com 1% de polissorbato 80. Este valor foi discrepante do resultado obtido no presente estudo, com valor nominal de 184,75 µg/mL.

Acredita-se que esta variação possa estar relacionada ao método de solubilização (banho ultrassônico por 2 horas em contraposição ao *shake-flask*) e duração do estudo adotados pelos pesquisadores indianos, bem como as características relacionadas ao fármaco, tais como tamanho de partícula e polimorfismo (STORPIRTIS, 2009).

6.3.2 Estudos de dissolução

6.3.2.1 Perfis de dissolução de arteméter

As **Figuras 47 e 48** apresentam os perfis de dissolução para o arteméter a partir de comprimidos do biolote de Coartem[®] nos diferentes meios de dissolução com variação do sistema de agitação.

Figura 47 - Perfis de dissolução de arteméter, aparelhagem pás, 50 rpm e 900 mL de meio de dissolução.

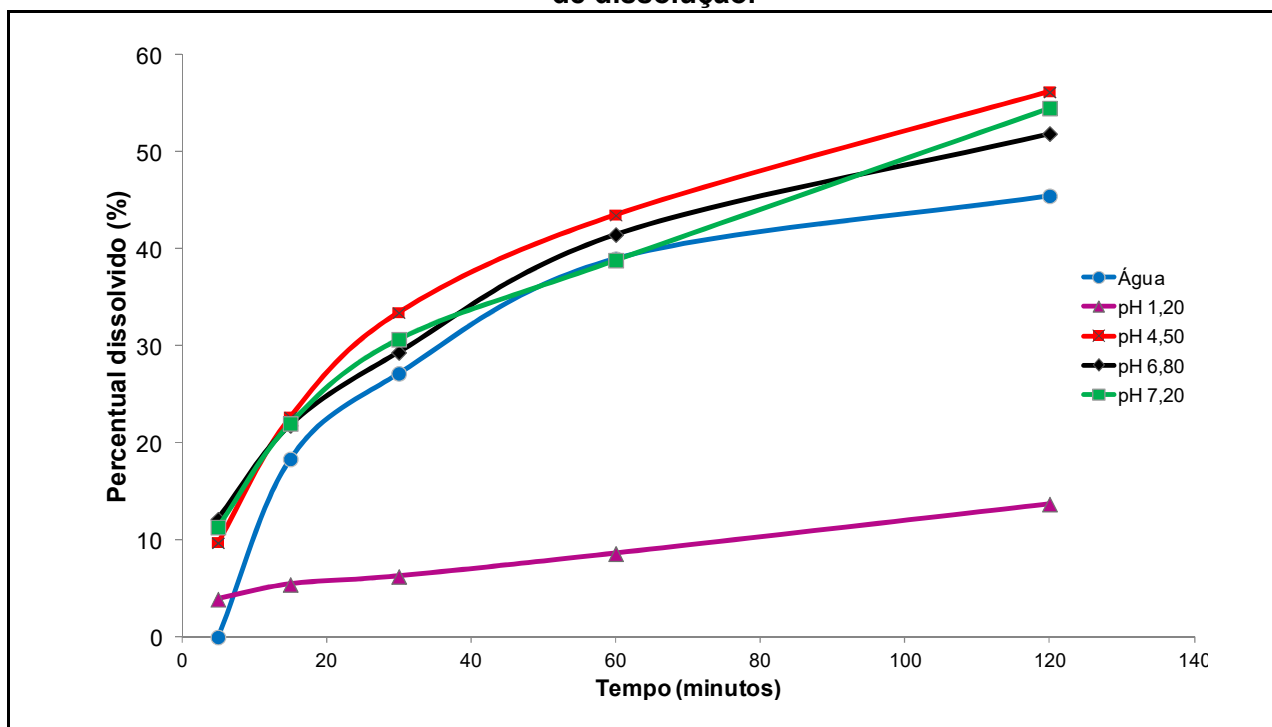
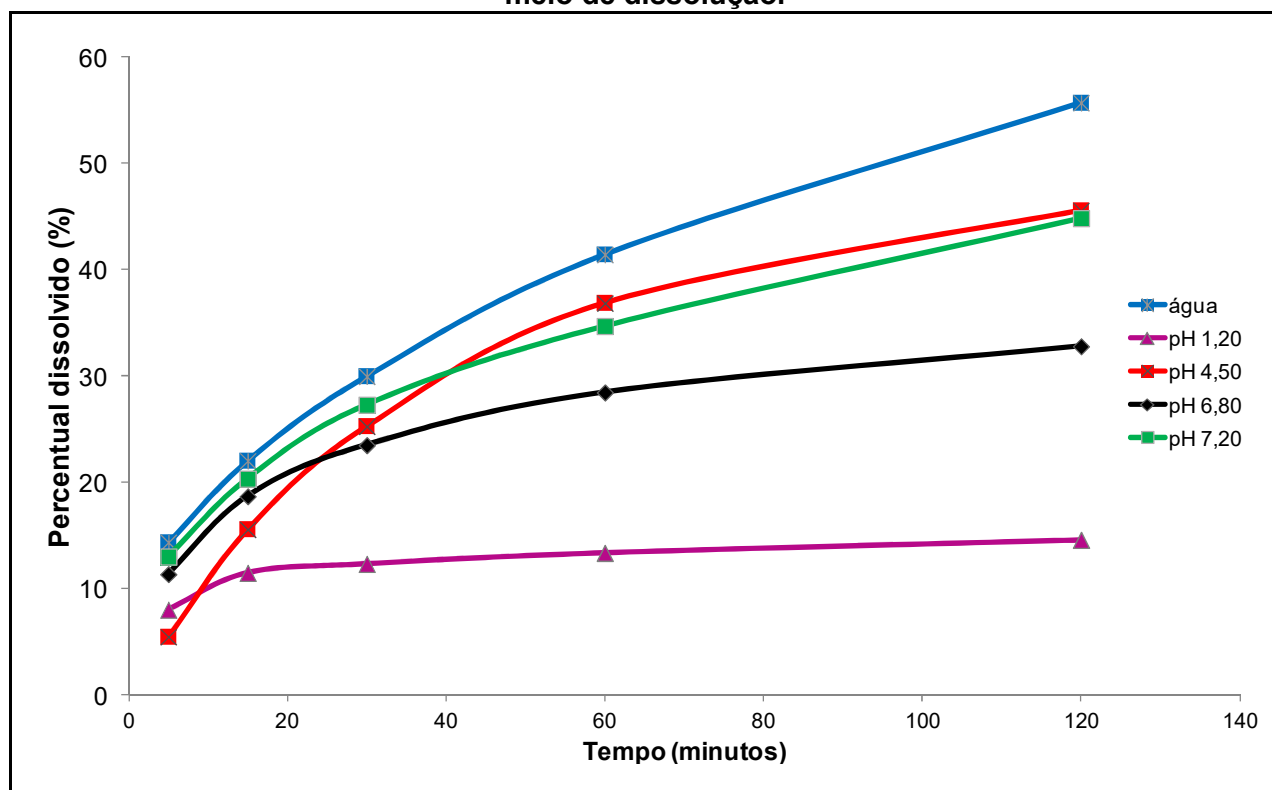


Figura 48 - Perfis de dissolução de arteméter, aparelhagem cestas, 100 rpm e 900 mL de meio de dissolução.

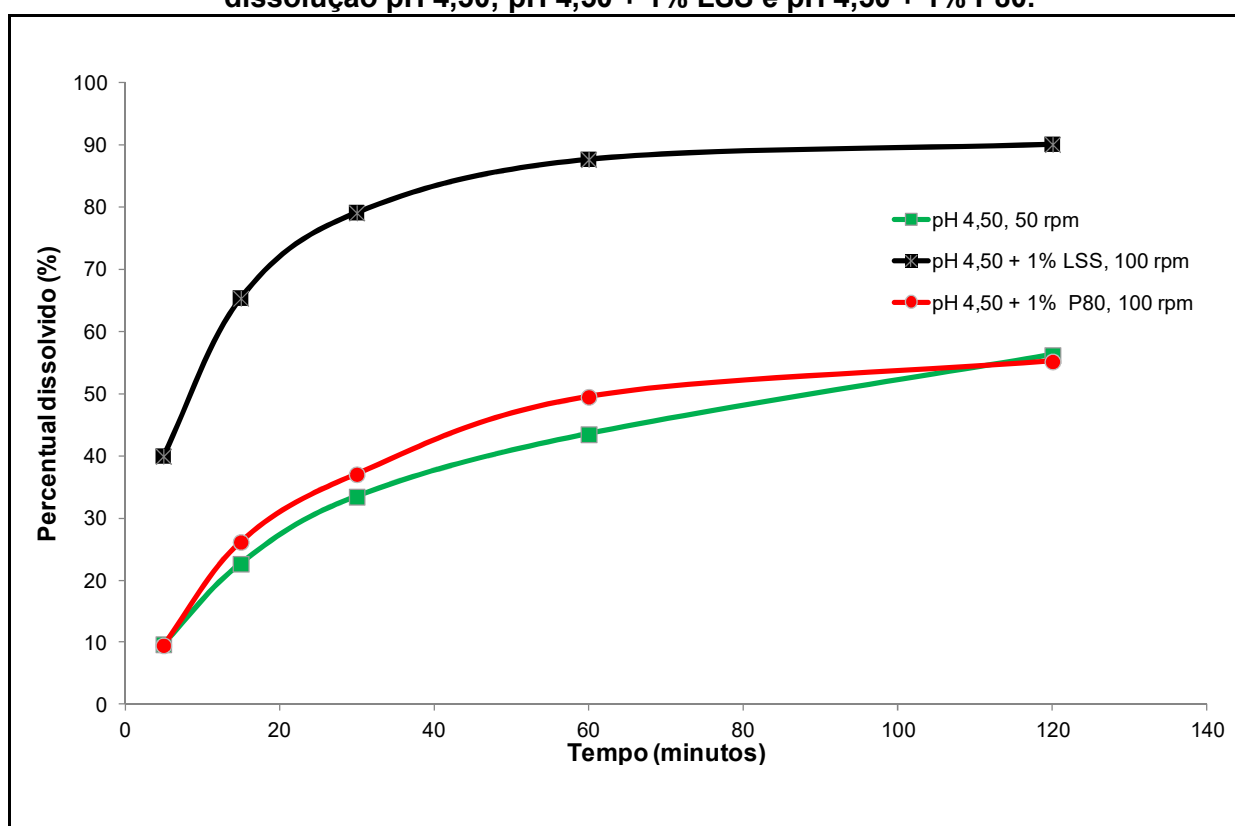


A porcentagem máxima de arteméter dissolvida em 120 minutos de teste, foi de aproximadamente 60% em ambas condições. No meio pH 1,20, o arteméter apresentou os menores valores de dissolução. Durante o experimento com a aparelhagem cestas, em 100 rpm, foi possível notar que parte dos comprimidos ficou retida em seu interior, e, conseqüentemente, não ocorreu a contato adequado dos fármacos com o meio de dissolução. Nos experimentos utilizando pás a 50 rpm, houve um aumento do percentual de fármaco dissolvido para todas as condições, quanto comparado a aparelhagem cestas, entretanto, a porcentagem de cedência não ultrapassou o valor de 60%. Foi observado durante a agitação que os comprimidos desagregavam-se rapidamente e depositavam no fundo da cuba de dissolução. A velocidade de 50 rpm não foi suficiente para manter a forma farmacêutica em contato com o meio de dissolução, de forma homogênea. Considerando-se o valor de solubilidade 75,7 µg/mL encontrado para o meio de pH 4,50, e considerando-se que são utilizados em 900 mL do meio de dissolução, seria possível a dissolução de, aproximadamente, 68 mg de arteméter, ou seja, uma quantidade 3,4 vezes superior à dose do fármaco contida no comprimido. Esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que a determinação da solubilidade em equilíbrio utiliza apenas o insumo farmacêutico em um período de 48 horas, e no teste de dissolução, são submetidos ao ensaio os comprimidos. Esta fonte de variação pode ser relacionada à composição qualitativa e quantitativa da forma farmacêutica e ao processo de fabricação, que são determinantes para os mecanismos de liberação do fármaco.

Em decorrência da formação de um aglomerado em formato de cone no fundo da cuba, nos testes realizados com pá a 50 rpm, foi realizado estudo de avaliação visual do comportamento dos comprimidos utilizando as velocidades de 75 rpm e 100 rpm. Foi identificada a formação dos aglomerados, entretanto, em menor extensão para a velocidade de 100 rpm. A partir desta observação, foram padronizadas as condições do método de dissolução com aparelhagem pás na velocidade de 100 rpm. As porcentagens médias dissolvidas *versus* tempo de arteméter nos comprimidos de Coartem® nos meios de dissolução com 1% de tensoativo estão representadas na **Figura 49**.

A adição de 1% de laurilsulfato de sódio no meio de dissolução de pH 4,50 aumentou substancialmente a solubilização do arteméter em apenas 20 minutos de teste. O mesmo não foi observado quando se adicionou polissorbato 80. A solubilidade do arteméter em meio pH 4,50 com adição de 1% de LSS foi superior a 3 mg/mL, apresentando relação D/S equivalente a 6, o que significa que seriam suficientes apenas 6 mL para solubilizar 20 mg de arteméter, atendendo *sink conditions*.

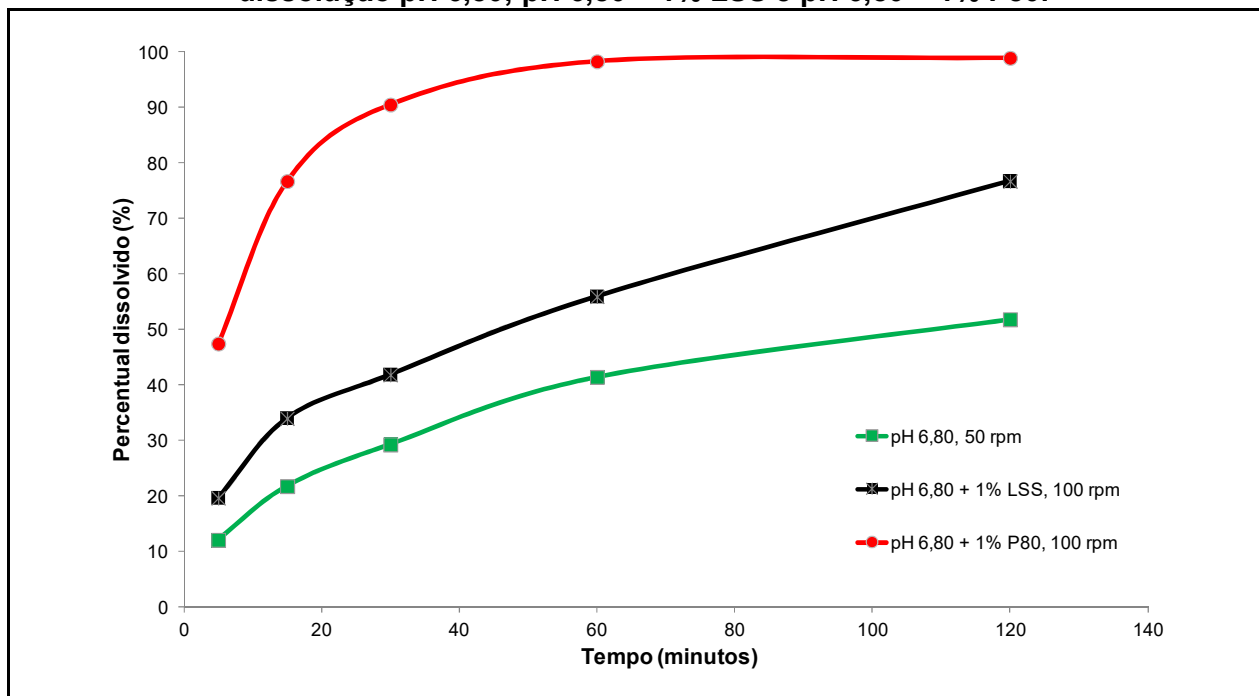
Figura 49 - Perfis de dissolução de arteméter, aparelhagem pás, nos meios de dissolução pH 4,50; pH 4,50 + 1% LSS e pH 4,50 + 1% P80.



As porcentagens médias dissolvidas *versus* tempo de arteméter a partir dos comprimidos de Coartem® após a inclusão de 1% de tensoativo nos meios de dissolução de pH 6,80 estão representadas na **Figura 50**.

Ocorreu um aumento significativo da dissolução do arteméter na presença de polissorbato 80. Nesta condição, 80% do fármaco foram dissolvidos em 15 minutos do teste. Com 1% de laurilsulfato de sódio, houve uma aumento significativo da dissolução do arteméter, após 90 minutos de teste.

Figura 50 - Perfis de dissolução de arteméter, aparelhagem pás, nos meios de dissolução pH 6,80; pH 6,80 + 1% LSS e pH 6,80 + 1% P80.



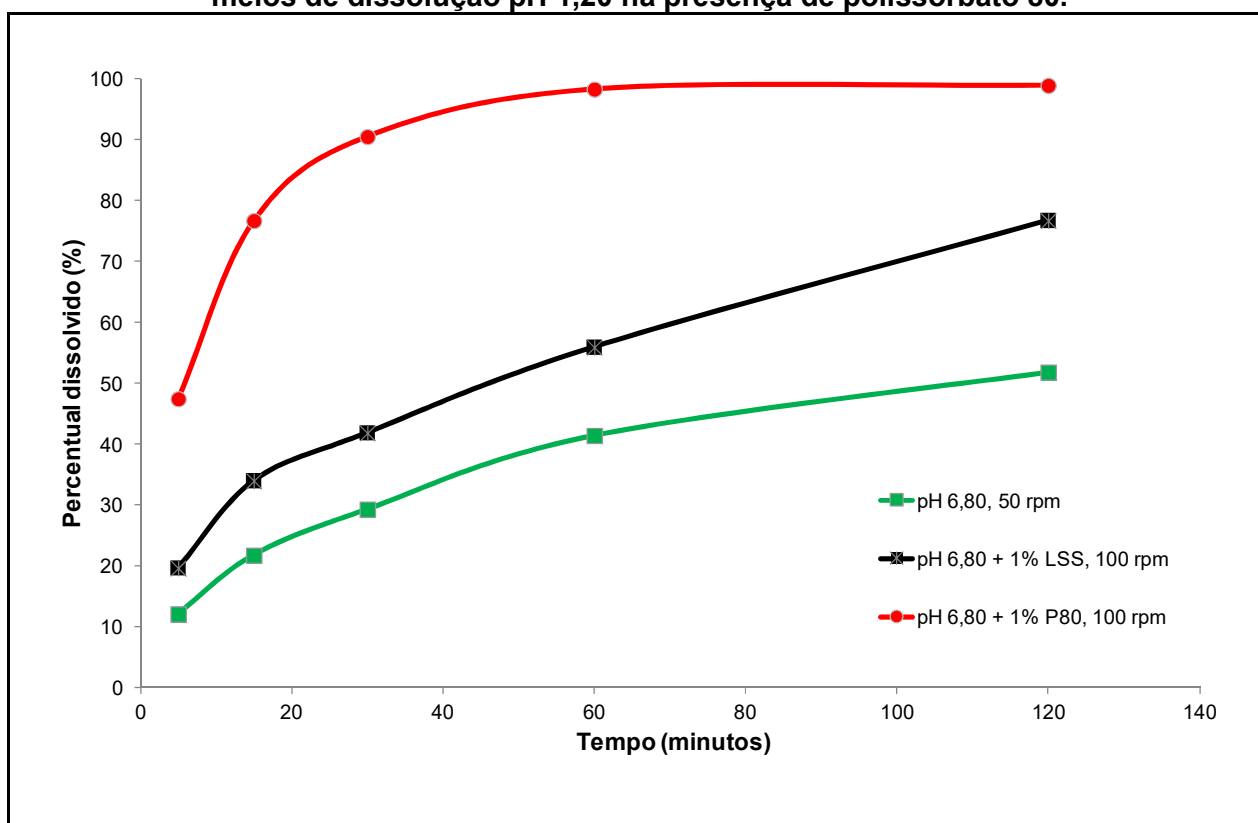
6.3.2.2 Perfis de dissolução de lumefantrina

Foram realizados os perfis dos comprimidos de dose fixa combinada e verificou-se que a lumefantrina não dissolveu nos meios de dissolução sem tensoativo. Já os testes de dissolução realizados com adição de tensoativos, apresentaram percentuais de cedência inferiores a 10%, com exceção do meio pH 1,20 com 1% de polissorbato 80. As porcentagens médias de cedência de lumefantrina *versus* tempo estão representadas na **Figura 51**. Nos testes de solubilidade, a lumefantrina não apresentou dados de relação dose: solubilidade inferiores a 250 mL. O maior valor de solubilidade encontrado foi em pH 1,20 com adição de 1% de polissorbato, equivalente a 180,65 µg/mL. Considerando-se o volume de 900 mL no meio de dissolução, a quantidade a ser solubilizada de lumefantrina seria, teoricamente, de 162,6 mg, superior a quantidade de lumefantrina contida no comprimido (120 mg). Desta forma, o volume seria suficiente para dissolver todo o fármaco, apesar de não apresentar *sink condition*. Entretanto, foi necessário realizar a avaliação do efeito da diminuição da concentração de tensoativo no meio de dissolução, para garantir que

a concentração selecionada seja a menor possível, para que o método desenvolvido seja discriminativo (ANVISA, 2010; FDA, 1997a).

Com aumento da concentração de tensoativo de 0,25% para 0,50%, e de 0,50% para 1,00%, nota-se um aumento da dissolução a partir de 40 minutos e essa proporção foi mantida até o tempo de coleta de 180 minutos. Em 60 minutos de teste, o perfil de lumefantrina já atinge um platô, superior a 80% de dissolução de lumefantrina.

Figura 51 - Perfis de dissolução de lumefantrina, aparelhagem pás, a 100 rpm, nos meios de dissolução pH 1,20 na presença de polissorbato 80.



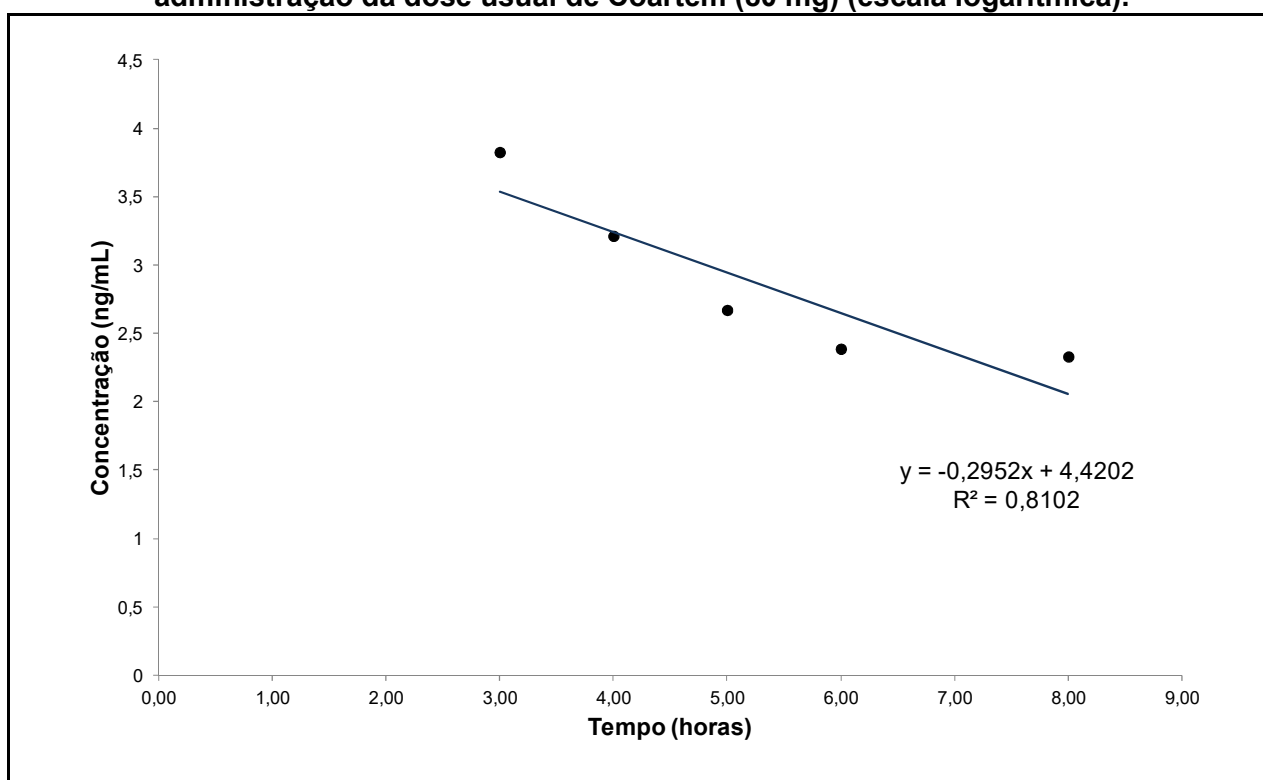
As características das curvas obtidas para arteméter e lumefantrina demonstraram que os fármacos não estão sujeitos a bioisenção, tendo em vista que não foi obtida rápida dissolução dos fármacos a partir dos comprimidos de Coartem[®], em todas as condições testadas na faixa de pH fisiológico na ausência de tensoativos (ANVISA, 2011).

Não estão disponíveis métodos de dissolução para arteméter e lumefantrina comprimidos nos compêndios nacionalmente reconhecidos pela RDC 37/2009, que trata da admissibilidade de farmacopeias estrangeiras no país.

6.3.3 Correlação *in vitro- in vivo*

A disposição cinética do arteméter após administração em dose única de 4 comprimidos de Coartem[®] está representada na **Figura 52**. Ao se correlacionar as concentrações plasmáticas em função do tempo, obtém-se uma curva com o formato típico de modelo monocompartimental, coerente com a avaliação farmacocinética realizada por WHITE e colaboradores em 1999.

Figura 52 - Decaimento das concentrações plasmáticas de arteméter após a administração da dose usual de Coartem (80 mg) (escala logarítmica).

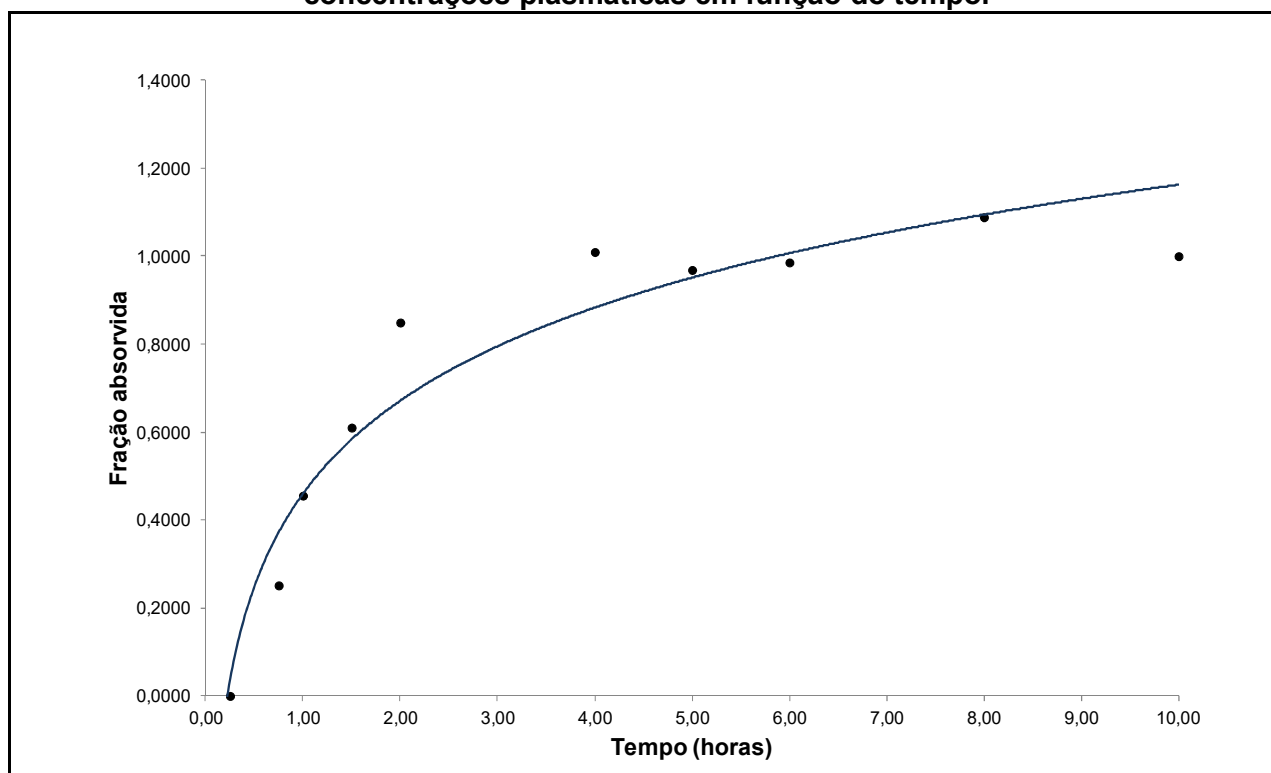


As frações absorvidas em função do tempo de arteméter após administração em jejum foram obtidas por deconvolução dos valores de concentração plasmáticas, aplicando-se o modelo de Wagner-Nelson (**Tabela 75 e Figura 53**).

Tabela 75 - Frações absorvidas de arteméter, obtidas por deconvolução das concentrações plasmáticas.

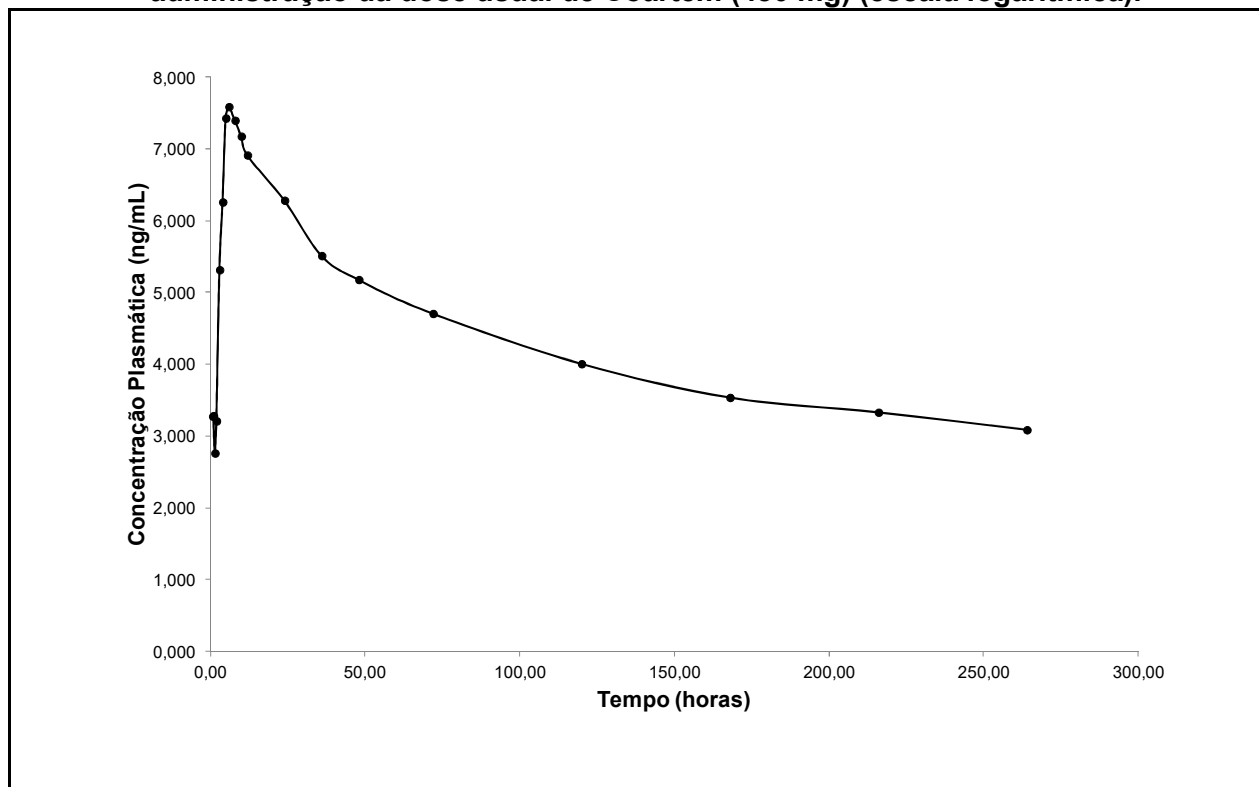
Cp média (ng/mL)	t (h)	F (t)
0,000	0,00	0,000
0,000	0,25	0,0000
16,221	0,50	0,2358
15,821	0,75	0,2513
28,435	1,00	0,4555
33,694	1,50	0,6101
43,600	2,00	0,8492
45,831	3,00	1,1152
24,839	4,00	1,0096
14,454	5,00	0,9687
10,886	6,00	0,9858
10,283	8,00	1,0887
0,000	10,00	1,0000

Figura 53 - Frações absorvidas de arteméter obtidas por deconvolução das concentrações plasmáticas em função do tempo.



A disposição cinética de lumefantrina após administração em dose única de 4 comprimidos de Coartem[®] está representada na **Figura 54**. Ao se correlacionar as concentrações plasmáticas obtidos nos estudos realizados por CÉSAR e colaboradores em 2009 em função do tempo, obtém-se uma curva com o formato típico de modelo bicompartimental, coerente com a avaliação farmacocinética reportada por WHITE e colaboradores em 1999.

Figura 54 - Decaimento das concentrações plasmáticas de lumefantrina após a administração da dose usual de Coartem (480 mg) (escala logarítmica).



O valor de α (constante de velocidade de distribuição) foi estimado matematicamente, com resultado de 0,206, calculado a partir dos valores dos parâmetros farmacocinéticos descritos por WHITE e colaboradores (1999) e CÉSAR e colaboradores (2009) (**Tabela 76**).

Tabela 76 - Parâmetros farmacocinéticos de lumefantrina.

Parâmetro	Estimado
k_a (h^{-1})	0,17 ¹
$T_{máx}$	5,80 ²
β (h^{-1})	0,0094 ¹
k_{21} (h^{-1})	0,015 ¹
K_{el} (h^{-1})	0,01 ²

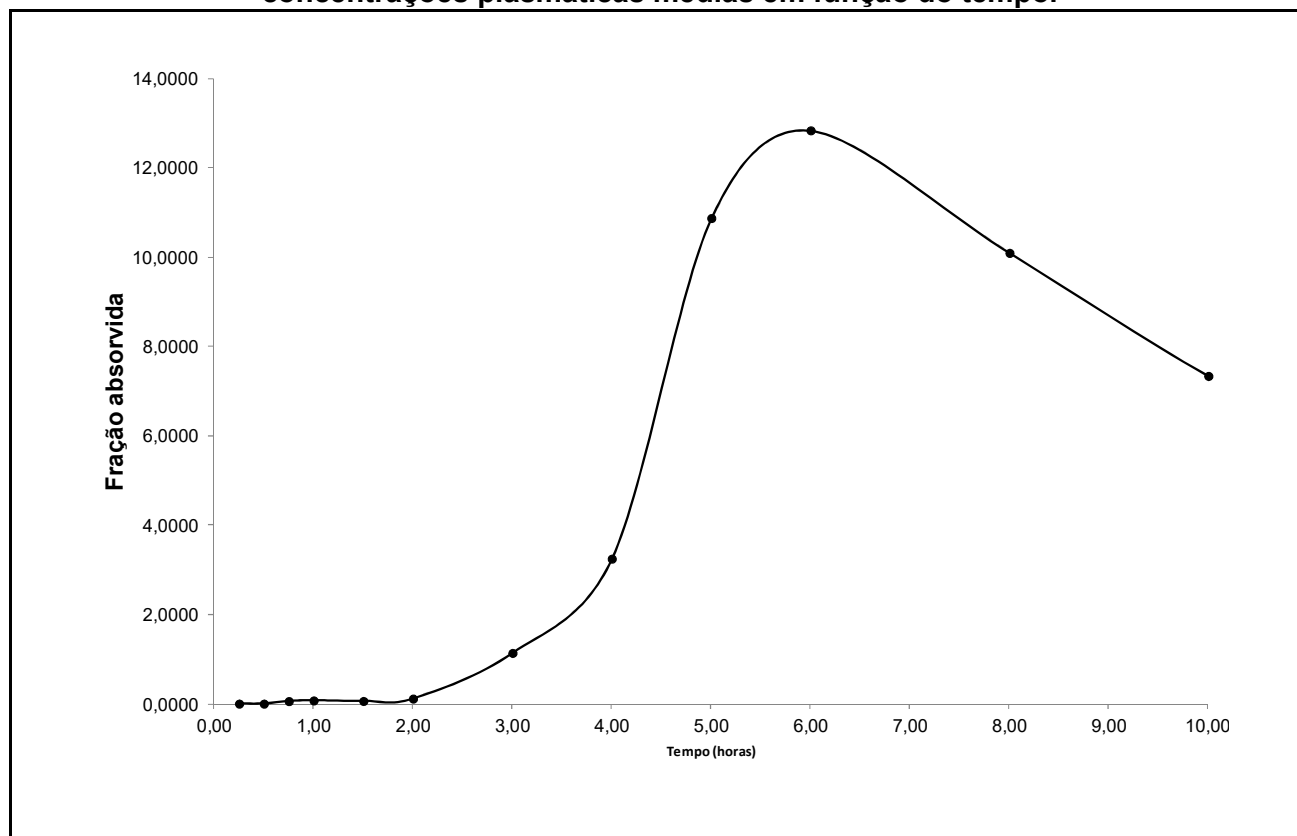
Fonte: adaptado de WHITE, 1999¹ e CESAR et. al. 2009².

As frações absorvidas em função do tempo de lumefantrina após administração em jejum foram obtidas por deconvolução dos valores de concentração plasmáticas, aplicando-se o modelo de Wagner-Nelson (**Tabela 77** e **Figura 55**), adaptado para modelos bicompartimentais (NELSON, 1974).

Tabela 77 - Frações absorvidas de lumefantrina obtidas por deconvolução das concentrações plasmáticas.

Cp média (ng/mL)	t (h)	F (t)
0,000	0,00	0,0000
0,000	0,25	0,0000
0,000	0,50	0,0000
26,435	0,75	0,0555
26,649	1,00	0,0714
15,837	1,50	0,0583
24,788	2,00	0,1109
203,648	3,00	1,1340
523,806	4,00	3,2435
1686,187	5,00	10,8688
1977,149	6,00	12,8328
1634,232	8,00	10,0904
1310,024	10,00	7,3335
1006,883	12,00	5,0440
536,197	24,00	1,6090
247,917	36,00	1,0988
177,489	48,00	1,0433
110,688	72,00	1,0181
54,971	120,00	1,0051
34,354	168,00	1,0021
27,972	216,00	1,0014
21,900	264,00	1,0011

Figura 55 - Frações absorvidas de lumefantrina obtidas por deconvolução das concentrações plasmáticas médias em função do tempo.



As correlações *in vitro-in vivo* foram realizadas para o arteméter utilizando as frações dissolvidas em todos os perfis de dissolução obtidos e sendo calculados os respectivos coeficientes de determinação, utilizando-se Microsoft Excel® (**Tabela 78**).

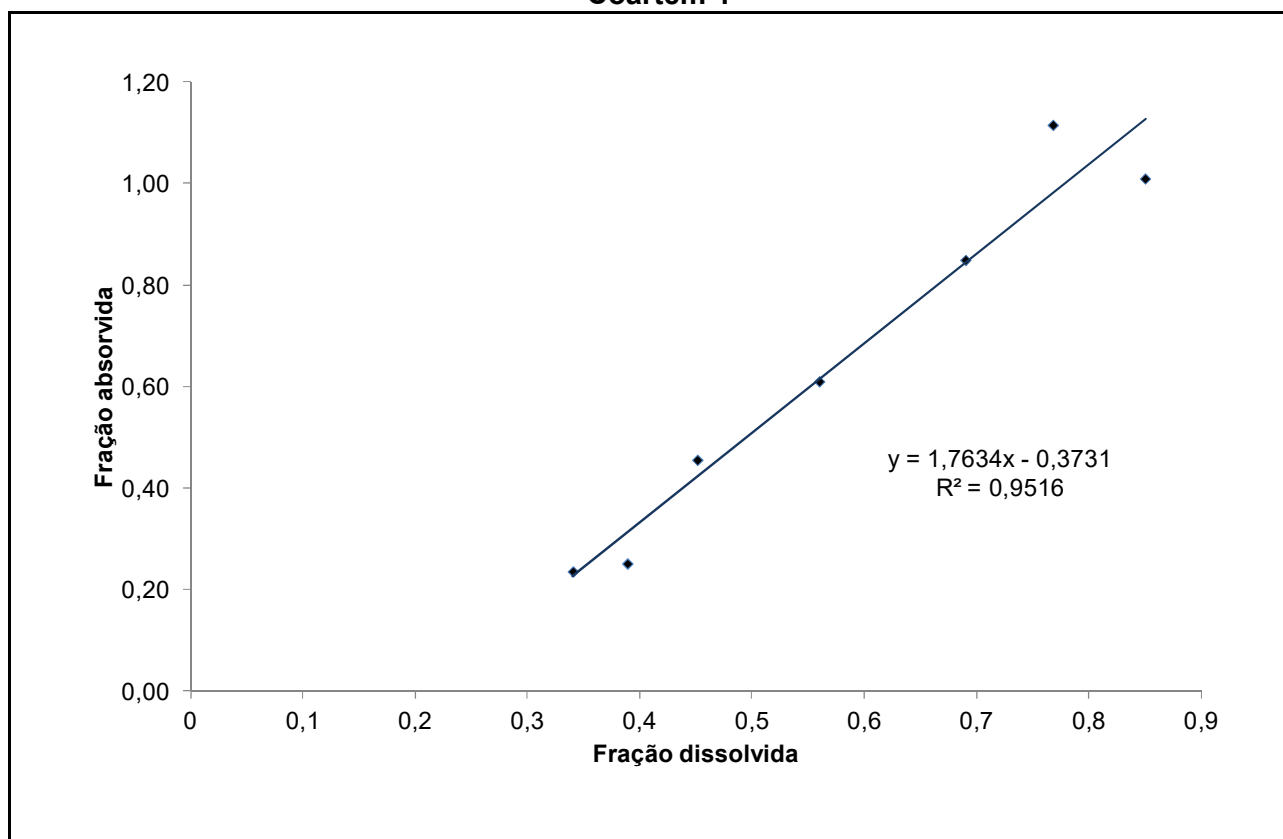
Tabela 78 - Avaliação da relação *in vitro-in vivo*, para arteméter.

Meio de dissolução	Coefficiente de determinação
Água + 1% LSS	0,7236
Água + 1% P80	0,7488
pH 1,20 + 1% LSS	0,7784
pH 1,20 + 1% P80	0,8892
pH 4,50 + 1% LSS	0,6736
pH 4,50 + 1% P80	0,7628
pH 6,80 + 1% P80	0,5453
pH 6,80 + 1% LSS	0,9516
pH 6,80 + 0,50% LSS	0,7657
pH 6,80 + 0,25% LSS	0,7905

A curva de correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) para arteméter está representada na **Figura 56**. A fração absorvida foi obtida por deconvolução da concentração plasmática média de arteméter (n=6) *versus* tempo *in vivo* e, a fração dissolvida, dos perfis de dissolução (n=12) *in vitro* em pH 6,80 contendo 1% de laurilsulfato de sódio. Foi aplicado deslocamento de 30 minutos para a fração absorvida, considerando-se o tempo para início da absorção do fármaco e inerente à mobilidade do trato gastrointestinal. O coeficiente de determinação calculado foi de 0,9512, próximo a valor desejável de 1,00 (THE UNITED, 2016), caracterizando a correlação *in vitro-in vivo* nível A para o arteméter.

Sendo o arteméter um fármaco que apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade (SCB - Classe II) (LINDENBER *et. al.*, 2004), a velocidade de absorção é superior à velocidade de dissolução, e conseqüentemente, a dissolução do fármaco controla o seu processo de absorção (EMAMI, 2006). Nesta perspectiva, é esperada a correlação *in vitro-in vivo* para fármacos dessa classe biofarmacêutica, resultados coerente com o obtido no presente estudo para o arteméter em comprimidos de Coartem®.

Figura 56 - Correlação *in vitro-in vivo* nível A, para arteméter em comprimidos de Coartem®.



As correlações *in vitro-in vivo* foram realizadas para a lumefantrina (**Tabela 79**), em que as frações dissolvidas foram obtidas pelos perfis de dissolução em pH 1,20 com adição de polissorbato 80, nas concentrações crescentes de 0,25, 0,50 e 1%.

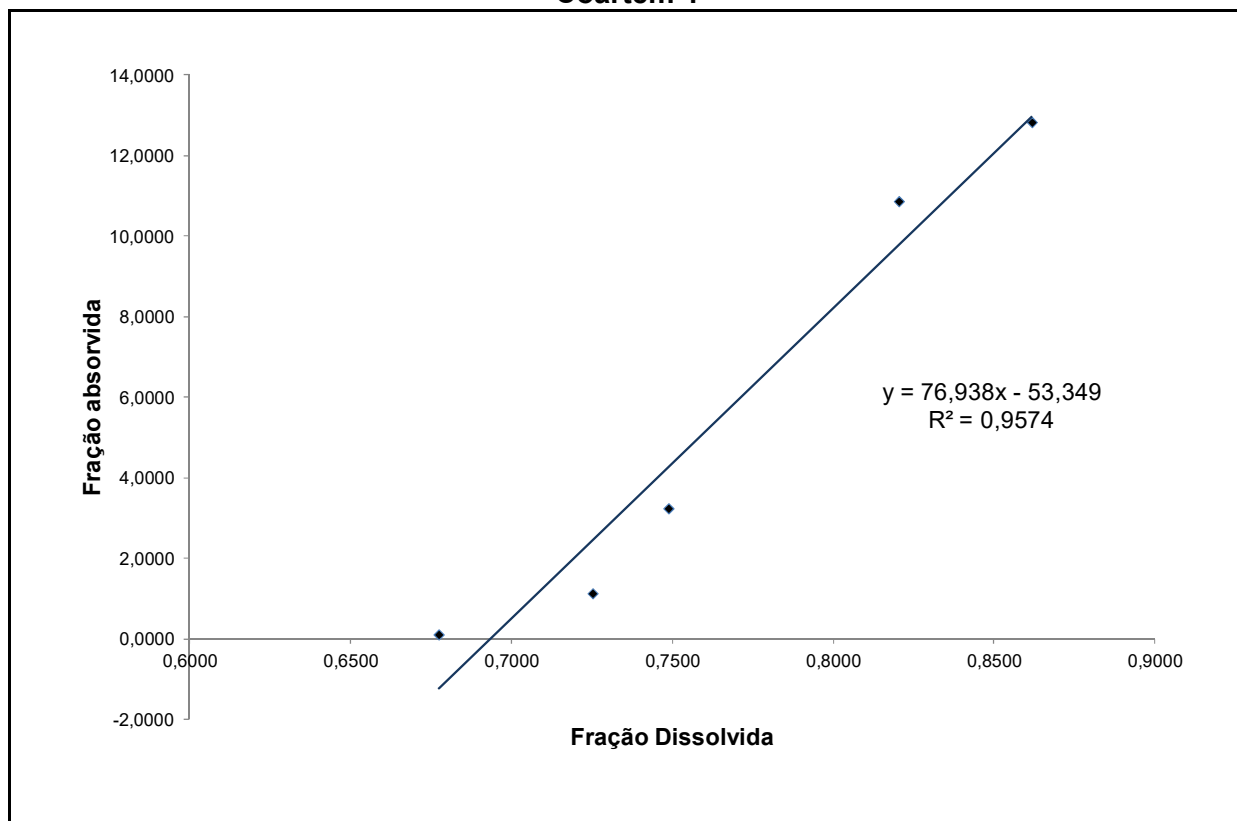
Tabela 79 - Avaliação da relação *in vitro-in vivo*, para lumefantrina.

Meio de dissolução	Coefficiente de determinação
pH 1,20 + 1% P80	0,9574
pH 1,20 + 0,50% P80	0,7178
pH 1,20 + 0,25 % P80	0,6412

A curva de correlação *in vitro-in vivo* para lumefantrina está representada na **Figura 57**. A fração absorvida foi obtida por deconvolução dos valores da concentração plasmática média (n=6) *versus* tempo *in vivo* e, a fração dissolvida, diretamente dos perfis de dissolução (n=12) *in vitro* em meio de dissolução pH 1,20 contendo 1% de polissorbato 80. A curva foi obtida com um deslocamento de duas horas, tempo de latência da lumefantrina descrito previamente na literatura (WHITE *et al.*, 1999). O

valor obtido de coeficiente de determinação foi de 0,9574, próximo ao valor esperado para correlação de nível A (THE UNITED, 2016).

Figura 57 - Correlação *in vitro-in vivo* nível A para lumefantrina em comprimidos de Coartem®.



A lumefantrina é um fármaco que apresenta baixa solubilidade e baixa permeabilidade (classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica) (LINDENBER *et. al.*, 2004), apresentando problemas significativos para liberação oral efetiva e, neste contexto, a correlação *in vitro-in vivo* dificilmente ocorre. As relações dose:solubilidade obtidas nos testes de solubilidade em equilíbrio na faixa de pH fisiológico são superiores a 250, sendo, desta forma, um fármaco de baixa solubilidade e os valores de permeabilidades não se encontram disponíveis em literatura científica. O conhecimento da permeabilidade da lumefantrina é fundamental para conclusão assertiva dos estudos para classificação biofarmacêutica para o fármaco e estabelecimento da CIVIV. O modelo matemático adequado para obter a fração absorvida do fármaco de modelos farmacocinéticos bicompartimentais é o desenvolvido por Loo-Riegelmann, no qual é necessária administração endovenosa e oral do fármaco em um mesmo indivíduo para obtenção das concentrações plasmáticas (EMANI, 2006; STORPIRTIS, 2011). Os

tratamentos matemáticos realizados neste estudo, utilizando dados farmacocinéticos de estudos distintos para o cálculo das microconstantes, podem ter gerado um resultado satisfatório, mas que requerem estudos confirmatórios adicionais para validar a correlação e estudos farmacocinéticos para modelos bicompartimentais mais amplos em um mesmo grupo de indivíduos.

6.4 Conclusões

- Os estudos de solubilidade em equilíbrio realizados para o arteméter e para a lumefantrina demonstraram que os fármacos são pouco solúveis, segundo critérios do sistema de classificação biofarmacêutica e permitiram a seleção de meios para realização dos perfis de dissolução.
- Os estudos de dissolução realizados para os fármacos permitiram o cálculo da fração dissolvida para os estudos de correlação *in vitro-in vivo*.
- Os estudos *in vivo* demonstraram que arteméter e a lumefantrina apresentam modelo monocompartimental e bicompartimental, respectivamente, e as frações absorvidas foram obtidas por deconvolução por modelos matemáticos adequados.
- A construção da correlação *in vitro-in vivo*, utilizando os dados de dissolução em meio de pH 6,80 + 1% de laurilsulfato de sódio e dados da fração absorvida dos estudos *in vivo*, permitiram caracterizar um comportamento linear de nível A, para o arteméter.
- Foi obtida correlação linear entre a fração absorvida e a fração dissolvida de lumefantrina em comprimidos de Coartem® em pH 1,20 + 1% de polissorbato 80, aparelhagem pás, velocidade de agitação de 100 rpm e volume do meio de dissolução de 900 mL.

7 CONCLUSÕES FINAIS

Foram realizadas as caracterizações dos insumos farmacêuticos ativos arteméter e lumefantrina para utilização nos estudos.

Os estudos de solubilidade em equilíbrio dos fármacos em faixa de pH fisiológica permitiram classificar o arteméter e a lumefantrina como fármacos de baixa solubilidade segundo os critérios do sistema de classificação biofarmacêutica.

Os estudos de correlação *in vitro-in vivo* entre a fração absorvida e fração dissolvida de arteméter e de lumefantrina nos comprimidos de Coartem® apresentaram correlação de nível A nos meios pH 6,80 + 1% de laurilsulfato de sódio para o arteméter.

Foram validados os métodos para doseamento de arteméter e lumefantrina em matérias-primas e comprimidos, o que permitiu a elaboração das monografias de lumefantrina insumo farmacêutico ativo e arteméter e lumefantrina comprimidos.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução da diretoria colegiada RDC 37 de 3 de agosto de 2011:** Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. Brasília: 2011. 13 p. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/rdc0037_03_08_2011.html>. Acesso em: 15 jun. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC 64, de 28 de dezembro de 2012:** Publica a Lista das Denominações Comuns Brasileiras - DCB da Farmacopeia Brasileira. Brasília, 2012. x p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0064_28_12_2012.html>. Acesso em 20 abril 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RE 482 de 19 de março de 2002:** Determina a publicação do Guia para Estudos de Correlação *In Vitro-In Vivo* (CIVIV). Brasília: 2002. 3 p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/res0482_19_03_2002.html>. Acesso em: 09 abril 2015.

AMIDON G. L.; LENNERNÄS H.; SHAH VP, CRISON J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, Texas, v.12, n. 3, p. 413-420, 1995.

BOEHM M.; FUENFSCHILLING P. C.; KRIEGER M.; KUESTERS E.; STRUBER F. An Improved Manufacturing Process for the Antimalaria Drug Coartem. Part I. **Organic Process Research & Development**, Ohio, v. 11, n. 3, p. 336-340, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC no. 31, de 11 de Agosto de 2010.** Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Poder Executivo, de 12 de Agosto de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC no. 37, de 06 de Julho de 2009.** Trata da admissibilidade das farmacopéias estrangeiras. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Poder Executivo, de 08 de Julho de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE no 899, de 29 de maio de 2003.** Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 31 mai 2003. Disponível em: <<http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>>. Acesso em: 28 abr 2015.

CÉSAR, I. C. **Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano.**[Tese] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009

CÉSAR, I. C., RIBEIRO, J. A. A., TEIXEIRA, L. S., BELLORIO, K. B., 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, p. 114-120, 2011.

CHILUKURI, D. M.; SUNKARA, G.; YOUNG, D. **Pharmaceutical Product Development: In Vitro-In vivo Correlation**. New York: Informa Healthcare, 2007. 204 p.

DJIMDÉ, A.; LEFÈVRE, G. Understanding the pharmacokinetics of Coartem®. **Malaria Journal**, Londres, v. 8, n. a, p. 1-8, 2009.

EMAMI J. *In vitro - In vivo* Correlation: From Theory to Applications. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Canada, v. 9, n. 2, p. 31-51, 2006.

EZZET, F.; MULL, R.; KARBWANG, J.; Population pharmacokinetics and therapeutic response of CGP 56697 (artemether + benflumetol) in malaria patients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Switzerland, v. 46, n.6, p. 553-561, 1998.

FARMACOPEIA Brasileira, 5a edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations**. Rockville, 1997. 2 FDA, 1997.7 p.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms**. Rockville, 1997. 17 p.

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

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

HANSON, W. A. **Handbook of Dissolution Testing**. 2. ed. Oregon: Aster Publishing Corporation, 1991. 159 p

INTERNATIONAL Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of Analytical Procedures: Methodology - Q2B**. Geneva, November 1996. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 01 ago. 2014.

LÖBENBERG, R.; AMIDON G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international

regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 3-12, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2010. 38 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Malária. **Esquemas recomendados para o tratamento da malária não complicada no Brasil**. Brasília: Editora MS, 2006.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2012. 546p.

REDDY B. B.; KARUNAKAR A. Biopharmaceutics Classification System: A Regulatory Approach. **Dissolution Technologies**, Delaware, v. 18, n.1, p.31-37, 2011.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley Interscience, 1997. 765 p.

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos**. 2007. 297f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2007.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

STORPIRTIS, S. *et al.* **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321 p.

STORPIRTIS, S. *et al.* **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011. 222 p.

THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. 5.ed. Geneva: World Health Organization, 2015. 1499 p.

THE MERCK Index. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14. ed. Rahway: Merck Co., 2006. 2564 p.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 39 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2016. 3654 p.

UMAPATHI, P.; AYYAPPAN J.; QUINE, S. Development and Validation of a Dissolution Test Method for Artemether and Lumefantrine in Tablets. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Nigeria, v. 10, p. 643-653, 2011.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods**. Rockville: FDA, 33 p. 1994.

WHITE, N. J.; VAN VUGT, M.; EZZET, F. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. **Clinical pharmacokinetics**, Auckland, v.37, n. 2, p. 105-125, 1999.

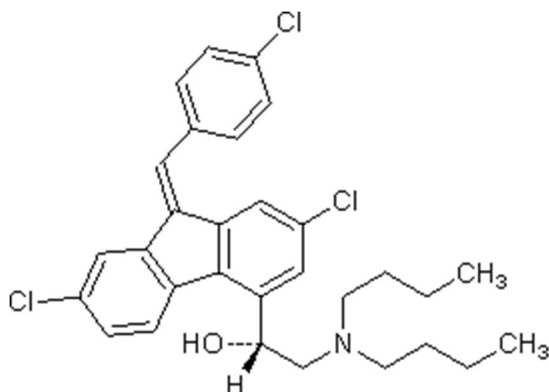
WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Malaria, **Global technical strategy for malaria 2016-2030**. 35 p, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Malaria. **World malaria report 2015**, 280 p, 2016.

APÊNDICE A - Minuta de monografia para lumefantrina insumo farmacêutico ativo

LUMEFANTRINA

Lumefantrinum



$C_{30}H_{32}Cl_3NO$; 528,94

Lumefantrina; 05462

(1R)-2-(diethylamino)-1-[(9Z)-2,7-dichloro-9-[(4-clorofenil)metilideno]-9H-fluoren-4-il] etanol [82186-77-4]

Contém, no mínimo, 98,5% e, no máximo 101,0% de $C_{30}H_{32}Cl_3NO$ em relação a substância dessecada.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó cristalino amarelo.

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em clorofórmio e em acetato de etila, solúvel em diclorometano, pouco solúvel em metanol e etanol.

Constantes físico-químicas.

Faixa de fusão (5.2.2): 128 °C a 132 °C.

IDENTIFICAÇÃO

A. O espectro de absorção no infravermelho (5.2.14) da amostra, dispersa em brometo de potássio, apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de lumefantrina SQR, preparado de maneira idêntica.

B. O espectro de absorção no ultravioleta (**5.2.14**), na faixa de 275nm a 325nm, de solução a 0,002% (p/v) em metanol, exibe máximo em aproximadamente 302nm e a absorvância específica $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ está entre 314 e 348.

C. Proceder conforme descrito em cromatografia em camada delgada (**5.2.17.1**), utilizando sílica-gel como suporte, e mistura de éter de petróleo, acetato de etila e ácido acético glacial (40:6:10) como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa, 10 μL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): solução amostra a 10 mg/mL da amostra em acetato de etila.

Solução (2): solução padrão 10mg/mL de lumefantrina SQR em acetato de etila.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Examinar sob luz ultravioleta a 254 nm. A mancha principal obtida com a Solução (1) corresponde em posição, cor e intensidade àquela obtida com a Solução (2).

D. Proceder conforme descrito em Cromatografia em camada de papel (**5.2.17.2**), utilizando as condições descritas acima, usando sílica-gel R5, como suporte.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar e expor ao vapor de iodo até aparecimento das manchas. Examinar sob luz visível. A mancha principal obtida com a Solução (1) corresponde em posição, cor e intensidade àquela obtida com a Solução (2).

ENSAIOS DE PUREZA

Limpidez da solução (5.2.25).

Solução de hidrazina: transferir 1 g de sulfato de hidrazina para um balão volumétrico de 100mL, dissolver e completar o volume com água e agitar. Deixar em repouso por 4 a 6 horas.

Solução de metenamina: transferir 2,5 mg de metenamina para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 25 mL de água e agitar até dissolver.

Suspensão opalescente primária: transferir 25 mL da Solução de hidrazina para o balão volumétrico de 100 mL contendo a Solução de metenamina. Agitar e deixar em repouso por 24 horas (Esta suspensão é estável por 2 meses, se mantida em frasco de vidro fechado e sem defeitos. A suspensão pode aderir ao vidro e deve ser agitada antes do uso.).

Padrão de opalescência: transferir 15 mL da *Suspensão opalescente primária* para um balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume com água e agitar (Esta solução não deve ser utilizada após 24 horas do preparo).

Solução amostra: transferir 1g de lumefantrina para um balão volumétrico de 10 mL e solubilizar com diclorometano e completar o volume com o mesmo solvente.

Suspensão de referência: transferir 5 mL do *Padrão de opalescência* para um balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água.

Procedimento: transferir individualmente porções de *Solução amostra*, *Suspensão de referência*, água e diclorometano para tubos de vidro incolor e transparente com diâmetro interno entre 15 mm e 25 mm, de forma a obter aproximadamente 40 mm de profundidade. Comparar a *Solução amostra*, a *Suspensão de referência*, água e diclorometano empregando fundo escuro e luz, avaliados verticalmente. A difusão da luz deve ser tal que a *Suspensão de referência* possa ser rapidamente distinguida do diclorometano. Se a *Solução Amostra* for tão límpida quanto a água ou o diclorometano, não é necessário preparar a *Suspensão de referência*. A *Solução amostra* tem a mesma claridade da água e do diclorometano ou não apresentam maior opalescência que a *Suspensão de referência*.

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito em Cromatografia em camada de papel (5.2.17.2), utilizando sílica-gel, como suporte, e mistura de éter petróleo, acetato de etila e ácido acético glacial (40:6:10; v/v/v), como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa, 10 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): Dissolver 10 mg/mL da amostra em acetato de etila.

Solução (2): Diluir 1,0 mL da *Solução (1)* para 100 mL de acetato de etila.

Solução (3): Diluir 3 mL da *Solução (2)* em 10 mL de acetato de etila.

Solução (4): Diluir 2 mL da *Solução (2)* em 20 mL de acetato de etila.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa e deixar secar ao ar. Examinar sob luz ultravioleta (254 nm). Qualquer mancha secundária obtida no cromatograma com a *Solução (1)*, diferente da mancha principal, não é mais intensa que aquela obtida com a *Solução (3)* (0,5%) e nenhuma das duas manchas é mais intensa do que aquela obtida com a *Solução (4)* (0,1%).

Metais pesados (5.3.2.3). Utilizar método II. No máximo 0,001% (10 ppm).

Perda por dessecação (5.2.9). Dessecar em estufa a 105 °C, por 3 horas. No máximo 0,5%

Cinzas sulfatadas (5.2.10). Determinar em 1 g da amostra. No máximo 0,1%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir:

A . Proceder conforme descrito em *Titulações em meio não aquoso (5.3.3.5)*. Pesar exatamente cerca de 0,2 da amostra e dissolver em 10 mL de anidrido acético e 40 mL de ácido acético glacial. Titular com ácido perclórico 0,1 M SV determinando o ponto final potenciometricamente. Cada mL de ácido perclórico 0,1 M SV equivale a 52,89 mg de $C_{30}H_{32}Cl_3NO$.

B. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 335 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 μ m) mantida à temperatura de 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 1 mL/minuto.

Fase móvel: mistura de metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20)

Solução amostra: transferir 15 mg da amostra previamente, exatamente pesada para balão de 50 mL, adicionar 1 mL de diclorometano e completar o volume com metanol. Transferir 4 mL da solução obtida para balão de 50 mL e completar o volume com *Fase móvel*.

Solução padrão: transferir 15 mg de lumefantrina SQR, exatamente pesada para balão de 50 mL, adicionar 1 mL de diclorometano e completar o volume com metanol. Transferir 4 mL da solução obtida para balão de 50 mL e completar o volume com *Fase móvel*.

Injetar replicatas de 20 μ L da Solução padrão. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos registrados não deve ser maior que 2%. A eficiência da coluna não é menor que 1000 pratos teóricos/metro.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 μ L da *Soluções padrão e amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Calcular o teor de lumefantrina ($C_{30}H_{32}Cl_3NO$)

na amostra de lumefantrina a partir das respostas obtidas para a lumefantrina com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E DOSEAMENTO

Em recipientes bem fechados, ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Antimalárico