

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

PEDRO HENRIQUE REIS DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO  
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA E  
CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA**

Belo Horizonte – MG

2017

PEDRO HENRIQUE REIS DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE LUMEFANTRINA EM PLASMA HUMANO EMPREGANDO  
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA E  
CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Christian Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

Belo Horizonte – MG

2017

S586d Silva, Pedro Henrique Reis da.  
Determinação de lumefantrina em plasma humano empregando extração em fase sólida molecularmente impressa e cromatografia a líquido de alta eficiência / Pedro Henrique Reis da Silva. – 2017.

233 f. il.

Orientador: Christian Fernandes.  
Coorientador: Gerson Antônio Pianetti.

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

1. Malária – Tratamento – Teses. 2. Lumefantrina – Teses. 3. Polímero de impressão molecular – Teses. 4. Extração em fase sólida – Teses. 5. Planejamento experimental Doehlert – Teses. 6. Planejamento experimental Box Behnken – Teses. I. Fernandes, Christian. II. Pianetti, Gerson Antônio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Determinação de lumefantrina em plasma humano empregando extração em fase sólida molecularmente impressa e cromatografia a líquido de alta eficiência**

### PEDRO HENRIQUE REIS DA SILVA

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

Aprovada em 21 de fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Maria Beatriz de Freitas Marques  
UFMG

  
Prof. Maria Beatriz Abreu Glória  
UFMG

  
Prof. Christian Fernandes - Orientador  
UFMG

  
Prof. Gerson Antônio Pianetti  
UFMG

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2017.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha mãe Eliane e aos meus avós maternos, Francisca e Geraldo, por todo amor, suporte e incentivo incondicionais, mostrados diariamente, em pequenos ou grandes gestos e ações.

Aos demais membros da minha família, principalmente à minha tia Lísia, ao meu pai e à minha irmã Aline, pelo apoio e confiança demonstrados durante esse longo e árduo percurso. Agradeço ainda ao Hugo, pelo companheirismo, amor e paciência, principalmente nos momentos finais de maior tensão e ansiedade.

Ao meu orientador, doutor Christian Fernandes, pela confiança e credibilidade depositadas em mim, pela presença e disponibilidade constantes e pela inestimável contribuição intelectual para que esse trabalho fosse bem sucedido.

Ao meu coorientador doutor Gérson Antônio Pianetti, por estar sempre disponível para sanar problemas de quaisquer naturezas e por ser a grande inspiração acadêmica para mim desde a graduação.

Aos professores doutores Maria Elisa Scarpelli Ribeiro e Silva e Roberto Fernando de Souza Freitas, da Escola de Engenharia, por terem me recebido com muito carinho e prontidão em seu laboratório, atuando como coorientadores extraoficiais, contribuindo intelectual e praticamente nesse universo de ciências de polímeros que parecia “impossível” para mim, no início.

Agradeço especialmente à professora doutora Cristina Duarte Vianna Soares, por sua disposição em compartilhar comigo sua experiência com polímeros molecularmente impressos, quando tudo parecia distante e assustador.

Agradeço aos professores doutores Isabela de Costa César, José Eduardo Gonçalves, Rodrigo Maia de Pádua, Fernão Castro Braga, Letícia Malta Costa, Armando da Silva Cunha Júnior, André Augusto Gomes Faraco e Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira, que contribuíram significativamente para que esse projeto se concretizasse, por meio dos ensinamentos transmitidos em aulas ou consultorias informais.

Um agradecimento aos meus pupilos Leonardo Palma e Melina Diniz. Quando conversamos pela primeira vez, eu lhes disse que queria mais que alguém que me ajudasse nas tarefas práticas, queria alguém que contribuísse ao projeto com sugestões e autonomia. Vocês contribuíram muito mais do que eu podia pedir por e espero que eu tenha contribuído para o crescimento de vocês, em retribuição, pelo menos um pouco do que vocês contribuíram comigo. Vocês foram fundamentais e serei eternamente grato aos dois.

Aos meus amigos, sejam eles de infância, COLTEC, Farmácia ou Survivor por aguentarem e me apoiarem nos momentos de desespero. Aqui, vale uma menção especial à Nayara Andrade, que sempre se fez presente, ainda que à distância.

Às minhas queridas amigas e colegas de laboratório Juliana Veloso, Graziela Rivelli e Ana Coelho, por todas suas contribuições acadêmicas, mas, principalmente, não acadêmicas. Os encontros, cafés, risadas e fofocas foram o “alívio cômico” durante esse percurso que, vocês melhor do que ninguém, sabem o quanto difícil foi.

Aos colegas e funcionários do LQ e CEDAFAR, em especial à Juliana Brêtas, Naialy Reis e Diego Beltrão, por seus conselhos e esclarecimento de dúvidas.

Aos colegas, funcionários e alunos LCTP, por terem me recepcionando de forma respeitosa e por estarem sempre solícitos para ajudar e colaborar com meu projeto.

Aos funcionários dos laboratórios de Bioquímica de Alimentos, Farmacotécnica e Hematologia da Faculdade de Farmácia, por disponibilizarem sua infraestrutura para realização de alguns ensaios importantes.

Ao colegiado de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, nas figuras do Eduardo e Marton, por todo o auxílio em questões burocráticas.

A CAPES, pelo auxílio financeiro em forma de bolsa concedida, que permitiu que esse projeto se desenvolvesse.

## RESUMO

A malária é uma doença de origem infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Embora em declínio, a malária continua sendo um problema de saúde pública no Brasil. O tratamento emprega associações entre fármacos visando atingir o parasita em pontos-chave do seu ciclo evolutivo. Em infecções por *P. falciparum*, o tratamento de primeira escolha consiste na associação em dose fixa de lumefantrina e artêmeter. Um dos desafios para erradicação da malária se deve à resistência do parasita aos antimaláricos. Portanto, a determinação de fármacos em fluidos biológicos é essencial para monitorização terapêutica, pois doses subterapêuticas podem levar à resistência e falha terapêutica. Assim, o uso de métodos bioanalíticos adequados é imprescindível para garantir resultados confiáveis. Contudo, como matrizes biológicas são complexas, é preciso uma etapa de preparo de amostras, para remoção de interferentes e concentração de analitos. Dentre os materiais disponíveis para o preparo de amostras, os polímeros de impressão molecular (MIPs) são alternativa altamente seletiva, de produção relativamente fácil, barata e simples. Nesse contexto, visou-se com esse trabalho à síntese de MIP para lumefantrina, usando planejamento experimental Box-Behnken. O MIP obtido, a partir de 2-vinilpiridina, etilenoglicol dimetacrilato e tolueno, foi caracterizado, sendo determinados ainda coeficiente de distribuição (977,83 µg/g), fator de impressão (2,44) e fator de seletividade (1,44). O polímero desenvolvido foi empregado para extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) de lumefantrina em plasma. Um método bioanalítico foi otimizado por planejamento experimental Doehlert e validado. O método empregou coluna Kinetex C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 2,6 µm) e mistura de metanol, acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,14% (50:33:17) como fase móvel, na vazão de 0,7 mL/min, a 35 °C, detecção em 305 nm e halofantrina como padrão interno. O método desenvolvido cumpriu os ensaios de efeito residual, efeito matriz e estabilidade, mostrando-se seletivo, preciso, exato e linear na faixa de 50 a 10000 ng/mL, com limite de quantificação de 50 ng/mL e recuperações de 83,7 a 85,4%. O método desenvolvido mostrou-se adequado para determinação de lumefantrina em plasma humano.

**Palavras-chave:** malária, lumefantrina, polímero de impressão molecular, extração em fase sólida, planejamento experimental, Box Behnken, Doehlert.

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by protozoan of genus Plasmodium. Although declining, malaria remains a public health issue in Brazil. Treatment of malaria is carried out using association of different drugs aiming to reach the parasite in key points of its biological cycle. The first-choice treatment for infections caused by *P. falciparum* consists in artemether and lumefantrine in a fixed dose combination. One of the challenges for malaria eradication is the resistance of parasites to antimalarials. Therefore, quantification of drugs in biological fluids is imperative for therapeutic drug monitoring, since subtherapeutic doses are related to drug resistance and therapeutic failure. Employing suitable bioanalytical methods is then crucial to obtain reliable results. However, since biological matrices are complex, a sample preparation step is required for removal of interferences and preconcentration of analytes. Molecularly imprinted polymers (MIPs) has emerged as a highly selective alternative among available sample preparation materials, being also relatively easy, inexpensive and simple to obtain. Therefore, it was aimed with this study synthesizing a MIP for lumefantrine using a Box-Benhken design. This MIP was synthesized using 2-vinylpyridine, ethylene glycol dimethacrylate and toluene and was then characterized. Distribution coefficient (977.83  $\mu\text{g/g}$ ), imprinting factor (2.44) and selectivity factor (1.44) were determined. This polymer was used for extraction of lumefantrine from human plasma samples by means of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE). A bioanalytical method for determination of lumefantrine in plasma was developed and validated employing a Kinetex C<sub>18</sub> (100 x 4.6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ) column, a mixture of methanol, acetonitrile and 0.14% aqueous solution of trifluoroacetic acid (50:33:17) as mobile phase, at a flow-rate of 0.7 mL/min, at 35 °C, detection at 305 nm and halofantrine as internal standard. The method fulfilled validation parameters of carryover, matrix effect and stability, showing to be selective, accurate, precise and linear in the range of 50-10000 ng/mL. The limit of quantification and recoveries were found to be 50 ng/mL and 83.7-85.4%, respectively. The developed and validated method was suitable for determination of lumefantrine in human plasma.

**Keywords:** malaria, lumefantrine, molecularly imprinted polymer, solid-phase extraction, experimental design, Box Behnken, Doehlert.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico do agente etiológico da malária <i>Plasmodium vivax</i>	33
<b>Figura 2</b>	Declínio da incidência de malária por <i>Plasmodium falciparum</i> no Brasil, entre 2003 e 2017	37
<b>Figura 3</b>	Mapa de risco para malária no Brasil, por estado, em 2014	38
<b>Figura 4</b>	Estrutura química da lumefantrina	40
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática das etapas para obtenção de polímeros molecularmente impressos	55
<b>Figura 6</b>	Estrutura química dos monômeros funcionais ácido metacrílico, 2-hidroxietil metacrilato e 2-vinilpiridina	55
<b>Figura 7</b>	Estruturas químicas dos <i>crosslinker</i> etilenoglicol dimetacrilato, divinilbenzeno e trimetilolpropano triacrilato	5
<b>Figura 8</b>	Estrutura química e reação de decomposição do 2,2-azo-bis-isobutironitrila, sob aquecimento ou radiação ultravioleta	57
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática de procedimento para extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) em modo <i>off-line</i>	62
<b>Figura 10</b>	Estrutura química da halofantrina (padrão interno)	101
<b>Figura 11</b>	Curva de <i>van Deemter</i> para otimização de vazão de fase móvel de método analítico para determinação de lumefantrina	124
<b>Figura 12</b>	Cromatograma típico para o método analítico por CLAE-UV após otimização, conforme condições cromatográficas descritas na Tabela 29	125
<b>Figura 13</b>	Sobreposição dos cromatogramas obtidos para os monômeros funcionais e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina	126
<b>Figura 14</b>	Sobreposição dos cromatogramas obtidos para os <i>crosslinkers</i> e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina	126

## LISTA DE FIGURAS (continuação)

<b>Figura 15</b>	Sobreposição dos cromatogramas obtidos para o iniciador e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina	127
<b>Figura 16</b>	Sobreposição do cromatograma obtido para lumefantrina IFA submetida à degradação a 70 °C e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina	128
<b>Figura 17</b>	Sobreposição do cromatograma obtido para lumefantrina IFA submetida à degradação por fotólise (UV-Vis) e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina	128
<b>Figura 18</b>	Sobreposição do cromatograma obtido para lumefantrina IFA submetida à degradação por oxidação por 2,2-azo-bis-isobutironitrila e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina	129
<b>Figura 19</b>	Gráfico de dispersão para os dados brutos na avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina	131
<b>Figura 20</b>	Gráfico de quartis (Q-Q) para avaliação da normalidade dos resíduos, na avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina	131
<b>Figura 21</b>	Gráfico de resíduos para avaliação da independência dos resíduos, na avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina	131
<b>Figura 22</b>	Curva analítica para avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina	134
<b>Figura 23</b>	Espectros de absorção no ultravioleta na faixa de 200-400 nm para lumefantrina SQR e IFA sobrepostos	141

## LISTA DE FIGURAS (continuação)

<b>Figura 24</b>	Espectros de absorção no ultravioleta na faixa de 275-325 nm para lumefantrina SQR e IFA sobrepostos	141
<b>Figura 25</b>	Espectros de absorção no infravermelho na faixa de 4500 a 400 $\text{cm}^{-1}$ para lumefantrina SQR e lumefantrina IFA sobrepostos	142
<b>Figura 26</b>	Diagramas de Pareto para coeficiente de distribuição (à esquerda) e fator de impressão (à direita)	148
<b>Figura 27</b>	Superfícies de reposta obtidas para as variáveis coeficiente de distribuição (superior) e fator de impressão (inferior)	149
<b>Figura 28</b>	Histogramas de distribuição de tamanhos de partículas para MIP-24 e NIP-24, obtidos por difração de raio laser	160
<b>Figura 29</b>	Micrografias obtidas para MIP-24 (acima) e NIP-24 (abaixo), nos aumentos de 500x (à esquerda) e 1500x (à direita)	161
<b>Figura 30</b>	Termogramas de calorimetria exploratória diferencial para MIP-24, NIP-24 e lumefantrina	164
<b>Figura 31</b>	Termogramas de análise termogravimétrica para MIP-24, NIP-24 e lumefantrina	165
<b>Figura 32</b>	Espectros de absorção no FTIR para MIP-24 (antes e após extração da lumefantrina), NIP-24 e lumefantrina	166
<b>Figura 33</b>	Gráfico de dispersão dos coeficientes de distribuição para MIP-24 e NIP-24 por concentração de lumefantrina adicionada, em estudo de sorção estática	169
<b>Figura 34</b>	Gráfico de dispersão das quantidades percentuais sorvidas para MIP-24 e NIP-24 por concentração de lumefantrina adicionada, em estudo de sorção estática	169
<b>Figura 35</b>	Gráfico de dispersão dos coeficientes de distribuição para lumefantrina em função do tempo, para MIP-24 e NIP-24	170
<b>Figura 36</b>	Gráfico de dispersão das quantidades sorvidas de lumefantrina, em massa, em função do tempo, para MIP-24 e NIP-24	171

## LISTA DE FIGURAS (continuação)

<b>Figura 37</b>	Gráfico de dispersão das quantidades de lumefantrina em percentuais, em função do tempo, para MIP-24 e NIP-24	172
<b>Figura 38</b>	Espectros de absorção no UV para lumefantrina e halofantrina obtidas por <i>software ChromQuest</i>	175
<b>Figura 39</b>	Cromatogramas para lumefantrina e halofantrina, obtidos a 240 nm, 305 nm e 335 nm, para determinação de comprimento de onda ideal, na otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	175
<b>Figura 40</b>	Diagrama de Pareto para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano por planejamento experimental Doehlert	179
<b>Figura 41</b>	Superfícies de resposta obtidas para otimização de método bioanalítico por planejamento experimental Doehlert	181
<b>Figura 42</b>	Superfícies de resposta obtidas para otimização de método bioanalítico por planejamento experimental Doehlert	182
<b>Figura 43</b>	Cromatograma típico para condições cromatográficas otimizadas para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano por planejamento experimental Doehlert	183
<b>Figura 44</b>	Diagrama de Pareto para assimetria, por planejamento Doehlert	186
<b>Figura 45</b>	Cromatograma típico obtido para condições cromatográficas otimizadas por planejamento Doehlert mais ajustes finos (condição final) para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	191
<b>Figura 46</b>	Diagramas de Pareto para quantidades sorvidas de lumefantrina (à esquerda) e halofantrina (à direita)	194

## LISTA DE FIGURAS (final)

<b>Figura 47</b>	Gráficos <i>square plot</i> para quantidade sorvida de lumefantrina	195
<b>Figura 48</b>	Gráficos <i>square plot</i> para quantidade sorvida de halofantrina	196
<b>Figura 49</b>	Dessorção de lumefantrina de cartuchos MISPE em função da proporção de metanol ou acetonitrila	198
<b>Figura 50</b>	Cromatogramas de amostras de plasma normal, hemolisado e lipêmico sobrepostos ao cromatograma para amostra LIQ, para avaliação da seletividade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	200
<b>Figura 51</b>	Ampliação dos cromatogramas de amostras de plasma normal, hemolisado e lipêmico sobrepostos ao cromatograma para amostra LIQ, para avaliação da seletividade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	200
<b>Figura 52</b>	Cromatogramas para antimaláricos, paracetamol e cafeína sobrepostos ao cromatograma para amostra LIQ, para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	202
<b>Figura 53</b>	Cromatogramas de amostras de plasma normal analisados antes e após injeções de amostra LQS com o cromatograma para amostra LIQ, para avaliação do efeito residual de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	204
<b>Figura 54</b>	Ampliação do cromatogramas de amostras de plasma normal analisados antes e após injeções de amostra LQS com o cromatograma para amostra LIQ, para avaliação do efeito residual de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	204
<b>Figura 55</b>	Curvas de calibração para lumefantrina, na faixa de 50 a 10000 ng/mL, para avaliação de linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	208

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação dos principais fármacos antimaláricos empregados atualmente	40
<b>Tabela 2</b>	Características e propriedades físico-química da lumefantrina	41
<b>Tabela 3</b>	Métodos bioanalíticos para quantificação de lumefantrina em amostras biológicas publicados no período de 2005 a 2017	47
<b>Tabela 4</b>	Informações sobre lote e grau de pureza das substâncias químicas de referência utilizadas para desenvolvimento de métodos analítico e bioanalítico para determinação de lumefantrina	72
<b>Tabela 5</b>	Reagentes utilizados para avaliação da seletividade e seus respectivos estados físicos e classificações para método analítico para determinação de lumefantrina	80
<b>Tabela 6</b>	Condições de estresse e procedimentos para avaliação da seletividade por degradação forçada de método analítico para determinação de lumefantrina	81
<b>Tabela 7</b>	Planilha de diluições para preparo da curva analítica para avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina	82
<b>Tabela 8</b>	Variáveis e condições nominal e alternativa para avaliação da robustez de método analítico para determinação de lumefantrina	86
<b>Tabela 9</b>	Matriz de combinação fatorial para avaliação da robustez, pelo teste de <i>Youden</i> , de método analítico para determinação de lumefantrina	87
<b>Tabela 10</b>	Condições analíticas definidas para otimização de protocolo de síntese de polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina por planejamento Box-Behnken	91
<b>Tabela 11</b>	Variáveis e níveis para otimização de protocolo de síntese de polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina por planejamento Box-Behnken de 3 variáveis	91

## LISTA DE TABELAS (continuação)

<b>Tabela 12</b>	Quantidades utilizadas de fármaco, monômeros, <i>crosslinkers</i> e iniciador para síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs) para lumefantrina	91
<b>Tabela 13</b>	Matriz experimental para otimização de condições de síntese de polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina utilizando planejamento Box-Behnken, com valores codificados	92
<b>Tabela 14</b>	Matriz experimental para otimização de condições de síntese para polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina utilizando planejamento Box-Behnken, com valores reais	92
<b>Tabela 15</b>	Quantidades e proporções adicionadas dos monômeros funcionais 2-vinilpiridina e ácido metacrílico para avaliação da eficiência de copolimerização na otimização de protocolo de síntese para polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina	95
<b>Tabela 16</b>	Quantidades e proporções adicionadas de 2-vinilpiridina e de etilenoglicol dimetacrilato para avaliação de diferentes proporções molares fármaco:monômero funcional: <i>crosslinker</i> na otimização de protocolo de síntese para polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina	96
<b>Tabela 17</b>	Variáveis, número de níveis e faixas avaliadas em planejamento Doehlert de 5 variáveis para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	103
<b>Tabela 18</b>	Matriz experimental para planejamento Doehlert de 5 variáveis, com valores codificados, para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	104

## LISTA DE TABELAS (continuação)

<b>Tabela 19</b>	Matriz experimental para planejamento Doehlert de 5 variáveis, com valores reais, para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	105
<b>Tabela 20</b>	Classificação, valor alvo e limites inferior e superior para as respostas avaliadas na otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	106
<b>Tabela 21</b>	Variáveis e níveis avaliados em PFF $2^{4-1}$ na otimização da etapa de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) de lumefantrina	108
<b>Tabela 22</b>	Matriz experimental para PFF $2^{4-1}$ com valores codificados para as variáveis avaliadas na otimização da etapa de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) para lumefantrina	108
<b>Tabela 23</b>	Matriz experimental para PFF $2^{4-1}$ com valores reais para as variáveis avaliadas na otimização de etapa de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) para lumefantrina	109
<b>Tabela 24</b>	Composição das soluções de eluição empregadas para dessorção de lumefantrina e halofantrina dos cartuchos de MISPE, após extração	110
<b>Tabela 25</b>	Diluições para preparo de curva de calibração para avaliação de linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	116
<b>Tabela 26</b>	Diluições para preparo dos controles de qualidade de baixa, média e alta concentração e de diluição para avaliação da precisão e exatidão de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	117
<b>Tabela 27</b>	Parâmetros cromatográficos na avaliação de diferentes fases estacionárias na otimização de método analítico para determinação de lumefantrina	121



## LISTA DE TABELAS (continuação)

<b>Tabela 28</b>	Parâmetros cromatográficos para otimização de vazão de fase móvel por meio de curva de <i>van Deemter</i> , para otimização de método analítico para determinação de lumefantrina	124
<b>Tabela 29</b>	Condições cromatográficas e critérios de adequabilidade para método analítico por CLAE-UV definidos após otimização de método analítico para determinação de lumefantrina	125
<b>Tabela 30</b>	Parâmetros de regressão linear para avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina	131
<b>Tabela 31</b>	Quadro ANOVA para avaliação da significância da regressão e desvio da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina	133
<b>Tabela 32</b>	Parâmetros de regressão para avaliação de linearidade, segundo Souza e Junqueira (2005), de método analítico para determinação de lumefantrina	134
<b>Tabela 33</b>	Teores de lumefantrina e DPR (%) para avaliação da repetitividade, na avaliação da precisão de método analítico para determinação de lumefantrina	135
<b>Tabela 34</b>	Teores de lumefantrina e DPR (%) para avaliação da precisão intermediária, na avaliação da precisão de método analítico para determinação de lumefantrina	135
<b>Tabela 35</b>	Limites de detecção e quantificação estimados pela equação da reta e pela razão S/N de método analítico para determinação de lumefantrina	137
<b>Tabela 36</b>	Teores médios de lumefantrina e DPR (%) para avaliação da robustez de método analítico para determinação de lumefantrina	138
<b>Tabela 37</b>	Teor, fator de capacidade, número de pratos teóricos e assimetria para avaliação da robustez de método analítico para determinação de lumefantrina	138

## LISTA DE TABELAS (continuação)

<b>Tabela 38</b>	Efeitos de cada parâmetro analítico para cada uma das respostas na avaliação da robustez de método analítico para determinação de lumefantrina	138
<b>Tabela 39</b>	Atribuições de bandas de absorção típicas no IV para lumefantrina	136
<b>Tabela 40</b>	Teores e DPR (%) para ensaio de doseamento de lumefantrina IFA	143
<b>Tabela 40</b>	Teores e DPR para ensaio de doseamento de lumefantrina IFA	143
<b>Tabela 41</b>	Ensaio de identificação, caracterização físico-química e pureza para lumefantrina IFA, realizados por Rivelli (2016), para mesma IFA e mesmo lote	144
<b>Tabela 42</b>	Coeficientes de distribuição e fatores de impressão obtidos para MIPs e NIPs sintetizados conforme planejamento Box-Behnken na otimização de protocolo de síntese para MIP para lumefantrina	145
<b>Tabela 43</b>	Coeficientes de distribuição e fatores de impressão para avaliação da eficiência de copolimerização entre AMA e 2-VP, na otimização de protocolo de síntese de MIP para lumefantrina	153
<b>Tabela 44</b>	Coeficientes de distribuição e fatores de impressão para avaliação das proporções molares entre lumefantrina e 2-vinilpiridina, na otimização de protocolo de síntese para MIP para lumefantrina	154
<b>Tabela 45</b>	Coeficientes de distribuição e fatores de impressão para avaliação das eficiências de fotoiniciação e pré-polimerização, na otimização de protocolo de síntese de MIP para lumefantrina	156
<b>Tabela 46</b>	Protocolo de síntese de MIP para lumefantrina padronizado após otimização	157

## LISTA DE TABELAS (continuação)

<b>Tabela 47</b>	Tamanho de partícula e distribuição de tamanho de partícula para MIP-24 e NIP-24 obtidos por difração de raio laser	158
<b>Tabela 48</b>	Determinação de área superficial, volume e diâmetro de poro para MIP-24 e NIP-24, obtidas por sorção de nitrogênio líquido	162
<b>Tabela 49</b>	Atribuições de bandas de absorção características para lumefantrina no FTIR	167
<b>Tabela 50</b>	Atribuições de bandas de absorção características para MIP e NIP no FTIR	167
<b>Tabela 51</b>	Coeficientes de distribuição e quantidades sorvidas para MIP-24 e NIP-24, em estudo de sorção estática	168
<b>Tabela 52</b>	Coeficientes de distribuição e quantidades sorvidas de lumefantrina em estudo de sorção dinâmica, por período de 48 horas	170
<b>Tabela 53</b>	Coeficientes de distribuição e fatores de impressão para avaliação da reprodutibilidade entre diferentes lotes de MIP-24 e NIP-24	173
<b>Tabela 54</b>	Parâmetros cromatográficos obtidos para lumefantrina por planejamento Doehlert para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	176
<b>Tabela 55</b>	Desejabilidades individuais e global obtidas para lumefantrina, para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano por planejamento Doehlert	177
<b>Tabela 56</b>	Condições cromatográficas otimizadas por planejamento experimental Doehlert para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	183
<b>Tabela 57</b>	Parâmetros cromatográficos determinados para condições cromatográficas otimizadas por planejamento experimental Doehlert para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	184

## LISTA DE TABELAS (continuação)

<b>Tabela 58</b>	Parâmetros cromatográficos determinados após ajustes finos na concentração de ácido trifluoroacético, temperatura e vazão, na otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	188
<b>Tabela 59</b>	Influência da frequência de aquisição de dados na assimetria dos picos de lumefantrina e halofantrina	189
<b>Tabela 60</b>	Influência do tempo de resposta no detector na assimetria dos picos de lumefantrina e halofantrina	190
<b>Tabela 61</b>	Condições cromatográficas e critérios de adequabilidade para método bioanalítico por CLAE-UV para determinação de lumefantrina em plasma humano após otimização	190
<b>Tabela 62</b>	Parâmetros cromatográficos obtidos para condições cromatográficas otimizadas por planejamento Doehlert mais ajuste finos (condição final) para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	191
<b>Tabela 63</b>	Condições otimizadas para a etapa de extração de lumefantrina a partir de plasma humano	198
<b>Tabela 64</b>	Fatores de matriz normalizados e coeficientes de variação para avaliação do efeito matriz de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	199
<b>Tabela 65</b>	Recuperações de lumefantrina nos níveis CQB, CQM e CQA para avaliação de recuperação de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	205
<b>Tabela 66</b>	Recuperações de lumefantrina nos níveis CQB, CQM e CQA para avaliação de recuperação de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	206
<b>Tabela 66</b>	Avaliação das curvas de calibração conforme proposto por Souza e Junqueira (2005) para avaliação de linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	207
<b>Tabela 67</b>	Parâmetros de regressão para as 3 curvas de calibração na avaliação da linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	209

## LISTA DE TABELAS (final)

<b>Tabela 68</b>	Desvios em relação à concentração nominal para avaliação da linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	209
<b>Tabela 69</b>	Primeiro dia de avaliação da precisão e exatidão de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	210
<b>Tabela 70</b>	Segundo dia de avaliação da precisão e exatidão de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	211
<b>Tabela 71</b>	Terceiro dia de avaliação da precisão e exatidão de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	211
<b>Tabela 72</b>	Estabilidade de lumefantrina em plasma de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	212
<b>Tabela 73</b>	Estabilidade de lumefantrina e halofantrina em solução de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano	213

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
$\lambda$	Comprimento de onda
2-HEMA	2-hidroxietil metacrilato
2-VP	2-vinilpiridina
A	Assimetria
AcE	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
AIBN	2,2-azo-bis-isobutironitrila
AMA	Ácido metacrílico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEDAFAR-BIO	Laboratório de Bioequivalência do Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico
CLAE	Cromatografia a Líquido de alta eficiência
CLO	Clorofórmio
CLUE	Cromatografia a Líquido de ultra eficiência
$C_{m\acute{a}x}$	Concentração plasmática máxima
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (continuação)

CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês, <i>differential scanning calorimetry</i> )
DVB	Divinilbenzeno
ECC	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento
ECD	Estabilidade de curta duração
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
ELD	Estabilidade de longa duração
LLE	<i>Liquid liquid extraction</i> (Extração líquido-líquido)
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPP	Estabilidade de pós-processamento
EPR	Erro padrão relativo
ES	Estabilidade do analito e padrão interno em solução
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por <i>electrospray</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FM	Fase móvel

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (continuação)

FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia a líquido de alta eficiência)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
<i>k</i>	Fator de retenção ou capacidade
LCQ	Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos
LCTP	Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MEPS	<i>Microextraction by packed sorbent</i> (Microextração por sorvente empacotado)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Monômero funcional
MIP	<i>Molecularly imprinted polymer</i> (Polímero molecularmente impresso)
MISPE	<i>Molecularly imprinted solid phase extraction</i> (Extração em fase sólida molecularmente impressa)
mm	milímetros
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
<i>N</i>	Número de pratos teóricos
NIP	Nonimprinted polymer (Polímero molecularmente não impresso)
nm	nanômetros



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (continuação)

PA	Grau analítico (para análise)
PI	Padrão interno
PNCM	Programa Nacional de Controle de Malária
PPT	Precipitação de proteínas
$R$	Coeficiente de correlação
$R^2$	Coeficiente de determinação
RAM	<i>Restricted access media</i> (Meio de acesso restrito)
RAMIP	<i>Restricted access molecularly imprinted polymer</i> (Polímero de impressão molecular de acesso restrito)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos
RE	Resolução
SBSE	<i>Stir bar sorptive extraction</i> (Extração por sorção em barra de agitação)
SE	Solução estoque
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (Extração em fase sólida)
SPME	<i>Solid phase microextraction</i> (Microextração em fase sólida)
SQR	Substância química de referência
$t_{\text{máx}}$	Tempo máximo
$t_r$	Tempo de retenção
$t_0$	Tempo (ou volume) morto
TOL	Tolueno

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (final)

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida Ultra Eficiência)
USP	United States Pharmacopoeial Convention
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta e visível
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>2.1</b>	Objetivo geral	32
<b>2.2</b>	Objetivos específicos	32
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Malária</b>	<b>33</b>
<b>3.1.1</b>	Transmissão e ciclo biológico do parasita	33
<b>3.1.2</b>	Quadro clínico e diagnóstico	35
<b>3.1.3</b>	Quadro epidemiológico no Brasil e no mundo	36
<b>3.1.4</b>	Tratamento de malária no Brasil	38
<b>3.1.5</b>	Lumefantrina	40
<b>3.2</b>	Determinação de fármacos em fluidos biológicos	42
<b>3.3</b>	Determinação de lumefantrina em fluidos biológicos	46
<b>3.4.</b>	<b>Polímeros molecularmente impressos (MIPs)</b>	<b>51</b>
<b>3.4.1</b>	Aspectos gerais	52
<b>3.4.2</b>	Métodos de síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs)	57
<b>3.4.3</b>	Principais aplicações para polímeros molecularmente impressos (MIPs)	59
<b>3.4.4</b>	Extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE)	61
<b>3.5</b>	Emprego de planejamentos experimentais e ferramentas quimiométricas na otimização de condições experimentais	63
<b>3.5.1</b>	Tipos de planejamentos experimentais e metodologias de superfície de resposta	65
<b>3.5.2</b>	Ferramentas para otimização de respostas múltiplas	69
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>72</b>
<b>4.1</b>	Substâncias químicas de referência (SQR) e insumo farmacêutico ativo (IFA)	72
<b>4.2</b>	Amostras biológicas	73
<b>4.3</b>	Solventes, reagentes e colunas cromatográficas	73
<b>4.4</b>	Equipamentos e vidrarias	74
<b>4.5</b>	Desenvolvimento e otimização de método por CLAE-UV para determinação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo (IFA)	76

<b>4.6</b>	Validação de método analítico por CLAE-UV para quantificação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo (IFA)	79
<b>4.6.1</b>	Seletividade	80
<b>4.6.2</b>	Linearidade	82
<b>4.6.3</b>	Intervalo	84
<b>4.6.4</b>	Precisão	84
<b>4.6.5</b>	Limites de detecção e quantificação	85
<b>4.6.6</b>	Exatidão	85
<b>4.6.7</b>	Robustez	86
<b>4.7</b>	Controle de qualidade de lumefantrina insumo farmacêutico ativo	88
<b>4.8</b>	Síntese e caracterização de polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina	89
<b>4.8.1</b>	Otimização de protocolo de síntese para polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina	89
<b>4.8.2</b>	4Caracterização dos polímeros impresso (MIP) e não impresso (NIP) otimizados para lumefantrina	97
<b>4.8.2.1</b>	Caracterização quanto à morfologia	98
<b>4.8.2.2</b>	Caracterização quanto à estabilidade térmica	98
<b>4.8.2.3</b>	Caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	99
<b>4.8.3</b>	Estudos de sorção	99
<b>4.8.4</b>	Estudos de seletividade	100
<b>4.8.5</b>	Estudos de reprodutibilidade entre diferentes lotes (interlotes)	101
<b>4.9</b>	Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE-UV para quantificação de lumefantrina em plasma humano	101
<b>4.9.1</b>	Seleção do padrão interno (PI)	101
<b>4.9.2</b>	Desenvolvimento de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano empregando CLAE-UV e MISPE como etapa de preparo de amostras	102
<b>4.9.3</b>	Desenvolvimento da etapa de preparo de amostras por extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE)	107

4.9.4	Validação de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano empregando CLAE-UV e MISPE na etapa de preparo de amostras	111
4.9.4.1	Seletividade	111
4.9.4.2	Efeito residual ou <i>carryover</i>	112
4.9.4.3	Efeito matriz	113
4.9.4.4	Recuperação	113
4.9.4.5	Curva de calibração (linearidade)	114
4.9.4.6	Precisão e exatidão	117
4.9.4.7	Estabilidade dos analitos em matriz biológica	118
4.9.4.8	Estabilidade de analito e padrão interno em solução (ES)	119
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
5.1	Desenvolvimento de método por CLAE-UV para determinação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo (IFA)	121
5.2	Validação do método analítico por CLAE-UV para quantificação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo (IFA)	125
5.2.1	Seletividade	125
5.2.2	Linearidade	130
5.2.3	Precisão	134
5.2.4	Limite de detecção e limite de quantificação	136
5.2.5	Exatidão	137
5.2.6	Robustez	137
5.3	Controle de qualidade de lumefantrina insumo farmacêutico ativo (IFA)	140
5.4	Síntese e caracterização de polímero molecularmente impresso para lumefantrina	144
5.4.1	Otimização de protocolo de síntese para polímero molecularmente impresso	144
5.4.2	Caracterização quanto à morfologia	157
5.4.3	Caracterização quanto à estabilidade térmica	163
5.4.4	Caracterização por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta com transformada de Fourier (FTIR)	166
5.4.5	Estudos de sorção	168

5.4.5.1	Estudo de sorção estática	168
5.4.5.2	Estudo de sorção dinâmica	170
5.4.6	Estudos de seletividade	172
5.4.7	Estudos de reprodutibilidade entre diferentes lotes (interlotes)	173
5.5	Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE-UV e MISPE com etapa de preparo de amostras para determinação de lumefantrina em plasma humano	174
5.5.1	Desenvolvimento de método bioanalítico por CLAE-UV e MISPE com etapa de preparo de amostras para determinação de lumefantrina em plasma humano	174
5.5.2	Desenvolvimento da etapa de preparo de amostras por extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE)	174
5.5.3	Validação do método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano empregando CLAE-UV e MISPE como etapa de preparo de amostras	199
5.5.3.1	Seletividade	199
5.5.3.2	Efeito residual ou efeito de <i>carryover</i>	203
5.5.3.3	Efeito de matriz	204
5.5.3.4	Recuperação	206
5.5.3.5	Curva de calibração (linearidade)	207
5.5.3.6	Precisão e exatidão	210
5.5.3.7	Estabilidade dos analitos em matriz biológica	212
5.5.3.8	Estabilidade dos analitos em solução (ES)	213
6	CONCLUSÕES	215
	REFERÊNCIAS	216
	ANEXO	232

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença de origem parasitária, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, principalmente as espécies *P. vivax* e *P. falciparum*, responsável pela forma mais grave e letal da doença. A transmissão é vetorial, causada pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, popularmente conhecidos como mosquitos-prego, durante seu repasto sanguíneo. A malária pode se manifestar de forma não complicada ou de forma complicada e grave, o que dependerá da espécie de parasita, da parasitemia, tempo de infecção e histórico de exposição anterior. Dados epidemiológicos apontam que, embora em declínio, a malária continua sendo um grave problema de saúde pública em muitos países subtropicais, incluindo o Brasil, especialmente na região da Amazônia Legal, que concentra mais de 99% das notificações de malária no país. Em 2011, por exemplo, foram registrados 143.145 casos de malária no Brasil, incluindo 36 óbitos, demonstrando a necessidade de medidas mais eficazes para redução da morbimortalidade dessa enfermidade (BRASIL, 2010; NEVES *et al.*, 2012; WHO, 2015).

No Brasil, o combate à malária é realizado por meio do Programa Nacional de Controle de Malária (PNCM) que se utiliza de muitas ferramentas, sendo a principal delas a disponibilização gratuita de medicamentos em unidades do Sistema Único de Saúde (SUS). O tratamento farmacoterapêutico emprega diferentes fármacos antimaláricos, geralmente associados, que procuram atingir o parasita nas diferentes etapas do seu ciclo biológico. A associação entre lumefantrina e arteméter, em comprimidos de dose fixada combinada, é o tratamento de primeira escolha para infecções causadas por *P. falciparum* e para infecções mistas (BRASIL, 2010). Uma vez que o medicamento foi administrado, é importante assegurar que a concentração plasmática dos fármacos encontra-se acima da dose terapêutica necessária, pois doses subterapêuticas estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de resistência e, por consequência, ao insucesso da terapia. Para isso, o emprego de métodos analíticos adequados para a determinação dos fármacos em amostras de origem biológica é essencial (NATAL, 2002; CASSIANO *et al.*, 2006; DEVANSHU *et al.*, 2010).

Considerando a grande complexidade das matrizes biológicas, a etapa de preparo de amostra é crucial para que se alcance resultados confiáveis. A extração em fase

sólida empregando polímeros molecularmente impressos (MIPs) aparece como uma alternativa promissora para preparo de amostras, oferecendo elevada seletividade e uma produção relativamente simples, fácil e barata, quando comparado aos imunossorventes. Os MIPs são polímeros sintetizados ao redor de uma molécula molde (*template*), criando sítios de ligação altamente seletivos, capazes de sorver o analito de interesse de maneira similar ao reconhecimento molecular antígeno-anticorpo, mas apresentando maior estabilidade físico-química, mecânica (TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008).

Os MIPs foram inicialmente propostos por Wulf e Sarhan, em 1972, para separação de açúcares em misturas racêmicas. Desde então, tem sido observado um grande crescimento no número de trabalhos empregando esses polímeros, principalmente a partir da década de 1990, nas mais diversas áreas de atuação, como bioquímica, alimentos, química e farmacêutica. O emprego de MIPs para extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) demonstra resultados promissores, permitindo extrações seletivas e fatores de pré-concentração elevados para determinação de diferentes classes de fármacos a partir de amostras biológicas (WULFF, SARHAN, 1972; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; FIGUEIREDO, 2009).

Inúmeros parâmetros reacionais, como monômero funcional, *crosslinker*, solvente porogênio, temperatura, velocidade de agitação e proporções entre os reagentes de síntese podem influenciar nas propriedades físico-químicas e estruturais desses materiais e, portanto, em sua qualidade e eficiência. É necessário, por isso, que a seleção das condições reacionais seja efetuada de maneira racional (TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005). O uso de planejamentos experimentais e metodologias de superfície de resposta, como planejamento do tipo Box-Behnken e Doehlert, são uma ferramenta importante para otimização de condições experimentais, permitindo que parâmetros sejam otimizados e que respostas desejadas sejam maximizadas de maneira racional e rápida, utilizando-se um número reduzido de experimentos. O emprego da quimiometria tem se ampliado recentemente para diferentes finalidades, incluindo, por exemplo, a otimização de métodos analíticos por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (FERREIRA *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2008).



Em tais circunstâncias, com o presente trabalho, objetivou-se a síntese de polímero molecularmente impresso para extração do fármaco antimalárico lumefantrina, posteriormente empregado como fase estacionária na etapa de preparo de amostras plasmáticas por MISPE. Deve-se ressaltar que, até o presente momento não está descrito na literatura o desenvolvimento de MIP para extração de lumefantrina e o seu emprego em MISPE. As condições reacionais para esse MIP foram otimizadas utilizando-se planejamento experimental Box-Benhken, para definição do monômero funcional, *crosslinker* e solvente porogênio mais adequado. Um método bioanalítico por CLAE, com detecção por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, foi posteriormente otimizado, com auxílio de planejamento Doehlert, e validado, conforme normatização específica, para quantificação de lumefantrina em plasma humano.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar método para determinação de lumefantrina em plasma humano, por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), empregando extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) como técnica de preparo de amostras.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar, por planejamento experimental Box-Behnken, um protocolo de síntese de polímero molecularmente impresso para extração de lumefantrina de plasma humano;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas e estruturais do polímero molecularmente impresso obtido;
- Otimizar e validar um método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (CLAE-UV) para determinação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo;
- Desenvolver e validar um método bioanalítico por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (CLAE-UV) empregando extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) para determinação de lumefantrina em plasma humano;
- Avaliar a influência da utilização de uma etapa prévia de precipitação proteica na etapa de preparo de amostras.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Malária

A malária, referida ainda como paludismo, impaludismo, febre palustre, maleita, febre intermitente, febre terçã benigna ou sezão, é uma doença infecciosa, de origem parasitária, que possui como agente etiológico protozoários do gênero *Plasmodium*. Entre as inúmeras espécies de plasmódio existentes, estão relacionadas à malária humana as espécies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale* e *P. knowlesi*. No Brasil, predominam as infecções por *P. vivax*, responsáveis por mais de 90% dos casos, seguidas das infecções por *P. falciparum*, responsável pela forma mais grave e letal. Não há registros no país da transmissão autóctone de *P. ovale*, que se encontra restrita a regiões da África, enquanto infecções por *P. knowlesi* tem sido relatadas no sudeste asiático.

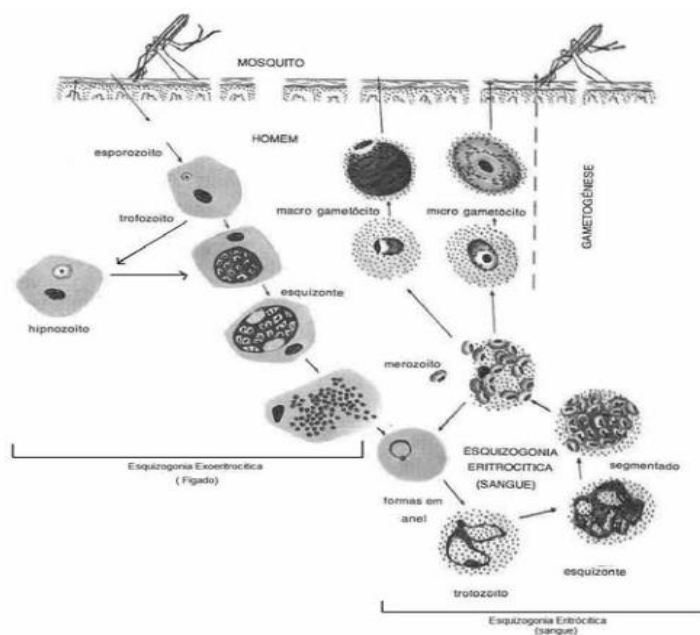
##### 3.1.1 Transmissão e ciclo biológico do parasita

A malária é transmitida de forma vetorial, ocorrendo, principalmente, por meio da picada de fêmeas de mosquitos anofelinos infectadas, popularmente conhecidos por mosquitos-prego, durante o seu repasto sanguíneo, sendo que a espécie mais frequentemente associada à malária no Brasil é a *Anopheles darlingi* e, eventualmente, a *Anopheles aquasalis*. Os anofelinos apresentam um comportamento altamente antropofílico e endofágico, se reproduzem preferencialmente em locais de águas límpidas, quentes, sombreadas, de baixo fluxo e com pouco aporte de matéria orgânica e sais, comumente encontradas nos países tropicais, incluindo a região da Amazônia. O homem é o principal reservatório com relevância epidemiológica para a malária (NEVES *et al.*, 2012; BRASIL, 2009; BRASIL, 2010; WHO, 2015).

O ciclo biológico do parasito divide-se basicamente em duas fases: uma fase sexuada, em que o protozoário se desenvolve no aparelho digestivo dos vetores (onde ocorre a fecundação) e uma fase assexuada, que se desenvolve no hospedeiro humano. A fase assexuada, por sua vez, subdivide-se em dois ciclos: a esquizogonia exoeritrocítica ou esquizogonia hepática, que ocorre no interior dos hepatócitos, e a esquizogonia eritrocítica, que ocorre no interior das hemácias,

caracterizando o padrão sintomático paroxístico e intermitente da malária. O início da infecção se dá quando esporozoítos do parasita são inoculados na pele do hospedeiro, após picada do vetor. Os esporozoítos inoculados invadirão os hepatócitos, de 30 minutos a uma hora após a inoculação, multiplicando-se e dando origem a milhares de novos parasitas, agora sob a forma de merozoítos. Esse primeiro ciclo da fase assexuada da infecção é intitulado esquizogonia hepática (NEVES *et al.*, 2012; BRASIL, 2010; WHO, 2015). Os merozoítos então romperão os hepatócitos e atingirão a circulação sanguínea, onde posteriormente invadirão as hemácias, iniciando o segundo ciclo da fase assexuada, a esquizogonia sanguínea, responsável pela fase sintomática da malária. Após invadirem as hemácias, os merozoítos iniciam ciclos de multiplicação eritrocitária, que se repetem em intervalos regulares, iguais a 48 horas para as infecções pelas espécies *P. vivax* e *P. falciparum* e iguais a 72 horas para infecções por *P. malariae* sanguíneo. Depois de algumas gerações, alguns merozoítos podem se diferenciar nas formas sexuais do parasita, genericamente denominadas de gametócitos. Os gametócitos não se multiplicam no interior das hemácias; entretanto, após a ingestão desses pelo vetor durante o seu repasto sanguíneo, ocorrerá fecundação no aparelho digestivo do inseto, dando início à fase sexuada do ciclo. A **Figura 1** ilustra o ciclo biológico da espécie *P. vivax* (BRASIL, 2009; BRASIL, 2010; NEVES *et al.*, 2012; WHO, 2015).

**Figura 1 – Ciclo biológico do agente etiológico da malária *Plasmodium vivax*.**



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2010.

### 3.1.2 Quadro clínico e diagnóstico

A malária se manifesta nas formas de malária não complicada e malária grave e complicada. A gravidade do quadro clínico da malária dependerá diretamente da espécie do parasita responsável pela infecção, da parasitemia, do tempo da doença e ainda do nível de imunidade adquirida do paciente infectado. Em casos de malária não complicada, o quadro clínico é caracterizado por sinais e sintomas clínicos inespecíficos, como episódios regulares de febre, com temperaturas iguais ou superiores a 40 °C, calafrios e sudorese, podendo estar acompanhadas por cefaleia, mialgia, fadiga, desconforto abdominal, náuseas e vômitos. Essas crises agudas (paroxismos) normalmente apresentam duração variável de 6 a 12 horas; a febre, no entanto, pode tornar-se intermitente após os primeiros paroxismos. O grande problema desse quadro de malária não complicada reside justamente na inespecificidade de sinais e sintomas, que podem facilmente confundir-se com os de outras inúmeras enfermidades, principalmente as de origem viral, como dengue, febre amarela, febre tifoide e leptospirose. O diagnóstico laboratorial diferencial faz-se, portanto, imprescindível antes de iniciar-se a farmacoterapia (DE CARLI, 2008; BRASIL, 2010; WHO, 2015).

Em casos de malária complicada, estão presentes manifestações clínicas e alterações laboratoriais mais sugestivas, que indicam necessidade de tratamento mais específico e internação. No caso de malária grave, são comumente relatadas a ocorrência de acidose metabólica, hemorragias, prostração, alteração da consciência, dispneia ou hiperventilação, hipotensão arterial ou choque, hemoglobinúria, convulsões, icterícia, hiperpirexia (acima de 41 °C), oligúria, hiperparasitemia, anemia severa, hipoglicemia, hiperlactemia, deficiência renal aguda, edema pulmonar e até mesmo coma, em casos de malária cerebral (BRASIL, 2010; WHO, 2010; MIRANDA, 2013; WHO, 2015).

O diagnóstico de malária é realizado por intermédio de testes microscópicos ou de ensaios imunocromáticos. O diagnóstico microscópico é baseado na investigação da presença do parasita no sangue do paciente, sendo o exame microscópico por gota espessa de sangue o método mais frequentemente utilizado. O diagnóstico pelo exame de gota espessa é considerado padrão-ouro para detecção e identificação de parasitas no sangue, principalmente por permitir a diferenciação entre as espécies e

entre os estágios do ciclo evolutivo dos plasmódios e por possibilitar a determinação de baixas densidades de parasitas. Os testes rápidos imunocromáticos aparecem como alternativa para diagnóstico da malária. Esses testes se baseiam na detecção antigênica dos parasitas, empregando-se anticorpos monoclonais, usando kits disponíveis comercialmente. Os resultados são fornecidos em aproximadamente 20 minutos, sendo de execução simples e fácil interpretação, além de dispensarem o uso de microscópios e não requererem pessoal muito capacitado ou experiente. Existem, contudo, desvantagens de sua utilização, como o fato de não diferenciarem entre as espécies de plasmódio (*exceto P. falciparum*), não estimarem parasitemia e não detectarem infecções mistas, sem contar o custo comparativamente elevado. Existe ainda a opção de diagnóstico por técnicas moleculares, incluindo reação de polimerase em cadeia (PCR), convencional ou em tempo real. O seu elevado custo, a dificuldade de interpretação, a falta de infraestrutura e a falta de mão de obra especializada são fatores que restringem o emprego dessa técnica diagnóstica (GUERIN *et al.*, 2002; BRASIL, 2010; REY, 2011; WHO, 2015).

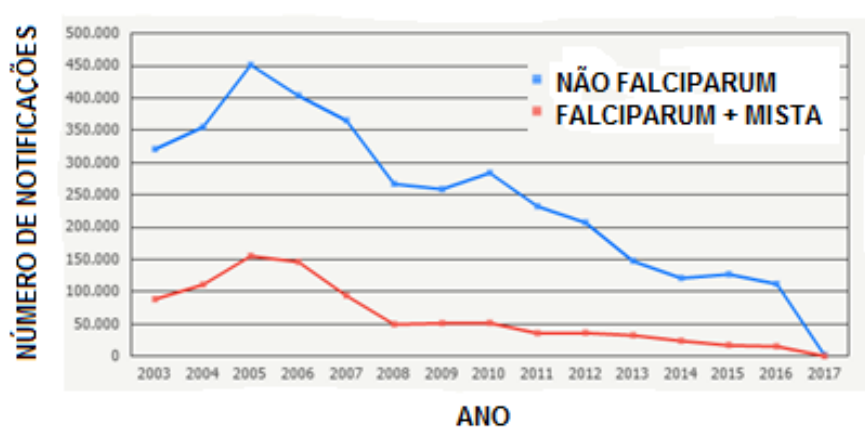
### 3.1.3 Quadro epidemiológico no Brasil e no mundo

Ainda que esforços e iniciativas para a erradicação da malária sejam constantes, a doença, ainda atualmente, constitui-se como um grave problema de saúde pública, sendo uma causa importante de mortalidade e morbidade no mundo. Estima-se que cerca de 50% da população mundial esteja sob risco de contrair malária, surgindo, a cada ano, 300 milhões novos casos e ocasionando mais de um milhão de mortes, especialmente entre crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas do continente africano. Em 2015, o número de casos de malária no mundo apresentou uma importante redução de 18% para notificações e de 50% para óbitos, mas mais de 214 milhões de pessoas ainda foram afetadas pela enfermidade. A grande maioria dos casos e óbitos por malária está concentrada nos países africanos (cerca de 90%), mas o sudeste da Ásia (cerca de 10%) e a região mediterrânea (cerca de 2%) ainda representam áreas endêmicas para a doença (BRASIL, 2010; WHO, 2015).

No Brasil, embora se observe um declínio de casos absolutos e da forma mais grave da doença (**Figura 2**), o quadro epidemiológico ainda é preocupante. Em boletim epidemiológico recente, a estimativa é de que, no período compreendido entre 2000

e 2011, uma média de mais de 400.000 pacientes foram notificados como portadores de malária anualmente. Em 2011, apesar de uma redução significativa nos índices de morbimortalidade, um total de 348.899 casos (incluindo 69 óbitos) ainda foi registrado. Em 2014, a redução foi ainda mais significativa, mas 143.415 notificações foram efetuadas, com 36 óbitos. Em aproximadamente 80% dos casos, a espécie responsável pela infecção no Brasil é *P. vivax* (DE CARLI, 2008; BRASIL, 2010; BRASIL, 2013; WHO, 2015).

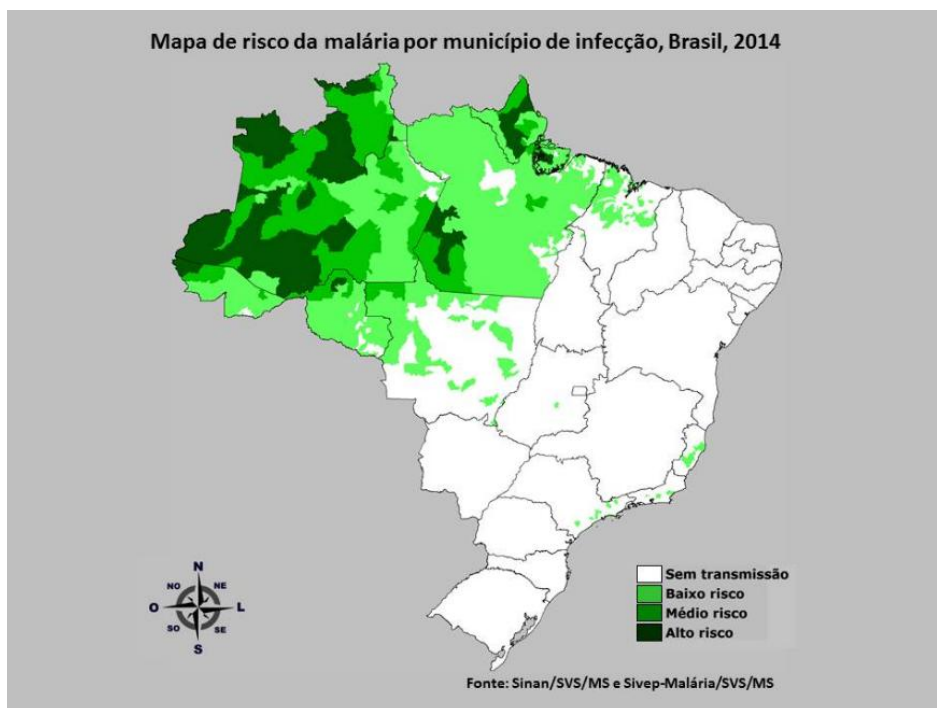
**Figura 2 – Declínio da incidência de malária por *Plasmodium falciparum* no Brasil, entre 2003 e 2017.**



Fonte: Adaptado de Portal da Saúde – SVS.

A Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e Maranhão, é a região em que o risco de transmissão da malária pode ser classificado como médio ou alto, concentrando quase a totalidade (99,7% segundo dados do Ministério da Saúde, referentes ao período de 2000 a 2011) dos casos da doença notificados no país, conforme mostrado na **Figura 3**. Apesar disso, em algumas cidades dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo, principalmente aquelas localizadas em regiões de Mata Atlântica, um número menor de casos ainda é notificado (transmissão residual). Em Minas Gerais, por exemplo, 53 notificações e 2 óbitos por malária foram registrados em 2016, nas cidades de Diamantina, Lima Duarte e Simonésia. Recentemente, nos primeiros dias de 2017, um surto de malária causada por *P. vivax*, provavelmente relacionado ao garimpo na região, causou alerta e reforço nas ações de proteção individuais e coletivas da Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais (DE CARLI, 2008; BRASIL, 2010; REY, 2011; BRASIL, 2013; WHO, 2015; MINAS GERAIS, 2016; PARREIRAS, 2017).

**Figura 3 – Mapa de risco para infecção por malária no Brasil, por estado, em 2014.**



Fonte: BRASIL, 2010.

### 3.1.4 Tratamento de malária no Brasil

A política nacional de combate à malária no Brasil se fundamenta no Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), do Ministério da Saúde. O PNCM possui como principais objetivos reduzir a incidência, a mortalidade e a morbidade dos casos de malária, especialmente os causados por *P. falciparum*, eliminar a transmissão da doença nas áreas urbanas e garantir a ausência da doença nos locais em que a transmissão foi erradicada. Para que tais objetivos sejam alcançados, o programa lança mão de estratégias importantes, como diagnóstico precoce, medidas específicas de controle do vetor e tratamento oportuno e adequado com fármacos antimaláricos (BRASIL, 2009; BRASIL, 2010).

Em relação à farmacoterapia, o tratamento da malária é padronizado e realizado com a utilização de diferentes fármacos, visando atingir o parasita em pontos críticos de seu ciclo evolutivo, como a interrupção da esquizogonia sanguínea, a destruição de formas latentes (hipnozoítos) ou a interrupção da transmissão pela cessação do desenvolvimento dos gametócitos. O tratamento farmacoterapêutico objetiva a prevenção da manifestação dos sintomas e sinais clínicos, uma vez que não é



possível, farmacologicamente, impedir a infecção. Levando-se em consideração que nenhum dos antimaláricos atualmente disponíveis é eficaz contra todos os estágios hepáticos e eritrocíticos dos plasmódios, que normalmente coexistem nos pacientes infectados, o tratamento farmacoterapêutico pode requerer mais de um fármaco para atingir o seu objetivo, estando disponíveis inúmeros esquemas terapêuticos baseados na combinação de dois ou mais fármacos antimaláricos. Para maior eficácia e segurança, utiliza-se associação de, pelo menos, um esquizonticida ou gametocitocida e um hipnozoitocida em infecções causadas por *P. vivax* (BRUNTON, LAZO, PARKER, 2010; BRASIL, 2009; BRASIL, 2010; WHO, 2015).

A decisão por um esquema terapêutico específico mais adequado é essencial para assegurar um tratamento eficaz e seguro, devendo considerar aspectos como a espécie de plasmódio infectante, a presença de resistência da espécie do plasmódio infectante ao antimalárico de escolha, a idade do paciente, o histórico de exposição do paciente (primoinfecção ou reinfeção), condições associadas (gravidez e alguns problemas de saúde) e ainda a gravidade do quadro clínico. Os antimaláricos disponíveis podem ser classificados, em termos práticos, segundo suas características químicas ou ainda segundo sua atividade, isto é, segundo o seu alvo de ação no ciclo biológico do plasmódio (NEVES *et al.*, 2012; BRASIL, 2009; BRUNTON, LAZO, PARKER, 2010).

Atualmente, os fármacos antimaláricos empregados no Brasil são: cloroquina, primaquina, artemeter, lumefantrina, artesunato, mefloquina, quinina, doxiciclina e clindamicina. Para o tratamento de infecções por *P. vivax*, Ministério da Saúde e Organização Mundial da Saúde preconizam o emprego de primaquina e cloroquina; há, contudo, relatos de cepas de *P. vivax* resistentes à cloroquina, inclusive no Brasil, estando relacionadas a casos de recrudescência. Em casos de resistência e em infecções provocadas por *P. falciparum*, o tratamento de primeira escolha é uma associação entre arteméter + lumefantrina e primaquina (ou uma associação entre artesunato + mefloquina e primaquina) (BRASIL, 2001; BRASIL, 2010; WHO, 2015). A **Tabela 1** correlaciona os principais antimaláricos à sua classificação por categoria química e por atividade, conforme proposto por Sweetman *et al.* (2005).

**Tabela 1 – Classificação dos principais fármacos antimaláricos empregados atualmente.**

Fármaco	Categoria química	Atividade
Cloroquina	4-aminoquinolina	Esquizonticida sanguíneo de ação rápida. Atividade gametocitocida marginal.
Primaquina	8-aminoquinolina	Esquizonticida tecidual. Apresenta atividade gametocitocida e atua em outras fases do ciclo de vida do parasita.
Quinina, Mefloquina	4-metanolquinolina	Esquizonticidas sanguíneos de ação rápida.
Artesimina e derivados (artesanato e arteméter)	Lactona sesquiterpênica	Esquizonticida sanguíneo.
Proguanil	Biguanina	Esquizonticida tecidual e esquizonticida sanguíneo de ação lenta.
Primetamina	Diaminopirimida	Esquizonticida tecidual e esquizonticida sanguíneo de ação lenta.
Lumefantrina	Ariloamino-alcóois	Esquizonticida sanguíneo.
Doxiciclina	Tetraciclina	Esquizonticida sanguíneo.
Clindamicina	Licosamidas	Esquizonticidade sanguíneo de ação rápida.

Fonte: Adaptado de SWEETMAN *et al.* (2005).

### 3.1.5 Lumefantrina

A lumefantrina (**Figura 4**), também denominada benflumetol, é um fármaco antimalárico pertencente à classe dos arilamino-álcoois, como quinina, mefloquina e halofantrina. Há duas formas enantioméricas, mas não se observou diferença significativa para atividade antimalárica entre os isômeros. A **Tabela 2** lista as principais propriedades físico-químicas da lumefantrina (WERNSDORFER *et al.*, 1998; THE MERCK, 2006; CÉSAR, 2009).

**Figura 4 – Estrutura química da lumefantrina.**

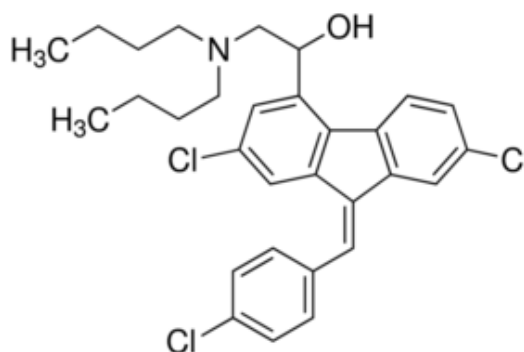


Tabela 2 – Características e propriedades físico-químicas da lumefantrina.

Característica ou propriedade físico-química	
Fórmula química	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> Cl <sub>3</sub> NO
Nome químico	(1RS)-2-(dibutilamino)-1-1{(9Z)-2,7-dicloro-9-[(4-clorofenil)metilideno]-9H-fluoreno-4-il}etanol
Número CAS	82-186-77-4
Número DCB	5462
Massa molar	528,94 g/mol
Características físicas	Pó amarelo fino e cristalino
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em clorofórmio e acetato de etila, solúvel em diclorometano, pouco solúvel em metanol e etanol.
pKa	9,78
log P	9,19
Ponto de fusão	129-131 °C
Ponto de ebulição	587-697 °C

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2012; FARMACOPEIA, 2010; INTERNATIONAL, 2015.

O fármaco está presente na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2014), em associação com arteméter, sendo recomendada para tratamento de malária não complicada, em infecções causadas por *P. falciparum* e para o tratamento de infecções mistas causadas por *P. falciparum* + *P. vivax* ou *P. ovale*, em esquemas curtos e longos e no tratamento de infecções por *P. falciparum* em gestantes no segundo e terceiro trimestres. Essa associação é uma das terapias de combinação com artemisinina (ACT, do inglês *artemisinin-based combination therapy*), que atualmente se tornaram tratamento de primeira escolha para tratamento de infecções por *P. falciparum*, mostrando-se comprovadamente seguros e eficazes. Os fármacos estão disponíveis comercialmente em associação de dose fixa, contendo 20 mg de arteméter e 120 mg de lumefantrina, em comprimidos convencionais e comprimidos dispersíveis (TAYLOR, WHITE, 2004; BOEHM *et al.*, 2007; NOSTEN, WHITE, 2007; CÉSAR, 2009; BRASIL, 2014).

O emprego de arteméter-lumefantrina se difundiu graças aos relatos de resistência do *P. falciparum* aos outros antimaláricos. O arteméter atua de forma rápida e efetiva na diminuição da parasitemia, enquanto a ação da lumefantrina é mais tardia, apresentando efeito de longa duração. O uso conjunto previne que os plasmódios desenvolvam resistências aos fármacos, pois a probabilidade de cepas resistentes aos dois fármacos é extremamente baixa. Em relação à lumefantrina, Cui *et al.* (2015) encontraram que o principal mecanismo de resistência ocorra por mutação mediada por poliformismo em proteínas transportadoras, principalmente pelos genes de multirresistência a fármacos de *P. falciparum* (*pfmdr1*) e no gene de proteína-1

multirresistente a fármacos de *P. falciparum* (Pfmrp1). Acredita-se, ainda, que a combinação de arteméter e lumefantrina promova maior prevenção contra reinfeção que as outras ACTs disponíveis (OMARI, GAMBLE, GARNER, 2004; MARTENSSON *et al.*, 2005).

Em termos de propriedades farmacocinéticas, a lumefantrina apresenta um elevado índice de ligação a proteínas plasmáticas, superior a 99%. O seu pico de concentração é atingido lentamente, entre 8-10 horas após a administração, com uma meia-vida de eliminação de 4,5 dias. O fármaco é extensivamente metabolizado no fígado, primordialmente por enzimas do citocromo P450 3A4, sendo a desbutil-lumefantrina o principal metabólito (EZZET *et al.*, 1998; WHITE, VAN VUGT, EZZET, 1999).

### **3.2 Determinação de fármacos em fluidos biológicos**

Sabe-se que a exposição a doses subterapêuticas é uma das principais causas de resistência a diferentes fármacos, incluindo os antimaláricos. Subdoses podem estar associadas à administração de uma dose incorreta para o paciente, a problemas de adesão do paciente ao tratamento, à má qualidade dos medicamentos empregados, a interações com outros fármacos ou alimentos ou deficiências de absorção. Em qualquer dessas situações, o parasita pode ser exposto a níveis inadequados dos fármacos, contribuindo para o desenvolvimento e disseminação de resistência, acompanhado por falha terapêutica. Um dos principais desafios no tratamento da malária é justamente a presença de plasmódios resistentes aos medicamentos antimaláricos, dificultando a padronização de esquemas terapêuticos, descontinuando uso de medicamentos anteriormente eficazes, elevando o custo para erradicação da doença e provocando epidemias globais. Embora menos comum, já há descrição de índices de insucesso da farmacoterapia com arteméter-lumefantrina superiores a 5% em países sulamericanos, incluindo o Brasil, o que é preocupante e evidencia a importância de uma monitorização terapêutica nos hospitais e centros de saúde das regiões endêmicas. (MANUAL, 2001; NATAL, 2002; WHO, 2010; WHO, 2015).

Nesse contexto, é evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos bioanalíticos para a determinação de fármacos e metabólitos em diferentes fluidos biológicos, como plasma, sangue total e urina. Além da sua utilização na monitorização terapêutica, esse tipo de método é fundamental para o desenvolvimento de novos medicamentos ou formas farmacêuticas e para alterações, inclusões e notificações pós-registro. Também são cruciais para avaliar e interpretar resultados de estudos farmacocinéticos, necessários para elaboração de perfis de absorção, distribuição e eliminação de potenciais candidatos a fármacos, estudos de biodisponibilidade e estudos de bioequivalência. (BRASIL, 2002; CASSIANO *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2007; VISWANATHAN *et al.*, 2007; SAVOIE *et al.*, 2009; DEVANSHU *et al.*, 2010; EMA, 2011; FDA, 2013).

Para garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, a utilização de métodos bioanalíticos adequados é imprescindível. Os métodos atualmente empregados associam técnicas modernas de separação e detecção a procedimentos de preparo de amostras para extração e pré-concentração dos analitos. A análise de fármacos em fluidos biológicos geralmente compreende as etapas de preparo de amostras, separação, detecção e tratamento estatístico dos dados obtidos. A etapa de separação geralmente emprega cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), associada a uma técnica para detecção e quantificação dos analitos, como espectrometria de massas, espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta ou espectroscopia de fluorescência (CASSIANO, 2007).

Quando a análise se realiza em matrizes complexas, como fluidos biológicos, há necessidade de um tratamento prévio das amostras, visando a remoção de potenciais interferentes, como proteínas no plasma, soro, tecidos e leite e sais inorgânicos na urina, para minimização do efeito matriz. Proteínas, sais, lipídios, anticoagulantes e outros componentes presentes nas amostras biológicas muitas vezes reduzem a estabilidade dos analitos, além de serem incompatíveis com os sistemas cromatográficos e métodos de detecção. Dessa forma, uma etapa de preparo de amostras eficiente contribui para extração do analito da matriz, remoção de potenciais interferentes, aumento da concentração e detectabilidade do analito e produção de um método robusto, reprodutível e independente das variações da matriz. Embora seja a etapa inicial, é uma etapa crítica, que consome 61% do tempo gasto e é responsável por 30% dos erros introduzidos nas análises, sendo fator

limitante na velocidade e na confiabilidade dos resultados de métodos bioanalíticos (KING *et al.*, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2001; HOPFGARTNER, BOURGOGNE, 2003; ZHOU *et al.*, 2005; MAJORS, 1991; ABDEL-REHIM, 2006; CHANG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010).

Idealmente, o preparo de amostras deve empregar uma técnica simples, rápida, precisa, exata, reproduzível, em poucas etapas, de baixo custo, preferencialmente automatizada, que apresente elevadas recuperações e que forneça soluções finais o mais limpas quanto for possível. O não consumo ou baixo consumo de solventes orgânicos, em tempos de maiores preocupações ambientais, tem se tornado um parâmetro igualmente considerável. O emprego de duas ou mais técnicas associadas é frequente quando se deseja aumentar a eficácia da extração (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997; KING *et al.*, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2001; MITRA, 2003; ZHOU *et al.*, 2005; 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010). Um grande número de técnicas para preparo de amostras está disponível atualmente, desde as mais simples (convencionais), como extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*), precipitação de proteínas (PPT, do inglês *protein precipitation*) e extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) às mais modernas e miniaturizadas, como extração em fluido supercrítico, microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase microextraction*) e microextração por sorvente empacotado (MEPS, do inglês *microextraction by packed sorbent*). Selecionar uma dessas técnicas deve considerar propriedades físico-químicas e concentrações dos analitos, tamanho da amostra e técnica instrumental (ARAÚJO, 2009).

Simples, de fácil execução, baixo custo e comumente utilizada para o preparo de amostras biológicas, a extração líquido-líquido se baseia na solubilidade diferencial dos analitos e interferentes presentes na amostra entre dois líquidos imiscíveis. De modo geral, ocorre a partição do analito de interesse da matriz para um solvente orgânico ideal; quanto maior for a afinidade pelo solvente escolhido, maiores serão as recuperações. Os solventes normalmente utilizados são éter dietílico, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio, hexano, tolueno e éter metil-ter-butílico (MTBE, do inglês *methyl tert-butyl ether*), puros ou em misturas de dois ou mais solventes. Em procedimento empregando extração líquido-líquido, pH, força iônica, proporções entre as fases e número de extrações são parâmetros que necessitam ser otimizados para garantir recuperações mais altas. A extração líquido-líquido não é

muito aplicável para analitos hidrofílicos ou para analitos termolábeis, requer solventes de pureza elevada, possui alto consumo de amostra e solventes, com geração de grande efluente de resíduos e exposição do analista, apresenta baixa seletividade e pronunciado efeito de matriz, é muito laboriosa por envolver muitas etapas e pela dificuldade de automatização e pode haver formação de emulsões (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2001; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; LANÇAS, 2004; NIESSEN, 2006; SANTOS NETO *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2007; DEVANSHU *et al.*, 2010; KOLE *et al.*, 2011).

A precipitação de proteínas é uma técnica convencional amplamente empregada, pela facilidade e simplicidade. O princípio de separação se baseia na desnaturação proteica, quando a amostra biológica é submetida a altas temperaturas, solventes orgânicos, sais, ácidos ou bases fortes. Depois da precipitação de proteínas, as amostras são centrifugadas, colhendo-se o sobrenadante para quantificação. Duas vantagens importantes da PPT são sua capacidade em quebrar ligações entre analito e proteínas, aumentando a recuperação de analitos que se ligam extensamente às proteínas plasmáticas, e de produzir extratos mais limpos. O tempo despendido para o preparo das amostras e a necessidade de grandes volumes de solvente e amostras, contudo, restringem a utilização da PPT (TAYLOR, 2005; NIESSEN, 2006; POLSON *et al.*, 2006; SANTOS NETO *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2007; KOLE *et al.*, 2011).

Já a extração em fase sólida é uma técnica de extração líquido-sólido, que faz uso de sorventes empacotados em discos ou cartuchos, normalmente constituídos por fases estacionárias similares às utilizadas em cromatografia de fase reversa, mas com tamanho de partícula maior, para permitir uma permeabilidade razoável. Os analitos que mais fortemente interagirem com a fase estacionária, por meio de interações fracas (ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações de natureza iônica ou interações hidrofóbicas), serão os mais retidos. O procedimento básico envolve as etapas de condicionamento ou ativação do sorvente, aplicação ou carregamento (do inglês, *loading*) da amostra, limpeza para remoção dos interferentes e eluição ou dessorção dos analitos. Seletividade, recuperação e efeito matriz são inteiramente dependentes dos tipos e quantidades de sorvente e solventes utilizados no procedimento. Um grande número de fases estacionárias, de diferentes naturezas e polaridades, encontram-se disponíveis, como sorventes de

sílica pura ou quimicamente ligada a grupos polares, como amino e hidroxil ou a grupos apolares, como C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, cianopropil e fenil e sorventes de troca iônica. A SPE apresenta alta versatilidade, permitindo análise de fármacos lipofílicos e hidrofílicos com altas recuperações, maior reprodutibilidade e produtividade e consumo de menores volumes de solvente orgânico. O emprego de quantidades consideravelmente altas de sorvente e a não reutilização dos cartuchos e discos são fatores que encarecem a técnica, limitando seu uso na rotina (QUEIROZ *et al.*, 2001; HOPFGARTNER; BOURGOGNE, 2003; LANÇAS, 2004; LI, RIVORY, CLARKE, 2006; NIESSEN, 2006; CHANG *et al.*, 2007; LASÁKOVÁ, JANDERA, 2009; DEVANSHU *et al.*, 2010; RANI, MALIK, SINGH, 2012)

Atualmente, aliando interesses econômicos e ambientais, muita investigação científica tem sido realizada no sentido de se encontrar materiais que promovam extrações com altas recuperações e maior seletividade. Uma nova abordagem de SPE empregando imunossorventes foi desenvolvida, baseando-se na interação reversível e altamente seletiva que se estabelece entre antígeno e anticorpo, propiciando uma extração quase específica. Esses materiais, no entanto, demonstram pouca estabilidade, que, somadas à dificuldade e alto custo de obtenção dos anticorpos, dificultam seu emprego rotineiro. Uma alternativa promissora se apoia na utilização de materiais biomiméticos sintéticos, denominados polímeros molecularmente impressos, que embora mimetizem os anticorpos, apresentam estabilidade físico-química notadamente maior e um custo e facilidade de produção mais acessível (LASÁKOVÁ, JANDERA, 2009).

### **3.3 Determinação de lumefantrina em fluidos biológicos**

Um considerável número de trabalhos que tratam da quantificação de lumefantrina em amostras biológicas pode ser encontrado na literatura científica. Um levantamento realizado no período entre 2005 e 2017 encontrou 16 trabalhos, que estão descritos resumidamente na **Tabela 3**, em relação à matriz biológica analisada, ao padrão interno utilizado (se aplicável), à técnica de preparo de amostras empregada, aos solventes ou sorventes utilizados, às condições cromatográficas e detecção empregadas e aos resultados obtidos para limite de detecção e recuperação.



Tabela 3 – Métodos bioanalíticos para quantificação de lumefantrina em amostras biológicas publicados no período de 2005 a 2017.

Matriz	Padrão interno	Preparo de amostra	Solvente ou sorvente	Condições cromatográficas	Detecção	LQ (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
Plasma de rato	Halofantrina	PPT	Acetonitrila	FE: C <sub>18</sub> (50 x 4,6, 5 µm) FM: acetonitrila:metanol (50:50) e tampão formiato de amônio 10 mM, pH 4,5 (95:5)	ESI-MS/MS (m/z 529 → m/z 511,3)	3,9	94,6 – 109,6	WAHAJUDDIN <i>et al.</i> , 2015
Plasma humano	NC	PPT	Acetonitrila	FE: C <sub>18</sub> (250 × 4,6 mm, 5 µm) FM: metanol:acetato de amônio 0,025M, pH 3,8(48:52)	UV (216 nm)	3000,0	94,3-97,2	SANDHYA, SHUJI KUMAR, MEENA, 2015
Sangue total de camundongo e plasma humano	Isótopo deuterado de LMF (D9-LMF)	PPT	Ácido fórmico 0,1% e acetonitrila (1:3, v/v)	FE: pentafluorofenil (50 x 2,0 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (30:70, v/v)	ESI-MS/MS (m/z 530,1 → m/z 347,8)	15,6	83,6-106,5 (sangue total) 100,5-114,2 (plasma)	GOVENDER <i>et al.</i> , 2015
Plasma humano	Isótopo deuterado de LMF (D9-LMF)	PPT	Metanol e dimetilsulfóxido 1:1 v/v	FE: C <sub>18</sub> (20 x 2,1 mm; 1,9 µm) FM: ácido fórmico 0,5%:ácido fórmico 0,5% em metanol – eluição em gradiente	ESI-MS/MS (m/z 528,2 → m/z 510,2)	21,0	19,6-44,2	SILVA <i>et al.</i> , 2015
Plasma humano	Meloxicam	PPT e LLE	Acetonitrila (PPT) Hexano:acetato de etila (75:25, v/v) (LLE)	FE: C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:ácido trifluoroacético 0,0% (70:30, v/v)	UV (335 nm)	18,0	87,80–89,11	KHUDA <i>et al.</i> , 2014
Plasma humano	Halofantrina	PPT	Ácido acético 0,5% em acetonitrila	FE: C16 (150 x 4,6 mm, 3 µm) FM: Ácido trifluoroacético 0,01% em acetonitrila:ácido trifluoroacético 0,01% em acetato de amônio 0,1 M – eluição em gradiente.	UV (300 nm)	125,0	101,0-103,0	MAGANDA <i>et al.</i> , 2013

Plasma humano	Isótopo deuterado de LMF (D9-LMF)	LLE	Ácido fórmico 5% e acetato de etila	FE: C8 (50 x 2,1 mm, 5 µm) FM: ácido fórmico 0,1% em acetonitrila:formiato de amônio 10 mM, pH 4,0 – eluição em gradiente	ESI-MS/MS ( <i>m/z</i> 528 → <i>m/z</i> 510)	50,0	81,0-84,3	HUANG <i>et al.</i> , 2012
Plasma humano	Artesunato	PPT	Ácido acético glacial 0,5% em metanol	FE: ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm) FM: metanol:acetato de amônio 10 mM com 0,2% de ácido e 0,1% de ácido fórmico – eluição em gradiente	ESI-MS/MS ( <i>m/z</i> 530 → <i>m/z</i> 348)	10,0	81,4-83,2	CÉSAR <i>et al.</i> , 2011
Plasma humano	Halofantrina	LLE	Hexano:acetato de etila (70:30, v/v)	FE: fenil (250 x 3,0 mm, 4 µm) FM: acetonitrila:tampão acetate de amônio 0,1 M pH 4,9 (85:15, v/v)	UV (335 nm)	12,5	88,0-102,0	KHALIL <i>et al.</i> , 2011
Plasma humano	Halofantrina	PPT e SPE	Acetonitrila (PPT) Copolímero de poli(divinil benzeno-co- <i>N</i> -vinilpirrolidona (SPE)	FE: C18 (100 x 2,1 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:ácido fórmico 0,1%– eluição em gradiente	ESI-MS/MS ( <i>m/z</i> 530,2 → <i>m/z</i> 512,4)	2,0	49,7-89,9	SETHI, DUA, JAIN, 2011
Sangue total	NC	PPT e SPE	Acetonitrila:Ácido acético 0.5 M (50:50, v/v) (PPT) C8 (SPE)	FE: C18 (150 x 2,0 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:formiato de amônio 20 mM com 1,0% de ácido fórmico (5:95,v/v) e acetonitrila:formiato de amônio 10 mM com 1% de ácido fórmico (80:20, v/v) – eluição em gradiente.	ESI-MS	200,0 (LD)	20,0	BLESSBORN <i>et al.</i> , 2010
Plasma humano	Piperazina-bis-cloroquinolina	PPT	Ácido fórmico 0,5% em metanol	FE: C8 (50 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:tampão acetato de amônio 10 mM:ácido acético 0.05% (85:10:5, v/v/v)	ESI-MS/MS ( <i>m/z</i> 528,2 → <i>m/z</i> 510,3)	220,0	51,5-64,8	MUNJAL <i>et al.</i> , 2010

Plasma humano	Isótopo deuterado de trimipramina	PPT	Acetonitrila	FE: C18 (50 x 2,1 mm, 3 µm) FM: ácido fórmico 0,5% em acetonitrila:ácido fórmico 0,5% em formiato de amônio 20 mM – eluição em gradiente	ESI-MS/MS ( <i>m/z</i> 530,1 → <i>m/z</i> 512,1)	3,0	74,2-89,2	HODEL <i>et al.</i> , 2009
Plasma de rato	Halofantrina	LLE	Tampão fosfato 50 mM pH 3 e hexano	FE: C18 (30 x 2,1 mm, 3,5 µm) FM: acetonitrila:metanol (50:50, v/v): acetato de amônio 0,01 M pH 5,5 (90:10, v/v)	ESI-MS/MS ( <i>m/z</i> 529 → <i>m/z</i> 511,3)	2,0	76,4	WAHAJUDDIN, SINGH, JAIN, 2009
Sangue total	Halofantrina	LLE	Tampão fosfato de sódio 0,4 M pH 2, hidróxido de potássio e éter diisopropílico	FE: fenil (150 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:tampão acetato de amônio 0,1 M pH 6,5 (10:90, v/v)	UV (335 nm)	158,7	45,0-51,0	NTALE <i>et al.</i> , 2008
Sangue total	TA 3039	SPE	C8	FE: ciano (150 x 3,0 mm, 3,5 µm) FM: acetonitrila:tampão fosfato 0,1 M pH 2 (55:45, v/v) com perclorato de sódio 0,03 M	UV (335 nm)	132,2	60,0-65,0	BLESSBORN <i>et al.</i> , 2007
Plasma humano	NC	SPE	C8	FE: ciano (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:tampão fosfato 0,1 M pH 2 (58:42, v/v) com perclorato de sódio 0,01 M	UV (335 nm)	25,0	83,0-86,5	ANNERBERG <i>et al.</i> , 2005
Plasma humano	NC	SPE	C8	FE: ciano (250 x 4,6 mm) FM: acetonitrila:tampão fosfato 0,1 M pH 2 (55:45, v/v) com perclorato de sódio 0,05 M	UV (335 nm)	24,0	63,0-75,0	LINDEGARDH <i>et al.</i> , 2005

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

Os métodos encontrados empregam CLAE na etapa de separação, havendo um equilíbrio entre espectrofotometria de absorção no ultravioleta (7 trabalhos) e espectrometria de massas (8 trabalhos) como forma de detecção. A Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº. 27/2012 preconiza espectrometria de massas, uma técnica mais sensível e seletiva, no desenvolvimento de métodos bioanalíticos; todavia, a lumefantrina apresenta absorvidade molar específica no ultravioleta consideravelmente elevada (igual a  $38000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), além de atingir concentrações plasmáticas muito altas (na ordem de  $\mu\text{g/mL}$ ), viabilizando o emprego de CLAE-UV para sua quantificação em amostras biológicas (VERMA, SYED, 2009; BRASIL, 2012)

Constata-se que todos os trabalhos utilizaram técnicas convencionais, com predomínio de PPT, seguida por LLE e SPE, presentes em 11 e 5 trabalhos, respectivamente. Houve a combinação de duas técnicas de preparo de amostras em três trabalhos avaliados, com o objetivo de aumentar a seletividade do método. Somente 3 trabalhos empregaram SPE isoladamente na etapa de preparo de amostras, utilizando sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano ( $\text{C}_8$ ) como fase estacionária. Os resultados encontrados para limites de detecção e recuperação, entretanto, foram pouco satisfatórios, sendo encontradas recuperações baixas e limites de detecção relativamente elevados. Outros dois trabalhos descrevem o emprego de SPE combinada a uma etapa prévia de precipitação proteica, que, embora signifique o acréscimo de uma etapa extra no método, conduz a amostras finais mais limpas e recuperações maiores para lumefantrina. Em todos os trabalhos que empregaram SPE na etapa de preparo de amostras, foram utilizados sorventes convencionais, como  $\text{C}_8$  e copolímero de poli(divinil benzeno-co-*N*-vinilpirrolidona).

O padrão interno mais utilizado para quantificação de lumefantrina foi a halofantrina (utilizada em 6 trabalhos), um antimalárico estruturalmente

análogo e pertencente à mesma classe. Em alguns métodos, foram empregadas substâncias ainda não comercialmente disponíveis, como os propostos por Munjal *et al.* (2010) e Blessborn *et al.* (2007). Isótopos deuterados de lumefantrina, padrões internos considerados ideais quando se emprega espectrometria de massas, foram utilizados em 3 dos 18 trabalhos avaliados.

### **3.4 Polímeros molecularmente impressos (MIPs)**

O emprego de materiais mais seletivos nas etapas de preparo de amostras e separação cromatográfica tem mostrado inestimável importância devido à grande complexidade das matrizes e pelos baixos níveis dos analitos nas amostras biológicas. Entre muitas estratégias analíticas desenvolvidas nas últimas décadas para preparo de amostras, os materiais biomiméticos surgiram como uma alternativa promissora, por se basearem no reconhecimento molecular inerente aos processos biológicos, como nas interações antígeno-anticorpo, enzima-substrato e replicação do DNA, em que moléculas de interesse se ligam seletivamente a sítios presentes nas biomoléculas. Um exemplo são os imunossorventes, que se baseiam na bioafinidade antígeno-anticorpo, sendo constituídos por um anticorpo específico ligado à sílica e usados em cartuchos ou colunas cromatográficas. O uso desses imunossorventes, entretanto, esbarra em desvantagens, como custo, necessidade de purificação, dificuldade de produção e alta instabilidade. Ultimamente, buscando superar as limitações dos imunossorventes, tem-se observado o surgimento de materiais sintéticos que substituam materiais biológicos, conservando seu elevado grau de reconhecimento seletivo, por meio de uma cavidade seletiva complementar em tamanho, formato e funcionalidade química. Destacam-se, para tal finalidade, ciclodextrinas, éteres-coroa e polímeros de impressão (JOULDBAUER, MAIER, LINDNER, 2002; QIAO *et al.*, 2006, LASÁKOVÁ, JANDERA, 2009; SOUSA, BARBOSA, 2009; BELTRAN *et al.*, 2010).

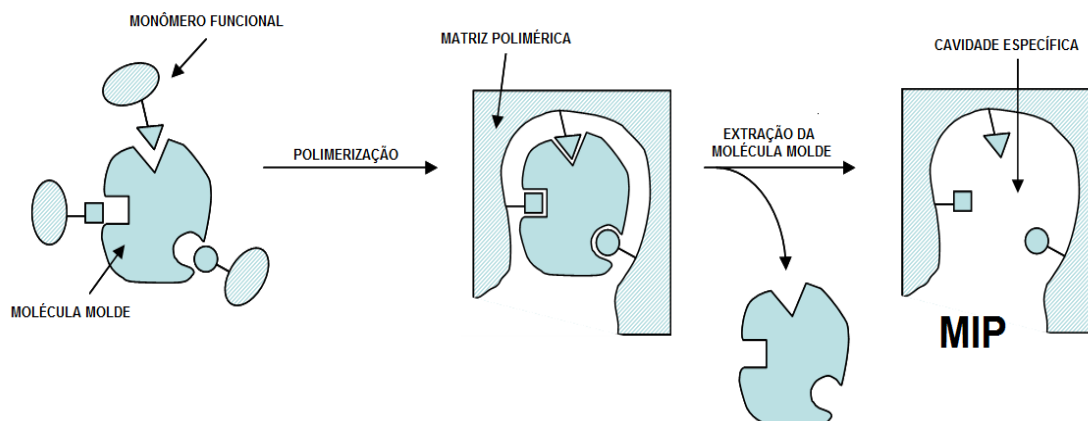
### 3.4.1 Aspectos gerais

Os polímeros molecularmente impressos (MIPs) são materiais biomiméticos sintéticos de estrutura tridimensional bastante rígida, sintetizados em torno de um complexo formado entre uma molécula molde (*template*) (como fármacos) e um monômero funcional, de modo a se produzir sítios de ligação altamente seletivos, complementares à molécula molde (*template*), que mimetizem uma interação antígeno-anticorpo, como proposto por Linus Pauling. O primeiro trabalho com MIP data de 1972, onde Wulf e Sarhan desenvolveram um polímero para separação enantioméricas de açúcares em racematos, usando ácido glicérico como molde, encontrando, porém, dificuldades na remoção da molécula molde (*template*), pela formação de ligações covalentes entre molde e polímero. Os primeiros relatos de MIPs obtidos a partir de ligações não-covalentes ocorreram na década de 1980, por Arshady e Mosbach, mas o grande salto no desenvolvimento e aplicação desses materiais ocorreu nos anos de 1990 (PAULING, 1940; DICKEY; 1949; WULFF, SARHAN, 1972; ARSHADY, MOSBACH, 1981; 2004; VALCÁRCEL, LENDLL, 2004; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005).

Os MIPs apresentam elevada seletividade, maior estabilidade físico-química (frente a pH, solventes e temperatura), maior capacidade de sorção, produção mais simples e barata, utilização em múltiplos ciclos e boa reprodutibilidade, mostrando-se muito versáteis e promissores para aplicação em muitas áreas, como química analítica, farmacêutica e de alimentos. O processo de obtenção dos MIPs é, no geral, bastante simples. Usa-se uma molécula molde (*template*), que pode ser o analito de interesse ou uma molécula estruturalmente relacionada, que interage com um monômero funcional, quando dissolvidos em solvente porogênio. Em seguida, adiciona-se um agente de ligação cruzada (*crosslinker*), responsável pela promoção de ligações cruzadas, por meio de reação de polimerização, iniciada por um iniciador radicalar, para que se forme uma rede tridimensional e seletiva. Após a síntese, o molde é removido por solvente adequado, quando as interações estabelecidas forem não-covalentes, ou por clivagem química, quando as interações forem covalentes, por extração por Soxhlet ou centrifugação. Um esquema dos procedimentos para se obter um MIP está ilustrado na **Figura 5**

(CARO, MARCE, BORRULL, 2006; TAMAYO, TURIEL, MARTÍN-ESTEBAN, 2007; SARAFRAZ-YAZDI, RAZAVI, 2015).

**Figura 5 – Representação esquemática das etapas para obtenção de polímeros molecularmente impressos.**



Fonte: Adaptado de Sarafaz-Yazdi e Razavi (2015).

A seleção criteriosa de molde, monômero funcional, *crosslinker*, iniciador radicalar, solvente porogênio e condições reacionais é uma etapa inicial crítica para a produção de MIP. Idealmente, o analito que funcionará como molécula molde (*template*) deve possuir grande número de grupos funcionais capazes de interagir com o monômero, formando um complexo molde-mônomo estável (com formato ou *shape* adequado), para que os materiais obtidos apresentem seletividade e capacidade de sorção adequadas. Em contrapartida, é importante que as moléculas não apresentem grupos que acelerem ou retardem as reações de polimerização, como grupos tióis, ou grupos polimerizáveis. O tamanho do molde é importante, sendo preferido analitos com grupos funcionais com baixo impedimento estérico. Outro fator essencial é a estabilidade dos analitos nas temperaturas empregadas na síntese, normalmente superiores a 60 °C, se aquecimento for o método para ativação do iniciador (KATZ, 1999; COMARCK, ELORZA, 2004; SPIVAK, 2005; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008; GRASSI, 2008; SILVA, 2009).

Uma infinidade de monômeros funcionais está disponível, podendo ser empregados isoladamente ou como misturas de dois ou mais monômeros. A escolha de um monômero deve ser sempre pautada na natureza do analito, buscando maximizar as interações entre ele e molde, propiciando a formação de um complexo estável para que o MIP apresente as propriedades desejadas.

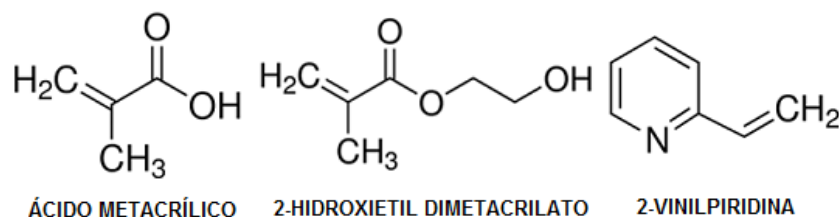
Os monômeros são empregados em quantidades excessivas em relação ao molde, com intuito de se deslocar o equilíbrio na direção da formação do complexo molde-monômero. Proporções molares de 4:1 são comuns, mas proporções maiores (12:1 a 20:1) foram ocasionalmente descritas (MOSBACH, ANDERSSON, SELLERGREN, 1984; MOSBACH, 1994; ANDERSSON, PAPRICA, ARVIDSSON, 1997; ANDERSSON, 2001; MARTIN-ESTEBAN, 2001; SELLERGREN, 2003; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005).

As interações entre monômero e molde podem ocorrer por meio de ligações covalentes ou de interações não-covalentes, como ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica e interação hidrofóbica. Os polímeros sintetizados por ligações covalentes possuem sítios mais seletivos e uniformes, mas são menos frequentes, pois somente um número limitado de analitos e monômeros são capazes de interagir covalentemente, a cinética de sorção é lenta e há maior dificuldade para remoção do molde. Por outro lado, polímeros sintetizados por ligações não-covalentes, embora menos seletivos, apresentam maior flexibilidade, sendo mais frequentemente encontrados (TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; PICHON, 2006; FERNANDES, 2012; PEÇANHA, 2012).

O ácido metacrílico (AMA) aparece como o monômero mais utilizado, por atuar como doador e receptor de ligações de hidrogênio, podendo interagir com o analito por interações iônicas. Todavia, por sua natureza predominantemente ácida, o AMA e seus derivados, como o 2-hidroxietil metacrilato (2-HEMA), são mais comumente empregados na síntese de MIP para analitos básicos. Já para analitos ácidos, monômeros de caráter básico, como vinilpiridinas e vinilimidazóis, que interagem por ligações de hidrogênio, interações iônicas e por transferência de cargas, são preferidos, sendo a 2-vinilpiridina (2-VP) o monômero mais comum. Em geral, estabelece-se como regra: monômeros ácidos para moldes básicos, monômeros básicos para moldes ácidos. As estruturas químicas de AMA, 2-HEMA e 2-VP são ilustradas na **Figura 6** (ANDERSSON, SELLGREN, MOSBACH, 1984; MARTÍN-ESTEBAN, 2001; COMARCK, ELORZA, 2004; SPIVAK, 2005; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; BELTRAN *et al.*, 2010).

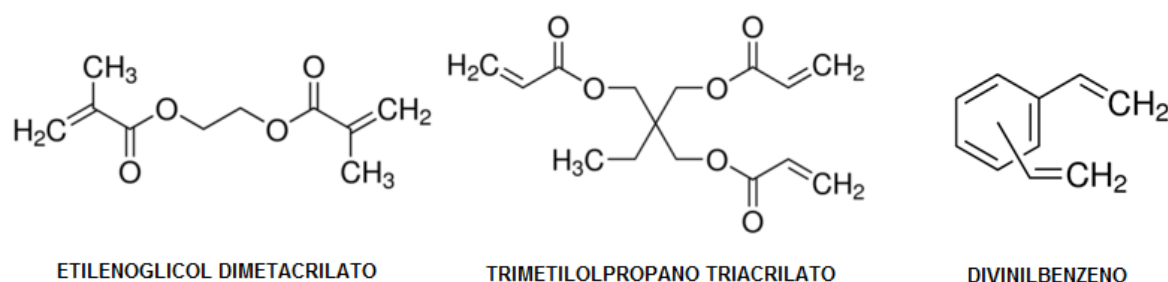


Figura 6 – Estrutura química dos monômeros funcionais ácido metacrílico, 2-hidroxiethyl metacrilato e 2-vinilpiridina.



Após a formação do complexo molde-monômero, os *crosslinkers* são fundamentais para a formação de uma rede polimérica tridimensional rígida, que estruture e mantenha a cavidade seletiva após a remoção do molde. Os *crosslinker* estão relacionados, ainda, às propriedades físico-químicas desejáveis para MIP, como estabilidades química, mecânica e térmica e rápida transferência de massa; portanto, a definição de *crosslinker* ideal é importante. Os *crosslinkers* são usados em proporções cerca de 5 vezes maiores que a quantidade de monômero funcional, para garantir a porosidade e rigidez estrutural dos polímeros. O *crosslinker* mais utilizado é o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA); o divinilbenzeno (DVB), muito utilizado também, é uma alternativa quando se utiliza monômeros básicos, como 2-VP. Recentemente, o emprego de trimetilolpropano triacrilato (TRIM) demonstrou resultados similares ou superiores, em relação à capacidade de sorção, aos encontrados para o EGDMA, constituindo-se mais uma opção ao *crosslinker*. Estruturas químicas dos principais *crosslinkers* utilizados para síntese de MIP são ilustradas na **Figura 7** (SELLERGREN, 2003; MAHONY *et al.*, 2005; SPIVAK, 2005; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA; 2005; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008; SOUSA, BARBOSA, 2009; FERNANDES, 2012).

Figura 7 – Estruturas químicas dos *crosslinker* etilenoglicol dimetacrilato, divinilbenzeno e trimetilolpropano triacrilato.

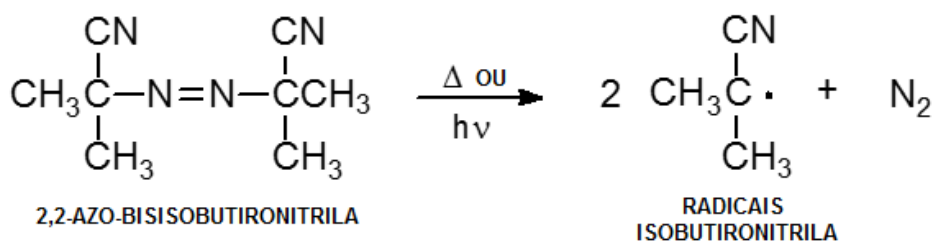


Mais do que simples solventes para analitos e reagentes, os solventes porogênicos desempenham um papel relevante na síntese de MIP, por influenciarem na estabilidade do complexo molde-monômero formado e nas características morfológicas, como porosidade e área superficial, interferindo na capacidade de reconhecimento molecular dos polímeros obtidos. O porogênio escolhido deve ser capaz de solubilizar analito e reagentes, nas quantidades e condições experimentais empregadas, além de não interferir nas interações que se estabelecem entre molde e monômero. Portanto, solventes orgânicos apróticos, de baixa polaridade e baixa constante dielétrica, como tolueno e clorofórmio, são mais frequentemente empregados, especialmente em sínteses por meio de ligações não-covalentes. O solvente acetonitrila, embora possua constante dielétrica alta, pode ser útil para analitos menos lipossolúveis, ainda que diminua a capacidade de religação do analito ao MIP. Trabalhos que propõem a síntese de MIPs para analitos mais polares, usando metanol e água tem surgido recentemente. O emprego desses solventes pode ser inevitável, mas indiscutivelmente prejudicial, pois competirão com o analito no estabelecimento de ligações de hidrogênio com o monômero, interferindo na formação do complexo molde-monômero. É importante ressaltar que o MIP exibirá suas propriedades de seletividade e capacidades de sorção máxima no meio em que foram produzidos. Desse modo, mesmo que seja comum a síntese de MIP em solventes orgânicos e sua utilização para extração de amostras biológicas aquosas (como plasma e urina), é de se esperar que a seletividade exibida por ele nessas condições seja menos pronunciada (MATSUI *et al.*, 1997; COMARCK, ELORZA, 2004; SPIVAK, 2005; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008; HAGINAKA *et al.*, 2008; PEREIRA, 2008).

Um MIP é sintetizado a partir de uma reação de polimerização, que se subdivide em 3 fases: iniciação, propagação e terminação. O iniciador radicalar é responsável pelo desencadeamento da reação (etapa de iniciação), que ocorre após o iniciador sofrer decomposição, gerando radicais livres que reagirão com moléculas de monômero e *crosslinker*. O gás oxigênio deve ser eliminado do meio reacional, por retardar a reação de polimerização, estabilizando os radicais livres formados. Essa etapa é realizada borbulhando-

se gás nitrogênio no meio reacional ou por sonicação do meio reacional. A iniciação química desses iniciadores radicalares pode ocorrer fotoquimicamente, por exposição à luz (fotólise), induzida por radiação ultravioleta, ou termicamente, por aquecimento. Sendo assim, a escolha de um iniciador considera o tipo de interações formadas entre analito e monômero: indica-se o emprego de iniciadores ativados fotoquimicamente, a temperaturas mais baixas, quando analito e monômero interagem por ligações de hidrogênio, para perturbar menos o complexo formado. O principal iniciador utilizado para sínteses de MIP, o 2,2-azo-bis-isobutironitrila (AIBN), quando exposto à radiação ultravioleta ou a aquecimento a temperaturas superiores a 60 °C, se decompõe, produzindo radicais isobutironitrila e liberando nitrogênio gasoso. Estrutura química e reação de decomposição do AIBN são apresentadas na **Figura 8** (SELLERGREN, 2003; COMARCK, ELORZA, 2004; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; FREITAS, 2008; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008; GRASSI, 2008).

**Figura 8 – Estrutura química e reação de decomposição do 2,2-azo-bis-isobutironitrila, sob aquecimento ou radiação ultravioleta.**



### 3.4.2 Métodos de síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs)

Os MIPs são tradicionalmente sintetizados empregando-se polimerização “em *bulk*” ou “em batelada”, em que a reação se processa de forma muito simples, em um ambiente homogêneo, usando volumes menores de solvente (5-10 mL). Esse método, contudo, requer uma etapa adicional de trituração do MIP formado que, além de representar um consumo maior de tempo graças à adição de uma etapa extra para obtenção, conduz à formação de partículas de tamanhos mais heterogêneos e à destruição de sítios seletivos que haviam sido formados, diminuindo a eficiência e aplicabilidade do polímero. Apesar das desvantagens, são encontrados na literatura um grande número de trabalhos

que utilizam esse método (COMARCK, ELORZA, 2004; PÉREZ-MORAL, MAYES, 2004; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; SPIVAK, 2005, QIAO *et al.*, 2006; FIGUEIREDO, 2009).

Considerando esses problemas, muitos outros métodos para síntese de MIP foram desenvolvidos nos últimos anos, buscando contorná-los. O preparo de MIP por polimerização por precipitação ocorre de maneira análoga ao método de polimerização “em *bulk*”, utilizando, entretanto, volume de solvente 5 a 10 vezes superior (25-100 mL), para impedir agregação das partículas de polímero formadas. A reação de polimerização se processa por crescimento em cadeia, com formação de ligações cruzadas, que diminuem a solubilidade do polímero no meio reacional, levando à precipitação. São obtidas microesferas de polímero, com maior homogeneidade, diâmetros reduzidos e rendimentos superiores, pela ausência da etapa de trituração. Depois de formadas, as partículas são separadas de solvente e reagentes residuais do meio reacional por centrifugação, sendo posteriormente secas (YE, 1999; TARLEY, SOTOMOAYOR, KUBOTA, 2005; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008).

No método de polimerização por suspensão, a reação ocorre no interior de gotículas do monômero dispersas em um solvente imiscível, como água para a maior parte dos casos. Para tanto, analito e demais reagentes são inicialmente dissolvidos em um solvente orgânico apolar, que é, posteriormente, adicionado de água na presença de um agente estabilizante, com aquecimento e sob agitação. Esses agentes, normalmente polímeros solúveis em água (como álcool polivinílico) ou sais inorgânicos, têm a função de impedir a coalescência das gotículas formadas. O método também produz partículas esféricas de tamanho uniforme e facilmente separadas da fase aquosa, mas é menos prático e aplicável geralmente apenas para analitos e monômeros que interajam entre si por meio de ligações hidrofóbicas, preferencialmente. Uma adaptação dessa metodologia, proposta por Mayes e Mosbach (1999), utiliza o perfluorocarbono como agente dispersante e permitiu que o alcance desse método fosse ampliado para analitos e monômeros mais polares. O elevado preço do perfluorocarbono constitui, porém, uma importante desvantagem dessa técnica (MAYES, MOSBACH, 1999; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008)

O método de polimerização por expansão em multi-etapas é uma adaptação da polimerização por precipitação, mas leva à produção de partículas de maior diâmetro, adequadas para uso como fase estacionária de colunas para CLAE. O método se baseia na utilização de partículas poliméricas, normalmente de estireno, de diâmetros reduzidos, que sofrerão expansão com o monômero e o solvente porogênio antes da síntese do MIP. Embora produza partículas cerca de 5 vezes maiores, o método é muito mais complexo, envolvendo um número maior de etapas e requerendo maior destreza dos analistas. Os métodos de polimerização no interior de suportes sólidos permitem a obtenção de partículas esféricas e homogêneas, graças à uniformidade dos poros de sílica e resinas utilizadas. Os poros funcionam como mini frascos reacionais, nos quais a reação de polimerização se processa normalmente. Após a síntese, o material poroso é dissolvido quimicamente, por ácido fluorídrico, para separação do MIP obtido (KUBO *et al.*, 2003; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005).

### **3.4.3 Principais aplicações para polímeros molecularmente impressos (MIPs)**

Os polímeros molecularmente impressos são materiais extremamente versáteis, possuindo um número muito grande de aplicações, nas mais diferentes áreas de atuação, como as áreas farmacêutica, bioquímica, química (especialmente analítica), de alimentos, entre outras. Um importante campo de pesquisa e aplicação para os MIP consiste na sua associação com técnicas eletroanalíticas e espectrofluorimétricas, buscando o desenvolvimento de sensores de elevada seletividade (ALLENDER *et al.*, 2000; PILETSKY, ALCOCK, TURNER, 2001; TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008). Segundo Piletsky (2001) aproximadamente 20% dos MIPs produzidos são voltados para essa finalidade.

Uma aplicação possível para os MIPs diz respeito à sua utilização no desenvolvimento de formas de liberação controlada de medicamentos (FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008). Esse propósito, contudo, ainda se encontra distante, pela complexidade inerente ao desenvolvimento de

dispositivos que apresentem eficácia e segurança desejadas. Um dos principais empecilhos reside na necessidade de avaliação da toxicidade dos polímeros, dos reagentes e solventes orgânicos residuais e dos prováveis produtos de degradação. Como exemplo, o trabalho de Puoci *et al.* (2004), demonstrou o potencial de utilização de um MIP a base de AMA para liberação controlada de sulfassalazina. O uso de MIPs sintetizados em meio aquoso para esse fim seria menos problemático, embora apresentem afinidade e seletividade muito menores (FIUME, 2002; ALVAREZ-LORENZO, CONCHEIRO, 2004; PUOCI *et al.*, 2004; FIGUEIREDO, DIAS, ARRUDA, 2008; AYDIN *et al.*, 2012)

Esses polímeros vêm sendo cada vez mais largamente empregados como fases estacionárias em processos de separação, como colunas e pré-colunas de CLAE, eletroforese capilar e eletrocromatografia capilar ou cromatoplasmas para cromatografia em camada delgada, especialmente para separações de enantiômeros. Essa aplicação corresponde a mais de um terço dos trabalhos disponíveis para MIP, conforme levantamento de Pilestky *et al.* (2001). Hwang e Lee (2001) utilizaram MIP em colunas cromatográficas para separação enantiomérica de fenilpropanolamina, encontrando-se fatores de separação muito superiores aos encontrados para colunas de C<sub>18</sub>. Destaca-se ainda a associação de MIP com colunas e pré-colunas de meio acesso restrito, os RAMIPs, que surgem como aplicação promissora, eliminando a necessidade de preparo de amostras e garantindo separação seletiva, sem comprometer o funcionamento do sistema cromatográfico. Oliveira *et al.* (2013) desenvolveram um RAMIP para clorpromazina, empregando AMA, EGDMA, 2-hidroxietil metacrilato (2-HEMA) e glicerol-1,3-dimetacrilato (GDMA), glutaraldeído e albumina sérica bovina e demonstraram porcentagem de recuperação de albumina bovina pelo RAMIP superior a 99% e recuperação de 88% para a clorpromazina (HWANG, LEE, 2001; PILETSKY, ALCOCK, TURNER, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O principal emprego de MIPs na área farmacêutica, entretanto, consiste em sua utilização nas etapas de preparo de amostra, em que têm sido amplamente utilizados, associados à extração em fase sólida e microextração em fase sólida (SPME), tendo eficiência demonstrada, com recuperações e fatores de

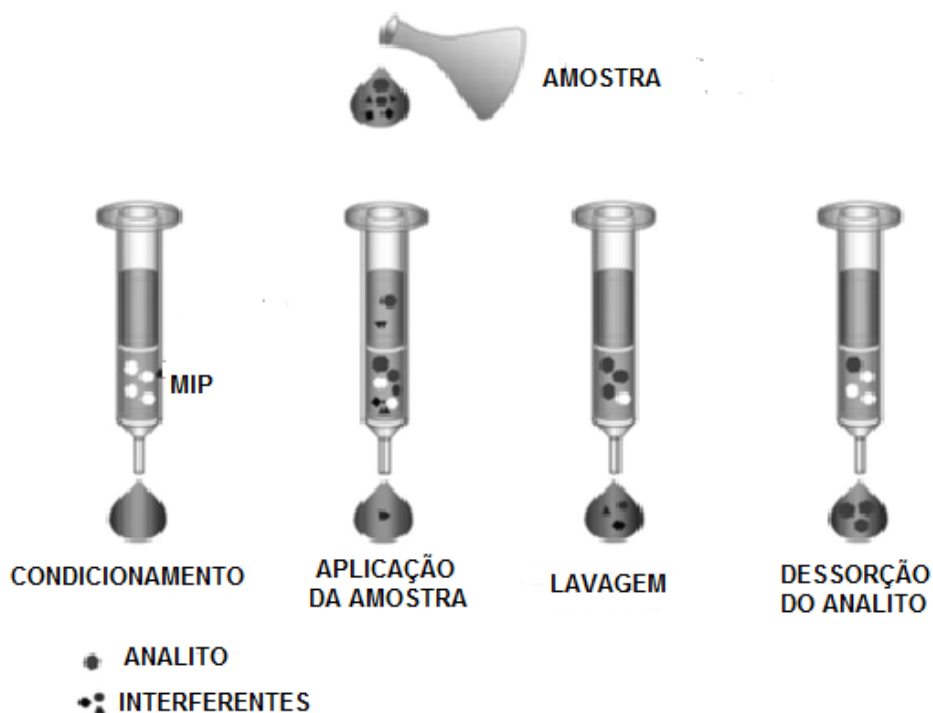
concentração consideravelmente elevados, conforme discutido a seguir (TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; FREITAS, 2008; FIGUEIREDO, 2009).

#### **3.4.4 Extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE)**

O emprego dos MIPs para o preparo de amostras vem ganhando força nas últimas décadas, por oferecerem maior seletividade quando comparados a fase estacionárias convencionais e mais estabilidade quando comparados aos imunossorventes. O uso de MIPs como fase estacionária para SPE e SPME é mais frequente, mas a associação de MIP a outras técnicas miniaturizadas, como microextração por sorvente empacotado (MEPS) e extração por sorção em barra magnética (SBME) tem crescido nos últimos anos (TARLEY, SOTOMAYOR, KUBOTA, 2005; QIAO *et al*, 2006).

A extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) obedece aos mesmos princípios e mecanismos da SPE, agregando um reconhecimento molecular altamente seletivo. O procedimento adotado para extração em fase sólida contendo polímeros molecularmente impressos pode ser realizado nos modos *online* e *off-line*. O modo *off-line* é mais frequentemente utilizado, graças à facilidade e simplicidade de sua execução. Depois do preparo dos cartuchos com o MIP, o procedimento de análise se dá pelas mesmas etapas de uma SPE convencional, conforme apresentado na **Figura 9**: condicionamento ou ativação do MIP; aplicação ou *loading* da amostra; lavagem com um solvente de baixa força de eluição para remoção de eventuais interferentes inespecificamente adsorvidos ao MIP; e, por fim, dessorção do analito de interesse com solvente ou mistura de solventes adequado (LASÁKOVÁ, JANDERA, 2009; VASAPOLLO *et al.*, 2011).

**Figura 9 – Representação esquemática de procedimento para extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) em modo *off-line*.**



Fonte: Adaptado de Lasáková e Jandera (2009).

Inúmeros trabalhos, utilizando MISPE *off-line*, são encontrados, demonstrando sua aplicabilidade para preparo de amostras na área farmacêutica. O primeiro trabalho nesse sentido foi proposto por Sellergren *et al.* (1994), para determinação de pentamidina em urina. Blomgren *et al.* (2002) empregaram MIP para extração de clenbuterol em amostras de urina, com faixa de detecção entre 0,5 ng/mL e 100,0 ng/mL e recuperações próximas a 100%. Dzygiel *et al.* (2007) descreveram o desenvolvimento e aplicação de polímeros compostos de ácido metacrílico e metacrilatos na extração de sildenafil e seu principal metabólito, desmetilsildenafil, com adequada recuperação. Andersson *et al.* (1997) utilizaram um MIP sintetizado a partir de AMA e EGDMA para extração de sameridina de plasma, com recuperações entre 97-102% e limite de quantificação inferior a 2 nmol/L. Em outro estudo, Javanbakht *et al.* (2012) desenvolveram MIP para extração de tramadol em amostras de plasma e urina. O método desenvolvido apresentou limite de quantificação de 8,5 ng/mL em plasma, com recuperação maior que 90%. Um método para determinação de efedrina em amostras de plasma foi descrito por Lasaková *et al.* (2009), tendo sido obtida recuperação próxima a 70% e elevada seletividade (SELLEGREN,



1994; ANDERSSON, PAPRICA, ARVIDSSON, 1997; BLOMGREN *et al.*, 2002; DZYGIEL *et al.*, 2007, LASÁKOVÁ *et al.*, 2009; JAVANBAKHT, MOEIN, AKBARI-ADERGANI, 2012).

O modo *online* se caracteriza por uma pré-coluna, empacotada com o polímero molecularmente impresso obtido, que está diretamente acoplada ao sistema cromatográfico. Hugon-Chapuis *et al.* (2008) desenvolveram método para determinação de alfuzosina, um  $\alpha$ -bloqueador utilizado no tratamento da hiperplasia prostática, empregando MISPE no modo *online*. Os valores de recuperação foram próximos de 100%, além de extração altamente seletiva. Em outro trabalho, Bjarnason *et al.* (1999) desenvolveram um MIP para determinação de herbicidas triazínicos de amostras de urina, extrato de maçã e ácido húmico, encontrando maior seletividade na separação e fatores de pré-concentração variando de 5 a 100 vezes. Mena *et al.* (2003) aplicaram MISPE *online* para extração de cloranfenicol em soluções oftálmicas e amostras de leite, com recuperações maiores que 99% e fator de pré-concentração de 500 vezes (BJARNASON, CHIMUKA, RAMSTROM, 1999; MENA *et al.*, 2003; HUGON-CHAPUIS *et al.*, 2008; LASÁKOVÁ, JANDERA, 2009).

### **3.5 Emprego de planejamentos experimentais e ferramentas quimiométricas na otimização de condições experimentais**

Quimiometria é o campo da química que utiliza ferramentas estatísticas para o planejamento e otimização de condições experimentais. Entende-se por otimização o processo pelo qual o desempenho de um sistema ou procedimento é aperfeiçoado no sentido de se obter o máximo benefício possível com o seu uso, isto é, de se atingir a melhor resposta possível para determinado resultado. Recentemente, o emprego de ferramentas quimiométricas na otimização de procedimentos de síntese orgânica e de métodos analíticos, inclusive métodos cromatográficos, tem se expandido, em decorrência de vantagens como redução do número de experimentos, do consumo de reagentes e da mão-de-obra laboratorial e desenvolvimento de modelos matemáticos que estimem a relevância estatística dos parâmetros

estudados, bem como de possíveis interações entre eles (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2006; EL-GINDY, HADAD, 2012; FERNANDES, 2016)

Um planejamento de experimentos pode ser entendido como um detalhamento procedimental a ser realizado para que se alcance uma resposta desejada. Os primeiros relatos de planejamento de experimentos levam a Ronald A. Fisher, estatístico que desenvolveu e aplicou a análise de variância (ANOVA) pela primeira vez, para análise estatística de projetos experimentais. Outros autores, depois, contribuíram de forma significativa para a evolução do estudo e aplicação de técnicas de planejamento experimental, como Yates, Box, Bose, Cochran e Kempthorne, dentre outros. Em um planejamento experimental, um ou mais testes são conduzidos ao se variar deliberadamente variáveis de entrada ou variáveis independentes (*inputs*) em determinado procedimento, de modo que seja possível a observação, identificação e avaliação dos efeitos dessas modificações nas variáveis de saída, referidas ainda como variáveis dependentes ou respostas (*outputs*) (GALDAMEZ, 2002; MONTGOMERY, 2012).

Os objetivos primordiais de um planejamento experimental são a melhoria e o aperfeiçoamento de um determinado procedimento de análise, com menor uso de recursos materiais e pessoais. Um planejamento experimental permite ainda identificar parâmetros que mais influenciam na resposta de interesse e controlar ou minimizar a variabilidade de determinados fatores e resultados. Tradicionalmente, a otimização de procedimentos analíticos sempre foi realizada pela variação de um parâmetro por vez, mantendo-se constantes os demais parâmetros de interesse, conduzindo a um número maior de testes e ignorando efeitos das interações entre dois ou mais fatores. Porém, os planejamentos experimentais permitem uma avaliação multivariada dos parâmetros, determinando não somente o efeito que cada um exerce individualmente sobre determinada resposta, mas também o efeito que interações entre esses parâmetros possam eventualmente exercer sobre ela. É por isso que há uma tendência atual no emprego de delineamentos multivariados de análise em detrimento a desenhos univariados (GALDAMEZ, 2002; BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2006; MONTGOMERY, 2012; FERNANDES, 2016).

A otimização multivariada de condições experimentais ocorre em duas etapas. Em uma primeira etapa, faz-se triagem dos parâmetros para que se determinem quais apresentam efeito verdadeiramente significativo para o procedimento, por meio de planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais fracionários. Após a seleção dos fatores mais relevantes, condições analíticas ótimas podem ser precisamente definidas empregando-se metodologias de superfície de resposta, por meio de planejamentos experimentais mais complexos, como planejamento de composto central (CCD, do inglês *central composite design*), Box-Behnken (BBD, do inglês *Box-Behnken design*) ou matriz Doehlert (DM, do inglês *Doehlert matrix*) (CALADO, MONTGOMERY, 2003; CAMARGO, MOREIRA, VACCARO, 2009).

### **3.5.1 Tipos de planejamentos experimentais e metodologias de superfície de resposta**

Os planejamentos fatoriais (PF) são largamente empregados quando há um grande número de parâmetros a serem analisados, para triagem. Os parâmetros e suas interações são avaliados concomitantemente. Em um PF, é importante que, primeiramente, se defina quais parâmetros serão analisados e quantos e quais níveis serão analisados. Quando se utiliza planejamento fatorial completo (PFC), normalmente os parâmetros são avaliados em 2 níveis, codificados como -1 e +1, ou, no máximo, 3 níveis (identificados por -1, 0 e +1), pois, uma vez que todas as combinações fatoriais são testadas, o número de experimentos aumenta grandemente com o aumento dos níveis avaliados. O número de variáveis ( $k$ ) escolhidas, pela mesma razão, é limitado. Quando se deseja avaliar mais variáveis, recomendam-se os planejamentos fatoriais fracionários (PFF), que permite que as mesmas conclusões conseguidas com um PFC sejam obtidas, mas com um número reduzido de experimentos, pelo uso de um fator de redução (BRERETRON, 2003; BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2006; MONTGOMERY, 2012).

As metodologias de superfície de resposta (RSM, do inglês *response surface methodology*) são ferramentas para otimização multivariada de procedimentos, desenvolvidas por Box, que engloba conhecimentos matemáticos e estatísticos

para descrever o comportamento de um conjunto de dados, pelo ajuste a um modelo matemático. Os dados passam a ser descritos por uma função linear ou quadrática ideal e por uma respectiva superfície de respostas, que permite que se estime, com precisão e significância estatística, valores críticos (ótimos) para cada parâmetro de interesse, considerando não apenas sua influência individual sobre a resposta, mas as interações que os parâmetros estabelecem entre si. O objetivo da RSM é atingir o melhor desempenho para um procedimento, obedecendo a uma série de etapas, a saber (BEZERRA *et al.*, 2008):

- definição das variáveis independentes (parâmetros);
- definição de um delineamento experimental mais adequado;
- tratamento matemático-estatístico dos dados e determinação do ajuste dos dados a uma função polinomial, por análise de variância (ANOVA);
- avaliação da necessidade de deslocamento do planejamento em relação a uma direção de condições ótimas;
- determinação dos valores ótimos para cada variável.

Os parâmetros podem ser definidos por um planejamento fatorial para triagem prévia ou com base na experiência do analista. Utilizam-se planejamentos experimentais mais robustos, que permitem a avaliação de dados que não se ajustam a um modelo linear, como planejamentos fatoriais de 3 níveis, CCD, BBD e DM, escolhendo-se um ou outro pela consideração das características das variáveis dependentes e independentes de interesse (BEZERRA *et al.*, 2008).

Um CCD, proposto por Box e Wilson, consiste na combinação entre um PF de 2 níveis acrescido de pontos axiais e, de pelo menos, um ponto central ( $C_0$ ), sendo constituído por 3 partes. Em um CCD, parte dos pontos avaliados decorre do planejamento fatorial (cúbico) empregado, o número total de experimentos decorrente do planejamento fatorial dependerá do número de variáveis ou parâmetros. Se o número de variáveis for muito grande, a escolha por um planejamento fatorial fracionário pode ser atrativa para diminuir o número de experimentos. O número e as posições relativas dos pontos axiais são definidos, geralmente, baseado no número de variáveis avaliadas. Os

pontos axiais estão posicionados em  $-\alpha$  a  $+\alpha$  distantes em relação ao centro, sendo que  $\alpha$  pode variar de 1 a  $\sqrt{k}$ , sendo, de forma geral, definido como  $\alpha = \sqrt{k}$ , que produz um delineamento esférico e permite a avaliação de uma faixa mais ampla. Cada variável é avaliada em 5 níveis ( $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ ), com número total de experimentos podendo ser calculado conforme a equação a seguir (AHMADI *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2008):

$$\text{Número de experimentos} = 2^k + 2k + C_0$$

Em que  $k$  = número de variáveis e  $C_0$  = número de replicatas do ponto central. É aconselhável adotar entre 3 e 5 replicatas do ponto central, para que se estime o erro puro e se homogeneize a variância das respostas. O CCD é amplamente empregado para otimização de procedimentos de extração, reações de derivatização, procedimentos de separação e robustez de métodos cromatográficos para quantificação de fármacos, em amostras ambientais e biológicas, entre outros (BEZERRA *et al.*, 2008).

O planejamento Box-Behnken consiste em uma metodologia de superfície de resposta alternativa ao CCD, que se baseia em planejamentos fatoriais de 3 níveis incompletos ( $-1, 0$  e  $+1$ ). O BBD se constitui de 3 partes de quatro corridas cada: 2 duas partes constituídas por planejamentos fatoriais completos  $2^2$  e uma terceira parte constituída por experimentos em que pelo menos uma variável é definida no ponto central ( $C_0$ ). Todos os pontos estão localizados tangencialmente aos centros das arestas de um cubo, com exceção do ponto central. O número de experimentos total em um BBD se dá por (FERREIRA *et al.*, 2007):

$$\text{Número de experimentos} = 2k(k - 1) + C_0$$

Um BBD apresenta uma marcante vantagem em relação a um PF de 3 níveis: os parâmetros são avaliados na mesma faixa, mas com um número menor de experimentos. Considerando 3 variáveis, por exemplo, um PF requereria 27 experimentos; um BBD, por sua vez, apenas 13. Em relação ao CCD, as vantagens do BBD incluem um menor número de experimentos (embora em menor grau), uma avaliação de cada parâmetro somente em 3 níveis, o que é importante quando a avaliação de determinada variável é limitada

experimentalmente a menor número de níveis, e, finalmente, o fato de não incluir experimentos em que todas as variáveis estão simultaneamente nos níveis mais alto ou mais baixo, que podem produzir resultados inadequados. O BBD ainda é comprovadamente um planejamento mais eficiente que o CCD. Ferreira *et al.* (2007) compararam as eficiências do BBD, CCD e Doehlert e notaram que, em termos de eficiência, a ordem decrescente entre os 3 tipos de planejamento seria Doehlert > BBD > CCD, sendo que, para um número menor de variáveis (3), as eficiências de BBD e Doehlert são comparáveis entre si, mas muito superiores às encontradas com CDD. O uso de BBD ainda é menos disseminado que o de CCD; no entanto, BBD tem sido utilizado na otimização de condições críticas para procedimentos de extração, reações de derivatização e de métodos cromatográficos por CLAE e por cromatografia gasosa (CG) (FERREIRA *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2008; PAVANI, RAO, KUMAR, 2016).

Diferentemente dos planejamentos tratados até agora, a matriz Doehlert, é um tipo de planejamento experimental assimétrico, de forma que diferentes variáveis são analisadas por um número de níveis diferente. Tal característica é benéfica para um tratamento mais minucioso de determinadas variáveis em relação a outras ou quando existirem limitações instrumentais ou de custo que impossibilitem avaliação de uma variável em maior número de níveis. Independentemente do número de parâmetros avaliados ( $k$ ), em um planejamento obtido a partir de uma matriz Doehlert, há um ponto localizado na origem (ponto central), enquanto os demais pontos estão localizados na superfície de uma esfera (para  $k = 3$ ) ou hiperesfera (para  $k > 3$ ), de raio 1, equidistantes entre si. O número total de experimentos obtido em um DM pode ser calculado pela equação (DOEHLERT, 1970; GÁZQUEZ *et al.*, 1998; BEZERRA *et al.*, 2008):

$$\text{Número de experimentos} = k^2 + k + 1$$

Uma das principais vantagens do DM em relação ao CCD e ao BBD reside no fato de um planejamento Doehlert poder ser deslocado para uma região de resultados mais desejáveis, preservando-se alguns dos experimentos já realizados. É possível ainda que se introduzam variações em novos fatores,

durante o ensaio, sem que todos os experimentos já realizados sejam perdidos. É conveniente também para avaliar faixas experimentais mais irregulares, graças a sua capacidade de preencher espaços uniformemente, além de ser mais econômico, especialmente quando  $k$  é muito alto, e mais eficiente. Em compensação, uma desvantagem importante do DM se refere ao fato de não ser um planejamento rotável, ao contrário do CCD e BBD (FERREIRA *et al.*, 2007; SENA *et al.*, 2012).

### 3.5.2 Ferramentas para otimização de respostas múltiplas

Otimizar simultaneamente um grande número de variáveis respostas, como propriedades, funções, condições ou parâmetros procedimentais, é um objetivo inerente à melhoria de procedimentos e produtos. A otimização de respostas múltiplas pode ser realizada de diversos modos, incluindo a sobreposição de superfícies de resposta, utilização de métodos de programação linear (ou não-linear) ou ainda pela combinação de várias respostas em uma única resposta utilizando funções como resposta múltipla (RM) ou desejabilidade. Sobrepor superfícies de resposta é uma opção em situações nas quais o número de fatores não é demasiadamente grande e o número de variáveis significativas permite a visualização dos modelos ajustados. Nesses casos, faz-se a sobreposição de duas ou mais superfícies e, por inspeção visual, define-se a melhor região (e, portanto, as melhores condições) (JAHAN, ISMAIL, NOOROSSANA, 2012; CANDIOTI *et al.*, 2014).

A função desejabilidade, um algoritmo primeiramente proposto por Harrington (1965), mas desenvolvida e aperfeiçoada em 1980 por Derringer e Suich, é um dos métodos disponíveis para otimização de experimentos multivariáveis, por meio da combinação de múltiplas respostas. O método se baseia na determinação de uma função de desejabilidade para cada uma das respostas individuais, a desejabilidade individual, que, no final, são agrupadas estabelecendo-se uma função de desejabilidade global. Cada resposta (desejabilidade individual) se associa a um valor numérico entre 0 e 1, em que 0 está relacionado a uma resposta muito indesejável e 1 se relaciona ao valor mais desejável. Derringer e Suich (1980) definiram 3 funções diferentes para a

determinação dos valores de desejabilidade individual, de acordo com a característica esperada para cada resposta. Os possíveis tipos de resposta são (HARRINGTON, 1965; DERRINGER, SUICH, 1980; CANDIOTI *et al.*, 2014, FERNANDES, 2016):

- quanto mais próximo a um valor nominal (de referência), melhor (*NTB*, do inglês *nominal the better*), em que o valor alvo para determinada resposta encontra-se entre um valor mínimo e um valor máximo;
- quanto maior, melhor (*LTB*, do inglês *larger the better*);
- quanto menor, melhor (*STB*, do inglês *shorter the better*).

O cálculo de desejabilidade individual para variáveis *NTB* se dá segundo as equações:

$$d_i = \left( \frac{y - L_i}{T - L_i} \right), \text{ se } L_i \ll y \ll T$$

$$d_i = \left( \frac{y - L_s}{T - L_s} \right), \text{ se } T \ll y \ll L_s$$

$$d_i = 0, \text{ caso contrário}$$

Em que  $d_i$  = desejabilidade individual;  $y$  = resposta encontrada para determinada variável dependente avaliada;  $T$  = valor alvo para determinada variável dependente;  $L_i$  = limite inferior (valor mínimo) aceito para determinada variável dependente; e  $L_s$  = limite superior (valor máximo) aceito para determinada variável dependente.

Já para as variáveis do tipo *LTB*, o cálculo da desejabilidade é efetuado conforme as equações:

$$d_i = \left( \frac{y - L_i}{L_s - L_i} \right), \text{ se } L_i \ll y \ll L_s$$

$$d_i = 0, \text{ se } y < L_i$$

$$d_i = 1, \text{ se } y > L_s$$



Finalmente, para variáveis do tipo *STB*, os valores de desejabilidade individuais podem ser estimados segundo as equações:

$$d_i = \left( \frac{y - L_s}{L_i - L_s} \right), \text{ se } L_i \ll y \ll L_s$$

$$d_i = 1, \text{ se } y < L_i$$

$$d_i = 0, \text{ se } y > L_s$$

O cálculo das desejabilidades individuais para cada variável resposta requer a definição de um valor mínimo ou limite inferior ( $L_i$ ), de um valor máximo ou limite superior ( $L_s$ ) e de um valor alvo ( $T$ ). Depois de calculados os valores de desejabilidade individual, esses valores são combinados em uma única resposta, em função da desejabilidade global. A desejabilidade global ( $D$ ) é determinada como a média geométrica dos valores de desejabilidade individual, estimada conforme a equação:

$$D = \sqrt{d_{iA} \times d_{iB} \times \dots \times d_{iZ}}$$

A desejabilidade é uma ferramenta amplamente utilizada no meio científico, em diversas vertentes. Não há, entretanto, descrição do seu uso na otimização de métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em amostras biológicas (FERREIRA *et al.*, 2007; CANDIOTI *et al.*, 2014).

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos de síntese e caracterização físico-química dos polímeros impressos e não impressos foram realizados no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros da Escola de Engenharia da UFMG. Os demais experimentos analíticos foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da UFMG. Os experimentos bioanalíticos foram efetuados no CEDAFAR-BIO, sendo que as coletas de sangue foram realizadas no Laboratório de Hematologia, ambos na FAFAR-UFMG.

##### 4.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e insumo farmacêutico ativo (IFA)

Os padrões de artesunato, cafeína e paracetamol foram gentilmente cedidos pela Farmacopeia Brasileira (Brasília, Brasil); os padrões de difosfato de cloroquina e fosfato de primaquina foram cedidos pelo INCQS-Fiocruz (Rio de Janeiro, Brasil); o padrão de halofantrina foi gentilmente cedido pela GlaxoSmithKline (Rio de Janeiro, Brasil); enquanto os padrões de arteméter e lumefantrina foram adquiridos da Farmacopeia Americana (Rockville, EUA). As informações referentes ao número de lote e grau de pureza das SQR utilizadas nesse trabalho estão apresentados na **Tabela 4**. Lumefantrina IFA, lote 06032402, foi gentilmente doado por Dafra Pharma (Turnhout, Bélgica).

**Tabela 4 – Informações sobre lote e grau de pureza das substâncias químicas de referência utilizadas para desenvolvimento de métodos analítico e bioanalítico para determinação de lumefantrina.**

Substância química de referência	Número do lote	Grau de pureza
Arteméter	H0M313	99,30
Artesunato	060810	Não consta
Cafeína	Não consta	Não consta
Difosfato de cloroquina	Y2F01	99,6
Fosfato de primaquina	Z2F01	99,7
Halofantrina	102886 <sup>a</sup>	99,4
Lumefantrina	G0L394	99,9
Paracetamol	Não consta	Não consta

## 4.2 Amostras biológicas

As amostras de plasma foram obtidas por meio da coleta de sangue de voluntários sadios, realizada no Laboratório de Hematologia Clínica da FAFAR-UFMG. Essa etapa foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, conforme protocolo CAAE 54567716.4.0000.5149 (**ANEXO**). Todas as amostras foram coletadas em tubos contendo heparina sódica. Para amostras de plasma normal e hemolisado, as coletas foram realizadas no período da manhã, com voluntários em jejum ou leve desjejum, caracterizado por uma alimentação pouco calórica e ausente de alimentos e bebidas ricos em xantinas, como café, chás e chocolate. Já para que fossem obtidas amostras lipêmicas, foram realizadas coletas pós-prandiais. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a  $480 \times g$  por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para amostras de plasma branco normal e de plasma lipêmico. O sobrenadante obtido, correspondente ao plasma, foi separado e armazenado em tubos Falcon de 15 mL devidamente identificados e armazenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização. Em uma das amostras, induziu-se hemólise por meio de ciclos de resfriamento e agitação em vórtex, para obtenção de amostras de plasma branco hemolisado. O sobrenadante obtido foi separado e transferido para tubos Falcon de 15 mL, que foram armazenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os voluntários sadios foram informados das condições da coleta e consentiram em participar do estudo após leitura e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (BRASIL, 2012).

## 4.3 Solventes, reagentes e colunas cromatográficas

Foram utilizados os solventes e reagentes de grau cromatográfico acetonitrila JT Baker (Xalostoc, México), ácido trifluoroacético Tedia (Fairfield, EUA), diclorometano Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e metanol JT Baker (Xalostoc, México) e Scharlau (New Jersey, EUA). Foram utilizados ainda os solventes e reagentes de grau analítico 2-hidroxietimetacrilato Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), 2-vinilpirina Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), acetato de etila Synth (Diadema, Brasil), ácido metacrílico Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), ácido perclórico Merck (Billerica, EUA), 2,2-azo-bis-isobutironitrila TCI (Saitama, Japão), brometo de potássio Synth (Diadema,

Brasil), clorofórmio Synth (Diadema, Brasil), divinilbenzeno Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), etilenoglicol dimetacrilato Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), tolueno Synth (Diadema, Brasil), trimetilolpropano triacrilato (Steinheim, Alemanha) e uracila Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Água ultrapura foi obtida utilizando-se ultrapurificador Millipore<sup>®</sup> modelo Direct Q3 (Billerica, EUA). Gás nitrogênio foi obtido da empresa White Martins (Contagem, Brasil), enquanto o nitrogênio líquido foi obtido da Air Products (Belo Horizonte, Brasil). Foram utilizadas as seguintes colunas cromatográficas: Phenomenex<sup>®</sup> Luna C<sub>18</sub> 250 x 4,6 mm, 5 µm (Torrance, EUA); Merck Millipore Purospher<sup>®</sup> STAR C<sub>18</sub> encapada 250 x 4,6 mm, 5 µm (Billerica, EUA); Agilent Zorbax<sup>®</sup> SB-Fenil 250 x 4,6 mm, 5 µm (Santa Clara, EUA); Agilent Zorbax<sup>®</sup> SB-Ciano 150 x 4,6 mm, 5 µm (Santa Clara, EUA) e coluna de núcleo fundido Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 100 x 4,6 mm, 2,6 µm (Torrance, EUA)

#### 4.4 Equipamentos e vidrarias

Utilizaram-se ainda as seguintes vidrarias e instrumentos:

- agulhas múltiplas para coleta de sangue a vácuo de 25 x 0,8 mm;
- balões volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mL;
- bastões de vidro;
- béqueres de 25, 50, 100, 200, 600, 1000 e 2000 mL;
- cartuchos para extração em fase sólida Strata X – 2 mL;
- erlenmeyers de 25, 250 e 500 mL;
- filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm;
- filtros de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm de tamanho de poro;
- frascos para soluções;
- frascos tipo penicilina;
- frascos tipo *vial* de 12x32 mm com tampa de rosca e septos de silicone;
- kit para filtração a vácuo;
- lâmpada de mercúrio BLB negra NARDS Light Express 125W;

- membrana de celulose regenerada para filtração de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro;
- micropipetas automáticas de 10, 20, 100, 200, 1000, 2000 e 5000  $\mu\text{L}$ ;
- minitubos Eppendorf de 1,5 e 2,0 mL;
- parafilme;
- peneira de malha 100  $\mu\text{m}$ ;
- pipetador automático HandyStep<sup>®</sup>;
- pipetas de Pasteur;
- pipetas graduadas de 1 mL;
- pipetas volumétricas de 1, 2 e 5 mL;
- placas de Petri;
- ponteiras de 200 e 1000  $\mu\text{L}$  para uso em micropipetas;
- ponteiras de 1,25 e 2,50 mL para uso em pipetador automático HandyStep<sup>®</sup>;
- rolhas de borracha;
- tubos de ensaio de vidro com rosca;
- tubos de ensaio de vidro 10,0 x 1,0 cm;
- tubos Falcon de 15 e 50 mL;
- tubos para coleta de plasma de 9 mL contendo heparina sódica;
- tubos tipo *insert* de fundo plano de 250 e 400  $\mu\text{L}$ .

Os equipamentos utilizados nas análises realizadas foram:

- analisador de área superficial Quantachrome NOVA 3200e;
- analisador de partículas por difração a laser Beckman Coulter LS 13320;
- aparelho de ultrassom BRANSONIC 220;
- aparelho de ultrassom UNIQUE 1400;
- balança analítica SARTORIUS BP211D com precisão de 0,01 mg;
- balança analítica Shimadzu AUW2200 com precisão de 0,001 mg;
- balança semi-analítica METTLER TOLEDO AE20;
- banho termostático com agitação orbital NOVA ÉTICA 304D;
- banho termostático SOLAB DUBNOFF SL157;
- bomba de vácuo LABOPORT KNF N842;
- bomba de vácuo VULKAN LOKING;
- centrífuga JOUAN MR231;

- centrífuga SPINLAB modelo SL16RAV;
- concentrador de amostras TECNAL TecVap TE-0194;
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência THERMO Surveyor Finnegan equipado com módulo desgaseificador, bomba quaternária, forno de coluna, *autosampler* e detector de arranjo de diodos (DAD) nas regiões do visível e do ultravioleta e *software* ChromQuest versão 4.2.34;
- espectrofotômetro SHIMADZU ultravioleta-visível UV1800 equipado com *software* UV PROBE versão 2.33;
- estufa a vácuo VACUOTERM 6030A;
- estufa FANEM 315SE;
- estufa NABERTHERM TR60;
- freezer REVCO com temperatura de -70 °C;
- kit para pastilhador;
- manta aquecedora para balões de fundo redondo NALGON 3310;
- potenciômetro METROHM 827 pH Lab;
- refrigerador CONSUL, com temperatura de 4 °C;
- refrigerador GELOPAR, com temperatura de 2 °C;
- ultrapurificador de água MILLIPORE DIRECT Q3;
- vórtex JK MS1;
- vortex mixer WARMNEST XH3800.

#### **4.5 Desenvolvimento e otimização de método por CLAE-UV para quantificação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo (IFA)**

Procedeu-se ao desenvolvimento de método por CLAE, com detecção por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, para quantificação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo. O método foi empregado para a padronização de padrão secundário de lumefantrina (padrão de trabalho) e nos ensaios de sorção estático e dinâmico para posterior avaliação dos coeficientes de distribuição dos polímeros molecularmente impressos e não impressos. O método foi adaptado de monografia oficial para lumefantrina descrita na Farmacopeia Internacional (INTERNATIONAL, 2015) e dos trabalhos de César (2009) e Rivelli (2016).

O preparo de soluções estoque e soluções de trabalho de lumefantrina SQR e lumefantrina IFA se descreve a seguir.

*Solução estoque de lumefantrina (SQR ou IFA) a 300 µg/mL:* pesou-se, aproximadamente, cerca de 7,5 mg de lumefantrina SQR ou IFA e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se, com auxílio de micropipeta, 0,5 mL de diclorometano para promover a solubilização do fármaco. Adicionou-se cerca de 20 mL de metanol e submeteu-se ao ultrassom por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se.

*Solução de lumefantrina (SQR ou IFA) a 24 µg/mL:* transferiu-se 2 mL da respectiva *solução estoque de lumefantrina (SQR ou IFA)*, com auxílio de pipeta volumétrica, para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com mistura de metanol e ácido trifluoroacético (TFA) a 0,05%, na proporção 80:20 (v/v) (fase móvel), e homogeneizou-se. Filtrou-se para *vial* por filtro de seringa de 0,45 µm.

A seleção de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de análise foi realizada de acordo com os métodos previamente citados, sendo definido em 335 nm, por causa de sua elevada seletividade e sensibilidade adequada. Foram testadas diferentes colunas cromatográficas de fase reversa, constituídas de diferentes fases estacionárias de sílica quimicamente modificada, com diferentes polaridades, como grupo octadecilsilano ( $C_{18}$ ), grupo octadecilsilano encapada ( $C_{18}$ ), grupo fenil (Phe) e grupo cianopropil (CN).

Realizaram-se injeções, em triplicata, de 20 µL de *solução de lumefantrina SQR a 24 µg/mL* e de 10 µL de *solução de uracila a 10 µg/mL em metanol*, sendo avaliados os parâmetros fator de capacidade ( $k$ ), assimetria ( $A$ ) e altura de prato teórico ( $H$ ), que contribuíram para a tomada de decisão no que diz respeito à escolha de uma fase estacionária ideal para a separação cromatográfica.

Calculou-se  $k$  a partir dos tempos de retenção para o lumefantrina e do tempo ou volume morto da coluna, definido pelo tempo de retenção da uracila, conforme equação abaixo:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_r}$$

Em que  $k$  = fator de capacidade,  $t_r$  = tempo de retenção para o pico de lumefantrina e  $t_0$  = tempo morto.

A altura de um prato ( $H$ ) teórico foi calculada conforme a equação abaixo:

$$H = \frac{L}{N}$$

Em que  $H$  = altura de um prato teórico (em mm),  $N$  = número de pratos teóricos e  $L$  = comprimento da coluna (em mm).

Finalmente, a assimetria foi calculada a 10% de altura do pico, conforme equação:

$$A = \frac{BC}{CA}$$

Em que  $BC$  = distância entre o ponto central do pico e sua porção seguinte (cauda), medida a 10% da altura de pico; e  $CA$  = distância entre o ponto central do pico e sua porção anterior (frente), medida a 10% da altura do pico.

Posteriormente, a composição da fase móvel, composta por uma mistura de metanol e TFA 0,05%, e temperatura do forno foram ajustadas para que parâmetros relacionados à retenção, ao formato dos picos e aos critérios de adequabilidade considerados ideais fossem conseguidos. Considerou-se como condições iniciais para fase móvel uma mistura de metanol e TFA 0,05% na proporção de 80:20 (v/v) e 40 °C para temperatura, de acordo com os métodos propostos por César (2009) e Rivelli (2016).

Depois da definição da fase estacionária e fase móvel, a vazão de fase móvel foi otimizada a partir da construção de uma curva de *van Deemter*, plotando-se a altura do prato teórico ( $H$ ) em função da velocidade linear da fase móvel ( $u_0$ ), com a finalidade de se determinar a velocidade linear na qual a eficiência da coluna é máxima – e, portanto,  $H$  é mínimo e o pico cromatográfico é mais alto, mais estreito e mais simétrico (PRADO, 2013). O gráfico de *van Deemter* foi



construído pela injeção de 20 µL de *solução de lumefantrina SQR a 24 µg/mL* e 10 µL de *solução de uracila a 10 µg/mL em metanol*, empregada para determinação do tempo morto, em diferentes vazões de fase móvel, na faixa de 0,2 mL/min a 2,0 mL/min. Fluxos inferiores a 0,2 mL/min não foram testados em virtude de limitações operacionais do equipamento utilizado. Para cada condição analítica, foram definidos para o pico de lumefantrina os parâmetros de fator de capacidade ou fator de retenção ( $k$ ), número de pratos teóricos ( $N$ ) e assimetria ( $A$ ).

A velocidade linear de fase móvel ( $u_0$ ) foi calculada de acordo com a equação:

$$u_0 = \frac{L \times (k + 1)}{t_r}$$

Em que  $u_0$  = velocidade linear da fase móvel,  $L$  = comprimento da coluna (em mm);  $k$  = fator de capacidade e  $t_r$  = tempo de retenção da lumefantrina.

Para definição de uma vazão ideal, foram considerados ainda os valores de  $A$  e tempos de corrida analítica, uma vez que corridas muito extensas são inviáveis para o emprego rotineiro do método por CLAE-UV desenvolvido.

#### **4.6 Validação de método analítico por CLAE-UV para quantificação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo (IFA)**

O método previamente desenvolvido foi posteriormente validado, de acordo com exigências presentes no Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da resolução RE n°. 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), no Guia de Validação de Métodos Analíticos do ICH (INTERNATIONAL, 2005), na Consulta Pública n°. 129, de 12 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016) e nos trabalhos de Youden e Steiner (1975), Souza (2007) e Souza e Junqueira (2005). Os parâmetros validados foram seletividade, linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

#### 4.6.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método, foram preparadas soluções dos monômeros funcionais, agentes de ligação cruzada ou *crosslinkers* e iniciador radicalar utilizados no procedimento de síntese dos polímeros impressos e não impressos obtidos, conforme **Tabela 5**.

**Tabela 5 – Reagentes utilizados para avaliação da seletividade e seus respectivos estados físicos e classificações para método analítico para determinação de lumefantrina.**

Reagente	Estado físico	Classificação
2-HEMA	Líquido	Monômero funcional
2-VP	Líquido	Monômero funcional
AIBN	Sólido	Iniciador radicalar
AMA	Líquido	Monômero funcional
DVB	Líquido	<i>Crosslinker</i>
EGDMA	Líquido	<i>Crosslinker</i>
TRIM	Líquido	<i>Crosslinker</i>

2-HEMA: 2-hidroxietil metacrilato; 2-VP: 2-vinilpiridina; AIBN: 2,2-azo-bis-isobutironitrila; AMA: ácido metacrílico; DVB: divinilbenzeno; EGDMA: etilenoglicol dimetacrilato; TRIM: trimetilolpropano triacrilato.

Foram preparadas, separadamente, *soluções a 4% (v/v)* para os reagentes líquidos e *solução a 300 µg/mL ou 0,03% (p/v)* para o AIBN, único reagente sólido, em fase móvel, constituída por uma mistura de metanol e TFA 0,05% na proporção de 80:20 (v/v). Transferiram-se as soluções preparadas para *vial*, filtrando-se por filtro de seringa de 0,45 µm. Os *vials* foram analisados em triplicata, conforme condições cromatográficas ótimas obtidas. O tempo de corrida foi de 30 minutos para permitir que todos os analitos presentes pudessem eluir da coluna cromatográfica. O tempo de retenção de cada analito foi comparado ao tempo de retenção da lumefantrina, pela sobreposição dos cromatogramas obtidos para cada um e para a *solução de lumefantrina SQR*, verificando-se a presença ou não de picos interferentes no intervalo de integração do pico de lumefantrina. Adicionalmente, submeteu-se a lumefantrina (SQR e IFA) a condições de estresse para degradação forçada, simulando condições que o fármaco seria submetido durante o procedimento de síntese, para identificação de eventuais produtos de degradação que pudessem interferir na quantificação do analito, conforme Resolução da Diretoria Colegiada RDC n°. 53, de 4 de dezembro de 2015 (BRASIL, 2015). Condições de estresse selecionadas e procedimentos de análise estão na **Tabela 6**.

**Tabela 6 – Condições de estresse e procedimentos para avaliação da seletividade por degradação forçada de método analítico para determinação de lumefantrina.**

Analito	Condição de estresse	Procedimento
2,0 mL de solução de lumefantrina (IFA e SQR) a 300 µg/mL em balão volumétrico de 25 mL	Fotólise	Armazenamento em câmara de fotoestabilidade, em temperatura ambiente, por 7 dias. Exposição à radiação ultravioleta (UV) e visível.
2,0 mL de solução de lumefantrina (IFA e SQR) a 300 µg/mL em balão volumétrico de 25 mL	Oxidação	Adição de 5 mL de solução de 2,2-azo-bis-isobutironitrila em fase móvel a 3% v/v. Armazenamento, em temperatura ambiente e protegida da luz, por 7 dias.
7,5 mg de lumefantrina (IFA e SQR) em placa de Petri	Calor	Armazenamento em estufa a 70 °C, por 7 dias.

Para as condições fotolítica e oxidativa, os testes foram ainda realizados para diluente e fase móvel, seguindo o mesmo procedimento adotado para lumefantrina. Após o prazo determinado de 7 dias, o volume dos balões volumétricos foram ajustados a 25 mL com fase móvel, sendo homogeneizados e transferidos para *vial*, filtrando-se por filtro de seringa de 0,45 µm. Para a condição de exposição ao calor, passados os 7 dias de ensaio, dissolveu-se o conteúdo da placa de Petri pela adição de 0,5 mL de diclorometano e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, adicionou-se cerca de 20 mL de metanol e submeteu-se ao ultrassom para solubilização. Completou-se o volume do balão com metanol e homogeneizou-se. Transferiu-se 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 25 mL, completou-se o volume com fase móvel, homogeneizou-se e transferiu-se para *vial*, filtrando-se por filtro de seringa de 0,45 µm. O ensaio não foi realizado com diluente e fase móvel, devido à evaporação dos solventes nas condições adotadas. Adotou-se temperatura de 70 °C, superior à temperatura utilizada nas sínteses (65 °C). Todos os *vials* foram analisados em triplicata nas condições cromatográficas ótimas obtidas. O tempo de corrida foi de 30 minutos. Foram avaliados teor de lumefantrina, presença de picos interferentes e pureza de pico referente à lumefantrina (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL, 2005; BRASIL, 2015).

#### 4.6.2 Linearidade

Para avaliação da linearidade, foram preparadas três *soluções estoque de lumefantrina SQR a 300 µg/mL* independentes, que sofreram diluições, segundo demonstrado na **Tabela 7**, adequadas de forma a se obter 9 níveis de concentração, igualmente espaçados, compreendidos na faixa de 20 a 180% ( $n = 27$ ). Os níveis de concentração menores, muito além do que a normatização preconiza, foram escolhidos para que a faixa linear compreendesse valores de concentração que poderiam ser eventualmente encontrados nos ensaios de sorção estático e dinâmico para os polímeros obtidos. O volume dos balões volumétricos foi completado com fase móvel, as soluções foram homogeneizadas e transferidas para *vial*, filtrando-se por filtro de seringa de 0,45 µm. As amostras nos *vials* foram analisados aleatoriamente em triplicata.

**Tabela 7 – Planilha de diluições para preparo da curva analítica para avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina.**

Nível de concentração (%)	Concentração teórica (µg/mL)	Volume da solução estoque de lumefantrina (mL)
20	4,8	0,4
40	9,6	0,8
60	14,4	1,2
80	19,2	1,6
100	24,0	2,0
120	28,8	2,4
140	33,6	2,8
160	38,4	3,2
180	43,2	3,6

Os resultados, expressos como média das áreas sob o pico em função da concentração, foram plotados em curva analítica. Examinou-se visualmente o gráfico para avaliação da relação linear e análise estatística por análise de variância (ANOVA), para determinação do coeficiente de correlação, interseção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo, conforme solicitado na RE n°. 899/2003. O critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação ( $r$ ) é que que seja superior a 0,99 (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL, 2005). Adicionalmente, procedeu-se à avaliação da linearidade conforme proposto por Souza (2007) e Souza e Junqueira (2005), empregando-se o modelo de regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados ordinários

(MMQO), com identificação e exclusão de valores dispersos (*outliers*) e verificação das premissas de normalidade, homogeneidade das variâncias (homocedasticidade) e independência dos resíduos. Adotou-se nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), com 95% de confiança, para os testes estatísticos mencionados anteriormente.

A presença de *outliers* foi avaliada pelo teste de resíduo padronizado de *Jackknife*, que permite a exclusão de até 2/9 ou 22% do total de dados originais, excetuando-se valores referentes à última replicata de cada nível, que não podem ser excluídos. A normalidade dos resíduos foi avaliada por meio do teste estatístico de *Ryan-Joiner*, por intermédio do cálculo da estatística  $R_{eq}$ , que foi comparada a um valor crítico, determinado com base no  $n$  amostral. Já a homocedasticidade dos resíduos foi analisada pelo teste de *Brown-Forsythe*, ou teste de *Levene* modificado, determinando-se estatística  $t_L$  de *Brown-Forsythe* ou *Levene* e do valor de  $p$ . Finalmente, a premissa da independência foi investigada por teste *Durbin-Watson*, em que estatística de *Durbin-Watson* ( $d$ ) calculada foi comparada aos valores críticos, um limite inferior ( $d_L$ ) e um limite superior ( $d_U$ ), a partir dos quais são calculados os valores de  $4-d_L$  e  $4-d_U$ .

Depois da exclusão de eventuais *outliers* e verificação das premissas de regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados ordinários, a significância da regressão e o desvio de linearidade foram avaliados por ANOVA. Os parâmetros da regressão linear, como coeficiente angular (inclinação,  $b$ ), coeficiente linear (intercepto,  $a$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram determinados. Para investigação do ajuste ao modelo linear, avaliou-se a significância da regressão e o desvio de linearidade por ANOVA. Construiu-se uma nova curva, plotando-se as médias das áreas do pico de lumefantrina por concentração, após tratamento estatístico e exclusão de *outliers*, a partir da qual foram definidos coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e uma equação da reta, utilizada para estimar concentração experimental nos outros parâmetros de validação, teor e ensaios de sorção.

### 4.6.3 Intervalo

O intervalo foi definido a partir dos limites inferior e superior de quantificação determinados para o método analítico, derivado da avaliação da linearidade e pela confirmação de que o método apresenta precisão, exatidão e linearidade adequadas dentro de determinada faixa (BRASIL, 2003). O intervalo foi definido entre 20 e 180%, correspondente a 4,8 a 43,2 µg/mL.

### 4.6.4 Precisão

Para avaliação da repetitividade ou precisão intracorrída (ou intradia), foram realizadas determinações em 3 níveis, contemplando o intervalo linear adotado, em triplicata, preparadas individualmente pelo mesmo analista, instrumentação e em um curto intervalo de tempo, avaliados em uma única corrida analítica (n= 9). A precisão intermediária também foi avaliada em 3 níveis de concentração, em triplicata, individualmente preparadas por dois analistas diferentes, em dias e corridas analítica diferentes (n = 18). Os níveis e as concentrações avaliados na repetitividade e precisão intermediária foram baixo (20% ou 4,8 µg/mL), médio (100% ou 24,0 µg/mL) e alto (180% e 43,2 µg/mL), tendo sido preparados conforme descrito na **Tabela 7** para linearidade. Para a avaliação da repetitividade e precisão intermediária, foi determinada a dispersão entre os resultados encontrados para área do pico de lumefantrina, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), conforme equação:

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

Em que  $DPR (\%)$  = desvio padrão relativo, em valores percentuais;  $DP$  = desvio padrão e  $CMD$  = concentração média determinada experimentalmente.

O valor máximo aceitável para  $DPR (\%)$  é 2,0%, para repetitividade, e 5,0%, para precisão intermediária. A comprovação da precisão intermediária foi realizada ainda pela demonstração de que não havia diferença estatística entre as médias para cada nível, nos dois dias de análise, utilizando-se teste de Tukey para comparação de médias (GREEN, 1996; BRASIL, 2003; INTERNATIONAL, 2005).

#### 4.6.5 Limites de detecção e quantificação

Inicialmente, os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir da equação que descreve a curva analítica obtida na linearidade, levando-se em consideração os parâmetros de inclinação e desvio padrão do intercepto no eixo das ordenadas (BRASIL, 2003; BRASIL, 2016). Os cálculos foram efetuados segundo as equações:

$$LD = \frac{3 \times DP}{b}$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{b}$$

Em que  $LD$  = limite de detecção,  $LQ$  = limite de quantificação,  $DP$  = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração e  $b$  = inclinação da curva de calibração.

Depois de definidos instrumentalmente, foram preparadas soluções diluídas de lumefantrina, em concentrações decrescentes, na faixa de 6,0 a 0,2 µg/mL. A avaliação dos limites de detecção e quantificação foi realizada pela determinação da razão entre a altura do sinal decorrente do pico de lumefantrina e a altura do ruído da linha de base, definida pelo próprio *software ChromQuest 4.2.34*. Para o limite de detecção, foi adotada a concentração que produziu uma razão sinal/ruído próxima a 3; para o limite de quantificação, adotou-se concentração que produziu razão aproximadamente igual a 10. Em seguida, foram preparadas soluções, em triplicata, na concentração definida, e avaliada a dispersão entre os resultados encontrados para comprovação da precisão. O valor de DPR encontrado não deve ser superior a 5,0% (GREEN, 1996; BRASIL, 2005; INTERNATIONAL, 2005).

#### 4.6.6 Exatidão

Para a avaliação da exatidão, o método proposto foi aplicado para determinações do teor de lumefantrina SQR. Foram avaliados, em triplicata, os mesmos 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto) empregados na avaliação da precisão, resultando em 9 determinações ( $n = 9$ ). Expressou-se a

exatidão como a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, levando-se em consideração o grau de pureza do padrão, conforme equação:

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

O DPR também foi calculado. Os valores encontrados para exatidão devem estar contidos no intervalo entre 98,0 e 102,0%. Os valores de DPR não devem superar 5,0% (GREEN, 1996; BRASIL, 2003; INTERNACIONAL, 2005; BRASIL, 2016).

#### 4.6.7 Robustez

Para determinar a robustez do método analítico desenvolvido, foi utilizado o teste de *Youden*. Os parâmetros avaliados e respectivas variações propostas estão descritas na **Tabela 8**. As condições nominais são representadas por letras maiúsculas e as variações propostas por letras minúsculas.

**Tabela 8 – Variáveis e condições nominal e alternativa para avaliação da robustez de método analítico para determinação de lumefantrina.**

Parâmetro analítico	Condição nominal	Condição alternativa
pH da fase aquosa	2,5 (A)	3,0 (a)
Proporção de metanol na fase móvel (%)	75 (B)	70 (b)
Temperatura (°C)	25 (C)	30 (c)
Vazão da fase móvel (mL/min)	1,0 (D)	1,2 (d)
Marca de metanol	J.T. Baker (E)	Scharlau (e)
Tempo de ultrassom (min)	10 (F)	5 (f)
Concentração de TFA (%)	0,05 (G)	0,10 (g)

Os parâmetros pH da fase móvel, composição da fase móvel, vazão da fase móvel e temperatura são preconizados pela RE 899/2003 e consulta pública n°. 29/2016 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2016) para métodos por CLAE. A normatização também preconiza a avaliação de diferentes lotes ou fabricantes de colunas, mas esse parâmetro não pode ser avaliado graças à indisponibilidade de outra coluna similar à utilizada. Foram adicionalmente escolhidos como parâmetros a marca de metanol empregada, o tempo em que a *solução de lumefantrina SQR* foi submetida ao ultrassom e a concentração



de TFA na fase móvel. O pH aparente da fase aquosa, constituída por uma solução de TFA 0,05%, é igual a aproximadamente 2,5. O ajuste para o pH 3,0, avaliado na condição alternativa, foi realizado pela adição de *solução de ácido trifluoroacético a 0,10%*.

Os 7 parâmetros foram combinados em 8 ensaios ou corridas analíticas, que foram analisados aleatoriamente. Quatro ensaios foram realizados com os parâmetros em seu valor nominal e outros quatro ensaios com os parâmetros na condição alternativa, resultando na matriz de combinação demonstrada na **Tabela 9**. Os resultados são expressos por letras minúsculas de s a z.

**Tabela 9 – Matriz de combinação fatorial para avaliação da robustez, pelo teste de Youden, de método analítico para determinação de lumefantrina.**

Parâmetro analítico	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pH da fase aquosa	A	A	A	A	a	A	A	A
Proporção de metanol na fase móvel (%)	B	B	B	B	B	B	B	B
Temperatura (°C)	C	C	C	C	C	C	C	C
Vazão da fase móvel (mL/min)	D	D	D	D	d	D	D	D
Marca de metanol	E	E	E	E	e	E	E	E
Tempo de ultrassom (min)	F	F	F	F	F	F	F	F
Concentração de TFA (%)	G	G	G	G	g	G	G	G
Resultado	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>x</b>	<b>W</b>	<b>y</b>	<b>Z</b>

Para cada combinação, os *vials* de *solução de lumefantrina SQR* e de *solução de lumefantrina IFA*, ambas a 24 µg/mL, foram analisados em triplicata. Entre uma combinação e outra, aguardou-se 30 minutos para estabilização da coluna antes de análise da próxima condição. Os teores médios encontrados foram comparados por ANOVA seguida de teste de *Dunnnett* para comparação de médias, considerando um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Em seguida, a influência de cada parâmetro foi avaliada pela comparação dos resultados encontrados quando se emprega determinada variável no nível nominal (letras maiúsculas) com as médias dos resultados obtidos para a condição alternativa (letras minúsculas). Considerando o primeiro parâmetro analítico, pH da fase aquosa, estimou-se o efeito pela equação:

$$\text{Efeito } A/a = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{x + w + y + z}{4}$$

Os parâmetros analíticos escolhidos tiveram sua influência avaliada em relação ao fator de capacidade ( $k$ ), número de pratos teóricos ( $N$ ), assimetria ( $A$ ) e teor de lumefantrina, definindo-se os parâmetros que apresentaram uma influência maior ou menor nos resultados finais, para que, com isso, se pudesse propor controle mais rigoroso desses parâmetros nas análises de rotina, minimizando variações.

#### **4.7 Controle de qualidade de lumefantrina insumo farmacêutico ativo**

A caracterização do insumo farmacêutico ativo lumefantrina, lote 06032403, foi realizada parcialmente a partir de monografia oficial para lumefantrina presente na Farmacopeia Internacional (INTERNATIONAL, 2015) e em minuta de monografia oficial proposta por Rivelli (2016). Confirmou-se a identidade do insumo farmacêutico ativo por espectrofotometria de absorção nas regiões do infravermelho e ultravioleta. Os espectros de absorção na região do ultravioleta, na faixa de 200 a 400 nm, foram obtidos para soluções a 0,002 mg/mL (2 mg%) em metanol para lumefantrina IFA e lumefantrina SQR, utilizando metanol como branco, sendo comparados quanto aos mínimos e máximos de absorção. O comprimento máximo de absorção, no intervalo de 275 a 325 nm, foi determinado e a absorvância específica a 302 nm foi determinada para *soluções de lumefantrina SQR e lumefantrina IFA*. Foram obtidos ainda espectros de infravermelho, na faixa de 4500 a 450  $\text{cm}^{-1}$ , a partir de pastilhas de brometo de potássio (KBr) previamente dessecado a 105 °C por 1 hora, pela dispersão de, exatamente, cerca de 3 mg de fármaco em 100 mg de KBr, utilizando pastilhador. Os espectros obtidos para lumefantrina IFA e lumefantrina SQR foram comparados quanto à ocorrência e intensidade dos máximos e mínimos de absorção.

Os demais testes de caracterização química, tais como solubilidade, ponto de fusão, identificação por cromatografia em camada delgada e por cromatografia em papel e ensaios de pureza (limpidez de solução, substâncias relacionadas por cromatografia em camada delgada, metais pesados, perda por dessecação e cinzas sulfatadas) foram realizados por RIVELLI (2016) para o mesmo IFA,

incluindo mesmo lote, segundo Farmacopeia Internacional (INTERNATIONAL, 2015) e Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010).

A determinação do teor de lumefantrina no insumo farmacêutico ativo foi realizada empregando o método por CLAE-UV desenvolvido e validado. Foram realizadas 6 determinações a 24 µg/mL, analisadas em triplicata. Determinou-se a concentração média experimental por interpolação a partir da curva do ensaio de linearidade, calculando-se o teor de cada replicata pela equação:

$$Teor (\%) = \frac{CMD \times 100}{Concentração\ teórica}$$

Em que *CMD* = concentração média determinada.

A dispersão entre os resultados obtidos foi determinada pelo cálculo do DPR (%). As especificações adotadas foram teor entre 98,5 e 101,0% (INTERNATIONAL, 2015) e DPR inferior a 5,0% (GREEN, 1996; BRASIL, 2003; INTERNATIONAL, 2005; BRASIL, 2016).

## **4.8 Síntese e caracterização de polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina**

### **4.8.1 Otimização de protocolo de síntese para polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina**

Os polímeros molecularmente impressos (MIP) e não impressos (NIP) foram sintetizados por polimerização por precipitação, utilizando-se volume maior de solvente orgânico para propiciar formação de partículas menores e mais uniformes, sem necessidade de trituração. Para que fosse sintetizado um MIP para lumefantrina que apresentasse características ideais, como elevadas seletividade e capacidade adsortiva e estabilidade físico-química e térmica, optou-se pela otimização de um protocolo de síntese que direcionasse para condições reacionais ótimas, que ocorreu em cinco etapas.

Inicialmente, na primeira etapa, procurou-se a definição dos reagentes monômero funcional, *crosslinker* e solvente porogênio. Essa etapa inicial de otimização foi realizada empregando-se planejamento experimental Box-

Behnken de 3 variáveis, que foram avaliadas em 3 níveis cada. Outros parâmetros que afetam as condições de síntese, como tipo e quantidade de iniciador radicalar e temperatura, estão muito bem definidos na literatura, apresentando, aparentemente, uma menor influência nas propriedades físico-químicas dos polímeros. Tais parâmetros foram, portanto, fixados. O iniciador radicalar foi escolhido com base em levantamento na literatura, sendo escolhido o 2,2-azo-bis-isobutironitrila, que se mostrou o mais frequentemente utilizado. Depois da escolha do iniciador, definiu-se a temperatura necessária para que o processo de iniciação ocorresse; o AIBN sofre decomposição nos radicais isobutironitrila em temperaturas próximas a 60 °C, para dar início ao processo de iniciação radicalar. Dessa forma, definiu-se a temperatura de análise como 65 °C (LI, 2008).

No planejamento proposto para definição dos reagentes, cada variável foi avaliada em 3 níveis. Os monômeros funcionais foram escolhidos pensando-se em abranger desde monômeros predominantemente ácidos (2-HEMA) a monômeros predominantemente básicos (2-VP), optando-se pelos mais utilizados. O terceiro monômero escolhido foi o AMA, que apresenta comportamento intermediário, podendo funcionar tanto como um doador quanto como um acceptor de ligações de hidrogênio e, justamente por isso, tem sido o mais comumente utilizado na síntese de MIPs. Entre os muitos *crosslinkers* disponíveis, os mais frequentemente descritos na literatura são o EGDMA, geralmente utilizado para monômeros ácidos, e o DVB, normalmente utilizado para monômeros básicos. O terceiro *crosslinker* escolhido foi o TRIM, uma vez que muitos autores descrevem a obtenção de polímeros com maior capacidade de sorção, seletividade e poder de resolução (YE, 2013). Os solventes escolhidos foram acetato de etila, clorofórmio e tolueno. Para a escolha dos solventes orgânicos, foram levados em consideração solubilidade da lumefantrina e dos reagentes utilizados, apolaridade, baixa constante dielétrica e temperaturas de ebulição maiores que 60 °C, para diminuir a evaporação durante a síntese. O volume de solvente foi definido como 25 mL, aproximadamente cinco vezes maior que o volume utilizado em polimerização “em *bulk*”, suficiente para garantir que o processo de síntese se daria por polimerização por precipitação, mas consumindo-se menos solvente orgânico.

Com isso, as condições avaliadas durante as sínteses estão apresentadas na **Tabela 10**, sendo os níveis em que foram avaliadas descritas na **Tabela 11**:

**Tabela 10 – Condições analíticas definidas para otimização de protocolo de síntese de polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina por planejamento Box-Behnken.**

Parâmetro	Condições testadas
Monômero funcional	2-HEMA, 2-VP, AMA
<i>Crosslinker</i>	DVB, EGDMA, TRIM
Solvente porogênio	AcE, CLO, TOL
Iniciador	AIBN
Temperatura	65 °C
Volume de solvente porogênio	25 mL

2-HEMA: 2-hidroxietil metacrilato; 2-VP: 2-vinilpiridina; AMA: ácido metacrílico; DVB: divinilbenzeno; EGDMA: etilenoglicol dimetacrilato; TRIM: trimetilolpropano triacrilato; AcE: acetato de etila; CLO: clorofórmio; TOL: tolueno.

**Tabela 11 – Variáveis e níveis para otimização de protocolo de síntese de polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina por planejamento Box-Behnken de 3 variáveis.**

Variável	Nível		
	-1	0	1
Monômero funcional (X <sub>1</sub> )	2-VP	AMA	2-HEMA
<i>Crosslinker</i> (X <sub>2</sub> )	DVB	EGDMA	TRIM
Solvente porogênio (X <sub>3</sub> )	CLO	TOL	AcE

Inicialmente, as sínteses foram realizadas na proporção molar de 1:4:20 entre os reagentes, isto é, uma relação de 1:4 entre fármaco e monômero funcional e uma relação de 1:5 entre monômero funcional e *crosslinker*, que foram definidas por serem as mais comumente encontradas. As quantidades molares, em massa e em volume (quando aplicável) de fármaco, monômeros funcionais, *crosslinkers* e iniciador radicalar utilizadas estão detalhadas na **Tabela 12**.

**Tabela 12 – Quantidades utilizadas de fármaco, monômeros, *crosslinkers* e iniciador para síntese de polímeros molecularmente impressos (MIPs) para lumefantrina.**

Reagente	Quantidade em massa (mg)	Quantidade molar (mmol)	Quantidade em volume (µL)
2-VP	63,6080	0,6050	65,2000
2-HEMA	78,7326	0,6050	73,4000
AIBN	20,0000	0,1220	Não aplicável
AMA	52,0830	0,6050	51,3000
DVB	393,8140	3,0249	430,9000
EGDMA	599,5992	3,0249	570,5000
Lumefantrina IFA	80,0000	0,1512	Não aplicável
TRIM	896,3436	3,0249	814,9000

O planejamento BBD proposto resultou em um delineamento experimental de 13 experimentos, incluindo ponto central. A matriz de combinação fatorial obtida está descrita na **Tabela 13**, para valores codificados para variáveis e níveis, e **Tabela 14**, para valores reais para variáveis e níveis. Os níveis do ponto central foram definidos como os reagentes mais utilizados, segundo levantamento bibliográfico para polímeros de impressão molecular utilizados em extração em fase sólida molecularmente impressa.

**Tabela 13 – Matriz experimental para otimização de condições de síntese de polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina utilizando planejamento Box-Behnken, com valores codificados.**

Experimento	Variáveis e níveis codificados		
	X1	X2	X3
1	1	1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	-1	-1	0
5	1	0	1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	-1	0	-1
9	0	1	1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	-1	-1
13 (PONTO CENTRAL)	0	0	0

**Tabela 14 – Matriz experimental para otimização de condições de síntese para polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina utilizando planejamento Box-Behnken, com valores reais.**

Experimento	Variáveis e níveis reais		
	X1	X2	X3
1	2-HEMA	TRIM	TOL
2	2-HEMA	DVB	TOL
3	2-VP	TRIM	TOL
4	2-VP	DVB	TOL
5	2-HEMA	EGDMA	CLO
6	2-HEMA	EGDMA	AcE
7	2-VP	EGDMA	CLO
8	2-VP	EGDMA	AcE
9	AMA	TRIM	CLO
10	AMA	TRIM	AcE
11	AMA	DVB	CLO
12	AMA	DVB	AcE
13 (PONTO CENTRAL)	AMA	EGDMA	TOL

Para síntese do MIP, pesou-se, em béquer, exatamente 80 mg (0,1512 mmol) de lumefantrina IFA e solubilizou-se com 20 mL de solvente orgânico, transferindo-se para tubo de ensaio com tampa de rosca de 25 mL. Em seguida, adicionou-se o monômero funcional e, posteriormente, o *crosslinker*, à mistura reacional. Borbulhou-se gás nitrogênio por 10 minutos, com auxílio de pipeta de Pasteur, para eliminação do oxigênio dissolvido. Depois, adicionou-se 20 mg de 2,2-azo-bis-isobutironitrila, previamente solubilizados em 5 mL de solvente. Borbulhou-se gás nitrogênio por mais 5 minutos e imediatamente fechou-se o tubo de ensaio, rosqueando e vedando com parafilme, para minimizar a penetração de ar e evaporação do solvente. Transferiu-se o tubo para banho termostático, mantido sob agitação branda e temperatura de 65 °C por 24 horas. Para síntese do NIP, seguiu-se o mesmo protocolo, excetuando-se a adição de lumefantrina.

Depois de 24 horas, separou-se o polímero obtido do líquido residual, transferindo-se para placas de Petri e secando-se em estufa à vácuo a 60 °C. Depois de secos, os MIPs foram transferidos para cartuchos de papel de filtro tipo Whatman, para remoção da lumefantrina por extração por Soxhlet, utilizando clorofórmio como solvente extrator, dada à elevada solubilidade da lumefantrina em clorofórmio. O procedimento de extração por Soxhlet mostrou-se mais rápido, mais eficiente e menos dispendioso que o procedimento de extração por centrifugação, que demandava maior trabalho manual. O tempo de extração foi de 24 horas, período depois do qual não mais se identificou lumefantrina no extrato de limpeza por CLAE-UV, utilizando o método analítico desenvolvido e validado anteriormente. Após a remoção da lumefantrina, os polímeros foram novamente submetidos à secagem em estufa a vácuo, na temperatura de 60 °C, e posteriormente peneirados por malha de 100 µm para uniformizar o tamanho das partículas, excluindo-se partículas muito heterogêneas ou aglomerados de partículas. Os NIPs também foram submetidos aos mesmos procedimentos de secagem e extração por Soxhlet. Tal padronização foi importante para remover reagentes que não sofreram reação e solventes orgânicos empregados na síntese e ainda para permitir uma comparação mais fidedigna entre MIP e NIP nos ensaios de caracterização

físico-química e estudos de sorção. Por fim, os polímeros foram transferidos para frascos plásticos e mantidos em dessecador até utilização.

Os 13 MIPs e 13 NIPs obtidos foram submetidos então a ensaios de sorção estática, para definição dos respectivos coeficientes de distribuição ( $K_d$ ) e fatores de impressão ( $IF$ ). Para esses ensaios, foram pesados exatamente 50 mg de polímero, que foram transferidos para erlenmeyers de 25 mL. Em seguida, adicionou-se 5 mL de *solução de lumefantrina IFA a 24 µg/mL* e fechou-se os erlenmeyers com rolhas de borracha, vedando-se com parafilme. Os erlenmeyers foram colocados no interior de béqueres de 100 mL, preenchidos com aproximadamente 20 mL de água destilada, e transferidos para banho termostático mantido a 25 °C, sob agitação branda constante, por 48 horas. Após 48 horas, os conteúdos dos erlenmeyers foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL e centrifugados a 320 x *g* por 5 minutos. Os sobrenadantes foram coletados em tubos de ensaio de 10 mL e transferidos para concentrador de amostras, para evaporação de solvente, mantidos a 60 °C sob fluxo de ar comprimido. Os conteúdos dos tubos foram ressuspensos com 5 mL de fase móvel, para ajustar o volume final ao volume inicialmente adicionado, uma vez que pequenas modificações poderiam ocorrer, em virtude de evaporação de solvente durante o ensaio, o que alteraria a concentração das amostras, levando a resultados menos confiáveis. Depois da ressuspensão, as soluções foram filtradas para *vial* por filtro de seringa de 0,45 µm e analisadas, em triplicata, para quantificação de lumefantrina e determinação dos coeficientes de distribuição e fatores de impressão.

O coeficiente de distribuição ( $K_d$ ), que mede a capacidade de sorção máxima, foi calculado segundo a equação:

$$K_d = \frac{(C_0 - C_{final}) \times V}{m}$$

Em que  $C_0$  = concentração inicial da *solução de lumefantrina IFA*, igual a 24 µg/mL;  $C_{final}$  = concentração final do sobrenadante após ressuspensão, determinada experimentalmente;  $V$  = volume de *solução de lumefantrina IFA*



adicionado para análise (em mL) e  $m$  = massa de polímero pesada adicionada para análise (em g).

A partir dos coeficientes de distribuição para MIP e NIP, foram determinados os fatores de impressão ( $IF$ ), por intermédio da equação:

$$IF = \frac{K_d \text{ MIP}}{K_d \text{ NIP}}$$

Os resultados, em termos de  $K_d$  e  $IF$ , foram analisados estatisticamente utilizando *software* STATISTICA<sup>®</sup> 8.0. Foram obtidos diagramas de Pareto, superfícies de resposta e valores críticos para as respostas, contribuindo para definição de condições ótimas para monômero funcional, *crosslinker* e porogênio, adotando-se  $\alpha = 0,05$  como nível de significância. Um MIP e um NIP foram sintetizados e caracterizados, quanto ao seu  $K_d$  e  $IF$ , com as condições definidas após a primeira etapa de otimização. Posteriormente, uma segunda etapa de otimização foi realizada, avaliando-se a síntese por polimerização por precipitação, mas empregando uma mistura de monômeros funcionais, em diferentes proporções, em lugar de um único monômero. Com base na primeira etapa de otimização, os monômeros escolhidos foram 2-VP e AMA, que apresentaram melhores resultados. Os polímeros foram sintetizados na mesma proporção (1:4:20 para lumefantrina, monômero funcional e *crosslinker*), utilizando-se EGDMA como *crosslinker*, 25 mL de tolueno como solvente porogênio, 20 mg de AIBN como iniciador radicalar e iniciação por aquecimento a 65 °C, em banho termostático sob agitação branda, por 24 horas. Testaram-se 3 proporções diferentes da mistura 2-VP e AMA, descritas na **Tabela 15**.

**Tabela 15 – Quantidades e proporções adicionadas dos monômeros funcionais 2-vinilpiridina e ácido metacrílico para avaliação da eficiência de copolimerização na otimização de protocolo de síntese para polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina.**

Experimento	Quantidade adicionada de 2-VP				Quantidade adicionada de AMA			
	Proporção (%)	Quantidade em massa (mg)	Quantidade molar (mmol)	Quantidade em volume (µL)	Proporção (%)	Quantidade em massa (mg)	Quantidade molar (mmol)	Quantidade em volume (µL)
1	25	9,6239	0,1513	16,3	75	23,6353	0,4538	38,5
2	50	19,2414	0,3025	32,6	50	15,7551	0,3025	25,7
3	75	28,8653	0,4538	48,9	25	7,8802	0,1513	12,8

As quantidades de lumefantrina, *crosslinker* e AIBN foram as mesmas apresentadas na **Tabela 12** ou descritas no procedimento de síntese. Em posse dos valores de  $K_d$  e  $IF$ , compararam-se os resultados obtidos para MIP e NIP sintetizados nas condições definidas após a primeira etapa de otimização, para que fosse definido se a síntese com um único polímero ou com uma mistura de polímeros (copolimerização) seria utilizada posteriormente.

Em uma terceira etapa de otimização, buscou-se definir se a proporção entre fármaco, monômero funcional e *crosslinker* utilizada de 1:4:2 era realmente a proporção ideal, testando-se diferentes relações entre fármaco e monômero funcional, enquanto se mantinha a relação entre monômero funcional e *crosslinker* constante (1:5). Testou-se proporções de 1:6:30, 1:8:40 e 1:10:50, utilizando 2-VP e EGDMA, nas quantidades adicionadas apresentadas na **Tabela 16**. Foram utilizados 80 mg de lumefantrina IFA, 25 mL de tolueno e 20 mg de AIBN; as demais condições de síntese e avaliação dos polímeros foram idênticas às descritas anteriormente. Definiu-se como proporção molar a que produzisse o MIP com maior  $K_d$  e, prioritariamente, maior  $IF$ .

**Tabela 16 – Quantidades e proporções adicionadas de 2-vinilpiridina e de etilenoglicol dimetacrilato para avaliação de diferentes proporções molares fármaco:monômero funcional:crosslinker na otimização de protocolo de síntese para polímero molecularmente impresso (MIP) para lumefantrina.**

Experimento	Proporção molar	Quantidade adicionada de 2-VP			Quantidade adicionada de EGDMA		
		Quantidade em massa (mg)	Quantidade molar (mmol)	Quantidade em volume ( $\mu$ L)	Quantidade em massa (mg)	Quantidade molar (mmol)	Quantidade em volume ( $\mu$ L)
1	01:06:30	57,7243	0,9075	98,7	2720,5914	4,5374	855,5
2	01:08:40	76,9657	1,2100	130,4	3627,4552	6,0498	1140,7
3	01:10:50	96,2071	1,5125	162,9	4534,3191	7,5623	1425,8

Depois de otimizados reagentes e proporções molares, foi avaliada a eficiência do método pelo qual se provocava a decomposição e ativação do AIBN, em uma quarta etapa. Desse modo, utilizando 80 mg de lumefantrina, 2-VP e EGDMA, na proporção inicial 1:4:30, tolueno (25 mL) e AIBN, nas quantidades mencionadas anteriormente, sintetizou-se mais um MIP e um NIP, utilizando radiação UV para promover iniciação química do AIBN, em vez de aquecimento. O preparo da mistura reacional foi realizado segundo o

procedimento descrito anteriormente, sendo a única diferença que, após fechados, os tubos foram transferidos para banho termostático mantido a 4 °C, equipado com lâmpada de mercúrio (Hg) de 125 W para emissão de radiação UV, por 24 horas. Depois, os tubos foram retirados e submetidos aos procedimentos para remoção de lumefantrina, secagem e determinação de  $K_d$  e  $IF$ , conforme descrito anteriormente. Os resultados para MIP e NIP obtidos por esse método foram comparados aos resultados obtidos pelo método anterior, com aquecimento a 65 °C por 24 horas.

Em uma última etapa de otimização, estudou-se a influência de pré-polimerização na seletividade e capacidade de sorção dos polímeros. Os reagentes empregados foram 2-VP, EGDMA e tolueno, na proporção molar de 1:4:30 e iniciação do AIBN provocada por aquecimento a 65 °C. Houve uma pequena diferença no procedimento descrito anteriormente: após a adição do monômero funcional, a mistura reacional foi mantida a 4 °C, em banho termostático, por 4 horas e por 8 horas, antes da adição do *crosslinker*. Procedeu-se à extração de lumefantrina, secagem e ensaio de sorção estática para determinação de  $K_d$  e  $IF$ , que foram comparados aos obtidos para os polímeros obtidos sem pré-polimerização. O protocolo com condições ideais de síntese, definidas após 5 etapas de otimização, foi padronizado para sínteses posteriores. MIP e NIP foram sintetizadas nas condições definidas, sendo determinados  $K_d$  e  $IF$  por estudos de sorção estática, conforme descrito anteriormente.

#### **4.8.2 Caracterização dos polímeros impresso (MIP) e não impresso (NIP) otimizados para lumefantrina**

MIP e NIP obtidos após a etapa de otimização foram caracterizados quanto à morfologia, por análise de distribuição de tamanho de partícula, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de área superficial e volume de poro, quanto à estabilidade térmica, por calorimetria exploratória diferencial (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) e termogravimetria (TG), e por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

#### 4.8.2.1 Caracterização quanto à morfologia

Para determinação do tamanho e distribuição de tamanho de partícula para os polímeros empregou-se método de difração por raio laser, em analisador de partículas Beckman Coulter LS 13 320. Foram preparadas suspensões de 50 mg dos polímeros em 25 mL de água ultrapura, que foram posteriormente adicionadas aos poucos no equipamento, para se atingir nível de obscuração igual a 10%, mantidas sob agitação e analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos em função da média, mediana (D50), percentil 90 (D90) e *SPAN*, medida da amplitude de distribuição de tamanho de partícula, calculado segundo a equação:

$$SPAN = \frac{D90 - D50}{D50}$$

Os polímeros foram caracterizados ainda por MEV. O ensaio foi realizado em microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM3000 TABLETOP MICROSCOPE, empregando-se voltagem de 15,0 kV e distância de trabalho entre 6,0 e 8,2 mm como parâmetros de análise. Imagens obtidas foram processadas por *software* TM3000, utilizando aumentos de 500x e 1500x. Os polímeros foram analisados à temperatura ambiente e não houve metalização das amostras, uma vez que a análise foi realizada em condições de baixo vácuo. Utilizando-se analisador de área superficial e tamanho de poro Quantachrome Nova 3200e, foram realizadas ainda determinações de área superficial específica e de propriedades texturais de poros, como volume e diâmetro médio, para MIP e NIP, empregando método de sorção de nitrogênio, em que se mede o volume de nitrogênio adsorvido pelos polímeros em diferentes condições de pressões, em temperaturas criogênicas – iguais a -195,8 °C, método denominado BET (*Brunauer-Emmett-Teller*).

#### 4.8.2.2 Caracterização quanto à estabilidade térmica

MIP, NIP e lumefantrina foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC), em equipamento Shimadzu DSC-60. O programa de temperatura variou da temperatura ambiente a 300 °C. Aproximadamente 3,5

mg de polímero foram colocados, sem tratamento prévio, em porta-amostras de alumínio selado com furo. Os polímeros e o fármaco foram analisados por termogravimetria, por equipamento de termogravimetria Shimadzu modelo TGA 50WS. O programa de temperatura variou da temperatura ambiente a 600 °C, para os polímeros, e a 900 °C, para lumefantrina. Cerca de 10 mg de cada polímero foram transferidos para porta-amostras de platina abertos. Em ambos os ensaios, utilizou-se taxa de aquecimento a 10 °C/min e nitrogênio como gás de arraste, a vazão dinâmica de 50 mL/min,

#### **4.8.2.3 Caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

MIP, antes e após a remoção do molde, NIP e lumefantrina foram avaliados por FTIR, sendo obtidos espectros de absorção molecular, na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , em espectrofotômetro FTIR THERMO Fischer Scientific Nicolet 6700, em modo de transmissão (modo ATR), com 64 varreduras e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , à temperatura ambiente, sem qualquer tratamento prévio. Os espectros foram comparados entre si, para MIP e NIP, atribuindo-se as bandas de absorção principais aos respectivos grupos funcionais.

#### **4.8.3 Estudos de sorção**

Estudos de sorção estática e dinâmica foram realizados para MIP e NIP, para avaliação do perfil e cinética de sorção dos polímeros. Em estudo de sorção estática, foram realizados 6 experimentos para cada polímero, utilizando-se concentrações crescentes da *solução de lumefantrina IFA*, iguais a 12,0; 18,0; 24,0; 30,0 e 36,0  $\mu\text{g/mL}$ , preparadas por diluição de uma *solução estoque de lumefantrina IFA*, procedendo-se conforme descrito anteriormente nos ensaios de sorção estática para otimização das condições reacionais, para quantificação de lumefantrina e determinação dos  $K_d$  e  $IF$ .

Já no estudo de sorção dinâmica, pesou-se exatamente 50 mg de polímero e transferiu-se para erlenmeyer de 25 mL, em que se adicionou 5 mL de *solução*

de lumefantrina IFA a 24  $\mu\text{g/mL}$ , fechando-se com rolha de plástico e parafilme. O erlenmeyer foi posicionado no interior de béquer de 100 mL contendo cerca de 20 mL de água destilada, sendo transferido para banho termostático mantido a 25 °C, sob agitação branda constante, por 48 horas. Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram recolhidas nos intervalos de tempo de 30 min e 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas. A seguir, foram filtradas para *vial* por filtro de seringa de 0,45  $\mu\text{m}$  para quantificação de lumefantrina e determinação da quantidade de fármaco sorvida, com reposição do volume inicial pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de fase móvel por retirada (condição *sink* ou esgotamento). Foram determinadas a quantidade de fármaco sorvida, em  $\mu\text{g}$  e percentuais (em relação à quantidade inicial), obtidos comparando-se as concentrações determinadas para os sobrenadantes de cada coleta, com a concentração inicial da *solução de lumefantrina IFA* empregada nos ensaios. Os resultados de quantidade de fármaco sorvida foram plotados pelo tempo de coleta (em minutos), para construção de uma curva que descrevesse o perfil cinético dos processos adsorptivos para MIP e para NIP.

#### 4.8.4 Estudos de seletividade

Para avaliação da seletividade do MIP e NIP, estudos de sorção estática foram realizados, separadamente, para lumefantrina e para halofantrina, escolhida por ser estruturalmente análoga ao analito de interesse. Preparou-se *solução de halofantrina SQR a 24  $\mu\text{g/mL}$* , seguindo-se o mesmo procedimento de preparo descrito para lumefantrina. Foram utilizados 50 mg de polímero e 5 mL das soluções dos fármacos, procedendo-se conforme descrito anteriormente. Determinaram-se  $K_d$  e  $IF$  para MIP e NIP frente à lumefantrina e à halofantrina, avaliando-se a seletividade por intermédio do fator de separação ou constante de seletividade ( $\alpha$ ) e do fator de seletividade ( $S$ ), calculados segundo as equações:

$$\alpha = \frac{K_{d\ LMF}}{K_{d\ HAL}}$$

$$S = \frac{IF_{LMF}}{IF_{HAL}}$$

#### 4.8.5 Estudos de reprodutibilidade entre diferentes lotes (interlotes)

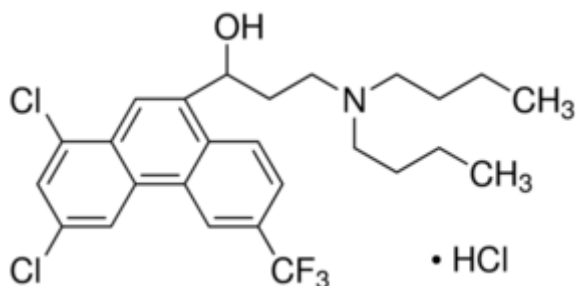
Avaliou-se a reprodutibilidade do procedimento de síntese pela comparação dos resultados obtidos para o lote inicialmente produzido (lote 1) com os resultados obtidos para outros dois lotes sintetizados posteriormente, seguindo o mesmo procedimento (lotes 2 e 3), quanto aos parâmetros  $K_d$  e  $IF$ . Os ensaios foram realizados em duplicata, para MIP e NIP obtidos, em um total de 12 experimentos ( $n = 12$ ).

### 4.9 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE-UV para quantificação de lumefantrina em plasma humano

#### 4.9.1 Seleção do padrão interno (PI)

Optou-se pela utilização de padrão interno no desenvolvimento e validação do método bioanalítico, a fim de se obter resultados suficientemente precisos e exatos, por se tratar de uma amostra complexa que requer uma etapa de preparo de amostras. Um padrão interno, segundo SNYDER *et al.* (1997) deve apresentar o mesmo comportamento químico do analito nos processos de extração e preparo da amostra, sendo, preferencialmente, estruturalmente relacionado ao analito. Assim, baseando-se nos aspectos de similaridade estrutural e química, disponibilidade comercial e outros métodos descritos na literatura, definiu-se a halofantrina (**Figura 10**) como o PI.

Figura 10 – Estrutura química da halofantrina (padrão interno).



#### **4.9.2 Desenvolvimento de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano empregando CLAE-UV e MISPE como etapa de preparo de amostras**

O método bioanalítico foi desenvolvido a partir do método analítico previamente desenvolvido e validado. Contudo, em virtude da maior complexidade de matrizes biológicas, optou-se pela utilização de coluna mais eficiente e com maior poder de separação. Assim, nessa etapa do projeto foi empregada para diminuir a influência de possíveis interferentes do plasma, ao garantir uma melhor separação entre eles, analito de interesse e padrão interno sem a necessidade de corridas analíticas muito longas. Portanto, com o objetivo de se obter método mais eficiente e rápido, utilizou-se coluna de núcleo fundido Kinetex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 2,6 µm). Por causa da modificação significativa na natureza da fase estacionária, para uma fase mais apolar, e para suprir a necessidade de se trabalhar com concentrações consideravelmente menores em método bioanalítico, foram necessários ajustes na composição da fase móvel e otimização de parâmetros operacionais do equipamento.

Para otimização das condições cromatográficas, foi preparada *solução de lumefantrina SQR e halofantrina SQR a 5,0 µg/mL*, a partir da diluição de *soluções estoque de lumefantrina SQR e halofantrina SQR a 100,0 µg/mL*, preparada como se descreve.

*Solução estoque de lumefantrina (ou halofantrina) SQR a 100,0 µg/mL*: pesou-se exatamente 2,5 mg de lumefantrina SQR (ou halofantrina SQR) e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 0,5 mL de diclorometano, para solubilização dos fármacos, seguido pela adição de cerca de 20 mL de metanol. Submeteu-se ao ultrassom por 10 minutos, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se.

*Solução de lumefantrina SQR + halofantrina SQR a 5,0 µg/mL*: transferiu-se 0,5 mL de *solução de lumefantrina SQR* e 0,5 mL de *solução de halofantrina SQR* para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol, homogeneizou-se e filtrou-se para *vial* por filtros de seringa de 0,45 µm.



Inicialmente, definiu-se o comprimento de onda ( $\lambda$ ) de análise, adotando-se seletividade e detectabilidade para lumefantrina e halofantrina como critérios para definição do  $\lambda$  ideal. Foram testados os  $\lambda$  de 240, 305 e 335 nm, com base nos espectros de absorção no UV para lumefantrina, selecionando-se, entre os três, aquele mais adequado para analito e PI. Posteriormente, otimizou-se a composição e vazão da fase móvel, temperatura, e concentração de TFA empregando planejamento experimental Doehlert de 5 variáveis. Escolheu-se um DM para que cada variável fossem avaliadas por número diferente de níveis, adotando maior número para variáveis que mais influenciam nos resultados. Parâmetros escolhidos e faixas avaliadas estão apresentados na **Tabela 17**.

**Tabela 17 – Variáveis, número de níveis e faixas avaliadas em planejamento Doehlert de 5 variáveis para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Número de níveis	Variável	Faixa avaliada
5	Temperatura (°C) (X1)	20-40
7	Fluxo (mL/min) (X2)	0,7-1,3
7	Proporção de solvente orgânico (%) (X3)	78-88
7	Concentração de TFA (%) (X4)	0,04-0,14
3	Tipo de solvente orgânico (X5)	Não aplicável

Foram selecionadas as variáveis que influenciam fortemente nos parâmetros cromatográficos definidos como respostas, que foram área sob o pico, altura do pico, fator de capacidade ou retenção ( $k$ ), assimetria ( $A$ ), resolução, pureza de pico e número de pratos teóricos ( $N$ ), em relação ao pico da lumefantrina – com exceção do parâmetro resolução, que considera também o pico da halofantrina. Vazão, proporção do solvente orgânico e concentração de TFA foram consideradas os parâmetros mais importantes, sendo, portanto, avaliados em número maior de níveis (7). Testaram-se concentrações de TFA de 0,04 a 0,14% (v/v), para avaliar sua influência na retenção e no formato do pico. A proporção de solvente orgânico foi avaliada no intervalo compreendido entre 78 e 88%, definido com base nos outros métodos cromatográficos disponíveis para quantificação de lumefantrina e halofantrina empregando colunas C<sub>18</sub>. Vazão de fase móvel foi avaliada no intervalo de 0,7 a 1,3 mL/min, levando em consideração boa eficiência de separação e tempos de corrida práticos.

Para avaliação da temperatura, testou-se a faixa compreendida entre 20 e 40 °C, em 5 níveis. O tipo de solvente orgânico foi avaliado em 3 níveis. Os solventes orgânicos escolhidos foram metanol e acetonitrila, sendo os níveis superior e inferior definidos como os solventes puros, enquanto o nível intermediário foi definido como mistura 1:1 (v/v) desses solventes. A matriz experimental (**Tabelas 18 e 19**) gerou 31 experimentos independentes, mas como o ponto central (experimento 1) foi avaliado em triplicata, o total de experimentos foram 33. Injetaram-se 20 µL de *solução de lumefantrina SQR + halofantrina SQR a 5,0 µg/mL*, em triplicata, para cada experimento, definindo-se o tempo de corrida como 30 minutos. As análises foram realizadas em 305 nm e, entre um experimento e outro, estabilizou-se a coluna por 30 minutos, pela injeção de 5 µL de metanol puro.

**Tabela 18 – Matriz experimental para planejamento Doehlert de 5 variáveis, com valores codificados, para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Experimento	Variáveis codificadas				
	X1	X2	X3	X4	X5
1	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
3	0,5	0,866	0	0	0
4	0,5	0,289	0,817	0	0
5	0,5	0,289	0,204	0,791	0
6	0,5	0,289	0,204	0,158	0,775
7	-1	0	0	0	0
8	-0,5	-0,866	0	0	0
9	-0,5	-0,289	-0,817	0	0
10	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791	0
11	-0,5	-0,866	-0,204	-0,158	-0,775
12	0,5	-0,289	0	0	0
13	0,5	-0,289	-0,817	0	0
14	0,5	-0,289	-0,204	-0,791	0
15	0,5	-0,289	-0,204	-0,158	-0,775
16	-0,5	0,866	0	0	0
17	0	0,577	-0,817	0	0
18	0	0,577	-0,204	-0,719	0
19	0	0,577	-0,204	-0,158	-0,775
20	-0,5	0,289	0,817	0	0
21	0	-0,577	0,817	0	0
22	0	0	0,613	-0,791	0
23	0	0	0,613	-0,158	-0,775
24	-0,5	0,289	0,204	0,791	0
25	0	-0,577	0,204	0,791	0
26	0	0	-0,613	0,791	0
27	0	0	0	0,633	-0,775
28	-0,5	0,289	0,204	0,158	0,775
29	0	-0,577	0,204	0,158	0,775
30	0	0	-0,613	0,158	0,755
31	0	0	0	-0,633	0,775

**Tabela 19 – Matriz experimental para planejamento Doehlert de 5 variáveis, com valores reais, para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Experimento	Variáveis				
	X1	X2	X3	X4	X5
1	30	1	83	0,09	MeOH: MeCN 50:50
2	40	1	83	0,09	MeOH: MeCN 50:50
3	35	1,3	83	0,09	MeOH: MeCN 50:50
4	35	1,1	88	0,09	MeOH: MeCN 50:50
5	35	1,1	84,25	0,14	MeOH: MeCN 50:50
6	35	1,1	84,25	0,1	MeCN 100
7	20	1	83	0,09	MeOH: MeCN 50:50
8	25	0,7	83	0,09	MeOH: MeCN 50:50
9	25	0,9	78	0,09	MeOH: MeCN 50:50
10	25	0,9	81,75	0,04	MeOH: MeCN 50:50
11	25	0,7	81,75	0,08	MeOH 100
12	35	0,9	83	0,09	MeOH: MeCN 50:50
13	35	0,9	78	0,09	MeOH: MeCN 50:50
14	35	0,9	81,75	0,04	MeOH: MeCN 50:50
15	35	0,9	81,75	0,08	MeOH 100
16	25	1,3	83	0,09	MeOH: MeCN 50:50
17	30	1,2	78	0,09	MeOH: MeCN 50:50
18	30	1,2	81,75	0,04	MeOH: MeCN 50:50
19	30	1,2	81,75	0,08	MeOH 100
20	25	1,1	88	0,09	MeOH: MeCN 50:50
21	30	0,8	88	0,09	MeOH: MeCN 50:50
22	30	1	86,75	0,04	MeOH: MeCN 50:50
23	30	1	86,75	0,08	MeOH 100
24	25	1,1	84,25	0,14	MeOH: MeCN 50:50
25	30	0,8	84,25	0,14	MeOH: MeCN 50:50
26	30	1	79,25	0,14	MeOH: MeCN 50:50
27	30	1	83	0,13	MeOH 100
28	25	1,1	84,25	0,1	MeCN 100
29	30	0,8	84,25	0,1	MeCN 100
30	30	1	79,25	0,1	MeCN 100
31	30	1	83	0,05	MeCN 100

Os resultados de área do pico, altura do pico,  $k$ ,  $A$ , resolução, pureza de pico e  $N$ , para a lumefantrina, foram determinados pela média encontrada para as 3 replicatas, por experimento. Utilizou-se a função desejabilidade, definindo-se desejabilidades individuais ( $d_i$ ) para cada variável e, posteriormente, a desejabilidade global ( $D$ ). Classificação, valores alvos, mínimos e máximos foram definidos para cada resposta avaliada, conforme apresentado na **Tabela 20**. Os valores de  $D$  foram assumidos como única resposta para o planejamento Doehlert, sendo analisados utilizando *software* STATISTICA® 8.0. Diagramas de Pareto, valores críticos e superfícies de respostas foram obtidos, a partir dos quais foram determinadas condições ótimas para aperfeiçoamento das 5 variáveis independentes selecionadas, de forma

simultânea. Uma nova corrida analítica, utilizando as condições otimizadas, foi realizada, em triplicata. Ajustes finos posteriores foram realizados, para otimizar ainda mais respostas cujos valores encontrados não foram considerados suficientemente adequados.

As variáveis foram classificadas de acordo com a resposta que se esperava de cada uma delas. Para os parâmetros fator de capacidade, assimetria e resolução, desejava-se um valor intermediário, próximo a determinado valor nominal, uma vez que resultados inferiores ou superiores são considerados inadequados. Portanto, tais parâmetros foram classificados como variáveis do tipo *NTB*. Para as demais variáveis, quanto maiores os resultados encontrados, mais satisfatórios, de modo que estes parâmetros foram classificados como variáveis do tipo *LTB*.

**Tabela 20 – Classificação, valor alvo e limites inferior e superior para as respostas avaliadas na otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Resposta	Classificação	Valor alvo (T)	Limite inferior (Li)	Limite superior (Ls)
Fator de capacidade ( <i>k</i> )	<i>NTB</i>	3	1,5	6
Área	<i>LTB</i>	150000	120000	–
Altura	<i>LTB</i>	20000	15000	–
Assimetria ( <i>A</i> )	<i>NTB</i>	1	0,8	2
Resolução	<i>NTB</i>	2	2	10
Pureza de pico	<i>LTB</i>	0,999	0,99	–
Razão (S/N)	<i>LTB</i>	1000	700	–
Número de pratos teóricos ( <i>N</i> )	<i>LTB</i>	6000	2000	–

*NTB*: quanto mais próximo a um valor nominal (alvo), melhor (do inglês, *nominal the better*);

*LTB*: quanto maior, melhor (do inglês, *larger the better*).

Depois de definidos comprimento de onda, composição e vazão de fase móvel e temperatura, foram otimizados parâmetros instrumentais do cromatógrafo, referentes à frequência de aquisição de dados (*data rate*) e ao tempo de resposta do detector (*rise time*). Esses parâmetros foram avaliados porque poderiam comprometer a eficiência da coluna de núcleo fundido. O parâmetro assimetria (*A*), para lumefantrina e halofantrina, foi definido como resposta. Para avaliação, injetaram-se 20 µL de solução de lumefantrina SQR + halofantrina SQR a 5 µg/mL, variando-se separadamente um dos parâmetros, enquanto se mantinha o outro na condição padrão definida pelo fornecedor, em uma única corrida, nas condições cromatográficas definidas após otimização. O tempo de resposta no detector (*rise time*) foi avaliado nos níveis 0,1, 0,5, 1,0,

2,0, 5,0 e 10,0 s; a frequência de aquisição de dados (*data rate*) foi avaliada nos níveis 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 e 20,0 Hz.

#### **4.9.3 Desenvolvimento da etapa de preparo de amostras por extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE)**

Para o preparo das amostras de plasma, 500 µL de *solução de ácido perclórico 0,2% em acetonitrila* foram adicionados a 500 µL de amostras de plasma, em tubos Falcon de 15 mL, para precipitação proteica. Os tubos foram centrifugados a 480 x g por 15 minutos. Depois, 500 µL do sobrenadante foram transferidos para o cartucho de MISPE, prosseguindo-se o procedimento de extração conforme discutido posteriormente. Cartuchos Strata-X<sup>®</sup> (Phenomenex, Índia) de 3 mL, comercialmente disponíveis, foram esvaziados. Posteriormente, os cartuchos vazios e os *frits* de fluoreto de polivilideno (PVDF) foram lavados por 200 mL com mistura de metanol e água ultrapura, na proporção 60:40 (v/v) e submetidos a sonicação por 20 minutos. Os cartuchos vazios foram transferidos para câmara de vácuo Manifold<sup>®</sup>, sendo um dos *frits* posicionado na porção inferior. Transferiu-se, quantitativamente, quantidade exatamente definida e pesada do MIP, previamente suspensa em 5 mL de metanol, e permitiu-se que o conteúdo adicionado sedimentasse por 2 minutos. O segundo frit foi colocado sobre o conteúdo e pressionado homogeneamente, até que houvesse resistência à pressão. Os cartuchos foram padronizados quanto à quantidade de polímero adicionada (em mg) e quanto à altura do cartucho formado (em cm), para garantir que todos os cartuchos produzidos apresentassem um grau similar de compactação.

Uma vez preenchidos com o sorvente, os cartuchos foram condicionados com 2 mL (2x1 mL) de metanol seguidos de 2 mL (2x1 mL) de água ultrapura, por centrifugação a 320 x g por 2 minutos, a cada adição de solvente, procedimento frequentemente adotado no condicionamento de cartuchos convencionais e de MIPSE na literatura científica. Após condicionados, os cartuchos foram embrulhados em papel alumínio e mantidos em refrigerador a 8 °C até momento de uso, para evitar evaporação de solvente, secagem e fragmentação da fase extratora. O procedimento de condicionamento se repetiu sempre que os cartuchos foram utilizados para extração de amostras.

A etapa de carregamento (*loading*) ou extração das amostras foi otimizada empregando planejamento fatorial fracionário (PFF) de meia fração, com 2 níveis e 4 variáveis (PFF  $2^{4-1}$ ) e ponto central, utilizando-se uma *solução de lumefantrina SQR + halofantrina SQR*, no maior nível de concentração da curva de calibração, igual a 10000 ng/mL para lumefantrina e 2000 ng/mL para halofantrina. Os parâmetros escolhidos para otimização foram pH aparente do diluente, quantidade de polímero, força centrífuga/a relativa (RCF) e volume de amostra aplicado, avaliados nos níveis dispostos na **Tabela 21**.

**Tabela 21 – Variáveis e níveis avaliados em PFF  $2^{4-1}$  na otimização da etapa de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) de lumefantrina**

Variável	Níveis		
	-1	0	1
pH aparente do diluente (X1)	3,5	7,0	10,5
Quantidade de polímero (mg) (X2)	30	60	90
Força centrífuga relativa (x g) (X3)	800	1200	1600
Volume de amostra ( $\mu$ L) (X4)	500	750	1000

Foram utilizadas diferentes soluções diluentes para que valores diferentes de pH fossem possíveis. Para pH aparente de aproximadamente 3,5, utilizou-se *solução de ácido trifluoroacético 0,05% em metanol*; para pH próximo a 7,0, utilizou-se metanol puro; para pH aparente de aproximadamente 10,5, utilizou-se *solução de trietilamina 0,4% em metanol*. A matriz experimental obtida para o planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , com níveis codificados e reais, está descrita nas **Tabelas 22 e 23**.

**Tabela 22 – Matriz experimental para PFF  $2^{4-1}$  com valores codificados para as variáveis avaliadas na otimização da etapa de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) para lumefantrina**

Experimento	Variáveis e níveis codificados			
	X1	X2	X3	X4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

**Tabela 23 – Matriz experimental para PFF 2<sup>4-1</sup> com valores reais para as variáveis avaliadas na otimização de etapa de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) para lumefantrina**

Experimento	Variáveis e níveis reais			
	X1	X2	X3	X4
1	3,5	30	800	500
2	10,5	30	800	1000
3	3,5	90	800	1000
4	10,5	90	800	500
5	3,5	30	1600	1000
6	10,5	30	1600	500
7	3,5	90	1600	500
8	10,5	90	1600	1000
9	7,0	60	1200	750
10	7,0	60	1200	750
11	7,0	60	1200	750

Na elaboração da matriz, os valores codificados para a variável X4 foram obtidos pelo produto das variáveis X1, X2 e X3, gerando um PFF de resolução igual a 3. Os resultados foram avaliados em relação às quantidades sorvidas percentuais de lumefantrina e halofantrina, calculadas pela diferença de concentração entre a solução antes e após o carregamento da amostra nos cartuchos, segundo a equação:

$$Quantidade\ sorvida = \frac{(C_0 - C_{final}) \times 100}{C_0}$$

Em que  $C_0$  = concentração inicial na solução aplicada no cartucho e  $C_{final}$  = concentração final no filtrado após passagem pelo cartucho.

Os resultados foram analisados por *software* STATISTICA<sup>®</sup> 8.0 para definição das melhores condições de pH aparente, quantidade de polímero, RCF e volume de amostra para etapa de extração. As etapas de lavagem (*clean up*), para remoção dos interferentes, e dessorção, para eluição dos analitos de interesse, foram posteriormente avaliadas de forma simultânea. Exatamente 500 µL de *solução de lumefantrina SQR + halofantrina SQR*, nas concentrações de 10000 ng/mL e 2.000 ng/mL, respectivamente, foram aplicados nos cartuchos obtidos pela adição de 60 mg de MIP, após condicionamento, em experimentos conduzidos de forma independente. Em seguida, realizou-se a dessorção da lumefantrina e halofantrina sorvidas, usando-se soluções de eluição constituídas por misturas de metanol e TFA

0,05% ou acetonitrila e TFA 0,05%, em proporções crescentes de solvente orgânico, conforme **Tabela 24**. Testou-se ainda a dessorção dos analitos pela fase móvel usada para o método bioanalítico, uma mistura de metanol, acetonitrila e TFA 0,05%, na proporção de 50:33:17 (v/v/v).

**Tabela 24 – Composição das soluções de eluição empregadas para dessorção de lumefantrina e halofantrina dos cartuchos de MISPE, após extração**

Solvente e proporção (%)			
Experimento	Metanol	Acetonitrila	TFA 0,05%
1	10	–	90
2	30	–	70
3	50	–	50
4	70	–	30
5	90	–	10
6	–	10	90
7	–	30	70
8	–	50	50
9	–	70	30
10	–	90	10
11 (FM)	50	33	17

FM: fase móvel.

Os resultados foram expressos como quantidade de lumefantrina e halofantrina dessorvidas, determinada pela razão entre a concentração do eluato e a concentração inicial da solução aplicada. Como volume de amostra aplicado e volume de dessorção foram idênticos, não houve necessidade de correção nos cálculos, realizados pela equação:

$$\text{Quantidade dessorvida} = \frac{C_{\text{eluato}} \times 100}{C_0}$$

Em que  $C_{\text{eluato}}$  = concentração final, do eluato, após dessorção e  $C_0$  = concentração inicial da solução padrão aplicada.

Os resultados foram plotados em gráficos de quantidade dessorvida percentual versus proporção de solvente orgânico, resultando em uma curva para metanol e uma curva para acetonitrila. A partir dos gráficos, a composição das soluções de lavagem e dessorção foram definidas. Para solução de lavagem, utilizou-se a maior concentração de solvente orgânico que não provocou a dessorção de mais que 5% de lumefantrina ou halofantrina. Para a solução de eluição, utilizou-se a proporção de solvente orgânico que promovesse maior grau de dessorção dos analitos, idealmente próximo a 100%.



#### **4.9.4 Validação de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano empregando CLAE-UV e MISPE na etapa de preparo de amostras**

O método bioanalítico desenvolvido foi validado avaliando-se os parâmetros seletividade, efeito residual ou efeito *carryover*, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade do analito em matriz biológica e estabilidade do analito e do PI em solução, de acordo com o que é preconizado na RDC nº. 27, de 17 de maio de 2012, da ANVISA (BRASIL, 2012) e Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do EMA (EUROPEAN, 2011) e FDA (UNITED STATES, 2001). O polímero molecularmente impresso otimizado e caracterizado foi utilizado para preparo de amostras.

##### **4.9.4.1 Seletividade**

A seletividade foi avaliada pela comparação das áreas de eventuais picos interferentes, nos tempos de retenção do analito e PI, com as áreas obtidas para analito e PI nas amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ). Utilizaram-se 6 amostras de plasma branco provenientes de fontes distintas, sendo 4 amostras de plasma normal, uma amostra de plasma hemolisado e uma amostra de plasma lipêmico e ainda 3 injeções de amostra LIQ. A sequência analítica para avaliação da seletividade foi:

1. 4 amostras de plasma normal;
2. 1 amostra de plasma lipêmico;
3. 1 amostra de plasma hemolisado;
4. 1 amostra LIQ injetada em triplicata.

O cromatograma obtido a partir da amostra LIQ foi sobreposto aos 6 cromatogramas das amostras brancas, verificando-se, por inspeção visual, a presença de picos interferentes na região do cromatograma que compreende a integração dos picos de lumefantrina e halofantrina. Em seguida, calcularam-se os percentuais das áreas dos picos interferentes ocorridos nas amostras branco, nos ou próximos aos tempos de retenção do analito e PI, em relação às áreas obtidas para a amostra LIQ. Respostas para os picos interferentes

devem ser inferiores a 20,0% da resposta do analito e inferiores a 5,0% da resposta do PI na amostra LIQ. Em caso de um ou mais interferentes apresentarem percentual superior aos limites estabelecidos, novas amostras de outras 6 fontes diferentes deverão ser analisadas (BRASIL, 2012).

A seletividade foi avaliada ainda pela sobreposição do cromatograma obtido para amostras LIQ com cromatogramas obtidos a partir de outras substâncias que poderiam ser potenciais interferentes presentes nas amostras de plasma, os antimaláricos artesunato, arteméter, cloroquina e primaquina, o analgésico paracetamol e cafeína. Foram preparadas soluções em fase móvel desses analitos, nas concentrações de 200000 ng/mL para cloroquina e primaquina, 100000 ng/mL para cafeína e paracetamol, 300000 ng/mL para arteméter e 500000 ng/mL para artesunato. Verificou-se se os tempos de retenção coincidiam com os tempos de retenção da lumefantrina e halofantrina.

#### **4.9.4.2 Efeito residual ou *carryover***

O efeito residual foi avaliado pela injeção, em triplicata, de uma amostra de plasma branco normal, sendo uma injeção antes e duas injeções após o processamento de uma amostra do limite superior de quantificação (LSQ), obedecendo a seguinte sequência analítica:

1. 1 injeção de amostra de plasma branco normal;
2. 1 injeção de amostra LSQ;
3. 2 injeções de amostra de plasma branco normal.

O cromatograma obtido para a amostra LIQ foi sobreposto aos cromatogramas obtidos para as amostras branco, avaliadas antes e após a injeção de uma amostra LSQ. A ausência ou presença do efeito residual será avaliada comparando-se as áreas dos picos nos cromatogramas para amostras de plasma branco injetadas após a injeção da amostra LSQ com as áreas dos picos no cromatograma para a amostra LIQ, calculando-se os percentuais das áreas dos picos interferentes nos cromatogramas da amostra branco, quanto às áreas do analito e PI para amostra LIQ. Respostas dos picos interferentes

deverão ser inferiores a 20,0% da resposta do analito e inferiores a 5,0% da resposta do PI para a amostra LIQ (BRASIL, 2012; EMA, 2011, FDA, 2013).

#### 4.9.4.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado por amostras de plasma após processamento, posteriormente adicionadas de analito e PI, nos níveis de controle de qualidade de baixa concentração (CQB) e alta concentração (CQA), preparadas conforme descrito no item 4.4.4.6, com a diferença que o plasma havia sido processado previamente. Foram analisadas 8 amostras de plasma, sendo 4 amostras de plasma normal, 2 amostras de plasma lipêmico e 2 amostras de plasma hemolisado, conforme sequência analítica:

1. 4 injeções de plasma normal nos níveis CQB e CQA;
2. 2 injeções de plasma lipêmico nos níveis CQB e CQA;
3. 2 injeções de plasma hemolisado nos níveis CQB e CQA.

Os *vials* foram analisados em triplicata, sendo obtidos os fatores de matriz normalizado por PI (FMN), como descrito na equação:

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

Em que *FMN* = fator de matriz normalizado por PI.

O coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras foi determinado, sendo que a normatização estabelece que não há efeito matriz (ou que o efeito matriz é corrigido pelo padrão interno) se o CV calculado for inferior a 15,0% (BRASIL, 2012; EMA, 2011, FDA, 2013).

#### 4.9.4.4 Recuperação

Embora não seja solicitada pela RDC nº. 27/2012, a recuperação foi avaliada conforme preconizado pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do

FDA (FDA, 2013), pela comparação das respostas de amostras de plasma branco adicionados de lumefantrina e PI com amostras de analito e PI preparadas em solução, nos mesmos níveis, que foram os controles de qualidade CQB, controle de qualidade de concentração médio (CQM) e CQA, preparados conforme descrito no item 4.4.4.6, seguindo a sequência analítica:

1. 5 injeções de amostra CQB em solução;
2. 5 injeções de amostra CQM em solução;
3. 5 injeções de amostra CQA em solução;
4. 5 injeções de amostra CQB em plasma branco;
5. 5 injeções de amostra CQM em plasma branco;
6. 5 injeções de amostra CQA em plasma branco;

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

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Razão das áreas do analito e PI em matriz} \times 200}{\text{Razão das áreas do analito e PI em solução}}$$

#### **4.9.4.5 Curva de calibração (linearidade)**

Para avaliação da linearidade, foram construídas 3 curvas de calibração, incluindo amostras branco (amostras sem adição de analito e PI), amostras zero (amostras sem adição de analito, mas com adição de PI) e 7 amostras de diferentes concentrações de lumefantrina, na faixa de 50 a 10000 ng/mL, adicionadas de halofantrina em uma concentração fixa, igual 2000 ng/mL. O intervalo foi definido baseando-se nos intervalos adotados em outros trabalhos e nos estudos farmacocinéticos para lumefantrina, como o de César (2009), considerando ainda limitações da técnica de detecção empregada. A curva de calibração foi analisada aleatoriamente, incluindo:

1. 2 injeções de amostras branco;
2. 2 injeções de amostra zero;
3. 2 injeções de amostras LIQ, a 50 ng/mL;

4. 2 injeções de amostras a 500 ng/mL;
5. 2 injeções de amostras a 2000 ng/mL;
6. 2 injeções de amostras a 4000 ng/mL;
7. 2 injeções de amostras a 6000 ng/mL;
8. 2 injeções de amostras a 8000 ng/mL;
9. 2 injeções de amostras a 10000 ng/mL.

Foram preparadas 3 replicatas independentes de 3 *soluções estoque de lumefantrina*, em diferentes concentrações, que foram sucessivamente diluídas, conforme **Tabela 25**, em *pool* de plasma branco para as concentrações da curva de calibração. O preparo de 3 soluções estoques de concentrações diferentes se justificou para que se adicionassem volumes similares entre os diferentes níveis de concentração, garantindo que as características da matriz biológica se mantivessem similares. Foram utilizadas as seguintes soluções estoque:

*Solução estoque de lumefantrina a 250000 ng/mL (SE1)*: pesou-se exatamente 6,25 mg de lumefantrina IFA e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se, com auxílio de micropipeta, 0,5 mL de diclorometano seguido por 20 mL de metanol e submeteu-se ao ultrassom por 10 minutos, para completa solubilização. Completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se.

*Solução estoque de lumefantrina a 125000 ng/mL (SE2)*: transferiu-se 5 mL de SE1 para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se.

*Solução estoque de lumefantrina a 12500 ng/mL (SE3)*: transferiu-se 5 mL de SE2 para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se.

*Solução estoque de halofantrina a 100000 ng/mL (SE4)*: pesou-se exatamente 2,5 mg de halofantrina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se, com auxílio de micropipeta, 0,5 mL de diclorometano seguido por 20 mL de metanol e submeteu-se ao ultrassom por 10 minutos, para completa solubilização. Completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se.

**Tabela 25 – Diluições para preparo de curva de calibração para avaliação de linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Nível	Concentração (ng/mL)	Volume de solução estoque LMF (µL)	Volume de solução estoque HAL (µL)	Volume de <i>pool</i> de plasma branco (µL)
Branco	0	–	–	2500
Zero	0	–	50 (SE4)	2450
LIQ (1)	50	10 (SE3)	50 (SE4)	2440
2	500	100 (SE3)	50 (SE4)	2350
3	2000	40 (SE2)	50 (SE4)	2410
4	4000	80 (SE2)	50 (SE4)	2370
5	6000	60 (SE1)	50 (SE4)	2390
6	8000	80 (SE1)	50 (SE4)	2370
LSQ (7)	10000	100 (SE1)	50 (SE4)	2350

HAL: halofantrina; LMF: lumefantrina; SE: solução estoque.

Após os procedimentos de extração, lavagem e dessorção transferiram-se 200 µL do eluato para *vial* com *insert* de 250 µL, filtrando-se por filtro de seringa de 0,45 µm. Os *vials* foram analisados em triplicata. Os dados representando a relação entre resposta, aqui avaliada como a razão entre área do pico para lumefantrina e área do pico para halofantrina, e a concentração de lumefantrina, foram plotados, sendo obtidas equações da reta para cada curva, empregando-se o modelo matemático mais simples possível. Amostras branco e amostras zero não foram incluídas na construção da curva de calibração, mas foram utilizadas para se verificar a presença de picos interferentes (amostras branco) e se as respostas para halofantrina obtidas para amostras zero se aproximava das respostas para PI nos demais níveis de concentração.

Pontos que apresentarem desvio maior que 20,0% em relação à concentração nominal, para as amostras LIQ, e maior que 15,0% em relação à concentração nominal, para os outros pontos da curva, foram excluídos, não sendo utilizados para a determinação da equação da reta. Considerou-se aprovada uma curva quando pelo menos 75% dos pontos apresentaram desvios inferiores aos mencionados e pelo menos 6 níveis de concentração forem aprovados, incluindo as amostras LIQ e LSQ (BRASIL, 2012; EMA, 2011, FDA, 2013).

A RDC nº. 27/2012 preconiza que a variância dos resíduos seja constante no intervalo de quantificação contemplado pelo método, pois, caso contrário, deve-se utilizar fator de ponderação que propicie a menor soma dos desvios em relação às concentrações nominais. Por isso, a linearidade foi adicionalmente investigada segundo proposto por Souza e Junqueira (2005) e Souza (2007),

avaliando-se o ajuste ao modelo de regressão linear simples pelo método MMOQ, por ANOVA, a presença de *outliers* (pelo teste do resíduo padronizado de *Jackknife*), a normalidade dos resíduos (pelos testes de *Ryan-Joiner*), homocedasticidade dos resíduos (pelo teste de *Brown-Forsythe* ou *Levene* modificado) e a independência dos resíduos (pelo teste de *Durbin-Watson*).

#### 4.9.4.6 Precisão e exatidão

Os parâmetros de precisão e exatidão foram avaliados simultaneamente à curva de calibração, em uma mesma corrida analítica (para avaliação de precisão e exatidão intracorrída) e em, no mínimo, 3 corridas analíticas realizadas em dias diferentes (para avaliação de precisão e exatidão intercorridas). Os ensaios foram realizados por 5 injeções de amostras LIQ e amostras dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA e ainda do controle de qualidade de diluição (CQD). O CQB foi definido como 150 ng/mL, concentração 3 vezes maior que a concentração das amostras LIQ, enquanto o CQM foi estabelecido como 5000 ng/mL, aproximadamente a média entre LIQ e LSQ, e o CQA como 7500 ng/mL, concentração que representa 75% da concentração LSQ. Finalmente, o CQD foi estipulado como 15000 ng/mL, concentração superior ao LSQ, de modo que um procedimento de diluição de 1:1 em plasma branco produziria concentração similar ao CQA. O preparo desses controles de qualidade foi realizado como descrito para o preparo das soluções da curva de calibração, por meio de diluições de *soluções estoques de lumefantrina SQR e halofantrina SQR*. Os volumes das soluções estoque de lumefantrina e halofantrina adicionadas e volume de plasma branco para o preparo dos controles de qualidade estão presentes na **Tabela 26**.

**Tabela 26 – Diluições para preparo dos controles de qualidade de baixa, média e alta concentração e de diluição para avaliação da precisão e exatidão de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Nível	Concentração (ng/mL)	Volume de solução estoque LMF (µL)	Volume de solução estoque HAL (µL)	Volume de <i>pool</i> de plasma branco (µL)
CQB	0	30 (SE3)	50 (SE4)	2420
CQM	50	100 (SE2)	50 (SE4)	2350
CQA	500	75 (SE1)	50 (SE4)	2375
CQD	2.000	150 (SE1)	50 (SE4)	2300

A sequência analítica para avaliação da precisão e exatidão foi a seguinte:

1. 5 injeções de amostras LIQ;
2. 5 injeções de amostras CQB;
3. 5 injeções de amostras CQM;
4. 5 injeções de amostras CQA;
5. 5 injeções de amostras CQD;

A avaliação da precisão se deu pela determinação do DPR entre os resultados, para cada nível de concentração, definindo-se como limites valores de DPR de no máximo 15,0% para os controles de qualidade e de no máximo 20% para o limite inferior de quantificação (LIQ). Já para avaliação da exatidão, foram estimados erros padrão relativos (EPR), comparando-se a concentração experimental determinada, para cada nível, com o respectivo valor nominal, segundo a equação:

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

Em que  $CMD$  = concentração média determinada e  $C_{nominal}$  = concentração nominal (valor de referência). Não se admitem EPR fora da faixa de  $\pm 15,0\%$  do valor nominal, com exceção de amostras LIQ, para as quais não se admitem EPR fora da faixa de  $\pm 20,0\%$  (BRASIL, 2012; EMA, 2011, FDA, 2013).

#### **4.9.4.7 Estabilidade dos analitos em matriz biológica**

A estabilidade foi avaliada por meio dos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECC), curta duração (ECD), longa duração (ELD) e pós-processamento (EPP), sendo que em cada um, foram analisadas quadruplicata de amostras CQB e CQA. Os ensaios foram executados de maneira que fossem reproduzidas condições de armazenamento, preparo de amostras e análise de amostras. Os intervalos de tempo de cada ensaio foram definidos em função do tempo em que as amostras dos voluntários poderiam ficar expostas a diferentes condições de temperatura e em função da logística de funcionamento e manutenção dos equipamentos no laboratório.



Foram consideradas estáveis amostras que não demonstraram desvio superior a 15,0% da média de todas as concentrações obtidas em relação à concentração nominal. Se constatado que os analitos são instáveis em determinada condição, o método ainda é aplicável, desde que se garanta que todas as amostras, durante validação ou análise de voluntários, seja avaliada dentro do tempo no qual a amostra apresentou adequada estabilidade.

Na avaliação da ECC, as amostras foram inicialmente congeladas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Em seguida, procedeu-se ao descongelamento das amostras, à temperatura ambiente, por aproximadamente 2 horas, sendo novamente congeladas por mais 24 horas. O procedimento se repetiu por mais 2 vezes, completando-se 3 ciclos de congelamento e descongelamento, quando as amostras foram descongeladas, processadas e analisadas, em triplicata. Para avaliação da ECD, as amostras permaneceram à temperatura ambiente ( $21 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), em bancada, por 24 horas, tempo superior aos que as amostras de voluntários foram mantidas durante o estudo. Posteriormente, as amostras foram processadas e analisadas, em triplicata. Já na avaliação da ELD, as amostras foram inicialmente congeladas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 dias, tempo superior ao intervalo entre a coleta da primeira amostra e análise da última amostra de voluntários. Em seguida, as amostras foram descongeladas, processadas e analisadas, em triplicata. Finalmente, para a avaliação da EPP, as amostras, após processamento, foram mantidas na bandeja do *autosampler* do cromatógrafo, a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 72 horas, tempo superior ao tempo compreendido entre o preparo das amostras e o final da corrida analítica, sendo posteriormente processadas e analisadas, em triplicata (BRASIL, 2012).

#### **4.9.4.8 Estabilidade de analito e padrão interno em solução (ES)**

Determinou-se a estabilidade de analito e PI em solução (ES), mantidas nas condições de análise ( $21 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e de armazenamento em geladeira ( $5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 15 dias. Foram preparadas soluções de lumefantrina nos níveis LIQ e LSQ, e solução de halofantrina a  $2000\text{ ng/mL}$ . As soluções preparadas foram filtradas por filtros de seringa de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  para 3 *vials* cada, identificados por A, B e C. Os *vials* A de cada solução foram imediatamente avaliados, em

triplicata. Os *vials* B foram armazenados em bancada, à temperatura ambiente ( $21 \pm 2$  °C), enquanto os *vials* C foram armazenados em geladeira, a  $5 \pm 2$  °C, ambos por 15 dias. Depois desse prazo, os *vials* B e C foram analisados, em triplicata. Para determinação da ES, comparou-se a média das respostas para analito e PI para soluções em estudo (*vials* B ou C) com a média das respostas para soluções recém-preparadas (*vials* A), conforme equação:

$$\text{Variação (\%)} = \frac{(\text{Área média}_{B \text{ ou } C} - \text{Área média}_A) \times 100}{\text{Área média}_A}$$

Foram consideradas estáveis soluções cujas variações calculadas não superaram 10%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento de método por CLAE-UV para determinação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo (IFA)

A lumefantrina apresenta 4 máximos de absorção característicos em seu espectro de absorção no UV (234, 264, 302 e 335). Embora 335 nm não seja o comprimento de onda em que a lumefantrina exibe maior absorvidade molar, é o máximo de absorção posicionado mais ao final da região do espectro correspondente ao UV, entre 200 e 400 nm, o que confere maior seletividade ao método, já que um menor número de moléculas absorve nessa região do espectro. Portanto, o comprimento de onda de análise foi definido em 335 nm. É importante que se discuta que o maior número de autores definiu 335 nm como comprimento de onda para determinação de lumefantrina.

Em relação ao diluente para preparo da *solução de lumefantrina SQR e IFA*, o emprego de pequena fração de diclorometano foi necessária para que a lumefantrina fosse totalmente dissolvida. Testes realizados excluindo-se ou substituindo-se o diclorometano por clorofórmio mostraram uma redução importante na área do pico de lumefantrina, provavelmente porque o fármaco não foi completamente solubilizado ou porque o clorofórmio possui maior valor de *cut off* no UV. Diferentes fases estacionárias foram avaliadas no desenvolvimento do método analítico. Os resultados médios referentes aos tempos de retenção,  $k$ , área do pico de lumefantrina,  $A$ ,  $N$  e  $H$  foram obtidos, em triplicata, para a *solução de lumefantrina SQR* e para *solução de uracila*, sendo apresentados na **Tabela 27**. O tempo de retenção para uracila, igual a aproximadamente 2,15 minutos para as colunas de 250 mm e a 1,67 minutos para a coluna cianopropil de 150 mm, foi utilizado para cálculos dos respectivos valores de  $k$ .

**Tabela 27 – Parâmetros cromatográficos na avaliação de diferentes fases estacionárias na otimização de método analítico para determinação de lumefantrina**

Coluna cromatográfica	Tempo de retenção (min)	Fator de capacidade ( $k$ )	Área (mAu.s)	Assimetria ( $A$ )	Número de pratos teóricos ( $N$ )	Altura de prato teórico (mm)
Coluna C <sub>18</sub> encapada	66,78	30,06	3276322	1,7647	4686	0,0534
Coluna C <sub>18</sub> convencional	36,48	15,97	3854066	1,3377	7081	0,0353
Coluna fenil	40,90	18,02	3452845	1,7974	4304	0,0581
Coluna cianopropil	4,40	1,55	3979646	1,2793	4211	0,0356

Como a lumefantrina se caracteriza por ser um fármaco muito lipofílico, pode-se observar que o analito ficou fortemente retido nas colunas C18 e fenil. De maneira geral, quanto mais lipofílica for a fase estacionária, maior o tempo de retenção encontrado para lumefantrina. Com o emprego de colunas mais apolares, como C<sub>18</sub>, a lumefantrina demonstrou ser fortemente retida, refletindo em tempos de retenção e  $k$  elevados. Como a coluna encapada é ainda mais apolar, uma vez que os grupos silanóis residuais foram quimicamente modificados por grupos metila, esperava-se uma diferença de retenção entre as colunas C<sub>18</sub> encapada e convencional, o que foi observado nos resultados. Em ambos os casos, entretanto, os tempos de corrida são desnecessariamente grandes e inviáveis para análise rotineira.

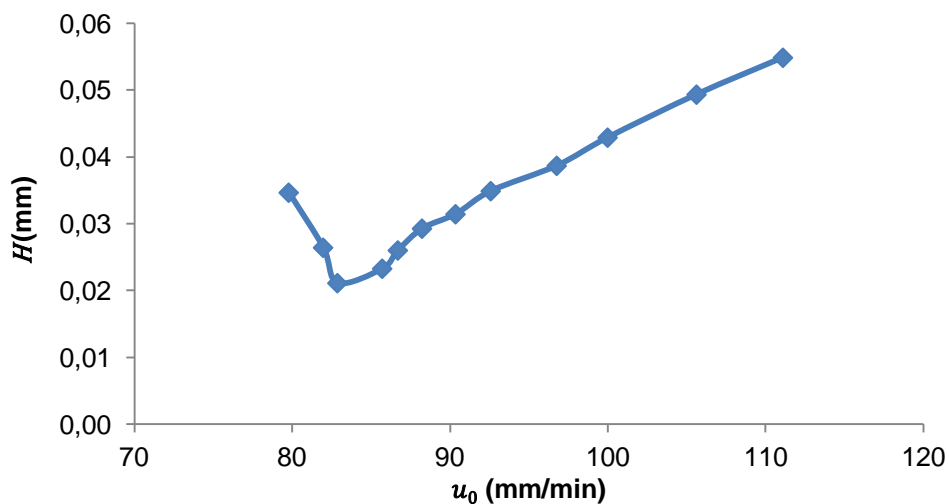
Com a coluna fenil, a lumefantrina também foi fortemente retida, levando a um tempo de retenção comparável aos obtidos para as colunas C<sub>18</sub>, o que provavelmente se justifica por interações hidrofóbicas entre elétrons  $\pi \rightarrow \pi$  do anel aromático do grupo fenil da fase estacionária e anéis aromáticos presentes na estrutura da lumefantrina. Já para a coluna cianopropil, o tempo de retenção foi consideravelmente menor, mas ainda suficiente para  $k > 1$ , como preconizado na literatura (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997).

Compararam-se as eficiências das colunas pela altura do prato teórico ( $H$ ), não apenas pelo número de pratos teóricos ( $N$ ) isoladamente, por se tratarem de colunas de comprimentos diferentes. Dessa forma, por mais que as colunas C<sub>18</sub> encapada, fenil e cianopropil apresentem  $N$  muito próximo, a eficiência da coluna cianopropil foi superior por apresentar menor comprimento, o que se evidencia pelo menor  $H$  encontrado para a coluna cianopropil. Quanto menor  $H$ , maior a eficiência da coluna, porque um menor segmento dessa coluna se mostra suficiente para que se crie um estágio de separação na coluna. De forma análoga, embora o  $N$  para a coluna C<sub>18</sub> convencional seja maior que para a coluna cianopropil, o  $H$  para ambas é praticamente idêntico, de forma que se conclui que a eficiência dessas colunas para separação de lumefantrina é muito similar. Os maiores resultados para área e menores resultados para  $A$  foram obtidos para a coluna cianopropil, indicando maior qualidade e eficiência dessa coluna. Portanto, levando-se em consideração retenção, qualidade e

eficiência das colunas testadas, a coluna de sílica quimicamente ligada a grupo cianopropil foi definida para utilização no método analítico.

Foram realizados ajustes na composição da fase móvel, de modo que a corrida analítica se desenvolvesse em tempo curto, mas suficiente para garantir uma separação eficiente, isto é,  $k > 1$ , para matrizes pouco complexas. A proporção de metanol e TFA 0,05%, inicialmente definida como 80:20 (v/v) por César (2009) e Rivelli (2016), apresentou uma força eluotrópica grande, demonstrada por um tempo de retenção consideravelmente baixo. Avaliou-se a proporção 75:25 (v/v), que se mostrou mais adequada, encontrando-se  $k = 1,55$  e corrida de apenas 7 minutos. O pH aparente dessa fase móvel, igual a 2,5, encontra-se dentro dos limites definidos pelo fornecedor da coluna. A vazão foi otimizada empregando-se curva de *van Deemter* (**Figura 11**), plotando  $H$  versus  $u_0$ , determinando-se ainda resultados para área e altura do pico,  $k$  e  $A$ , descritos na **Tabela 28**.

**Figura 11 – Curva de *van Deemter* para otimização de vazão de fase móvel de método analítico para determinação de lumefantrina**



**Tabela 28 – Parâmetros cromatográficos para otimização de vazão de fase móvel por meio de curva de *van Deemter*, para otimização de método analítico para determinação de lumefantrina**

Vazão (mL/min)	Velocidade linear (mm/min)	Tempo morto (min)	Tempo de retenção (min)	$k$	Área (mAu.S)	Altura (mAu)	$N$	$A$	$H$ (mm)
0,3	80	1,88	56,09	28,84	12817605	103205	4327	2,3637	0,0347
0,4	82	1,83	21,19	10,58	9703797	201713	5674	1,9616	0,0264
0,5	83	1,81	16,86	8,31	8068739	271283	7100	1,6292	0,0211
0,6	86	1,75	10,54	5,02	66222393	348302	6441	1,5128	0,0233
0,7	87	1,73	6,93	3,00	5656775	410903	5764	1,4204	0,0260
0,8	88	1,70	5,38	2,16	4906110	391625	5122	1,3909	0,0293
0,9	90	1,66	4,86	1,93	4372871	393748	4770	1,3712	0,0314
1,0	93	1,62	4,41	1,48	3954261	413359	4298	1,3297	0,0349
1,2	97	1,55	3,46	1,23	3288609	411799	3877	1,2962	0,0387
1,5	100	1,50	2,53	0,68	2644862	409924	3496	1,2327	0,0429
1,8	106	1,42	2,01	0,42	2221949	423334	3040	1,1918	0,0493
2,0	111	1,35	1,65	0,22	2006467	412611	2734	1,1782	0,0549

A: assimetria;  $H$ : altura de prato teórico;  $k$ : fator de capacidade ou retenção;  $N$ : número de pratos teóricos.

De acordo com a curva de *van Deemter*, percebe-se que vazão de 0,5 mL/min foi responsável pelo menor  $H$  e, portanto, maior eficiência. Contudo, o tempo de corrida torna-se desnecessariamente longo, inviabilizando o seu uso rotineiro. Ademais, os picos de lumefantrina para vazão de 0,5 mL/min apresentaram-se baixos, alargados e assimétricos. Dessa forma, optou-se por utilizar uma vazão maior, que permitisse uma detectabilidade maior e tempo de corrida menor. A vazão selecionada foi de 1,0 mL/min, que já representou um ganho significativo em termos de eficiência quando comparado ao fluxo de 1,5 mL/min proposto por César (2009) e Rivelli (2016).

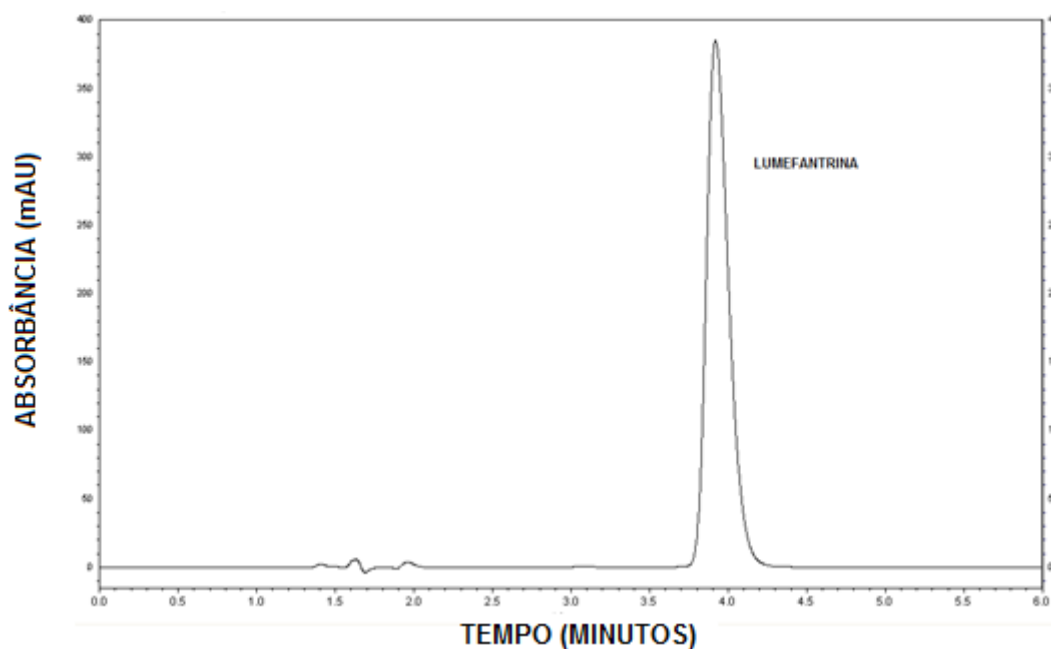
Finalmente, otimizou-se a temperatura, diminuindo-a de 40 para 30 °C. Foi possível observar que temperaturas mais baixas produziram picos menos simétricos e tempos de retenção longos, por aumentar a viscosidade da fase móvel. Por outro lado, temperaturas mais elevadas reduziram a eficiência da separação cromatográfica, além de comprometer a vida útil da coluna. Assim, a temperatura de 30 °C foi escolhida, para que fossem obtidas corridas analíticas em tempo curto e para que fossem obtidos picos de lumefantrina menos assimétricos. As condições definidas para o método após otimização estão apresentadas na **Tabela 29** e o cromatograma obtido nessas condições é demonstrado na **Figura 12**.

**Tabela 29 – Condições cromatográficas e critérios de adequabilidade para método analítico por CLAE-UV definidos após otimização de método analítico para determinação de lumefantrina**

Parâmetro analítico	Especificação
Fase estacionária	Coluna Zorbax SB-CN 250 x 4,6 mm (5 µm)
Fase móvel	MeOH:TFA 0,05% 75:25 v/v
Vazão da fase móvel	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	30 °C
Comprimento de onda de detecção	335 nm
Tempo de corrida	7 min
Número de pratos teóricos	$N \geq 2000$
Assimetria	$0,8 \leq A \leq 2,0$
Fator de retenção	$1,0 \leq k \leq 10,0$

MeOH: metanol; TFA: ácido trifluoroacético.

**Figura 12 – Cromatograma típico para o método analítico por CLAE-UV após otimização, conforme condições cromatográficas descritas na Tabela 29**



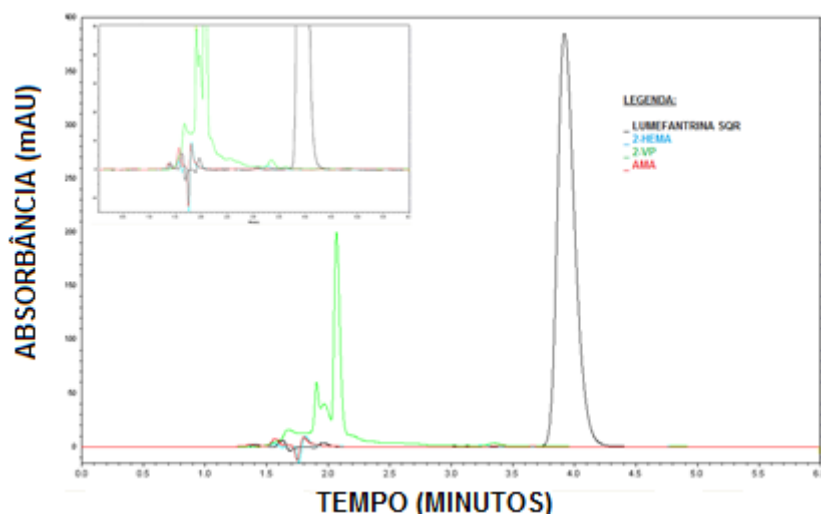
## 5.2 Validação do método analítico por CLAE-UV para quantificação de lumefantrina em insumo farmacêutico ativo (IFA)

### 5.2.1 Seletividade

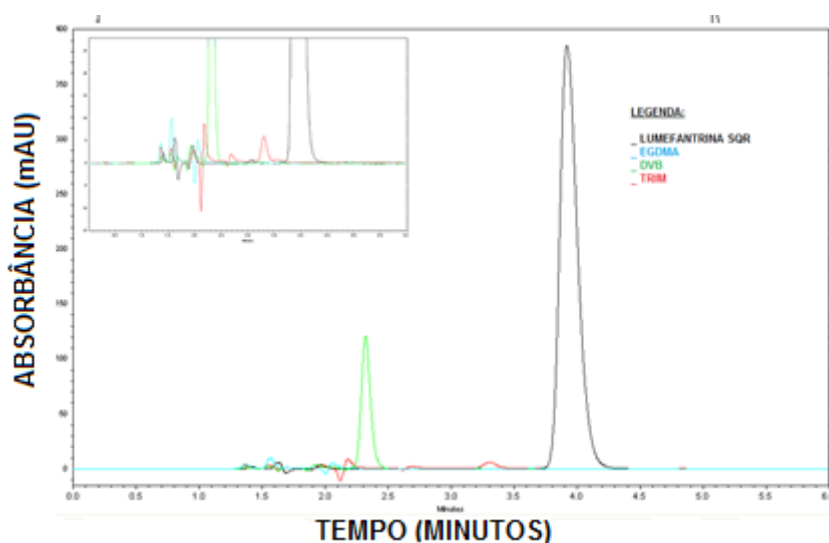
Inicialmente, avaliou-se a seletividade do método frente aos outros reagentes empregados na síntese dos polímeros, incluindo monômeros funcionais, *crosslinkers* e iniciador. A importância da avaliação desses reagentes se justifica pelo fato de serem possíveis interferentes, pois se encontram em quantidade elevada na mistura reacional em comparação com a quantidade de

fármaco adicionada e, adicionalmente, porque a reação de polimerização não necessariamente os consome em sua totalidade, apenas parcialmente. Os cromatogramas obtidos foram sobrepostos ao cromatograma obtido para *solução de lumefantrina SQR*, sendo apresentados, respectivamente, pelas **Figuras 13, 14 e 15**. Um *zoom* da porção inicial dos cromatogramas sobrepostos foi incluído, à esquerda, para melhor visualização de quaisquer interferentes presentes nas amostras.

**Figura 13 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos para os monômeros funcionais e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina**

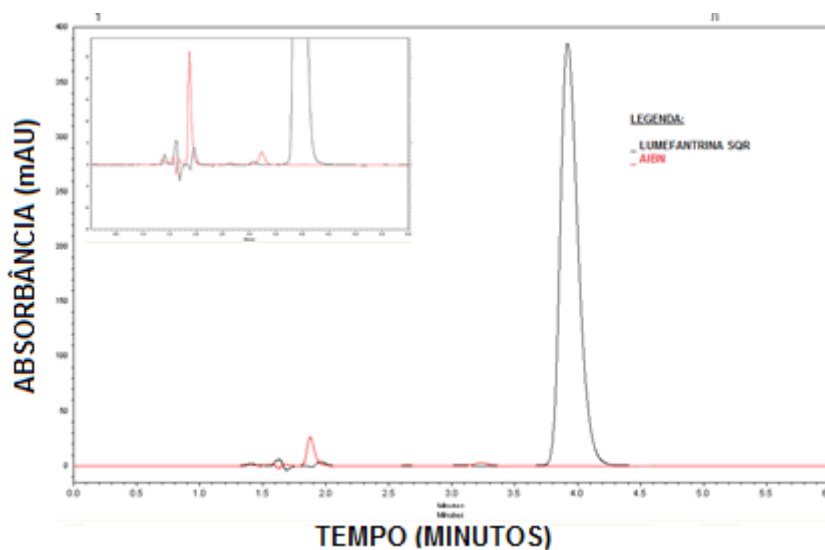


**Figura 14 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos para os *crosslinkers* e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina**





**Figura 15 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos para o iniciador e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina**



Conforme inspeção visual dos cromatogramas sobrepostos, não foram identificados picos interferentes no tempo correspondente ao tempo de retenção da lumefantrina, igual a aproximadamente 4 minutos. Os picos referentes aos monômeros funcionais, *crosslinkers* e iniciador ficaram menos retidos, eluindo muito mais rapidamente que a lumefantrina, geralmente no tempo morto. Portanto, não há interferência de nenhum desses reagentes na quantificação de lumefantrina, comprovando-se a seletividade do método frente aos reagentes de síntese.

Investigou-se, ainda, a seletividade frente a interferentes formados em condições de estresse. Os cromatogramas obtidos para as *soluções de lumefantrina IFA* submetidas às condições de estresse foram sobrepostos ao cromatograma para a *solução de lumefantrina SQR*, sendo apresentados nas **Figuras 16, 17 e 18**.

Figura 16 – Sobreposição do cromatograma obtido para lumefantrina IFA submetida à degradação a 70 °C e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina

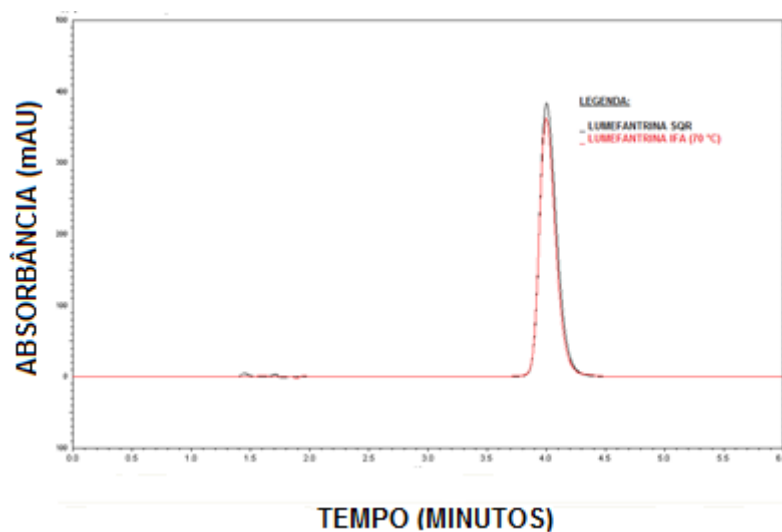
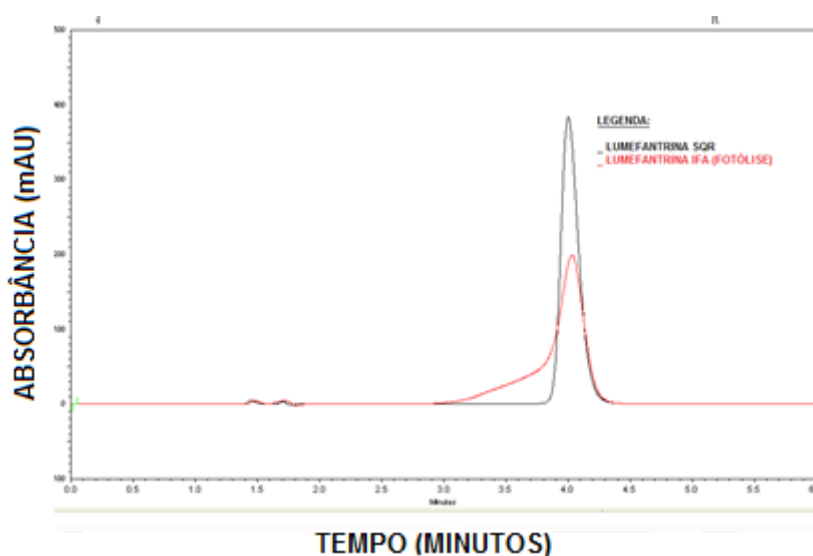
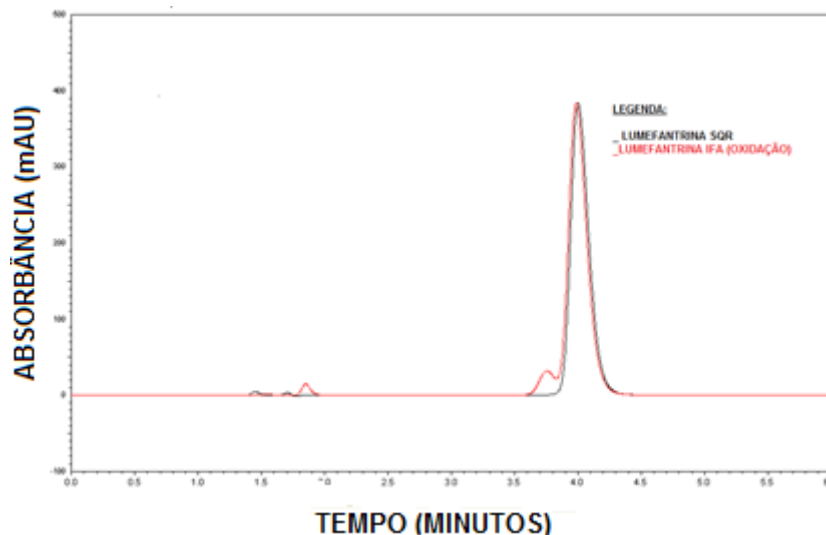


Figura 17 – Sobreposição do cromatograma obtido para lumefantrina IFA submetida à degradação por fotólise (UV-Vis) e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina



**Figura 18 – Sobreposição do cromatograma obtido para lumefantrina IFA submetida à degradação por oxidação por 2,2-azo-bis-isobutironitrila e do cromatograma obtido para lumefantrina SQR para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina**



Não foram observados picos referentes a produtos de degradação no cromatograma para a lumefantrina IFA submetida à degradação a 70 °C. Houve, entretanto, uma diminuição em relação à área do pico de 4,33%, que pode ter sido causada pela formação de um produto de degradação, que não apresentasse grupo cromóforo detectável a 335 nm. Contudo, acredita-se que, uma vez que a lumefantrina foi inicialmente colocada em placa de Petri, pode não ter havido solubilização ou transferência quantitativa da quantidade de fármaco pesada para o balão volumétrico, no preparo da solução analisada, explicando a redução encontrada. Conclui-se, portanto, que a lumefantrina apresenta estabilidade adequada em relação à exposição a temperaturas empregadas experimentalmente.

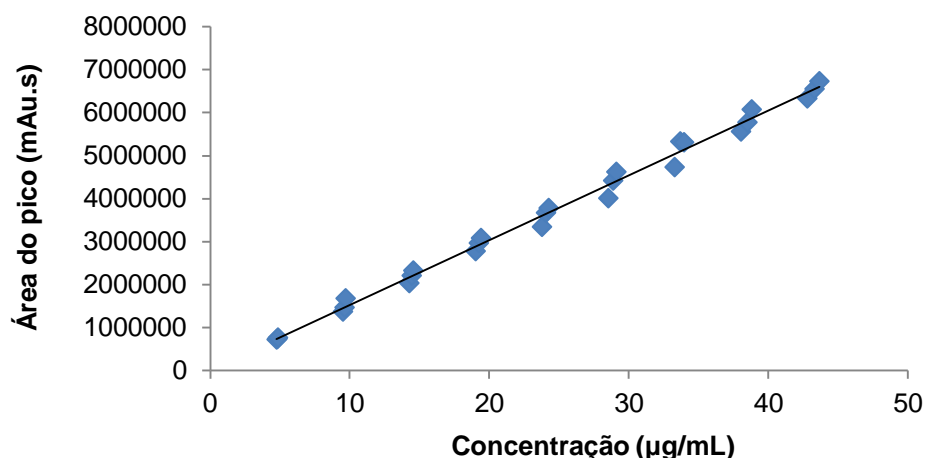
Analisando o cromatograma para a solução de lumefantrina degradada por fotólise, não se observou nenhum pico interferente, não havendo redução significativamente importante da área relativa ao pico da lumefantrina (de 3,45%). Entretanto o pico da lumefantrina apresentou-se muito assimétrico, com diminuição de sua altura. Pode-se concluir, dessa forma, que a exposição à radiação UV é condição de estresse muito mais drástica para o fármaco do que altas temperaturas.

Já no cromatograma obtido após oxidação por AIBN, percebeu-se o aparecimento de um pico referente a um produto de degradação (o primeiro pico desse cromatograma se refere ao pico do AIBN), próximo ao pico da lumefantrina, de modo que não se conseguiu uma resolução ao nível de linha de base para ambos. É provável, portanto, que o produto de degradação formado seja similar estruturalmente à lumefantrina, mas o produto de degradação não foi caracterizado porque não era objetivo dos autores desse trabalho. Embora a ocorrência de degradação seja evidenciada pelo pico interferente formado, não se observou ainda uma redução significativa da área referente ao pico da lumefantrina (menos que 1% de degradação). É necessário destacar, entretanto, que a concentração utilizada para o AIBN na condição de estresse (3% p/v) é 37,5 vezes maior que a concentração de AIBN empregada para síntese dos polímeros (0,08% p/v), sem contar que o tempo de exposição foi 7 vezes superior ao empregado. Desse modo, é possível que não se observe degradação nas condições experimentais definidas para a síntese. Não foram encontrados picos interferentes nos cromatogramas para fase móvel e diluente submetidas às condições de estresse fotolítica e oxidativa. Os estudos de degradação forçada e avaliação da seletividade frente a possíveis interferentes de síntese demonstram que o método analítico desenvolvido provou ser seletivo.

### 5.2.2 Linearidade

Em um primeiro momento, a linearidade foi avaliada conforme preconizado na RE nº. 899/2003. Os resultados de área do pico versus concentração de lumefantrina, na faixa de 4,8 a 43,2 µg/mL (20 a 180%), foram plotados em um gráfico de dispersão (**Figura 19**). Os parâmetros de regressão linear, como coeficiente de determinação, coeficiente de correlação, inclinação e intercepto, determinados por ANOVA, são descritos na **Tabela 30**.

**Figura 19 – Gráfico de dispersão para os dados brutos na avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina**

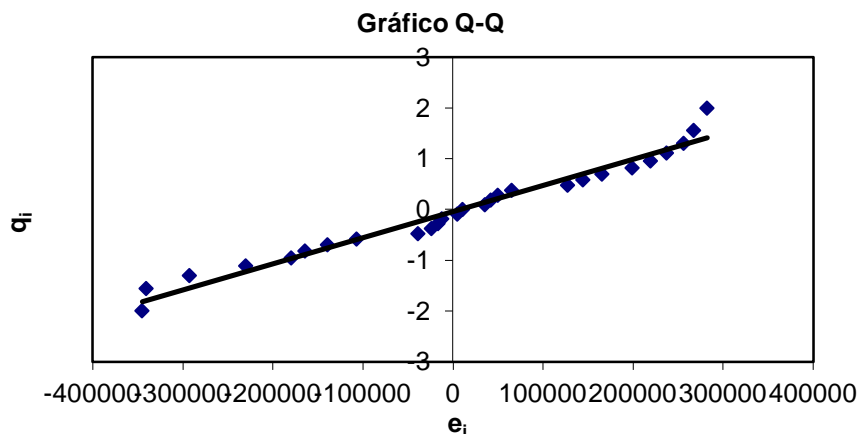


**Tabela 30 – Parâmetros de regressão linear para avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina**

Parâmetros da regressão	Resultados
Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9934
Coefficiente de correlação ( $r$ )	0,9967
Inclinação $\pm$ desvio padrão	150518,2302 $\pm$ 2455,4189
Intercepto $\pm$ desvio padrão	23305,0636 $\pm$ 66414,2566
$F$ de significação	8,9460 $\times 10^{-9}$
Faixa de concentração (%)	20 – 180
Número de pontos	27

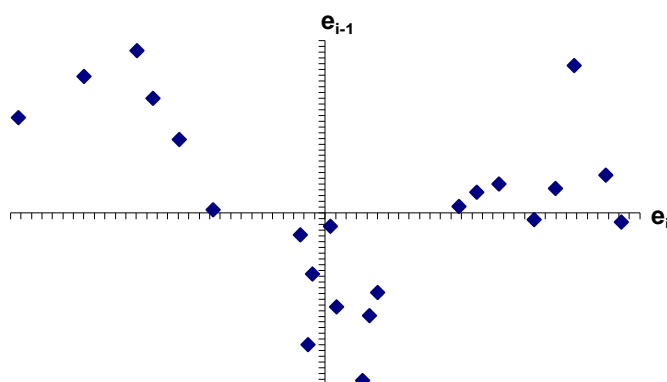
O coeficiente de correlação ( $r$ ) para a curva analítica foi maior que 0,99, comprovando-se a linearidade do método segundo a RE 899/2003. Encontrou-se regressão estatisticamente significativa, pois o  $F$  de significação determinado por ANOVA foi muito menor que o nível de significância adotado ( $\alpha = 0,05$ ), havendo evidência para rejeição da hipótese nula. O intervalo que descreve o intercepto incluiu o 0 e, portanto, o intercepto não difere estatisticamente de 0. Posteriormente, os dados foram avaliados conforme proposto por Souza e Junqueira (2005). O teste do resíduo padronizado *Jackknife* não encontrou nenhum *outlier*, não havendo, portanto, exclusão de nenhum ponto. A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de *Ryan-Joiner*; o  $R_{e'q}$  determinado de 0,9834 superou o valor para o  $R_{crítico}$  definido para  $\alpha = 0,05$ , igual a 0,9607. Dessa forma, não há evidências para se rejeitar a hipótese nula, assumindo-se que os dados seguem distribuição normal. A inspeção visual do gráfico de quartis (**Figura 20**) corrobora com o teste de *Ryan-Joiner*, pois há pouca dispersão dos resíduos em relação à reta traçada.

**Figura 20 – Gráfico de quartis (Q-Q) para avaliação da normalidade dos resíduos, na avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina**



Calculou-se estatística de *Durbin-Watson* ( $d$ ) para avaliação da autocorrelação (independência) dos resíduos. Os valores críticos para os limites inferior ( $d_L$ ) e superior ( $d_U$ ) foram estimados por expansão polinomial, considerando  $n = 27$ , sendo adotados  $d_L$  igual a 1,3151 e  $d_U$  igual a 1,4691. O  $d$  calculado para os resíduos foi de 2,3899, encontrando-se entre  $d_U$  e  $4-d_U$ , região em que não há autocorrelação dos resíduos. Conclui-se, portanto, que os resíduos são independentes entre si. Complementarmente, o gráfico de resíduos (**Figura 21**) demonstra uma distribuição aleatória e sem tendências dos resíduos entre os quartis do gráfico, confirmando a independência dos resíduos.

**Figura 21 – Gráfico de resíduos para avaliação da independência dos resíduos, na avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina**



Determinou-se a homocedasticidade por teste de *Brown-Forsythe*, encontrando-se valor de  $p$  igual a 0,1283 e estatística  $t_L$  de *Levene* de 1,57. Como o valor de  $p$  foi superior ao nível de significância estabelecido, igual a 0,05, não foram encontradas evidências para rejeição da hipótese nula, assumindo-se que os resíduos são, desse modo, homocedásticos. Depois de confirmadas a normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos, o método de MMOQ pôde ser adequadamente empregado para análise de regressão linear. O ajuste ao modelo foi determinado por ANOVA, avaliando-se a significância da regressão e desvio da linearidade (**Tabela 31**).

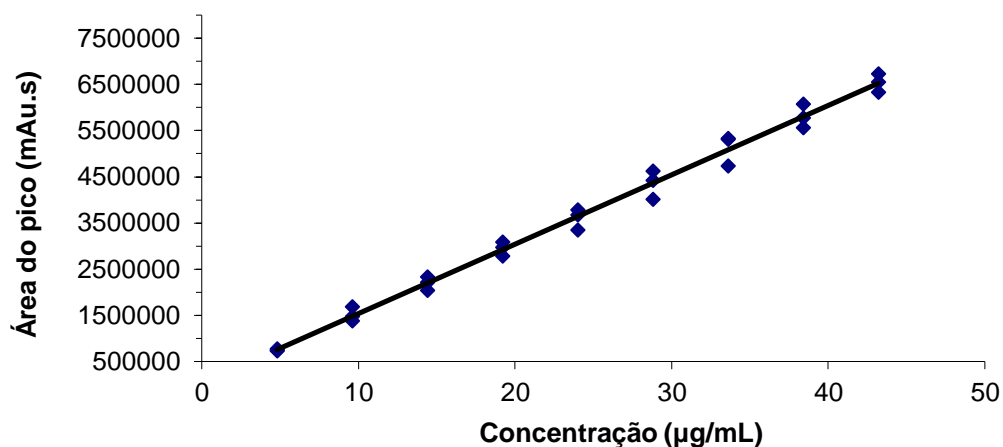
**Tabela 31 – Quadro ANOVA para avaliação da significância da regressão e desvio da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina**

FV	GL	SQ	QM	F	p	F <sub>crítico</sub>
Regressão	1	9,4E+13	9,4E+13	2619,083	7,88E-27	4,241699
Resíduo	25	8,97E+11	3,59E+10			
Desvio da linearidade	4	1,57E+10	3,92E+09	0,093512	0,983449	2,8401
Entre níveis	5	9,4E+13				
Erro puro (dentro dos níveis)	21	8,81E+11	4,2E+10			
Total	26	9,49E+13				

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

O  $F$  calculado (2619,08) para a regressão foi superior ao  $F_{crítico}$  (4,24), com valor de  $p$  obtido foi muito menor que 0,05, o que fornece evidências para que se rejeite a hipótese nula, concluindo-se que a regressão é estatisticamente significativa. Para o desvio da linearidade, o  $F$  calculado (0,09) foi inferior ao  $F_{crítico}$  (2,84), com valor de  $p$  igual a 0,98, muito maior que 0,05. Dessa forma, não se rejeita a hipótese nula, concluindo-se que não há desvio da linearidade, isto é, que o modelo linear é adequado para descrever os dados obtidos. Após tratamento de *outliers*, confirmação das premissas de regressão e ajuste ao modelo linear, os dados foram plotados em um gráfico de dispersão (**Figura 22**), que correlacionava área do pico por concentração de lumefantrina e determinando-se equação da reta e parâmetros de regressão (**Tabela 32**).

**Figura 22 – Curva analítica para avaliação da linearidade de método analítico para determinação de lumefantrina**



**Tabela 32 – Parâmetros de regressão para avaliação de linearidade, segundo Souza e Junqueira (2005), de método analítico para determinação de lumefantrina**

Parâmetros da regressão	Resultados
Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9905
Coeficiente de correlação ( $r$ )	0,9953
Inclinação $\pm$ desvio padrão	150526,9390 $\pm$ 2941,3020
Intercepto $\pm$ desvio padrão	20377,9846 $\pm$ 75590,8892
F de significação	7,88 $\times 10^{-27}$
Faixa de concentração (%)	20 – 180
Número de pontos	27

O intervalo que descreve o intercepto no eixo das ordenadas inclui o 0, logo o intercepto não difere estatisticamente de 0. O coeficiente de correlação ( $r$ ) foi superior a 0,99, cumprindo o critério definido pela RE 899/2003, comprovando-se a linearidade do método. Como o modelo para avaliação da linearidade proposto por Souza e Junqueira (2005) requer um tratamento estatístico mais criterioso, atendendo, ainda, às especificações preconizadas pela normatização pertinente, a equação da reta obtida por esse modelo foi utilizada para determinação, por interpolação, da concentração de lumefantrina.

### 5.2.3 Precisão

Os teores de lumefantrina determinados para as 9 determinações analisadas para avaliação da repetitividade (precisão intracorrida ou intradia) e o DPR (%) entre os resultados estão descritos na **Tabela 33**. O valor obtido para o DPR



(%), igual a 0,93%, foi inferior a 2,0%, confirmando que o método demonstra repetitividade adequada (GREEN, 1996).

**Tabela 33 – Teores de lumefantrina e DPR (%) para avaliação da repetitividade, na avaliação da precisão de método analítico para determinação de lumefantrina**

Nível de concentração	Concentração (µg/mL)	Replicata	Teor (%)
Baixo (20%)	4,8	1	98,07
		2	99,01
		3	98,20
Médio (100%)	24,0	1	100,52
		2	99,41
		3	100,72
Alto (180%)	43,2	1	99,78
		2	99,37
		3	100,01
<b>CMD (%)</b>			99,45
<b>DPR (%)</b>			0,93

**Tabela 34 – Teores de lumefantrina e DPR (%) para avaliação da precisão intermediária, na avaliação da precisão de método analítico para determinação de lumefantrina**

	Nível de concentração	Concentração (µg/mL)	Replicata	Teor (%)
Dia 1, analista 1	Baixo (20%)	4,8	1	98,07
			2	99,01
			3	98,20
	Médio (100%)	24,0	1	100,52
			2	99,41
			3	100,72
	Alto (180%)	43,2	1	99,78
			2	99,37
			3	100,01
Dia 2, analista 2	Baixo (20%)	4,8	1	98,88
			2	100,95
			3	98,62
	Médio (100%)	24,0	1	98,39
			2	99,12
			3	99,33
	Alto (180%)	43,2	1	98,65
			2	98,78
			3	98,44
<b>CMD (%)</b>				99,24
<b>DPR (%)</b>				0,87

Os teores de lumefantrina para as 18 determinações, em 3 níveis diferentes de concentração, analisados em dois dias diferentes e por dois analistas diferentes, para avaliação da precisão intermediária (precisão intercorridas ou

precisão interdiária) e o DPR (%) calculado para os resultados são apresentados na **Tabela 34**. O DPR (%) determinado foi inferior a 5,0%; comprovando-se, portanto, que o método desenvolvido apresentou precisão intermediária adequada. As médias para cada nível de concentração, nos dois dias de análise, foram comparadas entre si pelo teste de *Tukey*, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa a 5% de significância (valor de  $p > 0,05$ ).

#### 5.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram inicialmente estimados pelos parâmetros coeficiente angular ( $b$ ) e desvio padrão do coeficiente linear ou intercepto ( $a$ ), definidos no ensaio de linearidade. Posteriormente, LD e LQ foram estimados pelas razões entre sinal e ruído de linha de base encontradas para *soluções de lumefantrina IFA* de concentrações progressivamente diluídas. Os valores de LD e LQ para ambos os métodos estão descritos na **Tabela 35**.

**Tabela 35 – Limites de detecção e quantificação estimados pela equação da reta e pela razão S/N de método analítico para determinação de lumefantrina**

Parâmetro	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Pela equação da reta	Pela razão S/N
Limite de detecção (LD)	1,51	0,30
Limite de quantificação (LQ)	5,02	3,20

S: sinal, do inglês *signal*; N: ruído, do inglês *noise*.

O LQ determinado pela equação da reta foi um pouco superior ao menor ponto da curva analítica, igual a 4,8  $\mu\text{g/mL}$ , o que se deve a um elevado desvio padrão obtido para o intercepto do eixo das ordenadas. Entretanto, como esse primeiro ponto da curva de linearidade foi quantificado com precisão e exatidão adequadas, esse resultado para LQ pode ser considerado irreal. Foram determinados recuperações e DPR (%) para o LQ estimado pela razão S/N, em triplicata, sendo iguais a respectivamente 99,06% e 1,43%, o que comprova adequada exatidão e precisão do método para quantificação de lumefantrina nesse limite de quantificação.

### 5.2.5 Exatidão

Comprovou-se a exatidão do método desenvolvido simultaneamente à avaliação da repetitividade, determinando-se os valores de recuperação e coeficientes de variação (CV) para cada nível de concentração. Em termos de recuperação, os resultados médios encontrados para os níveis baixo, médio e alto foram, respectivamente, iguais a 98,43%, 100,22% e 99,72%, dentro do intervalo de 98,0 a 102,0%. Nenhum valor individual encontrado ficou fora dessas especificações. Os CV determinados foram iguais a, respectivamente, 0,51%, 0,71% e 0,33%, inferiores aos 5,0% definidos como aceitáveis segundo a RE 899/2003, demonstrando que o método é exato no intervalo avaliado.

### 5.2.6 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada por intermédio do teste de *Youden*, determinando-se o efeito de cada variável, de modo a ordenar as influências de cada uma delas em relação à área do pico de lumefantrina. Trata-se de um ensaio simples, que permite não somente avaliar se determinado método apresenta robustez adequada, como ainda definir o tipo e influência e ordená-las, para cada parâmetro analítico avaliado. O teste de *Youden* baseia-se na realização de um número de determinações sobre uma mesma amostra, segundo um plano de controle de fatores, susceptíveis de influenciar na resposta. Embora cada alteração seja avaliada individualmente no que diz respeito à influência nos resultados finais, a análise é realizada de forma multivariada e, portanto, inúmeras alterações são efetuadas simultaneamente. A etapa inicial para emprego do teste de *Youden* é análise pormenorizada, com base nas condições nominais empregadas e na experiência pessoal e histórica para definição de parâmetros, independentes entre si e susceptíveis de influenciar nos resultados finais das determinações. Por isso, foram selecionados sete parâmetros analíticos para avaliação, que são avaliados em seu valor nominal e em um valor deliberadamente variado (YUDEN, STEINER, 1975; BRASIL, 2003; CÉSAR, 2009). Os teores individuais e médios

para as 6 determinações para as 8 condições testadas e os respectivos DPR (%) estão apresentados na **Tabela 36**.

**Tabela 36 – Teores médios de lumefantrina e DPR (%) para avaliação da robustez de método analítico para determinação de lumefantrina**

Replicata/Condição	Teor (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	99,87	99,03	98,97	100,08	98,75	99,17	98,77	99,09
2	98,99	99,12	99,35	100,34	99,72	99,08	99,44	101,32
3	99,72	99,45	99,25	99,98	99,65	99,28	99,37	99,79
4	99,75	99,33	99,22	99,76	98,33	99,50	99,37	99,70
5	99,43	99,30	99,03	99,81	99,41	99,54	99,11	99,14
6	99,24	98,85	98,55	99,70	99,42	98,90	100,12	99,41
<b>MÉDIA</b>	99,50	99,18	99,06	99,95	99,21	99,25	99,36	99,74
<b>DPR (%)</b>	0,34	0,22	0,29	0,24	0,56	0,25	0,45	0,83

Os teores médios foram comparados por ANOVA, seguida por teste de *Dunnnett* para comparação das médias obtidas para cada condição alternativa, em relação à condição nominal. Não houve diferença estatisticamente significativa, a 5% de significância, entre as médias para as condições alternativas (2-8) quando comparadas à média encontrada para a condição nominal (1), comprovando, portanto, que o método apresentou robustez adequada. Os valores de teor,  $k$ ,  $N$  e  $A$  médios obtidos para 6 determinações, em condição analisada, incluindo a condição nominal, são apresentados na **Tabela 37**. Os efeitos calculados para cada parâmetro sobre a resposta estão na **Tabela 39**.

**Tabela 37 – Teor, fator de capacidade, número de pratos teóricos e assimetria para avaliação da robustez de método analítico para determinação de lumefantrina**

Replicata/Condição	Teor (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Teor médio (%)	99,50	99,18	99,06	99,95	99,21	99,25	99,36	99,74
Fator de capacidade ( $k$ )	1,61	1,42	2,15	1,73	1,29	0,97	2,27	1,93
Número de pratos teóricos ( $N$ )	4190	4078	4241	3960	3746	3578	4103	3994
Assimetria ( $A$ )	1,28	1,22	1,32	1,39	1,34	1,48	1,27	1,19

**Tabela 38 – Efeitos de cada parâmetro analítico para cada uma das respostas na avaliação da robustez de método analítico para determinação de lumefantrina**

Parâmetro analítico	Efeito			
	Teor	$K$	$N$	$A$
pH da fase aquosa	0,03	0,11	262,00	-0,02
Proporção de metanol na fase móvel (%)	-0,24	-0,70	-176,50	0,04
Temperatura (°C)	-0,24	0,32	167,50	-0,02
Vazão da fase móvel (mL/min)	0,08	0,27	210,00	0,14
Marca de metanol	-0,04	-0,01	29,00	0,01
Tempo de ultrassom (min)	0,39	-0,06	-27,50	-0,02
Concentração de TFA (%)	0,21	-0,05	-57,00	0,09

De acordo com as **Tabelas 37 e 38**, nenhum dos parâmetros apresentou influência significativa nos resultados encontrados para teor, corroborando com o que se discutiu anteriormente, de que o método é satisfatoriamente robusto, sendo adequado para quantificação de lumefantrina em IFA. O maior efeito encontrado ocorreu quando se diminuiu o tempo em que as amostras eram submetidas ao ultrassom, o que, provavelmente, reduzia a solubilização da lumefantrina. O efeito encontrado, igual a 0,39%, embora consideravelmente baixo e pouco significativo, sugere que se padronize o tempo no ultrassom em, pelo menos, 10 minutos. Em relação aos outros parâmetros analíticos, os valores encontrados para efeito foram ainda menores, inferiores aos DPR encontrados na precisão, podendo estar relacionados, inclusive, com a variabilidade inerente ao próprio método. Conclui-se, portanto, que esses parâmetros apresentam influência mínima sobre o teor de lumefantrina nas amostras, demonstrando a robustez do método.

O tempo de retenção e, por consequência, o fator de capacidade ( $k$ ), sofreu influência mais pronunciada dos parâmetros proporção de metanol na fase móvel, temperatura e vazão de fase móvel, o que era previsível. Os valores de  $k$  encontrados diminuíram quando a temperatura e vazão de fase móvel foram aumentadas, diminuindo quando a proporção de metanol foi reduzida. Recomenda-se, portanto, que esses parâmetros sejam cuidadosamente controlados nas análises de rotina, para que se evite que variações muito grandes nos tempos de retenção ocorram. Os outros parâmetros analíticos influenciaram muito pouco significativamente nos tempos de retenção.

Vazão de fase móvel e concentração de TFA foram os parâmetros analíticos que apresentaram maiores influências em relação à assimetria. Como esperado, o aumento na concentração de TFA e pH provocou uma diminuição dos valores de  $A$  e picos mais simétricos. Esse comportamento se deve ao fato de a lumefantrina ser uma base fraca, de modo que menores valores de pH podem prejudicar a ionização do fármaco, fazendo com que a lumefantrina se encontre parcialmente ionizada e parcialmente não ionizada, o que leva à formação de cauda ou frente. Percebeu-se ainda que um aumento na vazão provocou uma redução acentuada de  $A$ , como esperado, pois fluxos maiores

diminuem o alargamento dos picos. Surpreendentemente, a temperatura não foi um parâmetro que influenciou na simetria dos picos; geralmente, aumentos na temperatura diminuem  $A$ , o que não foi observado aqui provavelmente porque a diferença de temperatura avaliada não foi grande.

O parâmetro  $N$  não sofreu influência considerável dos parâmetros marca de metanol, tempo de ultrassom e concentração de TFA, mas foi influenciado por vazão de fase móvel, proporção de metanol e temperatura, ordenados do maior para o menor efeito. Uma vez que  $N$  se correlaciona diretamente aos tempos de retenção e ao alargamento dos picos (e, portanto, à eficiência da coluna), esse fator foi influenciado similarmente aos parâmetros  $k$  e  $A$ . Diminuições na vazão e na proporção de metanol aumentaram  $N$  por possibilitar que a lumefantrina interaja melhor com a fase estacionária, promovendo separação mais eficiente. Em contrapartida, aumentos na temperatura diminuem  $N$  ao diminuir a viscosidade da fase móvel e, por consequência, os tempos de retenção do analito. Elevações no pH reduziram consideravelmente  $N$ , exercendo maior influência sobre o número de pratos teóricos, que pode ser explicada por maior alargamento de picos graças à ionização parcial das moléculas de lumefantrina.

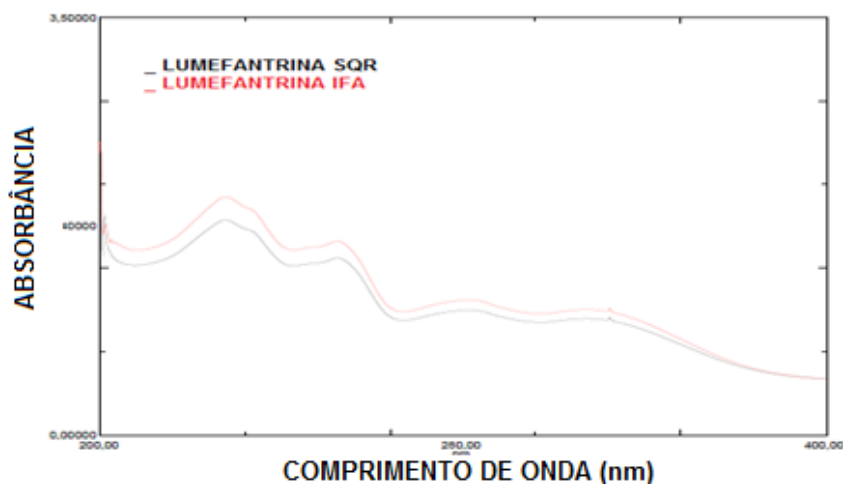
Entre todos os parâmetros analíticos selecionados, a marca de metanol foi o que apresentou menor influência nas respostas medidas, de uma forma geral. Por outro lado, parâmetros como proporção de metanol, vazão de fase móvel e pH devem ser controlados rotineiramente com maior rigor. Entretanto, como o objetivo principal do método desenvolvido foi quantificar lumefantrina, o método demonstrou ser suficientemente robusto, como discutido anteriormente.

### **5.3 Controle de qualidade de lumefantrina insumo farmacêutico ativo (IFA)**

Procedeu-se a identificação de lumefantrina IFA por espectrofotometria de absorção no UV. Os espectros de absorção obtidos, na faixa de 200 a 400 nm, para *soluções de lumefantrina SQR e IFA a 0,002% (p/v)* foram sobrepostos, sendo demonstrados na **Figura 23**. Os mínimos e máximos de absorção

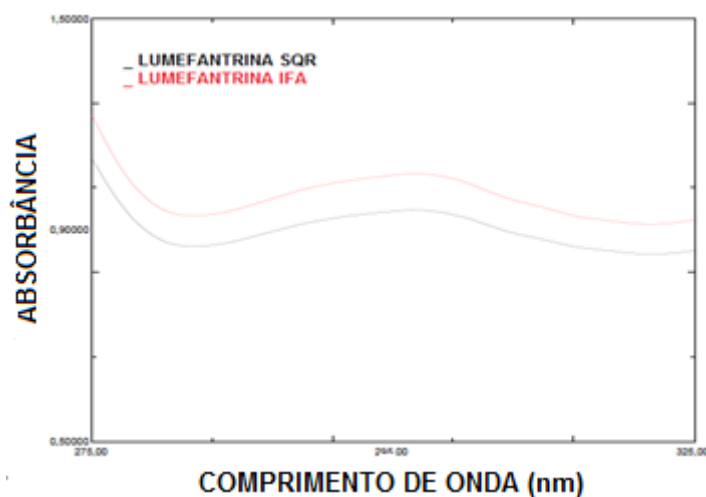
encontrados no espectro da lumefantrina IFA coincidiram com aqueles encontrados para o lumefantrina SQR, confirmando a identidade do insumo.

**Figuras 23 – Espectros de absorção no ultravioleta na faixa de 200-400 nm para lumefantrina SQR e IFA sobrepostos**



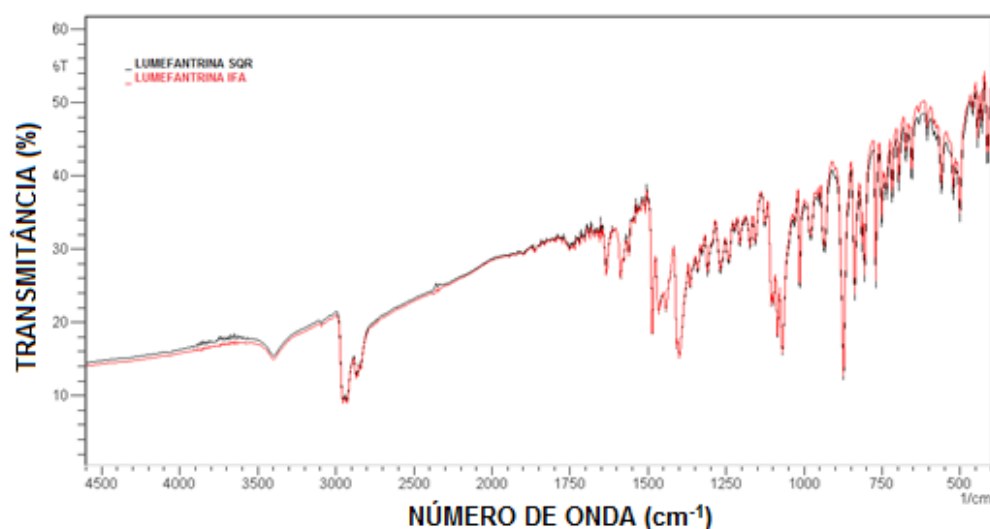
A monografia oficial descrita na Farmacopeia Internacional propõe ainda que sejam traçados espectros na faixa de 275 a 325 nm, para que se determine o máximo de absorção entre 275 e 325 nm e a absorvância específica ( $A_{1cm}^{1\%}$ ) a 302 nm. Os espectros sobrepostos para o intervalo 275 a 325 nm são apresentados na **Figura 24**. Encontrou-se máximo de absorção igual a 302 nm e absorvância específica igual a 328, cumprindo as especificações definidas em compêndio oficial e, assim, confirmando a identidade da lumefantrina IFA.

**Figuras 24 – Espectros de absorção no ultravioleta na faixa de 275-325 nm para lumefantrina SQR e IFA sobrepostos**



Utilizou-se também espectrofotometria de absorção no IV para identificação de lumefantrina. Os espectros de absorção foram traçados, na faixa de 4500 a 400  $\text{cm}^{-1}$  para lumefantrina SQR e lumefantrina IFA e sobrepostos para comparação dos máximos e mínimos de absorção e das intensidades relativas, conforme **Figura 25**.

**Figura 25 – Espectros de absorção no infravermelho na faixa de 4500 a 400  $\text{cm}^{-1}$  para lumefantrina SQR e lumefantrina IFA sobrepostos**



Demonstrou-se, pela sobreposição dos espectros, que lumefantrina IFA e lumefantrina SQR correspondem à mesma substância, apresentando bandas de absorção nos mesmos números de onda e com intensidades relativas similares. Os números de onda típicos para grupos funcionais presentes na lumefantrina foram atribuídos (**Tabela 39**), confirmando a identidade do IFA.

**Tabela 39 – Atribuições de bandas de absorção típicas no IV para lumefantrina**

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
3390-3400	Deformação axial O-H de álcool;
2850-3000	Deformação axial C-H;
1600-1650	Deformação axial C=C de alqueno;
1550-1600	Deformação axial C=C de grupos aromáticos;
1450-1500	Deformação angular C-H de alceno;
1080-1100	Deformação axial C-O de álcool;
1050-1070	Deformação axial C-N;
830-850	Deformação angular C-H de grupos aromáticos;
750-780	Deformação axial C-Cl.



Os teores de lumefantrina encontrados, em sextuplicata, e o DPR (%) para as replicatas avaliadas, encontrados para o doseamento de lumefantrina IFA estão demonstrados na **Tabela 40**. O teor médio encontrado no ensaio de doseamento foi de 99,96%, que está dentro dos limites farmacopeicos especificados, de 98,5% a 101,0%. O DPR obtido, de 0,24%, foi inferior aos 5,0% definidos como limite aceitável. Portanto, a lumefantrina IFA cumpriu o ensaio de doseamento.

**Tabela 40 – Teores e DPR (%) para ensaio de doseamento de lumefantrina IFA.**

Replicata	Teor (%)
1	100,12
2	99,98
3	99,78
4	100,02
5	100,26
6	99,60
<b>CMD</b>	99,96
<b>DPR (%)</b>	0,24

Os resultados para outros ensaios de identificação, caracterização físico-química e pureza preconizados para o insumo farmacêutico ativo lumefantrina pela Farmacopeia Internacional, encontrados por Rivelli (2016), estão descritos sumariamente na **Tabela 41**. Ressalta-se, inclusive, que ambos os trabalhos utilizaram o mesmo insumo farmacêutico ativo, incluindo lote. Os resultados demonstram que a lumefantrina IFA possui qualidade adequada para utilização nos ensaios posteriores desenvolvidos durante a execução desse trabalho.

**Tabela 41 – Ensaio de identificação, caracterização físico-química e pureza para lumefantrina IFA, realizados por Rivelli (2016), para mesma IFA e mesmo lote**

Ensaio	Resultado
Solubilidade	Cumprir o teste. Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em clorofórmio e acetato de etila, solúvel em diclorometano e pouco solúvel em etanol e metanol.
Temperatura de fusão	Cumprir o teste (130,3 °C)
Limpidez da solução	Cumprir o teste. Não foram observadas manchas secundárias no cromatograma obtidos com a <i>solução (1)</i> .
Perda por dessecação	Cumprir o teste (0,14%)
Cinzas sulfatadas	Cumprir o teste (0,05%)
Metais pesados	Cumprir o teste (menos que 10 ppm)
Quantificação por titulação em meio não aquoso	Cumprir o teste (100,36%)

## 5.4 Síntese e caracterização de polímero molecularmente impresso para lumefantrina

### 5.4.1 Otimização de protocolo de síntese para polímero molecularmente impresso

Um planejamento BBD de 3 variáveis foi empregado na otimização da síntese de MIP para lumefantrina, para determinação de condições experimentais ótimas, quanto ao monômero funcional, *crosslinker* e porogênio. A avaliação de diferentes monômeros funcionais é importante, pois os monômeros são responsáveis pelas interações químicas com o fármaco e, portanto, pela complementaridade de ligações na cavidade seletiva formada. Analogamente, os *crosslinkers* foram avaliados porque são, por sua vez, responsáveis pela rigidez estrutural e pelas propriedades físico-químicas (como estabilidade), além de interferirem também em características dos polímeros que favoreçam ou desfavoreçam o emprego em SPE. Os porogênios, por fim, são essenciais para formação de poros e, portanto, para definição da área superficial acessível ao analito e da capacidade de sorção do MIP. Em uma primeira etapa, 13 MIPs e 13 NIPs foram sintetizados e, após serem submetidos a procedimento de extração por Soxhlet e secagem a vácuo, foram avaliados quanto ao coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) e fator de impressão ( $IF$ ), que são apresentados na **Tabela 42**. O  $K_d$  avalia a capacidade máxima de sorção dos polímeros frente a um analito, enquanto o  $IF$  avalia a diferença entre as capacidades de sorção do MIP e NIP. Quanto maior for o valor do  $IF$ , maior a diferença entre MIP e NIP e, portanto, maior o indício de queda fato, houve a impressão molecular, com a formação de um sítio seletivo para o fármaco.

**Tabela 42 – Coeficientes de distribuição e fatores de impressão obtidos para MIPs e NIPs sintetizados conforme planejamento Box-Behnken na otimização de protocolo de síntese para MIP para lumefantrina**

Experimento		Coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fator de impressão ( $IF$ )
1	MIP	540,96	0,50
	NIP	1080,99	
2	MIP	558,30	0,99
	NIP	561,17	
3	MIP	1022,41	1,56
	NIP	656,23	
4	MIP	583,73	1,68
	NIP	348,14	
5	MIP	718,79	0,92
	NIP	777,82	
6	MIP	595,74	1,06
	NIP	564,60	
7	MIP	649,04	1,21
	NIP	535,30	
8	MIP	598,87	1,74
	NIP	344,24	
9	MIP	244,51	0,37
	NIP	669,38	
10	MIP	566,78	0,46
	NIP	1246,87	
11	MIP	918,14	0,98
	NIP	939,60	
12	MIP	922,10	0,99
	NIP	934,74	
13	MIP	773,32	1,10
	NIP	703,76	

Com base nos resultados encontrados, nota-se que para os experimentos 1, 9 e 10, o NIP apresentou, inesperadamente,  $K_d$  superiores quando comparados aos do MIP, resultando em  $IF$  menores que 1. Considerando que, na pior das hipóteses, quando não houver impressão molecular, MIP e NIP apresentariam constituição química e perfil de sorção muito similares, graças aos sítios inespecíficos, espera-se sempre que um MIP apresente  $K_d$  igual ou maior que o NIP. Em comum, MIP-1, MIP-9 e MIP-10 foram sintetizados utilizando-se TRIM como *crosslinker*, o que indica que o TRIM não constituiu um *crosslinker* ideal para síntese de MIP para lumefantrina. Uma teoria que explicaria os resultados encontrados seria uma provável interação preferencial entre lumefantrina e *crosslinker* em vez de lumefantrina e monômero funcional, justamente porque,

assim como a lumefantrina, o TRIM é muito mais lipofílico que os demais reagentes empregados para síntese. Desse modo, não só não haveria impressão molecular, como o MIP produzido teria em sua composição, menor proporção de TRIM em relação à composição do NIP. Considerando que para ambos os casos a sorção se explicaria pela ligação do fármaco a sítios inespecíficos, por interações hidrofóbicas entre lumefantrina e a rede polimérica formada, o MIP possuiria uma menor capacidade de sorção graças ao menor conteúdo em TRIM.

Uma explicação alternativa plausível seria a de que, embora não tenha havido impressão molecular em ambos os casos, a presença da lumefantrina no meio reacional contribuiu para que fossem formados poros maiores na rede polimérica para o MIP do que na obtida para o NIP. Como a interação analito-polímero seria, no entanto, inespecífica, a presença de poros maiores facilitaria que a molécula de lumefantrina penetrasse, se sorvendo à rede, mas permitiria, por outro lado, que a lumefantrina se desorvesse mais facilmente. O resultado líquido seria uma sorção menor para o MIP, por sua rede polimérica apresentar-se como um emaranhado mais “frouxo” e permissivo.

Já para os experimentos indicados pelos números 2, 5, 6, 11, 12 e 13, os resultados encontrados para  $K_d$  foram muito próximos para MIP e NIP, levando a  $IF$  aproximadamente iguais a um. Concluiu-se, portanto, que para esses experimentos, não houve de fato impressão molecular e que a sorção da lumefantrina aos polímeros (MIP e NIP) ocorreu por mecanismo inespecífico. MIP-11, MIP-12 e MIP-13 foram preparados empregando-se AMA como monômero funcional. Considerando que o MIP-9 e o MIP-10 também utilizaram AMA como monômero e produziram resultados ainda piores, pode-se concluir que AMA e lumefantrina não interagem de maneira adequada entre si. Similarmente, os MIP-2, MIP-5 e MIP-6 foram sintetizados a partir de 2-HEMA, mesmo caso do MIP-1, indicando que lumefantrina e 2-HEMA também não interagem adequadamente entre si.

Como a lumefantrina é uma base fraca, imaginava-se que ela interagiria mais fortemente com monômeros predominantemente ácidos, como AMA e 2-HEMA. É importante ressaltar, contudo, que, além de um caráter básico fraco,

o nitrogênio básico da lumefantrina é um nitrogênio terciário, possuindo 3 grandes grupos, incluindo dois grupos butila, como substitutos, que promovem grande impedimento estérico, dificultando o estabelecimento de ligações de hidrogênio entre lumefantrina e os grupos ácidos doadores de ligação de hidrogênio dos monômeros ácidos. O grupo ácido presente na molécula de lumefantrina é um grupo hidroxil (função álcool), de acidez praticamente desprezível, que dificilmente funcionaria como doador de elétrons para o AMA, que pode atuar como doador e receptor de ligações de hidrogênio.

Os únicos resultados satisfatórios foram obtidos quando se empregou 2-VP como monômero funcional, o que pode ser facilmente percebido pelos resultados satisfatórios encontrados para os MIP-3, MIP-4, MIP-7 e MIP-8. Embora para esses polímeros os  $K_d$  não tenham sido muito altos, os  $IF$  foram consideravelmente maiores que 1, fornecendo indício de que houve impressão molecular e que as interações entre lumefantrina e MIP se deram, predominantemente, por sua ligação a cavidades específicas formadas na rede polimérica tridimensional. Fez-se evidente, assim, que a 2-VP é o monômero funcional ideal para produção de MIP para lumefantrina. A 2-VP é um monômero básico que atua como um aceptor de elétrons, interagindo, preferencialmente, com analitos mais ácidos. Levando em consideração que o caráter ácido do grupo alcóolico da lumefantrina é praticamente desprezível, admite-se que as interações entre lumefantrina e 2-VP ocorram por outros tipos de interação, como interação entre dipolos, interações de *van der Waals*, interações hidrofóbicas e interações entre elétrons  $\pi \rightarrow \pi$ .

Os resultados encontrados para os 13 polímeros, em termos de  $K_d$  e  $IF$ , foram analisados por *software* STATISTICA® 8.0, sendo obtidos diagramas de Pareto (**Figura 26**) e superfícies de resposta (**Figura 27**), para ambas respostas, contribuindo para definição mais precisa e racional de condições reacionais que não ficaram precisamente claras pela análise dos dados da **Tabela 42**. O modelo utilizado considerou os termos linear (L) e quadrático (Q) de variável e interações lineares entre elas. Superfícies de resposta foram obtidas para duas variáveis por vez, fixando-se a terceira variável em seu nível central.

Figura 26 – Diagramas de Pareto para coeficiente de distribuição (à esquerda) e fator de impressão (à direita)

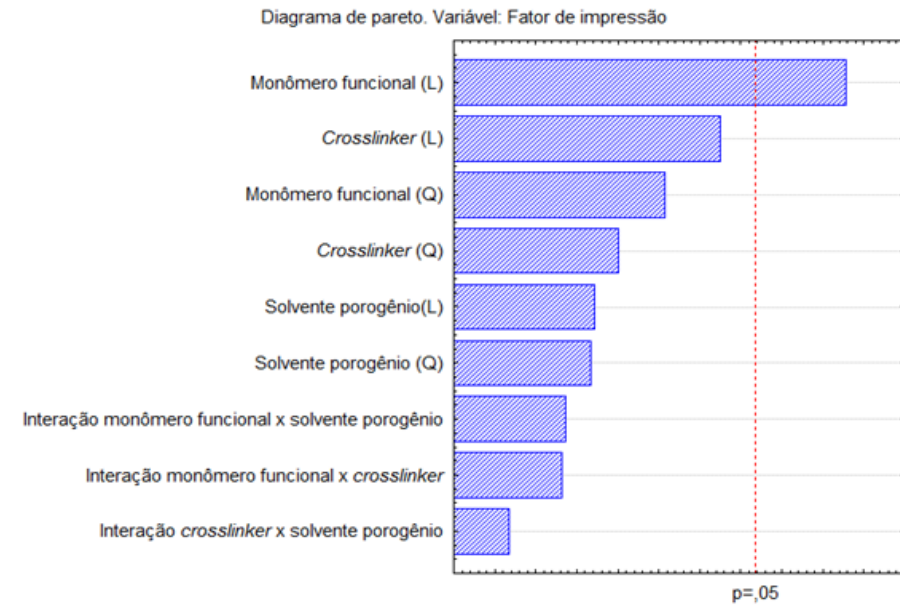
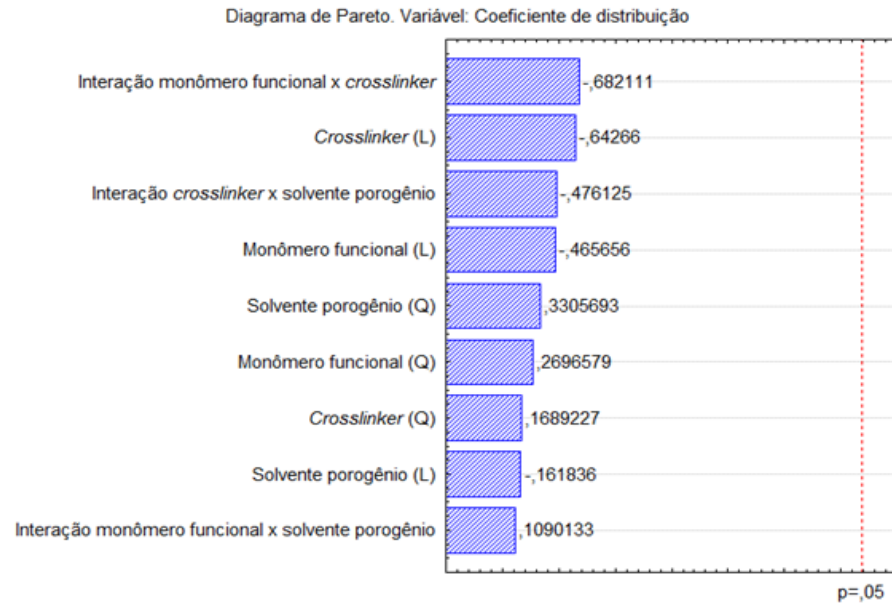
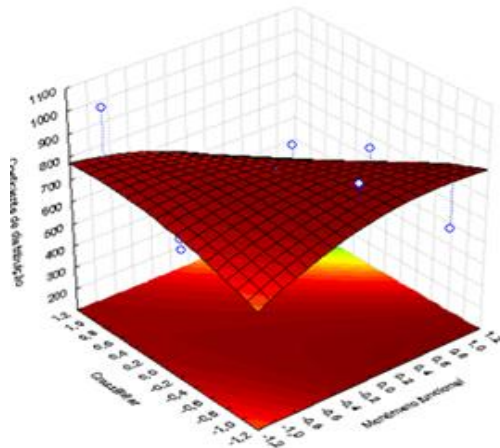
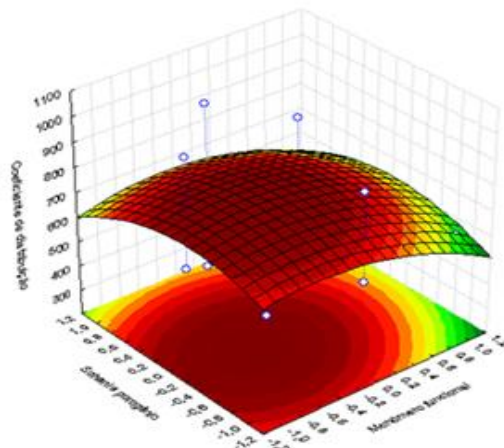


Figura 27 – Superfícies de reposta obtidas para as variáveis coeficiente de distribuição (superior) e fator de impressão (inferior)

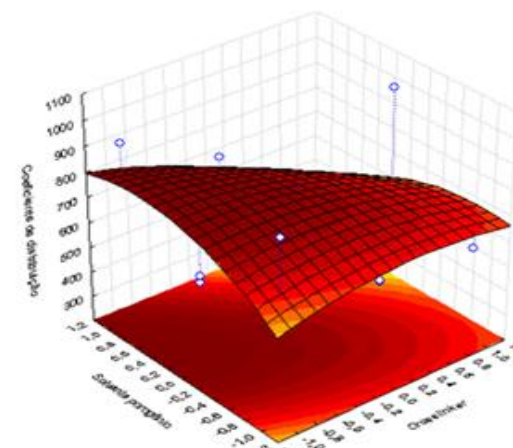
Superfície de resposta; Variável: Coeficiente de distribuição  
Monômero funcional x Crosslinker



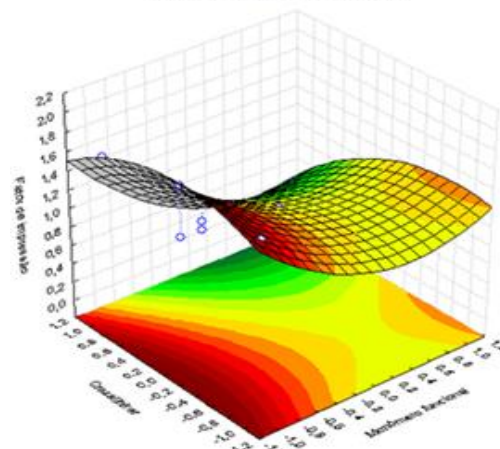
Superfície de resposta; Variável: Coeficiente de distribuição  
Monômero funcional x Solvente porogênio



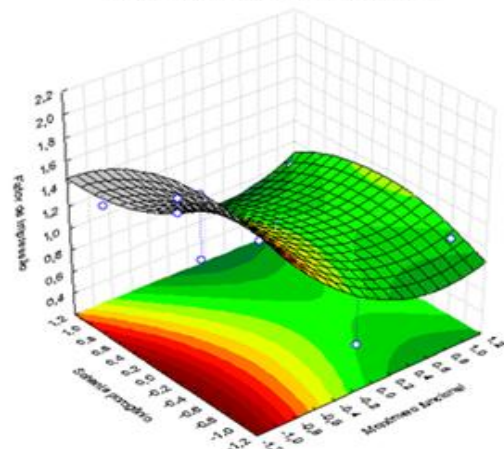
Superfície de resposta; Variável: Coeficiente de distribuição  
Crosslinker x Solvente porogênio



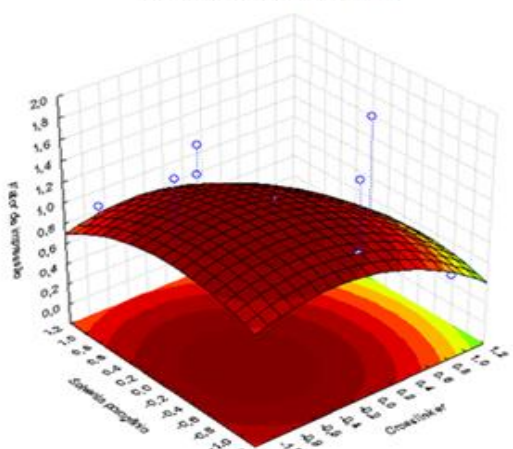
Superfície de resposta; Variável: Fator de impressão  
Monômero funcional x Crosslinker



Superfície de resposta; Variável: Fator de impressão  
Monômero funcional x Solvente porogênio



Superfície de resposta; Variável: Fator de impressão  
Crosslinker x Solvente porogênio



O diagrama de Pareto para o  $K_d$  demonstrou que nenhuma variável pôde ser considerada estatisticamente significativa, a 5% de significância. Entretanto, percebe-se que o *crosslinker* parece exercer maior influência que monômero funcional, enquanto o porogênio parece exercer uma menor influência. Já para o  $IF$ , observa-se que, corroborando o que foi discutido anteriormente, o parâmetro monômero funcional, foi estatisticamente significativo. Os outros termos lineares e quadráticos, incluindo interações, mesmo que não estatisticamente significativos, indicam que as variáveis monômero funcional, principalmente, e *crosslinker* influenciam mais fortemente para resultados desejáveis em relação aos  $IF$  que a variável solvente porogênio. Interações entre duas variáveis demonstraram ser pouco importantes.

Para  $K_d$ , a inspeção visual das superfícies de resposta não conduziu a resultados conclusivos, mas demonstrou que coeficientes superiores a 800  $\mu\text{g/g}$  podem ser encontrados para toda a faixa avaliada. Como as superfícies obtidas indicaram pontos de sela em vez de pontos de máximo, valores críticos não puderam ser estimados, porque a região experimental avaliada precisaria ser deslocada em direção à resposta máxima. Sobrepondo-se visualmente as superfícies de resposta, os maiores resultados foram encontrados para AMA ou 2-VP como monômero (ou uma mistura de ambos), DVB como *crosslinker* e tolueno como porogênio, responsáveis pelas regiões de máximo observadas. Atribuiu-se maior relevância, entretanto, para o  $IF$ , variável que indica se houve ou não impressão molecular, e, portanto, indiretamente, se o MIP apresentou seletividade adequada, sem contar que resultados maiores para  $K_d$  podem ser alcançados otimizando-se outras condições de síntese e extração, como proporção molar entre molde e monômero ou quantidade de polímero utilizada para produção dos cartuchos. Por isso, deu-se prioridade às conclusões alcançadas para o  $IF$  na determinação dos reagentes de síntese ideais.

Diferentemente dos resultados encontrados pela análise das superfícies de resposta para  $K_d$ , os resultados encontrados para  $IF$  direcionaram a conclusões mais inequívocas quanto a condições experimentais ótimas. Embora não tenha sido possível definir valores críticos, pois as superfícies de resposta não apresentaram pontos de máximo, mas sim pontos de sela, o planejamento BBD



apontou claramente que a 2-VP é o monômero funcional de escolha, porque a região de máxima resposta está totalmente deslocada em sua direção. Esses resultados corroboram com as discussões anteriores, sendo, portanto, a 2-VP definida como o monômero funcional para as próximas etapas de síntese.

Já para solvente porogênio, percebeu-se que a região de máxima resposta apontou na direção do tolueno (nível central), embora bons resultados sejam encontrados com o clorofórmio e, depois dele, com o acetato de etila. Os 3 solventes apresentam baixa constante dielétrica e apolaridade, mas algumas observações experimentais contribuíram, somado aos resultados fornecidos pelo *software*, para que se selecionasse o tolueno como solvente porogênio. O uso de acetato de etila é menos frequentemente empregado para síntese de MIP, razão pela qual deu-se prioridade aos outros solventes analisados. O clorofórmio, embora utilizado amplamente, apresenta ponto de ebulição muito próximo à temperatura definida para as sínteses, podendo evaporar e levar à formação de agregados de partículas, que precisarão ser triturados, diminuindo a eficiência dos polímeros. Outro achado importante foi que o clorofórmio não solubilizou completamente os monômeros e *crosslinkers* empregados na síntese em temperaturas mais baixas, restringindo sua aplicabilidade quando se avaliasse a ativação do iniciador radicalar fotoquimicamente ou a eficiência de uma etapa de pré-polimerização, quando as amostras foram mantidas a 4 °C. Por isso, o clorofórmio foi descartado como solvente porogênio.

Finalmente, as superfícies indicaram que melhores *IF* foram obtidos quando o EGDMA foi usado como *crosslinker*, embora resultados muito bons tenham sido encontrados para o DVB. Curiosamente, o TRIM apareceu como pior opção entre os *crosslinkers*, embora um dos melhores resultados tenha sido atingido por uma combinação entre 2-VP e TRIM (MIP-3). É essencial destacar que os polímeros sintetizados usando-se TRIM apresentaram enorme capacidade de intumescimento. Testes de SPE foram efetuados para o MIP-3, mas os tempos necessários para eluição dos solventes de condicionamento e amostra foram grandes, dispendendo-se algumas horas para que poucos mililitros eluíssem pelo cartucho, o que contribuiu para que o TRIM fosse descartado como *crosslinker*. O DVB, por sua vez, demonstrou como principal

desvantagem rendimentos de reação muito inferiores aos encontrados para EGDMA: enquanto mais de um grama de MIP foi obtido nas sínteses usando EGDMA, somente 100-200 mg foram obtidos com DVB. Considerando ainda que o MIP com maior  $IF$  (MIP-8) foi obtido para a combinação 2-VP e EGDMA, selecionou-se o EGDMA como *crosslinker* ideal.

Depois de definidos monômero funcional, *crosslinker* e porogênio, foram sintetizados MIP e NIP nas condições otimizadas, mantendo-se a proporção molar de 1:4:20, identificados como MIP-14 e NIP-14. Os polímeros foram submetidos a estudo de sorção estática, para determinação dos respectivos  $K_d$  e  $IF$ , sendo encontrados resultados de  $K_d$  de 600,20  $\mu\text{g/g}$  para o MIP-14 e 342,02  $\mu\text{g/g}$  para o NIP-14, com  $IF$  de 1,76, muito próximos aos obtidos para o MIP-8 (598,87  $\mu\text{g/g}$  e 1,74, respectivamente), considerado como resultado mais satisfatório na primeira etapa de otimização desse protocolo de síntese. Considerando que a única condição modificada foi o solvente, de clorofórmio para tolueno, era de se esperar que valores muito similares fossem obtidos.

Em seguida, avaliou-se se a combinação dos dois melhores monômeros funcionais (2-VP e AMA) na primeira etapa resultaria em benefício para capacidade de sorção ou seletividade. Permitiu-se, portanto, a avaliação da eficiência de copolimerização – uma vez que diferentes monômeros podem interagir com diferentes pontos ou grupos funcionais da molécula molde (*template*), de modo que a combinação entre diferentes monômeros poderia contribuir para formação de complexo fármaco-monômero mais estáveis e, conseqüentemente, para a produção de polímeros ainda mais seletivos. MIP-15, MIP-16 e MIP-17 e os respectivos NIPs foram sintetizados, mantendo-se outras condições reacionais constantes, nas seguintes proporções desses monômeros: 25% 2-VP + 75% AMA (MIP-15 e NIP-15); 50% 2-VP + 50% AMA (MIP-16 e NIP-16); e 75% 2-VP + 25% de AMA (MIP-17 e NIP-17). Os  $K_d$  e  $IF$  determinados são apresentados na **Tabela 43**.

**Tabela 43- Coeficientes de distribuição e fatores de impressão para avaliação da eficiência de copolimerização entre AMA e 2-VP, na otimização de protocolo de síntese de MIP para lumefantrina**

Experimento		Coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fator de impressão ( $IF$ )
15	MIP	715,27	1,12
	NIP	640,70	
16	MIP	682,74	1,13
	NIP	605,52	
17	MIP	477,17	1,22
	NIP	390,07	

Os dados da **Tabela 43** demonstram que a presença de AMA como comonômero não agregou benefício, pelo contrário. Embora o aumento da proporção de AMA se relaciona a um aumento na capacidade de sorção do polímero, evidenciado por maiores  $K_d$ , aumento ainda mais pronunciado ocorre para os NIP, de modo que o resultado final compreende uma diminuição importante dos  $IF$ , diretamente proporcional ao aumento do percentual de AMA, que representa redução da ocorrência de impressão molecular e, por isso, da seletividade do MIP. Os melhores resultados foram encontrados para o MIP-17, em que a proporção de 2-VP predomina sobre o AMA, mas os resultados para  $K_d$ , igual 477,17  $\mu\text{g/g}$ , e  $IF$ , igual a 1,22, foram ainda muito menores que os encontrados para o MIP-14. Logo, a combinação de 2 monômeros funcionais demonstrou efeito prejudicial à eficiência do MIP, de modo que se decidiu pela utilização de somente 2-VP como monômero funcional.

Depois de se definir os reagentes de síntese, a otimização da proporção molar entre lumefantrina e monômero funcional foi realizada, padronizando-se a relação entre monômero funcional e *crosslinker* em 1:5. Permitiu-se, portanto, a avaliação da eficiência de copolimerização – uma vez que diferentes monômeros podem interagir com diferentes pontos ou grupos funcionais da molécula molde (*template*), de modo que a combinação entre diferentes monômeros poderia contribuir para formação de complexo fármaco-monômero mais estáveis e, conseqüentemente, para a produção de polímeros ainda mais seletivos. Foram obtidos MIPs e NIPs nas proporções testadas 1:6 (MIP-18 e NIP-18), 1:8 (MIP-19 e NIP-19) e 1:10 (MIP-20 e NIP-20) entre fármaco e 2-VP, sendo posteriormente determinados seus  $K_d$  e  $IF$ , que constam na **Tabela 44**.

**Tabela 44 – Coeficientes de distribuição e fatores de impressão para avaliação das proporções molares entre lumefantrina e 2-vinilpiridina, na otimização de protocolo de síntese para MIP para lumefantrina**

Experimento		Coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fator de impressão (IF)
18	MIP	972,45	2,43
	NIP	400,76	
19	MIP	685,84	1,63
	NIP	420,92	
20	MIP	710,68	1,47
	NIP	482,16	

Analisando os resultados presentes na **Tabela 44**, notou-se que o aumento da proporção de monômero funcional contribuiu para aumentos nos  $K_d$  para o MIP-18, MIP-19 e MIP-20. O aumento da capacidade de sorção para o MIP-18, sintetizado na proporção 1:6:30, por exemplo, superou 60%, sendo de 972,45  $\mu\text{g/mL}$ . Foram observados aumentos para as proporções 1:8:40 (MIP-19) e 1:10:50 (MIP-20), mas menos acentuados, iguais a respectivamente 14% e 18%. Já para o  $IF$ , percebeu-se uma melhoria considerável para o MIP-18, na proporção 1:6:30, em comparação ao MIP-14. O  $IF$  determinado aumentou de 1,73 para 2,43, isto é, aproximadamente 40%. Entretanto, aumentos maiores na proporção de monômero apresentaram efeito inverso: foram observadas diminuições do fator de impressão para MIP-19 e MIP-20.

Os resultados demonstraram que o aumento na proporção relativa de 2-VP induziu aumento no número de interações entre monômero e fármaco, na formação do complexo fármaco-monômero. Com maior número de moléculas de 2-VP interagindo com diferentes pontos da molécula de lumefantrina, formase um complexo fármaco-monômero mais estável, que conduz, por consequência, à formação de sítios seletivos ainda mais complementares à lumefantrina quanto a tamanho e funcionalidade, conferindo maior capacidade de sorção e especificidade aos polímeros. O aumento no  $IF$  é indício que a proporção relativa entre a quantidade de sítios específicos em relação aos sítios inespecíficos foi aumentada, provavelmente porque número maior de moléculas de lumefantrina sofreu processo de impressão molecular quando se emprega monômero em maior quantidade.

É de se observar, contudo, que um aumento ainda maior da quantidade de monômero adicionada à mistura reacional diminuiu a seletividade dos polímeros, conforme foi percebido para o MIP-19 e MIP-20. Esse efeito contrário deve-se ao fato de que, como as quantidades de monômero e *crosslinker* são pronunciadamente maiores que a quantidade de lumefantrina, satura-se a interação entre monômero e fármaco, de modo que parte das moléculas de monômero presente no meio reacional não interage com moléculas de lumefantrina. Entretanto, a reação de polimerização não discrimina entre moléculas que não interagem e que interagem com o fármaco, de modo que, ao mesmo tempo em que são obtidas partículas de polímero molecularmente impressas, formam-se também partículas molecularmente não impressas. Dessa forma, há elevação da proporção de sítios inespecíficos em relação à proporção de sítios específicos, diminuindo a seletividade e afinidade dos polímeros pela lumefantrina. Por isso, embora o aumento da proporção de 2-VP melhore as características de sorção e seletividade dos polímeros até certo ponto, não se pode aumentá-la indefinidamente, pois, para proporções muito maiores, o efeito é prejudicial. Portanto, definiu-se a proporção 1:6:30 para fármaco, monômero funcional e *crosslinker* como condição ótima.

Estudos apontam que sínteses provocadas por exposição da mistura reacional à radiação UV, em vez de aquecimento, produzem MIPs mais seletivos, pois a polimerização ocorreria a temperaturas mais baixas, propiciando a formação de um complexo fármaco-monômero mais estável e elevando a eficiência de reconhecimento molecular dos polímeros. Zhang *et al.* (2010) compararam diferentes MIPs para sulfadiazina, iniciados quimicamente por aquecimento a 55 °C e por fotólise a 5 °C, encontrando melhores resultados em relação aos  $K_d$  para os MIPs obtidos por fotoiniciação. Decidiu-se, por isso, sintetizar MIP e NIP, nas mesmas condições que o MIP-14, mas usando-se radiação UV a 4 °C como método de ativação do AIBN (MIP-21 e NIP-21). Especula-se também que uma etapa prévia de pré-polimerização, em que a mistura reacional é mantida a baixas temperaturas por determinado período de tempo para permitir a formação de um complexo monômero-fármaco mais estável, propicia polímeros de maior afinidade e seletividade. Buscando-se verificar se a pré-polimerização seria realmente benéfica, foram obtidos MIP e NIP, exatamente

como descrito para o MIP-14, mas submetidos a 4 e 8 horas de pré-polimerização entre monômero e fármaco a 4 °C antes da adição de *crosslinker* e continuidade da síntese. Os polímeros foram identificados, respectivamente, como MIP-22 e NIP-22 e MIP-23 e NIP-23, sendo os respectivos  $K_d$  e  $IF$  demonstrados na **Tabela 45**.

**Tabela 45 – Coeficientes de distribuição e fatores de impressão para avaliação das eficiências de fotoiniciação e pré-polimerização, na otimização de protocolo de síntese de MIP para lumefantrina**

Experimento		Coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fator de impressão ( $IF$ )
21	MIP	607,93	1,77
	NIP	344,33	
22	MIP	592,17	1,81
	NIP	327,53	
23	MIP	612,92	1,75
	NIP	349,97	

Os resultados obtidos para o MIP-21 e NIP-21 foram praticamente iguais aos encontrados para o MIP-14 e NIP-14. Percebe-se, portanto, que contrariando o que se descreve na literatura, a fotoiniciação por UV não demonstrou importante ganho em afinidade e seletividade para MIP para lumefantrina. Considerando a proximidade entre resultados por aquecimento e por UV e ainda que a lumefantrina demonstrou ser mais estável ao aquecimento que à fotólise, optou-se por definir aquecimento a 65 °C como método de iniciação.

Os resultados da **Tabela 45** indicaram ainda que uma etapa prévia de pré-polimerização não refletiu em aumento expressivo no  $K_d$  e  $IF$  para MIP-22 e MIP-23 em relação ao MIP-14. O ganho sutil em seletividade encontrado para 4 horas de pré-polimerização (MIP-22) foi suficiente para que se definissem 4 horas de pré-polimerização como condição experimental ótima, uma vez que tempos maiores não resultaram em ganho adicional e aumentariam desnecessariamente o tempo de análise, que já é muito longo graças às 24 horas necessárias para que a síntese se processe. Com as condições experimentais otimizadas, descritas na **Tabela 46**, um protocolo de síntese foi definido para MIP para lumefantrina, a partir do qual foram sintetizados MIP e

NIP (MIP-24 e NIP-24) sendo posteriormente avaliados em ensaios de sorção, para determinação dos respectivos  $K_d$  e  $IF$ .

**Tabela 46 – Protocolo de síntese de MIP para lumefantrina padronizado após otimização**

Parâmetro	Condição
Monômero funcional	2-VP
<i>Crosslinker</i>	EGDMA
Solvente porogênio	TOL
Volume de solvente porogênio	25 mL
Iniciador	AIBN
Método de iniciação	Aquecimento a 65 °C
Tempo de síntese	24 horas
Proporção molar F:MF:CL	01:06:30
Tempo de pré-polimerização	4 horas
Temperatura de pré-polimerização	4 °C

Os resultados encontrados foram coeficientes de distribuição iguais a 977,83  $\mu\text{g/g}$  para o MIP-24 e 400,75  $\mu\text{g/g}$  para o NIP-24, com  $IF$  de 2,44, que foram os melhores resultados, de modo que o MIP-24 foi o polímero molecularmente impresso que demonstrou maior eficiência, afinidade e seletividade para lumefantrina dentre os 24 polímeros sintetizados durante a otimização. O planejamento experimental BBD demonstrou adequada habilidade na otimização de condições experimentais para síntese de polímero molecularmente impresso para lumefantrina.

#### 5.4.2 Caracterização quanto à morfologia

O tamanho de partícula e distribuição de tamanho de partícula foram determinados para o MIP-24 e NIP-24, utilizando-se a técnica de difração por raio laser. Os resultados de tamanho de partícula foram expressos como média, mediana (D50) e percentil 90% (D90), em triplicata. Como medida de dispersão do tamanho das partículas encontradas foi utilizado o *SPAN*, que pode ser considerado equivalente ao índice de polidispersão. Os resultados encontrados para MIP-24 e NIP-24 estão presentes na **Tabela 47**.

**Tabela 47 – Tamanho de partícula e distribuição de tamanho de partícula para MIP-24 e NIP-24 obtidos por difração de raio laser**

Replicata	MIP-24				NIP-24			
	Média (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)	SPAN	Média (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)	SPAN
1	38,64	33,23	78,78	1,37	26,92	23,17	61,74	1,66
2	38,90	33,28	80,55	1,42	26,89	22,01	59,73	1,71
3	38,23	33,04	78,67	1,38	27,44	22,43	61,19	1,73
<b>MÉDIA</b>	38,59	33,18	79,33	1,39	27,08	22,54	60,89	1,70
<b>CV (%)</b>	0,88	0,38	1,33	1,88	1,14	2,61	1,71	1,95

D50: mediana (percentil 50%); D90: percentil 90%; SPAN: índice de dispersão.

Os resultados encontrados demonstraram que as partículas obtidas para o MIP-24 apresentam tamanhos cerca de 10 µm maiores que as partículas obtidas para o NIP-24. Esses resultados são esperados, porque a presença da lumefantrina na mistura reacional durante a etapa de síntese dos polímeros e a formação de uma cavidade seletiva contribui para que se produzam partículas maiores para o polímero impresso. Os coeficientes de variação (%) obtidos para determinação do diâmetro médio, D50 e D90 foram inferiores a 2,0% para MIP-24 e NIP-24, indicando excelente reprodutibilidade das análises e, portanto, confiabilidade dos resultados encontrados. Os tamanhos de partícula encontrados para MIP e NIP foram ligeiramente maiores que os normalmente encontrados quando se emprega polimerização por precipitação, que variam de nanômetros a poucos micrômetros. Entretanto, as partículas obtidas apresentaram-se menores que partículas obtidas por precipitação “em *bulk*”, que geralmente superam 100 µm. Esse perfil intermediário pode ter sido causado por uma eventual aglomeração (nucleação) de partículas menores entre si, principalmente por uma limitação espacial, uma vez que as sínteses foram desenvolvidas em tubos de ensaios, por serem mais facilmente adaptáveis, em lugar dos balões de fundo redondo geralmente usados. Dessa forma, um núcleo se agregou a outros núcleos, formando microesferas que se aglomeraram em *clusters* ainda maiores, formando o corpo do MIP obtido. Os tamanhos de partícula obtidos, contudo, são adequados para emprego em SPE, em que normalmente se utilizam partículas entre 30 e 50 µm.

Inúmeros outros parâmetros podem influenciar na morfologia dos polímeros. Um parâmetro importante é o solvente, mas esse fator foi descartado porque o tolueno se trata do solvente porogênio mais amplamente empregado,

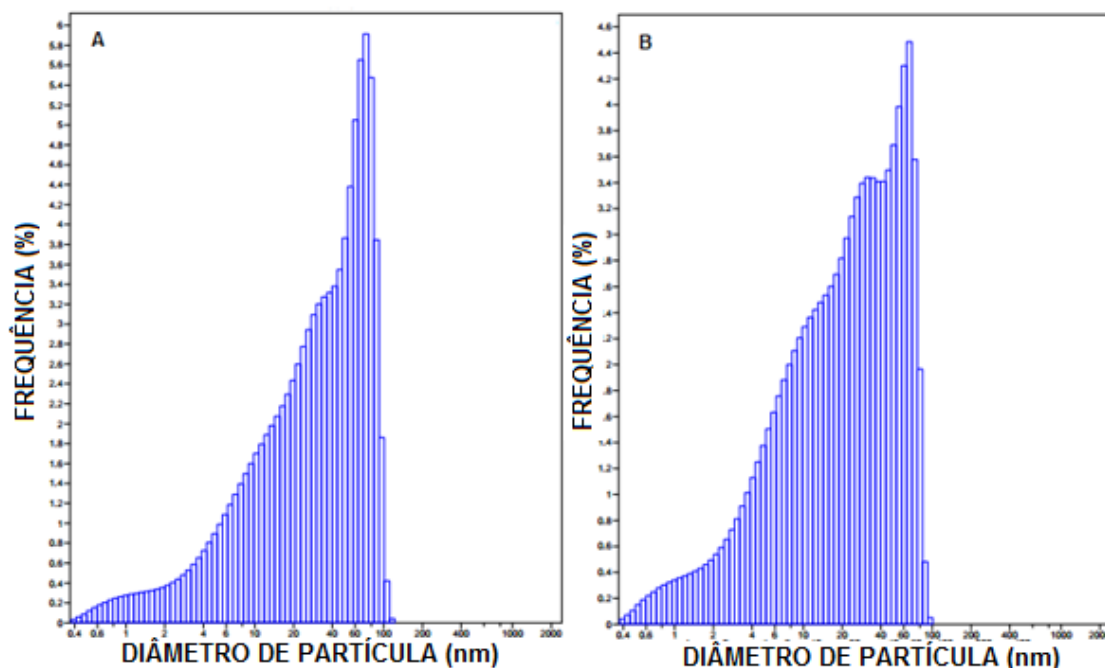


frequentemente fornecendo resultados apropriados. O volume de solvente porogênio, no entanto, pode ter sido um problema. Embora se descreva na literatura que volumes aproximadamente 5-10 vezes maiores que os utilizados para polimerização “em *bulk*” sejam suficientes para que a polimerização por precipitação ocorra, comumente se utiliza entre 50 e 60 mL de porogênio. Optou-se por se utilizar 25 mL, visando diminuir o consumo de solvente orgânico e, para que isso não prejudicasse a morfologia, decidiu-se diminuir as quantidades de lumefantrina, monômero funcional e *crosslinker*. Enquanto o volume de solvente foi reduzido pela metade, as quantidades relativas desses reagentes foram reduzidas a um quarto das quantidades molares normalmente empregadas, de modo a se trabalhar com certa faixa de segurança. Não se descarta, porém, que a diminuição do volume, apesar dessa compensação, tenha sido um parâmetro crítico que propiciou a produção de partículas maiores, ao favorecer a nucleação de partículas de menores diâmetros entre si.

O parâmetro agitação da mistura reacional durante a síntese pode exercer alguma influência na morfologia das partículas. Lee *et al.* (2006) e Carvalho (2012) demonstraram que a velocidade de agitação exerce um papel importante na forma e diâmetro de partículas, mostrando que, em velocidades de agitação mais baixas, as partículas obtidas eram mais irregulares e de diâmetros médios maiores, enquanto quando submetidas a velocidades de agitação maiores, partículas mais uniformes, esféricas e menores são sintetizadas. Os experimentos foram desenvolvidos a velocidades de agitação mais baixas, por limitações do equipamento utilizado, pois agitação e controle de temperatura ocorreram em mesmo equipamento. O grau de reticulação também não pode ser ignorado. Os MIPs se caracterizam por serem altamente reticulados, o que é importante para a formação de uma estrutura tridimensional rígida. Desse modo, grandes quantidades de *crosslinker*, adicionado em quantidade excessiva, são incorporadas à rede polimérica, formando partículas de maiores diâmetros médios. Finalmente, em reações de polimerização, as cadeias poliméricas formadas crescem em velocidades e tamanho diferentes entre si; portanto, a cinética dessas reações pode ser crucial na definição dos diâmetros médios das partículas obtidas. Por isso, observou-se certo grau de dispersão entre os diâmetros médios das partículas

do MIP-24 e do NIP-24, ilustrado nos histogramas de distribuição de tamanho de partículas (**Figura 28**).

**Figura 28 – Histogramas de distribuição de tamanhos de partículas para MIP-24 e NIP-24, obtidos por difração de raio laser**



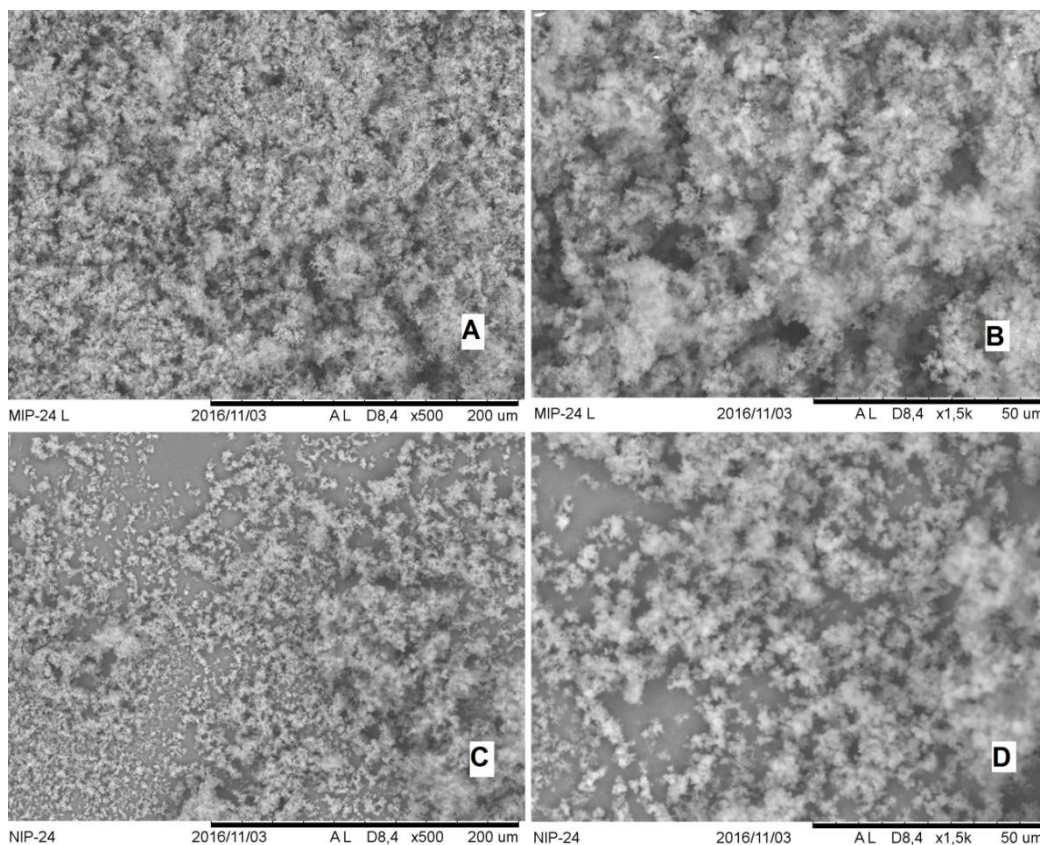
A: Distribuição de tamanhos de partículas para o MIP-24; B: Distribuição de tamanhos de partículas para o NIP-24.

Analisando-se os histogramas, percebe-se que há menor dispersão em relação à distribuição de tamanhos de partícula para o MIP-24 que para o NIP-24. Essa conclusão é corroborada pelos valores de *SPAN* presentes na **Tabela 47**: quanto mais próximo de 1 for o valor de *SPAN*, menor é a dispersão entre os diâmetros médios obtidos para as partículas. O *SPAN* calculado para o MIP-24, igual a 1,39, foi mais próximo à unidade que o *SPAN* para o NIP-24, igual a 1,70. Esse perfil de distribuição de partículas mais estreito é desejável, especialmente para o MIP, que será empregados nos cartuchos, para que se garanta reprodutibilidade entre cartuchos e resultados para as extrações.

MIP-24 e NIP-24 foram caracterizados, ainda quanto à sua morfologia, por MEV, sem qualquer tratamento prévio das amostras, que fornece uma imagem de alta ampliação e resolução de uma amostra, para entendimento de sua morfologia superficial. O princípio de funcionamento se baseia na emissão de

um feixe de elétrons por um capilar de tungstênio, mediante aplicação de uma diferença de potencial. As micrografias obtidas, aumentadas de 500 vezes e de 1500 vezes, estão presentes na **Figura 29**.

**Figura 29 – Micrografias obtidas para MIP-24 (acima) e NIP-24 (abaixo), nos aumentos de 500x (à esquerda) e 1500x (à direita)**



A: micrografia para MIP-24 (aumento de 500x); B: micrografia para MIP-24 (aumento de 1500x); C: micrografia para NIP-24 (aumento de 500x); D: micrografia para NIP-24 (aumento de 1500x)

As micrografias demonstraram que as partículas obtidas para o MIP-24 foram sutilmente maiores que para o NIP-24, confirmando o que foi discutido em relação aos diâmetros médios. Não há um consenso na literatura quanto à influência da presença do molde na morfologia e tamanho das partículas. Intuitivamente, espera-se que o MIP apresente partículas de diâmetros maiores que o NIP, mas alguns trabalhos não encontraram diferença considerável, enquanto outros encontraram partículas maiores para o polímero não impresso (GRANADO, 2011). Em relação à morfologia superficial dos polímeros obtidos, as micrografias para MIP-24 e NIP-24 aparentemente não exibiram diferença expressiva entre si. Ambos, entretanto, apresentam-se granulados,

visivelmente porosos e regulares, características resultantes do emprego de polimerização por precipitação. Todavia, os aumentos de 500x e 1500x não forneceram resolução suficiente, que propiciasse análise mais pormenorizada das morfologias superficiais desses materiais, porque o equipamento utilizado possui limitações, não fornecendo aumentos maiores que os demonstrados. Como os polímeros são maus condutores elétricos, seria necessário um tratamento prévio das amostras, por metalização, normalmente por ouro, para melhorar suas propriedades condutoras e, por consequência, se extrair mais informações de suas micrografias.

A diferença de porosidade e área superficial entre MIP-24 e NIP-24 foi avaliada por porosimetria de sorção de nitrogênio. Os resultados para área superficial, volume dos poros e diâmetro médio dos poros se apresentam na **Tabela 48**.

**Tabela 48 – Determinação de área superficial, volume e diâmetro de poro para MIP-24 e NIP-24, obtidas por sorção de nitrogênio líquido**

Amostra	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Volume total de poro (cm <sup>3</sup> /g)	Diâmetro do poro (Å)
MIP-24	139,6800	0,1253	8,9690
NIP-24	56,9030	0,0481	8,4531

Foram encontrados diâmetros de poro muito próximos para ambos, mas sutilmente maiores para o MIP-24. Ambos, entretanto, apresentam diâmetros menores que 20 Å, sendo classificados como microporos, característica primordial para um MIP, pois se associa a sítios específicos mais acessíveis ao analito – o que é fundamental para o processo de sorção, contribuindo para um perfil cinético de sorção mais favorável, propiciando maior reutilização dos polímeros e prevenindo efeito de memória nas etapas de pré-concentração e eluição (AMGARTEN, 2006; DA MATA, 2014).

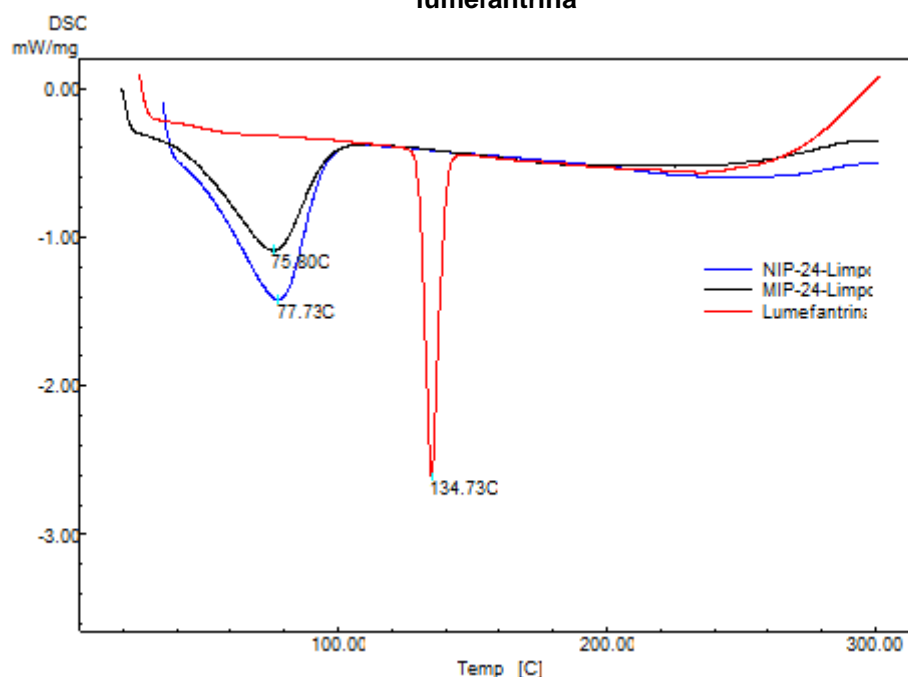
Como se esperava, percebeu-se grande diferença de porosidade entre os materiais, uma vez que o MIP-24 apresentou área superficial e volume de poro superiores aos encontrados para o NIP-24, o que é um forte indicativo de que ocorreu impressão molecular da lumefantrina. Confirma-se, portanto, que a presença de lumefantrina no meio reacional influencia no crescimento de partícula durante a reação de polimerização, conforme discutido por Yoshimatsu *et al.* (2007) e Fernandes (2012). Finalmente, sabe-se que maiores

áreas superficiais e volumes de poro certamente se relacionam a uma maior capacidade de sorção, o que era esperado para o MIP. Portanto, os ensaios de sorção por nitrogênio forneceram indícios de que houve formação de sítios seletivos no MIP, que apresenta, portanto maior afinidade e capacidade de sorver a lumefantrina que o NIP.

#### **5.4.3 Caracterização quanto à estabilidade térmica**

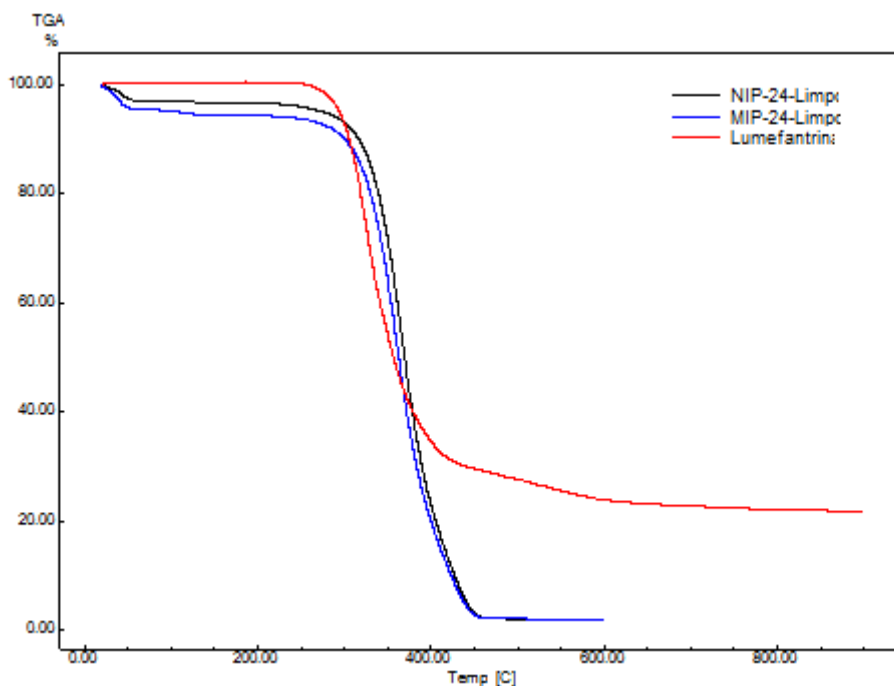
MIP-24, NIP-24 e lumefantrina foram caracterizados termicamente por DSC e TG, para investigação do comportamento dos polímeros e fármaco frente a aumentos programados de temperatura. Desejava-se identificar temperaturas relacionadas a eventos térmicos importantes, como temperaturas de fusão, transição vítrea e decomposição. Utilizou-se taxa de aquecimento lenta (baixa) para se conseguir resolução, melhor separação entre eventos térmicos e picos maiores e menos largos. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste para que se criasse uma atmosfera inerte que não interferisse nas reações ou transições e se eliminasse substâncias voláteis liberados durante a análise. O nitrogênio, por sua baixa condutividade térmica, foi importante ainda para aumentar a sensibilidade das análises. Notou-se que MIP-24 e NIP-24 mostraram comportamento de variação de massa em relação à temperatura muito similar, com curvas de DSC (**Figura 30**) e TG (**Figura 31**) que praticamente se sobrepõem, confirmando similaridade nas composições dos polímeros.

Figura 30 – Termogramas de calorimetria exploratória diferencial para MIP-24, NIP-24 e lumefantrina



O ensaio de DSC apontou para um único evento endotérmico nos termogramas, observado a 75,8 °C para MIP-24 e 77,7 °C para NIP-24. O evento foi inicialmente relacionado à volatilização de monômeros e *crosslinkers* não reagidos ou solventes residuais utilizados nas etapas de síntese e extração por Soxhlet. Contudo, SOLEIMANI *et al.* (2015) propuseram um MIP empregando-se 2-VP e EGDMA, de composição muito similar a do MIP-24, para extração de íons mercúrio (Hg) a partir de amostras de água e peixe e identificaram um pico endotérmico em suas curvas de DSC, a 93,9 °C, o qual associaram à temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Portanto, o evento endotérmico aqui encontrado pode também se referir à  $T_g$  dos polímeros. O DSC para lumefantrina apresenta somente um evento endotérmico, a 134,73 °C, que corresponde à temperatura de fusão da lumefantrina, sendo próxima às temperaturas de fusão descritas na literatura e compêndios oficiais (128 e 132 °C). O formato do pico, mais estreito e proeminente que os picos encontrados no DSC para os polímeros é característico de substâncias que possuem algum grau de cristalinidade, já que os polímeros são amorfos, resultando em picos menos pronunciados e mais alargados.

Figura 31 – Termogramas de análise termogravimétrica para MIP-24, NIP-24 e lumefantrina



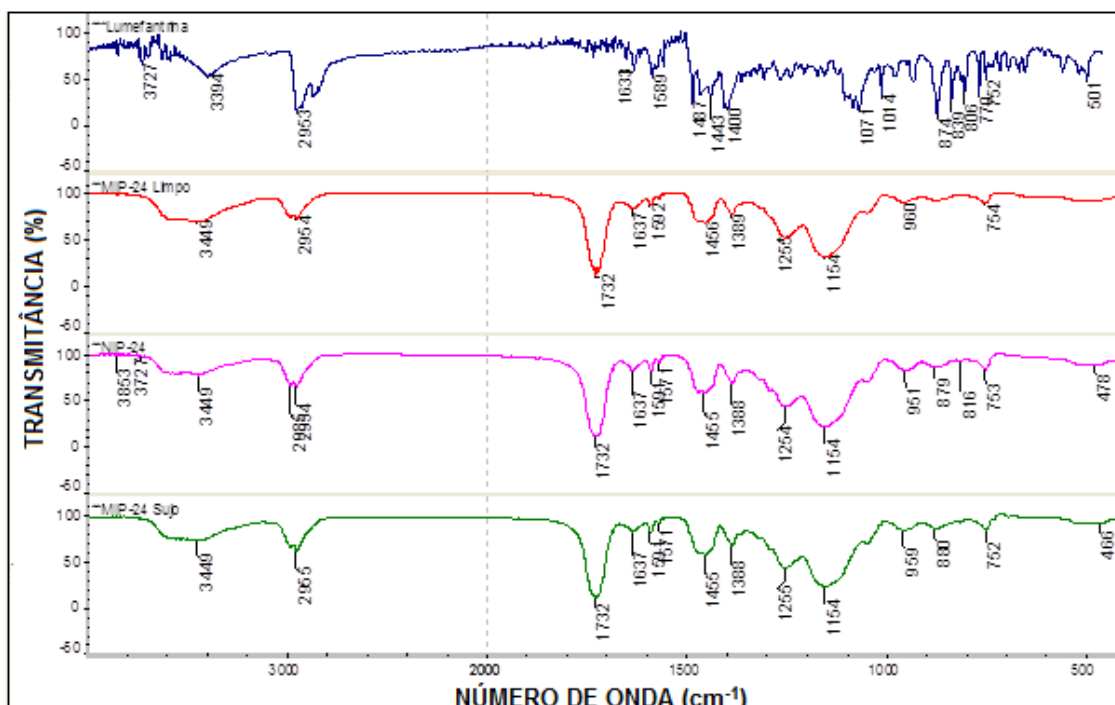
Os termogramas obtidos para o ensaio de TG permitiram que fosse avaliada a estabilidade térmica dos polímeros e molécula molde (*template*). Os polímeros podem ser considerados termoestáveis até temperaturas próximas a 330 °C, em que o seu processo de decomposição se inicia, para ambos, apresentando ponto médio entre 365 e 370 °C e perda de massa superior a 95%. A decomposição prossegue até aproximadamente 410 °C, temperatura a partir da qual 100% das massas de MIP e NIP foram decompostas e volatilizadas. Percebeu-se ainda um evento de perda de massa menos significativo, de 3,0% para o NIP e 4,5% para o MIP, com *onset* por volta de 30-35 °C e ponto médio a 35-40 °C, encerrando-se entre 48-52 °C. Esse evento pode estar relacionado à evaporação de monômeros e *crosslinker* que não reagiram ou solvente residual. Em relação ao termograma para lumefantrina, somente um evento térmico foi observado, com *onset* próximo a 300 °C, *mid point* a 340 °C e *endset* a 375 °C, o que demonstra elevada estabilidade térmica desse fármaco, mesmo quando submetido a condições mais drásticas. Houve perda de massa de apenas 78,3%, que se manteve constante mesmo após a elevação da temperatura até 900 °C. O resíduo presente, correspondente a 21,7% da

massa inicial, se deve à formação de produtos de decomposição não voláteis, devido à carbonização ou resíduos inorgânicos de síntese.

#### 5.4.4 Caracterização por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta com transformada de Fourier (FTIR)

Os polímeros e o fármaco foram caracterizados quanto à presença de grupos funcionais por FTIR, na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Optou-se por caracterizar o MIP-24 antes (com lumefantrina) e após (sem lumefantrina) a extração por Soxhlet, para identificar possíveis diferenças nos espectros de absorção do MIP na presença e ausência de lumefantrina ligada, de modo a se obter informações que ajudariam a entender melhor como as interações entre lumefantrina e 2-VP se estabelecem no polímero. Os espectros são apresentados na **Figura 32**.

**Figura 32 – Espectros de absorção no FTIR para MIP-24 (antes e após extração da lumefantrina), NIP-24 e lumefantrina**





Observou-se similaridade entre os espectros para MIP-24, antes e após a remoção do fármaco, com coincidência das bandas de absorção e intensidades relativas. Para o MIP-24, com a presença de lumefantrina, não foram observados no espectro bandas de absorção diferenciais encontradas no espectro do fármaco, o que pode ter ocorrido pois a proporção de monômero e *crosslinker* é infinitamente superior à de lumefantrina e porque as principais bandas características para lumefantrina coincidem com as bandas para o MIP, que mascarariam aquelas referentes ao fármaco. O espectro para lumefantrina obtido por FTIR foi condizente com os espectros no IV encontrados anteriormente para lumefantrina SQR e IFA (**Figura 25**). As principais bandas de absorção encontradas e suas respectivas atribuições estão apresentadas na **Tabela 49**.

**Tabela 49 – Atribuições de bandas de absorção características para lumefantrina no FTIR**

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3394	Deformação axial O-H de álcool.
2954	Deformação axial C-H.
1633	Deformação axial C=C de alqueno.
1589	Deformação axial C=C de grupos aromáticos.
1487, 1443, 1400	Deformação angular C-H de alcano.
1071	Deformação axial C-O de álcool.
1014	Deformação axial C-N.
839	Deformação angular C-H de grupos aromáticos;
752, 759	Deformação axial C-Cl.

Os espectros para MIP-24, com e sem lumefantrina, e NIP-24 foram praticamente idênticos, com enorme coincidência das bandas de absorção características e intensidades relativas. Confirma-se, mais uma vez, que as composições de MIP e NIP são muito similares, diferenciando-se apenas em termos de morfologia superficial e de poro. Bandas características principais e respectivas atribuições nos espectros para MIP e NIP são apresentadas na **Tabela 50**.

**Tabela 50 – Atribuições de bandas de absorção características para MIP e NIP no FTIR**

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3449	Deformação de O-H de ácido carboxílico.
2954-2955	Deformação axial de C-H de alifático
1732	Estiramento C=O de carbonila de ácido carboxílico.
1637	Estiramento C=N.
1254-1255	Deformação axial de C-O de ácido carboxílico.
1154	Deformação axial C-O de éster.
951-960	Deformação angular de O-H de ácido carboxílico.

A ausência de bandas entre 1650 e 1640  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros dos polímeros, referente ao estiramento C=C de grupos vinila, prova que esses grupos estão ausentes nas redes poliméricas, confirmando a ocorrência da reação de polimerização. A não observação de desvios nas bandas encontradas em 3449  $\text{cm}^{-1}$  e 1732  $\text{cm}^{-1}$ , referentes ao grupo COOH do *crosslinker*, e em 1637  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento C=N do monômero funcional, nos espectros de MIP em relação ao do NIP fornecem evidências de que a lumefantrina não interage com a rede polimérica por intermédio de ligações de hidrogênio.

## 5.4.5 Estudos de sorção

### 5.4.5.1 Estudo de sorção estática

MIP-24 e NIP-24 foram avaliados por estudo de sorção estática, frente a concentrações de lumefantrina entre 12,0 e 36,0  $\mu\text{g/mL}$ . Os  $K_d$  e quantidades percentuais sorvidas foram determinados, conforme **Tabela 51**. Os resultados encontrados foram plotados em gráficos de dispersão, para os  $K_d$  (**Figura 33**) e para quantidades percentuais (**Figura 34**).

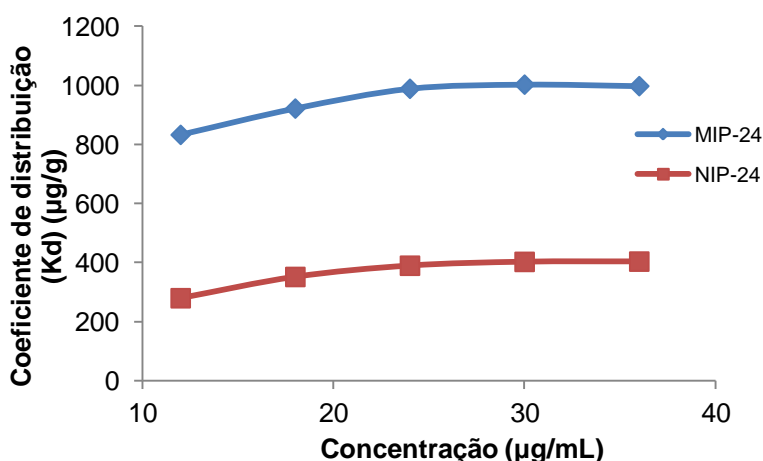
**Tabela 51 – Coeficientes de distribuição e quantidades sorvidas para MIP-24 e NIP-24, em estudo de sorção estática**

Concentração inicial ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )		Coeficiente de distribuição ( $\mu\text{g/g}$ )		Quantidade sorvida (%)	
	MIP-24	NIP-24	MIP-24	NIP-24	MIP-24	NIP-24
12,0	3,67	9,20	833,12	280,45	69,42	23,33
18,0	8,78	14,48	922,04	352,13	51,22	19,56
24,0	14,11	20,10	988,87	390,07	41,21	16,25
30,0	19,97	25,97	1003,10	402,79	33,43	13,43
36,0	26,02	31,96	997,90	404,01	27,72	11,22

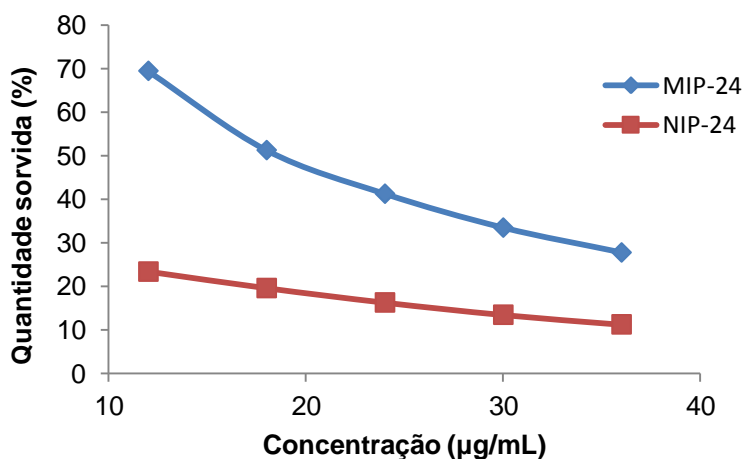
Notou-se que MIP-24 e NIP-24 apresentam um perfil similar: os coeficientes de distribuição inicialmente aumentam com o aumento da concentração de lumefantrina adicionada, atingindo um platô depois de 24,0  $\mu\text{g/mL}$ , para ambos, indicando saturação na capacidade de sorção desses polímeros e que aumentos progressivos na concentração adicionada não resultaram em aumentos no  $K_d$ , porque já se atingiu um equilíbrio. Os valores de  $K_d$  para MIP-24 foram superiores àqueles para NIP-24, coerentes com resultados anteriormente discutidos (de 977,83  $\mu\text{g/g}$  e 400,75  $\mu\text{g/g}$  para MIP-24 e NIP-24, respectivamente). Em consideração aos percentuais de quantidade de

lumefantrina sorvida, percebeu-se que há uma diminuição desses valores com o aumento na concentração de lumefantrina adicionada. Esse resultado é previsível, uma vez que as quantidades de fármaco adicionadas são muito maiores que a capacidade de sorção dos polímeros, de maneira que na medida em que essas quantidades são aumentadas, mais lumefantrina fica não sorvida, devido à saturação dos sítios de ligação. Com isso, por mais que a quantidade sorvida absoluta seja muito próxima, independentemente da concentração, a quantidade percentual diminui. Novamente, o MIP-24 apresentou maiores percentuais de quantidade sorvida de lumefantrina que o NIP-24, independentemente do nível de concentração avaliado.

**Figura 33 – Gráfico de dispersão dos coeficientes de distribuição para MIP-24 e NIP-24 por concentração de lumefantrina adicionada, em estudo de sorção estática**



**Figura 34 – Gráfico de dispersão das quantidades percentuais sorvidas para MIP-24 e NIP-24 por concentração de lumefantrina adicionada, em estudo de sorção estática**



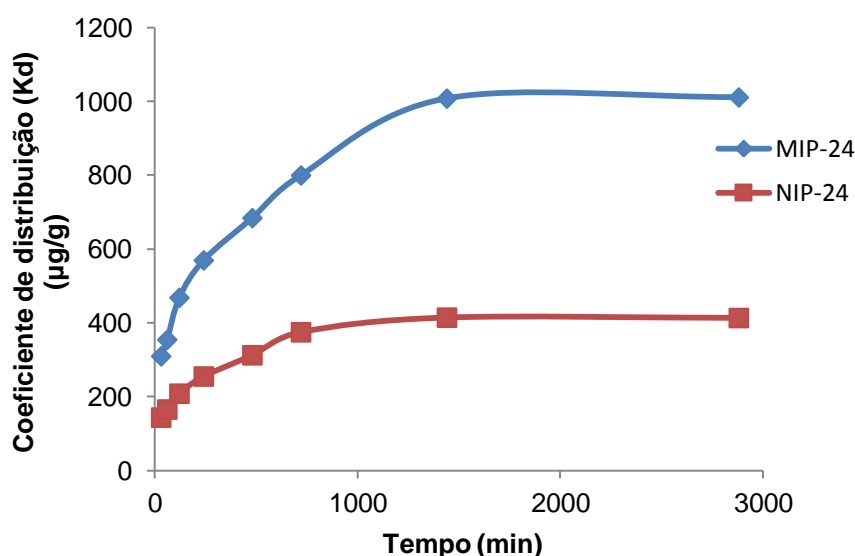
### 5.4.5.2 Estudo de sorção dinâmica

Um estudo de sorção dinâmica foi conduzido para MIP-24 e NIP-24 para que se avaliasse a cinética de religação (sorção) da lumefantrina aos polímeros, por 48 horas, em condição *sink*. Os resultados para  $K_d$  e quantidades sorvidas, em  $\mu\text{g}$  e percentual, por tempo, estão presentes na **Tabela 52**. Os resultados foram plotados em relação aos tempos de coleta, para  $K_d$  (**Figura 35**), quantidade sorvida, em  $\mu\text{g}$  (**Figura 36**) e percentual (**Figura 37**).

**Tabela 52 – Coeficientes de distribuição e quantidades sorvidas de lumefantrina em estudo de sorção dinâmica, por período de 48 horas**

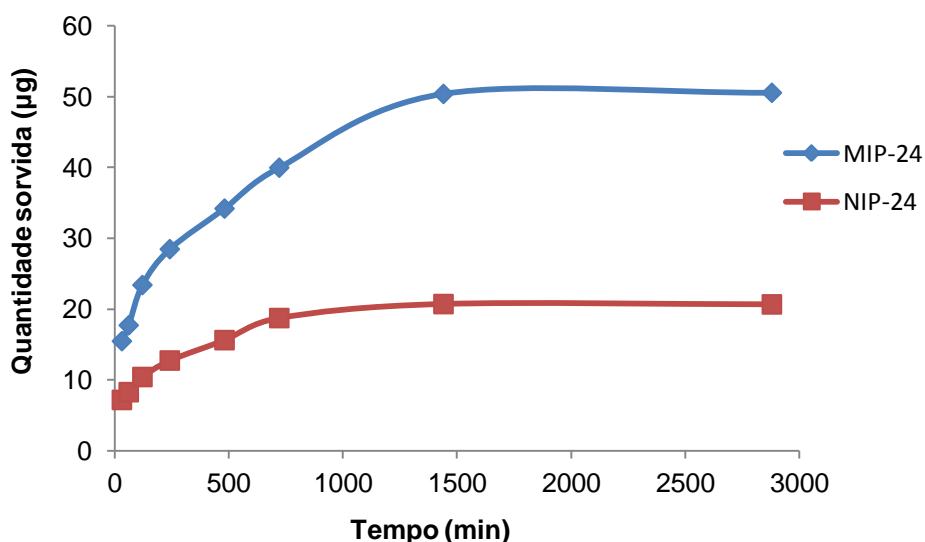
Tempo de coleta (min)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )		Coeficiente de distribuição ( $\mu\text{g/g}$ )		Quantidade sorvida ( $\mu\text{g}$ )		Quantidade sorvida (%)	
	MIP-24	NIP-24	MIP-24	NIP-24	MIP-24	NIP-24	MIP-24	NIP-24
30	20,91	22,57	309,22	143,33	15,46	7,17	12,88	5,97
60	20,46	22,35	354,02	165,20	17,70	8,26	14,75	6,88
120	19,32	21,92	467,70	208,03	23,39	10,40	19,49	8,67
240	18,31	21,45	568,93	254,55	28,45	12,73	23,71	10,61
480	17,17	20,88	683,48	312,12	34,17	15,61	28,48	13,01
720	16,01	20,26	798,98	374,45	39,95	18,72	33,29	15,60
1440	13,93	19,86	1007,12	414,01	50,36	20,70	41,96	17,25
2880	13,90	19,87	1010,30	412,99	50,52	20,65	42,10	17,21

**Figura 35 – Gráfico de dispersão dos coeficientes de distribuição para lumefantrina em função do tempo, para MIP-24 e NIP-24**

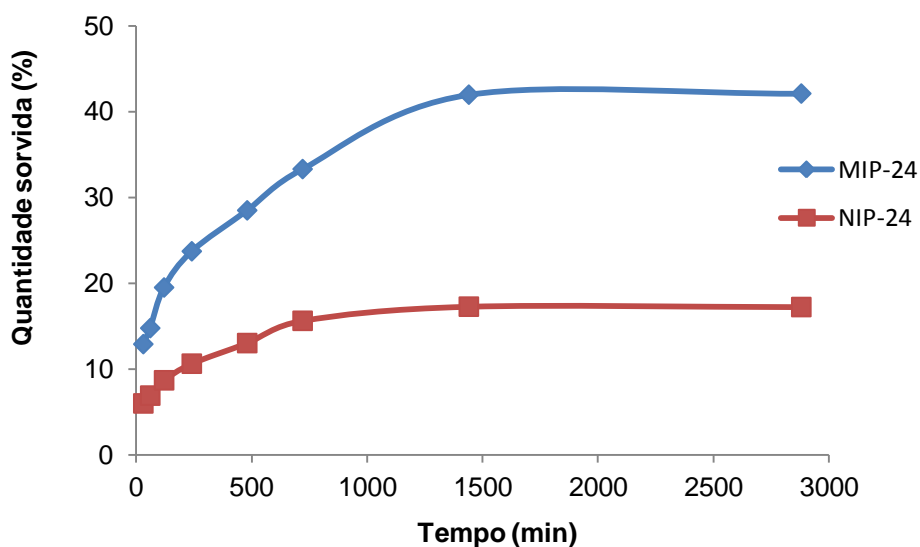


O gráfico demonstrou uma grande inclinação inicial, para MIP-24 e NIP-24, com quantidade considerável de lumefantrina sorvida nos 30 primeiros minutos, sendo maior (mais que o dobro para o MIP-24). Percebeu-se que os  $K_d$  aumentam proporcionalmente em função do tempo, para ambos, mas para o MIP-24, o coeficiente de distribuição aumenta até 24 horas, depois do qual se atinge um platô, indicando que houve saturação dos sítios de sorção, tendo sido estabelecido um equilíbrio, enquanto para o NIP-24, embora o perfil cinético seja parecido, o equilíbrio é aparentemente alcançado mais rapidamente, pouco antes de 24 horas. Determinar o momento exato no qual se atinge o platô para o NIP-24 somente seria possível se fossem realizadas coletas em intervalos entre 12 e 24 horas depois do início do experimento. Observou-se ainda que os  $K_d$  para MIP-24 são superiores aos para NIP-24, independentemente do tempo de coleta, mas que a diferença nos resultados tende a aumentar em função do tempo até que os equilíbrios de sorção tenham sido atingidos para ambos – a partir desse momento, a diferença se mantém aproximadamente constante. Outra vez, os coeficientes de distribuição encontrados para MIP-24 e NIP-24, após a saturação, foram condizentes com os resultados encontrados na primeira avaliação de suas afinidades e seletividades frente à lumefantrina.

**Figura 36 – Gráfico de dispersão das quantidades sorvidas de lumefantrina, em massa, em função do tempo, para MIP-24 e NIP-24**



**Figura 37 – Gráfico de dispersão das quantidades de lumefantrina em percentuais, em função do tempo, para MIP-24 e NIP-24**



Os perfis cinéticos em relação às quantidades sorvidas se descrevem como os perfis discutidos anteriormente para o coeficiente de distribuição. Os valores máximos obtidos foram aproximadamente 50  $\mu\text{g}$  e 42% para o MIP-24 e 21  $\mu\text{g}$  e 17% para o NIP-24. O estudo de sorção dinâmica demonstrou que o tempo determinado para os ensaios de sorção estática de 48, foi mais do que suficiente para que se mensurasse uma concentração de lumefantrina em equilíbrio, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos anteriormente.

#### 5.4.6 Estudos de seletividade

Os  $K_d$  e  $IF$  para MIP-24 e NIP-24 frente à lumefantrina e à halofantrina foram determinados, para se calcular o fator de separação ( $\alpha$ ) e o coeficiente de seletividade ( $S$ ). Os  $K_d$  foram, respectivamente, 993,63  $\mu\text{g/g}$  e 404,78  $\mu\text{g/g}$  para MIP-24 e NIP-24, em relação à lumefantrina, e 670,33  $\mu\text{g/g}$  e 392,40  $\mu\text{g/g}$ , para MIP-24 e NIP-24, em relação à halofantrina. Desse modo, os respectivos  $IF$  encontrados foram 2,46 para lumefantrina e 1,71 para halofantrina. Os coeficientes de distribuição para o NIP-24 para lumefantrina e halofantrina são muito similares, confirmando a inespecificidade das interações entre NIP e

fármaco. Como lumefantrina e halofantrina são quimicamente muito parecidas, esperava-se que ambas interagissem de forma semelhante com o NIP.

Foram encontrados  $\alpha$  e  $S$  de 1,48 e 1,44, respectivamente, para MIP-24. Entende-se, portanto, que o MIP-24 apresenta afinidade aproximadamente 50% maior para a lumefantrina. Como ambos superaram a unidade concluiu-se que houve impressão molecular e formação de sítios de reconhecimento molecular altamente seletivos, uma vez que o polímero apresenta afinidades significativamente diferentes para moléculas muito parecidas entre si. Portanto, o MIP-24 sintetizado é capaz de discriminar e interagir preferencialmente com lumefantrina mesmo na presença de interferentes estruturalmente relacionados, confirmando sua seletividade.

#### 5.4.7 Estudos de reprodutibilidade entre diferentes lotes (interlotes)

Uma das principais vantagens dos polímeros impressos em relação aos imunossorventes reside em maior reprodutibilidade de diferentes lotes. Decidiu-se, portanto, confirmar a reprodutibilidade do protocolo de síntese, sintetizando-se 3 diferentes lotes. Os resultados encontrados para os 3 lotes de MIP-24 e NIP-24, incluindo desvio padrão relativo (DPR), são apresentados na **Tabela 53**. Os valores de  $K_d$  variaram de 977,83  $\mu\text{g/g}$  a 1015,04  $\mu\text{g/g}$  para o MIP-24 e de 399,45  $\mu\text{g/g}$  a 408,09  $\mu\text{g/g}$  para o NIP-24, com DPR inferiores a 2,0% para ambos, enquanto os valores para  $IF$  variaram de 2,42 a 2,53, com DPR de 1,85%. Os resultados comprovam a reprodutibilidade do protocolo de síntese.

**Tabela 53 – Coeficientes de distribuição e fatores de impressão para avaliação da reprodutibilidade entre diferentes lotes de MIP-24 e NIP-24**

Lote	Replicata	Coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) ( $\mu\text{g/mL}$ )		Fator de impressão (IF)
		MIP	NIP	
Lote 1	1	977,83	400,75	2,44
	2	993,63	404,78	2,45
Lote 2	1	1004,42	399,45	2,51
	2	998,90	401,77	2,49
Lote 3	1	985,58	408,09	2,42
	2	1015,04	400,65	2,53
<b>MÉDIA</b>		995,90	402,58	2,47
<b>DPR (%)</b>		1,34	0,81	1,84

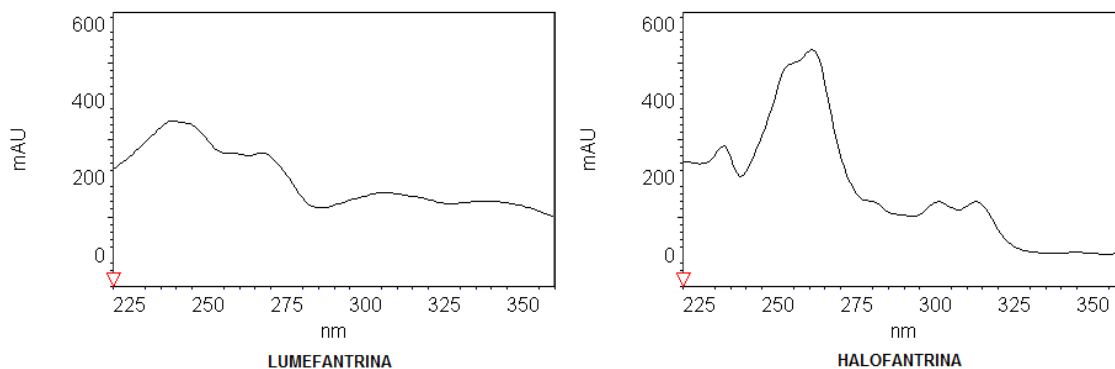
## 5.5 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por CLAE-UV e MISPE com etapa de preparo de amostras para determinação de lumefantrina em plasma humano

### 5.5.1 Desenvolvimento de método bioanalítico por CLAE-UV e MISPE com etapa de preparo de amostras para determinação de lumefantrina em plasma humano

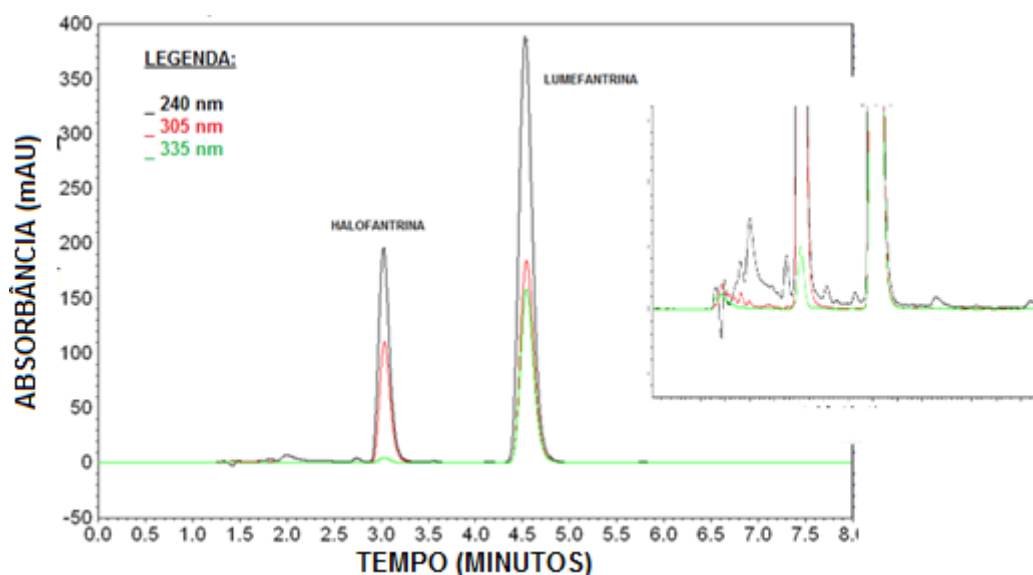
Inicialmente, o comprimento de onda ( $\lambda$ ) ideal foi selecionado, entre os 3  $\lambda$  analisados (240, 305 e 335 nm). Foram encontradas maiores absorvâncias para lumefantrina e halofantrina em 240 nm. Nesse comprimento de onda foram obtidos picos mais altos e de maiores áreas, conferindo maior detectabilidade ao método, sendo coerente com os espectros de absorção no UV de analito e PI em fase móvel (**Figura 38**). Entretanto, na região mais próxima de 200 nm, um número maior de moléculas absorve significativamente. Um elevado número de interferentes foi detectado nos cromatogramas desenvolvidos em 240 nm, confirmando sua baixa seletividade. Em contrapartida, os cromatogramas obtidos em 335 nm apresentaram-se sem a presença de interferentes,. Esse  $\lambda$  mostrou detectabilidade adequada para lumefantrina, o que era esperado, pois muitos autores utilizaram 335 nm em métodos para quantificação desse fármaco em amostras biológicas. Entretanto, o sinal para o pico de halofantrina foi muito baixo, inadequado para quantificação do PI, uma vez que a absorvidade molar da halofantrina em 335 é praticamente nula, conforme apresentado no espectro da **Figura 38**. Optou-se, portanto, pelo comprimento de onda de 305 nm, que apresentou detectabilidade intermediária e adequada para ambos os fármacos, mostrando-se suficientemente seletivo, pois nenhum interferente pôde ser identificado nos cromatogramas desenvolvidos em 305 nm (**Figura 39**). Um *zoom* no início dos cromatogramas foi efetuado para permitir melhor visualização dos interferentes.



**Figura 38 – Espectros de absorção no UV para lumefantrina e halofantrina obtidas por software ChromQuest**



**Figura 39 – Cromatogramas para lumefantrina e halofantrina, obtidos a 240 nm, 305 nm e 335 nm, para determinação de comprimento de onda ideal, na otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**



Posteriormente, foi proposto planejamento experimental Doehlert de 5 variáveis para definição das condições cromatográficas para os parâmetros analíticos temperatura do forno, composição da fase orgânica, proporção da fase orgânica na fase móvel, vazão de fase móvel e concentração de ácido trifluoroacético na fase aquosa. É importante ressaltar que o pH aparente da fase móvel, constituída com a maior concentração de TFA e maior proporção relativa na mistura, foi medido, encontrando-se valor inferior ao limite de 1,5 suportado pela coluna, conforme orientação do fornecedor. Decidiu-se pela faixa de temperatura adotada por pois temperaturas mais baixas produzem

fases móveis com viscosidade muito elevada, podendo causar elevação de pressões de operação e corridas excessivamente longas, enquanto temperaturas muito altas produzem separações ineficientes e reduzem a vida útil da coluna. O tipo de solvente orgânico foi avaliado apenas em três níveis porque embora seja uma variável crucial para os resultados finais, preferiu-se dar prioridade aos solventes mais comumente utilizados, por razões de preço, praticidade, embasamento teórico e toxicidade. Os resultados para os parâmetros cromatográficos  $k$ , área e altura do pico,  $A$ , resolução, pureza de pico, razão S/N e  $N$ , para a lumefantrina, estão apresentados na **Tabela 54**.

**Tabela 54 – Parâmetros cromatográficos obtidos para lumefantrina por planejamento Doehlert para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Replicata	Fator de capacidade ( $k$ )	Área (mAu.s)	Altura (mAu)	Assimetria ( $A$ )	Resolução	Pureza de pico	Razão S/N	Número de pratos teóricos ( $N$ )
1.1	1,7512	1370071	233321	1,5170	9,1904	0,9989	1264	8197
1.2	1,7512	1360054	226959	1,5251	9,2317	0,9990	6351	8063
1.3	1,7453	1364892	235455	1,5224	9,2194	0,9993	1290	8111
2	1,2167	1341947	268164	1,4497	7,3113	0,9985	659	7068
3	0,7320	1036001	247826	1,4092	6,7452	0,9978	9689	6120
4	1,7253	1208043	332455	1,4278	3,8435	0,9973	12095	4722
5	1,1393	1412536	266573	1,3869	7,0432	0,9986	543	5877
6	0,1653	1184132	331367	1,3419	3,4082	0,9910	15136	3838
7	2,5360	1340822	189756	1,6173	11,3428	0,9991	1034	8827
8	2,5707	1755938	198863	1,3609	7,5689	0,9982	1111	5862
9	4,8473	1391553	115353	1,4303	14,7075	0,9989	1365	8111
10	3,7833	2130462	206838	1,8174	12,1170	0,9981	405	7244
11	9,7933	1829544	76858	1,3127	10,7581	0,9997	796	6779
12	1,3987	1385517	206343	1,2851	5,8164	0,9970	822	4507
13	3,4373	1389786	130698	1,2976	9,5319	0,9912	1571	5918
14	2,6200	2122824	261693	1,6865	10,2604	0,9982	1460	7042
15	4,6887	1446193	217320	1,1414	7,9509	0,9966	562	5148
16	0,8327	930889	173730	1,1813	5,9981	0,9849	4890	4135
17	2,8067	1277093	153808	1,5601	11,6788	0,9919	610	7190
18	1,6393	1576934	259623	1,5732	9,5112	0,9982	2011	6641
19	3,2727	1415341	156103	1,6289	10,3025	0,9968	574	7717
20	0,4547	1384612	334632	1,4505	4,3650	0,9969	8172	4498
21	1,0080	1889939	363676	1,4693	4,9905	0,9966	14408	5488
22	0,8587	1859338	395051	1,4729	5,9170	0,9909	15917	5673
23	1,6240	1651597	264944	1,6228	6,4916	0,9988	797	6504
24	1,7967	1163701	179255	1,3649	8,7107	0,9911	1189	6537
25	2,4400	1588966	198913	1,3365	8,3084	0,9982	759	6635
26	4,0247	1269561	126670	1,3368	12,5998	0,9992	754	8659
27	3,7220	1555075	159991	1,4736	9,9504	0,9996	749	8343
28	0,2947	1192686	311132	1,3315	4,1437	0,9960	10894	4175
29	0,7773	1971239	416793	1,3861	4,7259	0,9929	16229	5201
30	0,9173	1591475	312532	1,3855	6,5237	0,9970	12078	5178
31	0,3000	1533956	359332	1,4392	3,3931	0,9719	14158	3388

Considerando que a análise em *software* STATISTICA® 8.0 para cada uma das respostas provavelmente direcionaria para condições cromatográficas ótimas diferentes, optou-se pelo uso da função desejabilidade para uma otimização multivariada. Limites superiores e inferiores e valores alvo para cada parâmetro foram definidos, conforme **Tabela 20**, para determinação das desejabilidades individuais ( $d_i$ ) e desejabilidades globais ( $D$ ) para os 33 experimentos, presentes na **Tabela 55**.

**Tabela 55 – Desejabilidades individuais e global obtidas para lumefantrina, para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano por planejamento Doehlert**

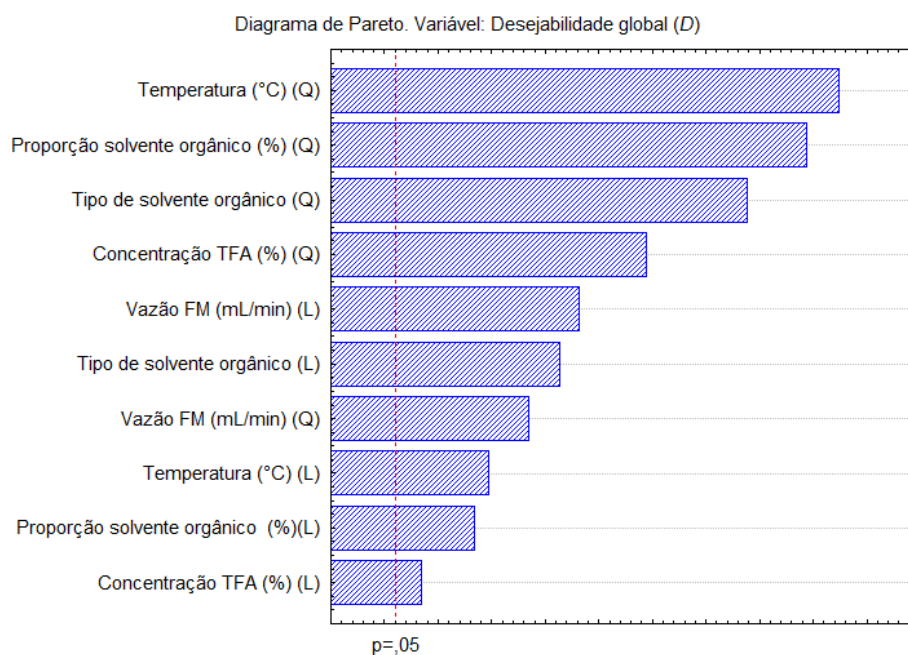
Replicata	Fator de capacidade ( $k$ )	Área (mAu.s)	Altura (mAu)	Assimetria ( $A$ )	Resolução	Pureza de pico	Razão S/N	Número de pratos teóricos ( $M$ )	Desejabilidade global ( $D$ )
1.1	0,5024	0,5669	1,0000	0,4830	0,1012	0,9872	1,0000	1,0000	0,5851
1.2	0,5024	0,5335	1,0000	0,4749	0,0960	0,9978	1,0000	1,0000	0,5765
1.3	0,4907	0,5496	1,0000	0,4776	0,0976	1,0000	1,0000	1,0000	0,5786
2	0,0000	0,4732	1,0000	0,5503	0,3361	0,9484	0,0000	1,0000	0,0000
3	0,0000	0,0000	1,0000	0,5908	0,4068	0,8720	1,0000	1,0000	0,0000
4	0,0000	0,0268	1,0000	0,5722	0,7696	0,8091	1,0000	0,6805	0,0000
5	0,0000	0,7085	1,0000	0,6132	0,3696	0,9535	0,0000	0,9693	0,0000
6	0,0000	0,0000	1,0000	0,6581	0,8240	0,1118	1,0000	0,4595	0,0000
7	0,8660	0,4694	0,7951	0,3827	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000
8	0,8573	1,0000	0,9773	0,6391	0,3039	0,9102	1,0000	0,9654	0,7842
9	0,2882	0,6385	0,0000	0,5697	0,0000	0,9925	1,0000	1,0000	0,0000
10	0,5542	1,0000	1,0000	0,1826	0,0000	0,9034	0,0000	1,0000	0,0000
11	0,0000	1,0000	0,0000	0,6873	0,0000	1,0000	0,3202	1,0000	0,0000
12	0,0000	0,6184	1,0000	0,7149	0,5230	0,7816	0,4071	0,6266	0,0000
13	0,6407	0,6326	0,0000	0,7024	0,0585	0,1307	1,0000	0,9794	0,0000
14	0,8450	1,0000	1,0000	0,3135	0,0000	0,9093	1,0000	1,0000	0,0000
15	0,3278	0,8206	1,0000	0,8586	0,2561	0,7329	0,0000	0,7870	0,0000
16	0,0000	0,0000	0,4746	0,8187	0,5002	0,0000	1,0000	0,5336	0,0000
17	0,7983	0,2570	0,0762	0,4399	0,0000	0,2123	0,0000	1,0000	0,0000
18	0,2787	1,0000	1,0000	0,4268	0,0611	0,9157	1,0000	1,0000	0,5344
19	0,6818	0,7178	0,1221	0,3711	0,0000	0,7521	0,0000	1,0000	0,0000
20	0,0000	0,6154	1,0000	0,5495	0,7044	0,7621	1,0000	0,6245	0,0000
21	0,0000	1,0000	1,0000	0,5307	0,6262	0,7292	1,0000	0,8720	0,0000
22	0,0000	1,0000	1,0000	0,5271	0,5104	0,0951	1,0000	0,9183	0,0000
23	0,2480	1,0000	1,0000	0,3772	0,4386	0,9826	0,3233	1,0000	0,5813
24	0,5933	0,0000	0,5851	0,6351	0,1612	0,1210	1,0000	1,0000	0,0000
25	0,8900	1,0000	0,9783	0,6635	0,2114	0,9131	0,1975	1,0000	0,6207
26	0,4938	0,2319	0,0000	0,6632	0,0000	1,0000	0,1813	1,0000	0,0000
27	0,5695	1,0000	0,1998	0,5264	0,0062	1,0000	0,1633	1,0000	0,2970
28	0,0000	0,0000	1,0000	0,6685	0,7320	0,6652	1,0000	0,5438	0,0000
29	0,0000	1,0000	1,0000	0,6139	0,6593	0,3186	1,0000	0,8003	0,0000
30	0,0000	1,0000	1,0000	0,6145	0,4345	0,7825	1,0000	0,7945	0,0000
31	0,0000	1,0000	1,0000	0,5608	0,8259	0,0000	1,0000	0,3470	0,0000

Embora considerada uma ferramenta estatística muito importante para otimização multivariada de condições experimentais, a função desejabilidade esbarra na desvantagem de que, se para uma única resposta for associado um valor de  $d_i$  igual a 0, o valor final para  $D$  também será nulo, e, portanto, considerado inaceitável. Percebeu-se, pela análise da **Tabela 55**, que 25 dos 33 experimentos estão associados a  $D$  nulas, o que não é ideal. Decidiu-se, porém, prosseguir o planejamento, adotando-se os valores de  $D$  como única resposta. Esses resultados foram analisados com auxílio do software STATISTICA<sup>®</sup> 8.0, sendo obtidos diagrama de Pareto, superfícies de resposta e valores críticos para os parâmetros analíticos escolhidos como variáveis, adotando-se  $\alpha = 0,05$ .

O diagrama de Pareto (**Figura 40**) demonstra que as 5 variáveis independentes influenciam significativamente na resposta desejabilidade global, quanto aos seus termos linear e quadrático. Os parâmetros temperatura, proporção de solvente orgânico e tipo de solvente orgânico, porém, demonstraram influência mais acentuada que os outros dois. Como, entretanto,  $D$  é uma resposta combinada das respostas individuais, pode ser que os parâmetros analíticos interfiram diferentemente, mais ou menos fortemente, nos parâmetros cromatográficos, se a avaliação fosse realizada individualmente. Em resumo, embora esses parâmetros sejam os mais importantes em relação à desejabilidade, podem não ser os mais relevantes para todas as respostas.

**Figura 40 – Diagrama de Pareto para otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano por planejamento experimental**

**Doehlert**



Superfícies de resposta, apresentadas nas **Figuras 41 e 42**, foram obtidas para duas variáveis independentes por vez, combinadas aos pares, mantendo-se as demais variáveis fixadas no nível central. Finalmente, foram determinados ainda equação que melhor descrevesse o conjunto de resultados encontrados e os valores críticos para cada parâmetro analítico, de modo a se maximizar *D*. Em virtude do grande número de variáveis independentes, optou-se por não se considerar interações entre variáveis para que o modelo proposto não se tornasse muito complexo e direcionasse a resultados menos precisos e confiáveis.

Todas as superfícies de resposta fornecidas para *D*, para o planejamento DM, demonstraram pontos de máximo, indicando que o delineamento experimental foi adequadamente planejado para incluir a região ótima para os parâmetros analíticos avaliados, não precisando sofrer deslocamento. Uma conclusão importante que se pode chegar somente por inspeção visual das superfícies de resposta é que, de modo geral, a região de *D* ótima se concentra, para os 5 parâmetros analíticos, especialmente para temperatura, proporção de solvente orgânico e concentração de TFA, nos níveis centrais. Ou seja, as superfícies

de resposta apontam que  $D$  máximas serão obtidas para temperatura próxima a 30 °C, proporção de solvente orgânico próxima a 83% e concentração de TFA próxima a 0,09%. Já para vazão, melhores resultados foram encontrados ao redor do ponto central, mas levemente deslocadas em direção a valores mais baixos, entre 0,8 e 0,9 mL/min. Para o parâmetro tipo de solvente orgânico, os melhores resultados foram obtidos, segundo o modelo ajustado, também na região próxima ao ponto central, mas um pouco mais sutilmente em direção a misturas entre metanol e acetonitrila, mas com maiores proporções de metanol. Os resultados para condições ótimas para  $D$  propostas pelo STATISTICA® 8.0 estão descritos na **Tabela 56**.

Uma vez que para o parâmetro tipo de solvente orgânico se utilizaram valores codificados, determinou-se a composição da fase orgânica atribuindo 100% de metanol à variável codificada -0,775; 100% de acetonitrila à variável codificada +0,775; e 50% de metanol + 50% de acetonitrila para o ponto central (0). Com isso, a partir do resultado codificado, pode-se determinar a proporção ideal entre os dois solventes na composição da fase orgânica. Como, para boa parte dos parâmetros, encontraram-se numerais não inteiros como resultados, foram necessários pequenos arredondamentos para se obter números inteiros, mais diretos e mais habituais em CLAE, conforme **Tabela 56**.

Figura 41 – Superfícies de resposta obtidas para otimização de método bioanalítico por planejamento experimental Doehlert

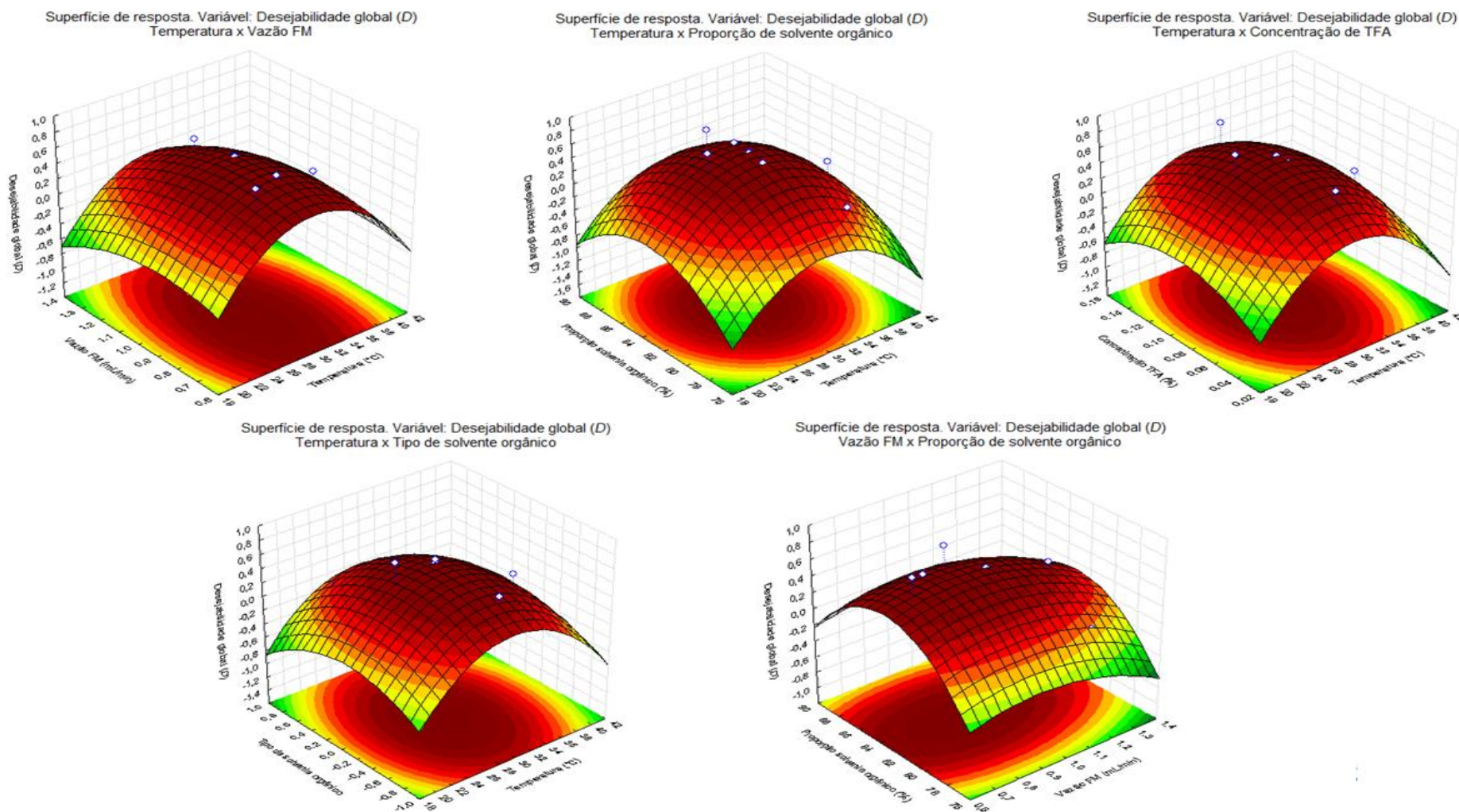
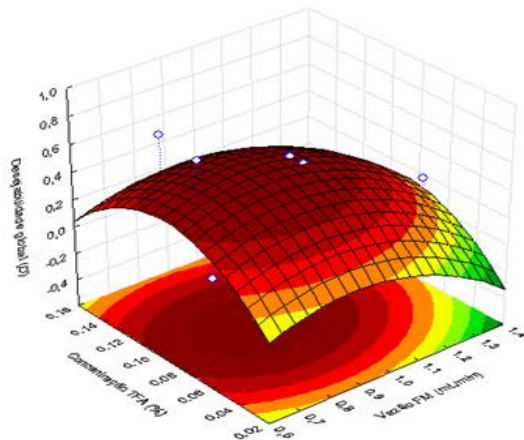
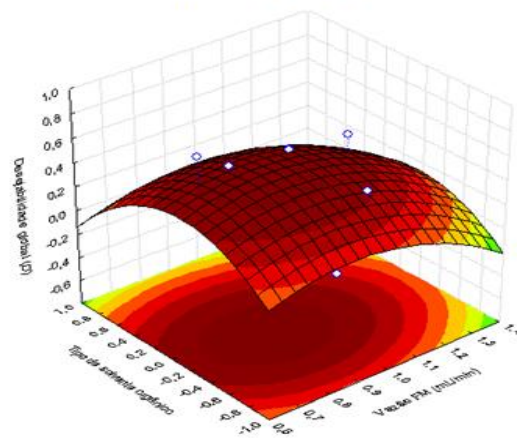
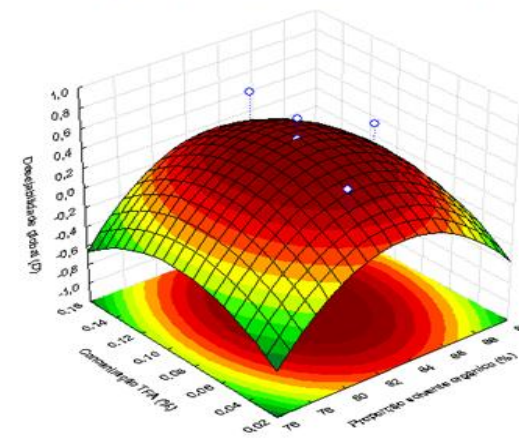
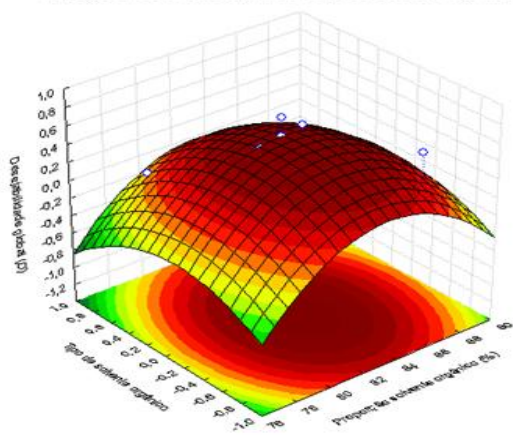
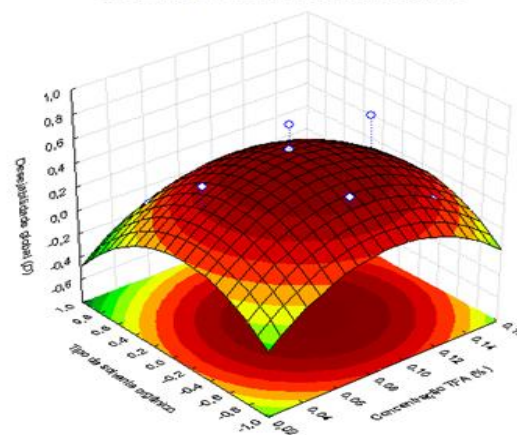


Figura 42 – Superfícies de resposta obtidas para otimização de método bioanalítico por planejamento experimental Doehlert

Superfície de resposta. Variável: Desejabilidade global (D)  
Vazão FM x Concentração TFASuperfície de resposta. Variável: Desejabilidade global (D)  
Vazão FM x Tipo de solvente orgânicoSuperfície de resposta. Variável: Desejabilidade global (D)  
Proporção de solvente orgânico x Concentração TFASuperfície de resposta. Variável: Desejabilidade global (D)  
Proporção de solvente orgânico x Tipo de solvente orgânicoSuperfície de resposta. Variável: Desejabilidade global (D)  
Concentração TFA x Tipo de solvente orgânico

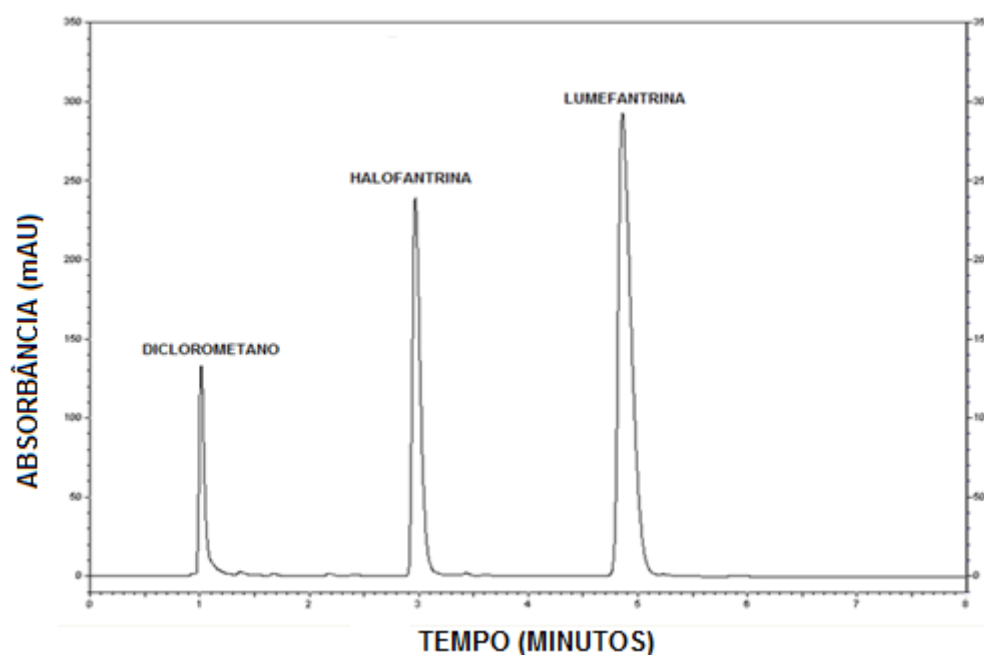


**Tabela 56 – Condições cromatográficas otimizadas por planejamento experimental Doehlert para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Parâmetro analítico	Condição ótima conforme STATISTICA	Condição ótima avaliada
Temperatura (°C)	29,4168	30,0
Proporção de solvente orgânico (%)	83,3369	83,0
Vazão de fase móvel (mL/min)	0,8800	0,9
Concentração de TFA (%)	0,0924	0,0900
Tipo de solvente orgânico	MeOH:ACN 59:41	MeOH:ACN 60:40

As condições cromatográficas otimizadas foram testadas empregando-se *solução de lumefantrina SQR e halofantrina SQR a 5,0 µg/mL*, para determinação dos parâmetros de adequabilidade. Um cromatograma típico, representado na **Figura 43**, apresentou tempos de retenção iguais a 3,06 minutos para a halofantrina e 4,86 minutos para a lumefantrina, resultando em corridas analíticas de 8 minutos. Um pico referente ao diclorometano, utilizado na etapa inicial do preparo de amostras para solubilização dos fármacos, pode ser observado em tempo de retenção de 1,03 minutos, antes do tempo morto da coluna (1,25 minutos). Os resultados para os parâmetros cromatográficos determinados estão na **Tabela 57**.

**Figura 43 – Cromatograma típico para condições cromatográficas otimizadas para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano por planejamento experimental Doehlert**



**Tabela 57 – Parâmetros cromatográficos determinados para condições cromatográficas otimizadas por planejamento experimental Doehlert para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Parâmetro cromatográfico	Resultados para lumefantrina
Fator de capacidade ( $k$ )	2,88
Área (mAu.s)	2403551
Altura (mAu)	291956
Assimetria	1,73578
Resolução	10,58
Pureza de pico	0,9989
Razão S/N	4438
Número de pratos teóricos/metro	74990

Os parâmetros classificados como respostas *LTB* (quanto maior, melhor), ou seja, área, altura e pureza de pico, razão S/N e  $N$ , foram eficazmente maximizados por planejamento DM associado à função desejabilidade, pois os resultados encontrados superaram os limites mínimos aceitáveis, superando ou, pelo menos igualando, os valores definidos como alvo. Para  $N$ , o resultado encontrado foi próximo a 7500, quase 25% maior que o admitido como desejável ( $N = 6000$ ) e muito próximo ao maior  $N$  encontrado para os 33 experimentos, de aproximadamente 9000, assegurando-se que, nas condições cromatográficas ótimas empregadas, a coluna apresentará eficiência satisfatória para a finalidade a que se propõe. Os elevados valores para área, altura e razão S/N foram considerados adequados, fornecendo indícios de que o método apresenta detectabilidade apropriada, permitindo a quantificação de lumefantrina em concentrações mais baixas, essencial para métodos bioanalíticos em que as concentrações plasmáticas de fármacos são baixas. Com isso, ainda que a espectrofotometria de absorção no UV não seja a primeira escolha para a determinação de fármacos em fluidos biológicos, demonstrou-se suficientemente sensível para quantificação de lumefantrina em plasma.

Para  $k$ , uma variável *NTB* (quanto mais próxima de um valor alvo ou nominal, melhor), o resultado encontrado foi de 2,88, entre os limites inferior e superior especificados, aproximando-se muito do valor alvo, igual a 3. Embora sejam admitidos valores de  $k$  entre 0,5 e 20 para quantificação de fármacos em amostras biológicas, definiu-se faixa mais estreita (entre 2 e 6) como desejável. O limite inferior foi estabelecido como  $k = 2$  para garantir que a lumefantrina não eluísse na porção inicial do cromatograma, onde normalmente muitos

interferentes eluem, especialmente quando se trata de amostras de maior complexidade. O limite superior ( $k = 6$ ) foi definido por dois motivos principais: prevenir tempos de corrida desnecessariamente longos e promover a formação de picos mais estreitos e altos, aumentando a detectabilidade do método e a qualidade dos resultados obtidos.

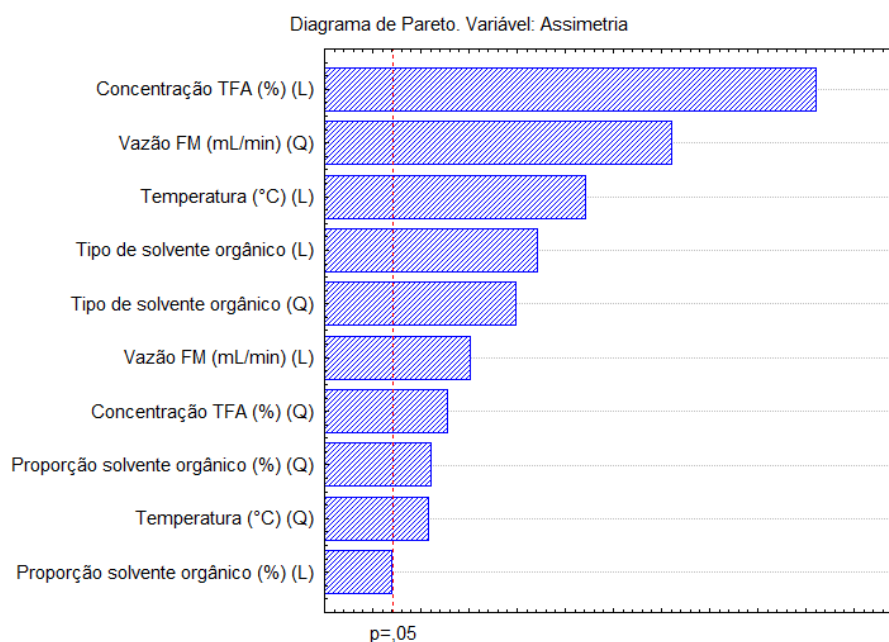
É importante que se discuta, entretanto, que ao se utilizar a ferramenta desejabilidade para otimização multivariada de respostas, os resultados obtidos para alguma das respostas individuais podem mostrar-se, ainda, insatisfatórios. Essa limitação ocorre porque a desejabilidade busca determinar parâmetros que forneçam condições ótimas para todas as respostas avaliadas, simultaneamente, mas respostas diferentes podem requerer condições ótimas igualmente diferentes, algo que a desejabilidade procura obter, mas nem sempre o faz satisfatoriamente. Esse fenômeno foi observado aqui: embora resultados satisfatórios tenham sido conseguidos para a maior parte das respostas avaliadas, os resultados para resolução e  $A$  (variáveis  $NTB$ ) ainda não foram adequados. Por exemplo, para a resolução entre os picos de lumefantrina e halofantrina, encontrou-se resultado de 10,58, pouco acima do limite definido como superior (10). Uma resolução ao nível de linha de base é conseguida para resoluções superiores a 2, mas o ideal é adotar resoluções um pouco maiores, como margem de segurança para prevenir a sobreposição dos picos se houver variações mínimas e incontroláveis dos parâmetros analíticos definidos, como temperatura, vazão e composição de fase móvel. Todavia, resolução superior a 10 faz-se indesejável, pois a separação entre os picos é muito maior do que a separação necessária, o que aumenta o tempo de corrida desnecessariamente.

O parâmetro mais crítico, contudo, foi a simetria do pico, pois, por mais que  $A$  determinada de 1,74 cumprisse as especificações preconizadas pela normatização ( $0,8 \leq A \leq 2,0$ ), ainda é consideravelmente alta, distante do valor alvo, igual a 1, para um pico  $c$  simétrico. Uma alternativa que a função desejabilidade oferece para esses casos é atribuir pesos diferenciados para diferentes respostas, nos cálculos de  $d_i$ . Desse modo, atribuiu-se maior peso (peso 2) às variáveis consideradas mais críticas ( $A$ ,  $N$  e resolução), para que,

ao final, os valores para D direcionassem para respostas mais desejáveis para os dois parâmetros. Entretanto, os resultados encontrados para as condições cromatográficas ótimas foram muito semelhantes àqueles apresentados na **Tabela 56**; portanto, os resultados encontrados para *A* e resolução não seriam significativamente melhorados nas novas condições. Decidiu-se, por isso, adotar as condições cromatográficas inicialmente definidas como um ponto de partida e proceder a ajustes finos para melhorar os resultados para *A* (prioritariamente) e resolução.

O planejamento Doehlert apontou que, especificamente para assimetria, os parâmetros que mais fortemente influenciaram foram concentração de TFA, vazão e temperatura, conforme diagrama de Pareto na **Figura 44**.

**Figura 44 – Diagrama de Pareto para assimetria, por planejamento Doehlert**



Em relação ao TFA, o planejamento adotado apontou que soluções mais concentradas propiciam formação de picos mais simétricos. Isso ocorre porque a lumefantrina é uma base fraca, de modo que em meios mais ácidos, o fármaco se encontrará completamente na forma ionizada, enquanto em meios menos ácidos haverá equilíbrio entre forma ionizada e não ionizada, causando alargamento dos picos. É sabido ainda que temperaturas maiores favorecem a formação de picos mais simétricos, ao diminuir a viscosidade da fase móvel e

promover menor retenção do analito, o que foi confirmado pelos resultados fornecidos pelo planejamento. Portanto, para diminuir  $A$  para o pico de lumefantrina, uma corrida analítica foi desenvolvida nas condições cromatográficas descritas na **Tabela 56**, substituindo-se TFA 0,09% por TFA 0,14%. O aumento da acidez da fase aquosa reduziu a assimetria de 1,74 para 1,56, sem alterar de forma significativa os outros parâmetros cromatográficos. Tal melhoria, no entanto, foi considerada insuficiente. Como, porém, concentrações maiores de TFA reduzem o pH aparente da fase móvel a valores menores que 1,5, que poderiam levar à deterioração da fase estacionária por hidrólise, aumentos subsequentes não puderam ser efetuados.

Partiu-se então para o aumento da temperatura, inicialmente definida como 30 °C, para 35 °C. Esse aumento, somado ao efeito benéfico anterior, propiciou a formação de picos mais simétricos, com  $A = 1,45$ . Um aumento posterior a 40 °C não melhorou substancialmente  $A$ , prejudicando os demais parâmetros e diminuindo a vida útil da coluna, sendo, por isso, descartadas. Conforme esperado, o aumento da temperatura alterou outros parâmetros cromatográficos, principalmente o tempo de retenção ( $t_R$  e, conseqüentemente,  $k$ ), que diminuiu notadamente para analito e PI, por causa da diminuição na viscosidade da fase móvel. Teve-se, portanto, que ajustar o parâmetro vazão, para que o ganho em  $A$  se mantivesse, sem prejudicar os outros parâmetros. Como a força de eluição da fase móvel apresentou-se maior do que o desejado, a saída encontrada foi diminuir a vazão, inicialmente para 0,8 mL/min. O aumento observado nos fatores de capacidade ( $k$ ) foram, entretanto, menos pronunciados do que se desejava. Portanto, a vazão foi diminuída novamente, para 0,7 mL/min. Feitas essas modificações, foram obtidos cromatogramas para *solução de lumefantrina SQR e halofantrina SQR*, em que foram encontrados tempos de retenção de 3,13 minutos para halofantrina e 4,71 minutos para lumefantrina. Os parâmetros cromatográficos determinados são apresentados na **Tabela 58**.

**Tabela 58 – Parâmetros cromatográficos determinados após ajustes finos na concentração de ácido trifluoroacético, temperatura e vazão, na otimização de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Parâmetro cromatográfico	Resultados para lumefantrina
Fator de capacidade ( <i>k</i> )	2,76
Área (mAu.s)	2704401
Altura (mAu)	313710
Assimetria	1,4604
Resolução	7,48
Pureza de pico	0,9974
Razão S/N	4971
Número de pratos teóricos/metro	73230

Os resultados obtidos foram considerados apropriados para os parâmetros cromatográficos e, portanto, essas condições cromatográficas foram definidas como condições otimizadas finais para o método, considerando-o, desse modo, devidamente otimizado para quantificação de lumefantrina em plasma. Observou-se que, para variáveis como fator de capacidade, número de pratos teóricos e pureza de pico, os resultados aqui encontrados foram muito próximos aos encontrados nas condições ótimas definidas por desejabilidade global, sendo igualmente satisfatórios. Já para área, altura e razão S/N, os resultados foram ainda melhores que os anteriormente encontrados, indicando que os ajustes finos efetuados propiciaram ganho adicional quanto à detectabilidade do método. Os maiores benefícios, todavia, foram obtidos para *A* e resolução, pois, a assimetria diminuiu de 1,73 para 1,46, enquanto a resolução diminuiu de 10,58 para 7,48, adequando-se aos limites definidos como aceitáveis.

Por fim, os parâmetros instrumentais frequência de aquisição de dados (*data rate*) e tempo de resposta no detector (*rise time*) foram otimizados. Tais parâmetros não demonstraram influência significativa para a maioria das respostas medidas, como tempos de retenção e eficiência da coluna, mas alteraram os resultados obtidos para *A*, sendo, portanto modificados de forma univariada para determinar-se valores ótimos. A importância dessa etapa se justificou para que o benefício trazido pelo emprego de uma coluna cromatográfica de núcleo fundido altamente eficiente, normalmente utilizada em métodos por CLUE, não fosse minimizado ou perdido por sua utilização em equipamentos menos robustos e eficientes, como os de CLAE. De forma a se obter uma performance desejável para colunas de núcleo fundido em CLAE,

esses parâmetros devem ser ajustados de modo a se obter um número mínimo de aquisição para o pico, atenuando os efeitos de ruído de linha de base e prevenindo alargamento.

O parâmetro frequência de aquisição de dados (*data rate*) foi avaliado progressivamente no intervalo de 0,1 a 20,0 Hz enquanto o tempo de resposta no detector foi mantido na configuração padrão (*default*) do equipamento, igual a 2,0 s. A influência da elevação do *data rate* na assimetria dos picos de lumefantrina e halofantrina é demonstrada na **Tabela 59**. O aumento na frequência de aquisição de dados demonstrou influenciar favoravelmente *A* para os picos de lumefantrina e halofantrina, sendo que picos mais simétricos foram obtidos para *data rate* de 20,0 Hz. Segundo Santos Neto (2011), a frequência de aquisição de dados deve ser idealmente regulado para manter um mínimo de 20 pontos de aquisição para o pico mais estreito do cromatograma, para garantir maior desempenho de colunas de partículas superficialmente porosas.

**Tabela 59 – Influência da frequência de aquisição de dados na assimetria dos picos de lumefantrina e halofantrina**

Frequência de aquisição de dados (Hz)	Assimetria	
	LUMF	HALO
0,5	1,45	1,82
1,0	1,48	1,69
2,0	1,54	1,57
5,0	1,44	1,59
10,0	1,48	1,48
20,0	1,36	1,41

O tempo de resposta no detector ou *rise time* foi avaliado na faixa de 0,5 a 10,0 s, fixando-se a frequência de aquisição de dados constante, em 10,0 Hz. Os resultados obtidos para *A* estão presentes na **Tabela 60**. Observa-se que os melhores resultados, expressos como menores *A*, foram encontrados quando se utilizou *rise time* de 5,0 s, que, portanto, substituiu o valor de 2,0 s padronizado pelo fabricante. Santos Neto (2011) discute que maiores tempos de resposta no detector são desejados, pois minimizam o ruído de linha de base de alta frequência. Contudo, tempos demasiadamente longos contribuem para que o pico pareça mais baixo e largo que seu aspecto real, sendo contraindicados.

**Tabela 60 – Influência do tempo de resposta no detector na assimetria dos picos de lumefantrina e halofantrina**

Tempo de resposta no detector (s)	Assimetria	
	LUMF	HALO
0,1	1,67	1,83
0,5	1,54	1,63
1,0	1,51	1,62
2,0	1,43	1,47
5,0	1,40	1,38
10,0	1,57	1,40

HALO: halofantrina; LUMF: lumefantrina.

Por isso, definiu-se o *data rate* e o *rise time* em, respectivamente, 20, 0 Hz e 5,0 s como configurações ótimas para melhor desempenho do sistema cromatográfico. A **Tabela 61** apresenta as condições definidas após otimização. Depois da otimização, foram definidas as condições cromatográficas e critérios de adequabilidade para o método bioanalítico, que se encontram sumarizados na **Tabela 61**.

**Tabela 61 – Condições cromatográficas e critérios de adequabilidade para método bioanalítico por CLAE-UV para determinação de lumefantrina em plasma humano após otimização**

Parâmetro analítico	Especificação
Fase estacionária	Coluna Kinetex C18 2,6 µm 100 x 4,6 mm
Fase móvel	MeOH: ACN:TFA 0,14% 50:33:17 v/v/v
Vazão da fase móvel	0,7 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	35 °C
Comprimento de onda de detecção	305 nm
Frequência de aquisição de dados	20,0 Hz
Tempo de resposta no detector	5,0 s
Número de pratos teóricos	$N \geq 6000$
Assimetria	$0,8 \leq A \leq 1,5$
Fator de retenção	$1,5 \leq k \leq 5,0$
Resolução	$\geq 2,0$

Um cromatograma típico, obtido nas condições otimizadas está ilustrado na **Figura 45**. Os tempos de retenção obtidos foram 3,11 minutos para halofantrina e 4,68 minutos para lumefantrina. Os parâmetros cromatográficos foram determinados, em relação ao pico de lumefantrina, sendo apresentados na **Tabela 62**.



Figura 45 – Cromatograma típico obtido para condições cromatográficas otimizadas por planejamento Doehlert mais ajustes finos (condição final) para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano

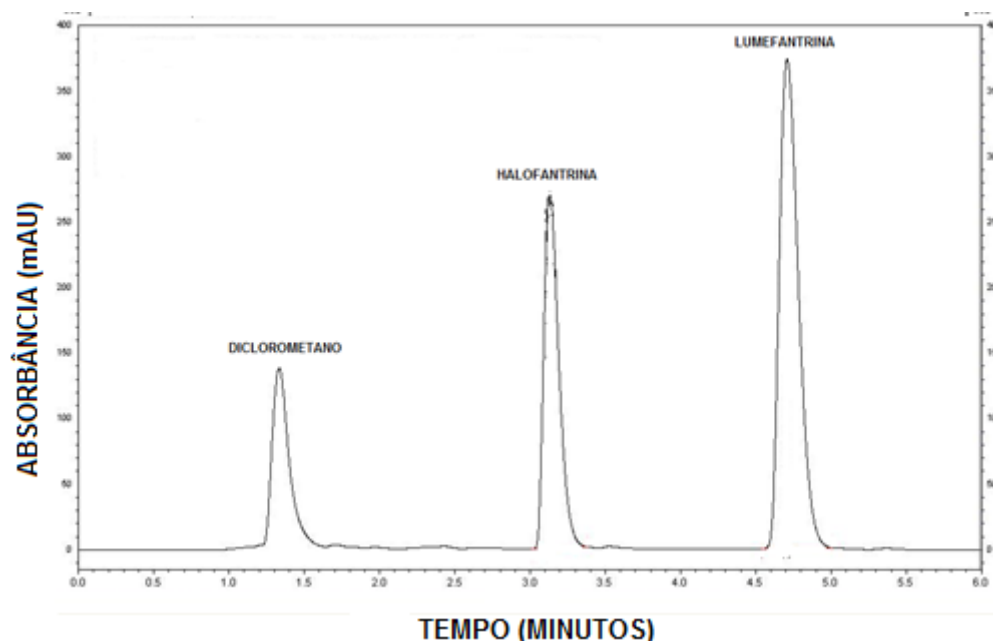


Tabela 62 – Parâmetros cromatográficos obtidos para condições cromatográficas otimizadas por planejamento Doehlert mais ajuste finos (condição final) para método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano

Parâmetro cromatográfico	Resultados para lumefantrina
Fator de capacidade ( $k$ )	2,74
Área (mAu.s)	2756983
Altura (mAu)	320787
Assimetria	1,2278
Resolução	7,35
Pureza de pico	0,9969
Razão S/N	8668
Número de pratos teóricos/metro	74590

Um aumento realizado simultaneamente nos parâmetros instrumentais *rise time* e *data rate* mostrou efeito sinérgico, reduzindo  $A$  dos picos lumefantrina de maneira ainda mais significativa que as reduções provocadas por cada parâmetro individualmente, passando de 1,36 para 1,23, a menor assimetria encontrada no desenvolvimento do método. Esses parâmetros contribuíram ainda para um aumento quase duas vezes da razão S/N, justamente pelo fato de que aumentos no *rise time* atenuam o ruído de linha de base de alta frequência. O método, desenvolvido de forma racional, rápida e utilizando-se

pequeno número de experimentos, demonstrou-se apropriado para quantificação de lumefantrina em plasma, sendo posteriormente validado.

### **5.5.2 Desenvolvimento da etapa de preparo de amostras por extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE)**

Um procedimento de preparo de amostras empregando extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) foi desenvolvido e otimizado empregando cartuchos contendo o MIP-24 como fase estacionária. Por sua natureza altamente lipofílica, a lumefantrina apresenta um elevado índice de ligação a proteínas plasmáticas, superior a 99%. Dessa forma, as recuperações encontradas em trabalhos que empregaram SPE na etapa de preparo de amostras de lumefantrina em fluidos biológicos foram muito baixas. Lindergardh *et al.* (2005) e Huang *et al.* (2010) mostraram que uma etapa de PPT precedendo a SPE aumentou as recuperações consideravelmente. Huang *et al.* ainda demonstraram que o uso de um ácido inorgânico forte, como ácido perclórico, como agente precipitante, em vez de soluções de ácidos orgânicos fracos (como ácido acético e ácido fórmico), levaram à formação de partículas de precipitado mais finas, que contribuem para maior liberação da lumefantrina do plasma e, portanto, para maiores recuperações.

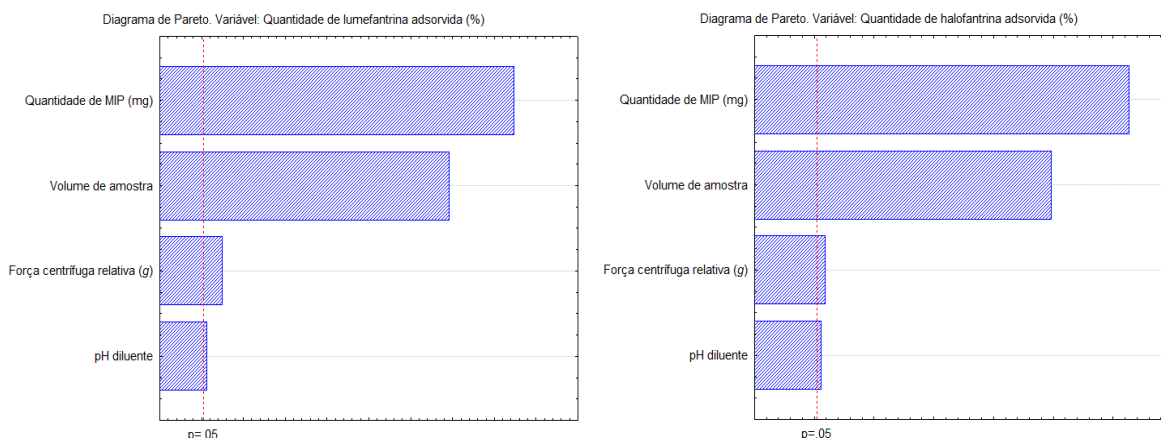
Portanto, decidiu-se pela realização de uma etapa prévia de precipitação de proteínas, conforme proposto por Huang *et al.* (2010), utilizando uma *solução de ácido perclórico a 0,2% em acetonitrila* como agente precipitante. Uma etapa prévia de precipitação de proteínas mostrou-se necessária pois foram encontradas recuperações muito baixas, de 1,42% para lumefantrina e 0,83% para halofantrina quando se utilizou somente MISPE, devido ao alto índice de ligação a proteínas plasmáticas desses fármacos, iguais a 99,7% para lumefantrina e 60-70% para halofantrina (CENNI *et al.*, 1995; COLUSSI *et al.*, 1999). A etapa de precipitação proteica promoveu liberação dos fármacos inicialmente ligados, contribuindo para maiores recuperações. O procedimento para precipitação de proteínas foi adaptado de Huang *et al.* (2010), mas, decidiu-se utilizar proporção de 1:1 entre *solução de ácido perclórico 0,2% em*

*acetonitrila* e amostra em vez da proporção de 3:1 proposta pelo autor, para diminuir a diluição da amostra, permitindo que concentrações plasmáticas menores de lumefantrina pudessem ser quantificadas adequadamente por CLAE-UV. Ademais, a quantidade adicionada de precipitante mostrou-se suficiente para que se obtivesse sobrenadantes límpidos e recuperações maiores que 80%, principalmente porque seria seguida de uma etapa de extração seletiva, por MISPE.

Para o condicionamento e ativação dos cartuchos contendo MIP-24, empregou-se 2 mL de metanol, em 2x1 mL, seguidos por 2 mL de água ultrapura, em 2x1 mL. Empregou-se centrifugação para eluir solventes e amostras nas etapas de condicionamento, *loading*, lavagem e dessorção, porque esse procedimento mostrou-se adequado e mais rápido que o procedimento empregando câmara a vácuo Manifold<sup>®</sup>, por limitação das bombas de vácuo utilizadas, que resultavam em vazões lentas. Os tempos médios consumidos para passagem de 1 mL de solvente quando se empregou câmara a vácuo variaram entre 15 e 20 minutos, enquanto para centrifugação os tempos gastos variaram de 2 a 5 minutos. Exceção foi feita para a aplicação da amostra, realizada mais lentamente para garantir tempo adequado de interação entre analito e fase extratora.. O método por centrifugação apresentou outra vantagem em relação à câmara de vácuo: permitir que um número maior de cartuchos (28 contra 6) fosse eluído de uma única vez, reduzindo o tempo de análise ainda mais.

Otimizou-se a etapa de carregamento ou *loading* de amostra por planejamento fracionário  $2^{4-1}$  de meia fração, em 11 experimentos, escolhendo-se pH aparente do diluente, quantidade de polímero, força centrífuga relativa e volume de amostra como variáveis. Os resultados para quantidades sorvidas percentuais foram analisados por *software* STATISTICA<sup>®</sup> 8.0, sendo obtidos diagrama de Pareto (**Figura 46**) e gráficos do tipo *square plot* (**Figuras 47 e 48**). O diagrama de Pareto mostrou que, apesar de todas as variáveis avaliadas demonstrarem influência significativa para a sorção de lumefantrina e halofantrina, os parâmetros quantidade de polímero e volume de amostra foram os que mais mostraram influência para fármaco e PI.

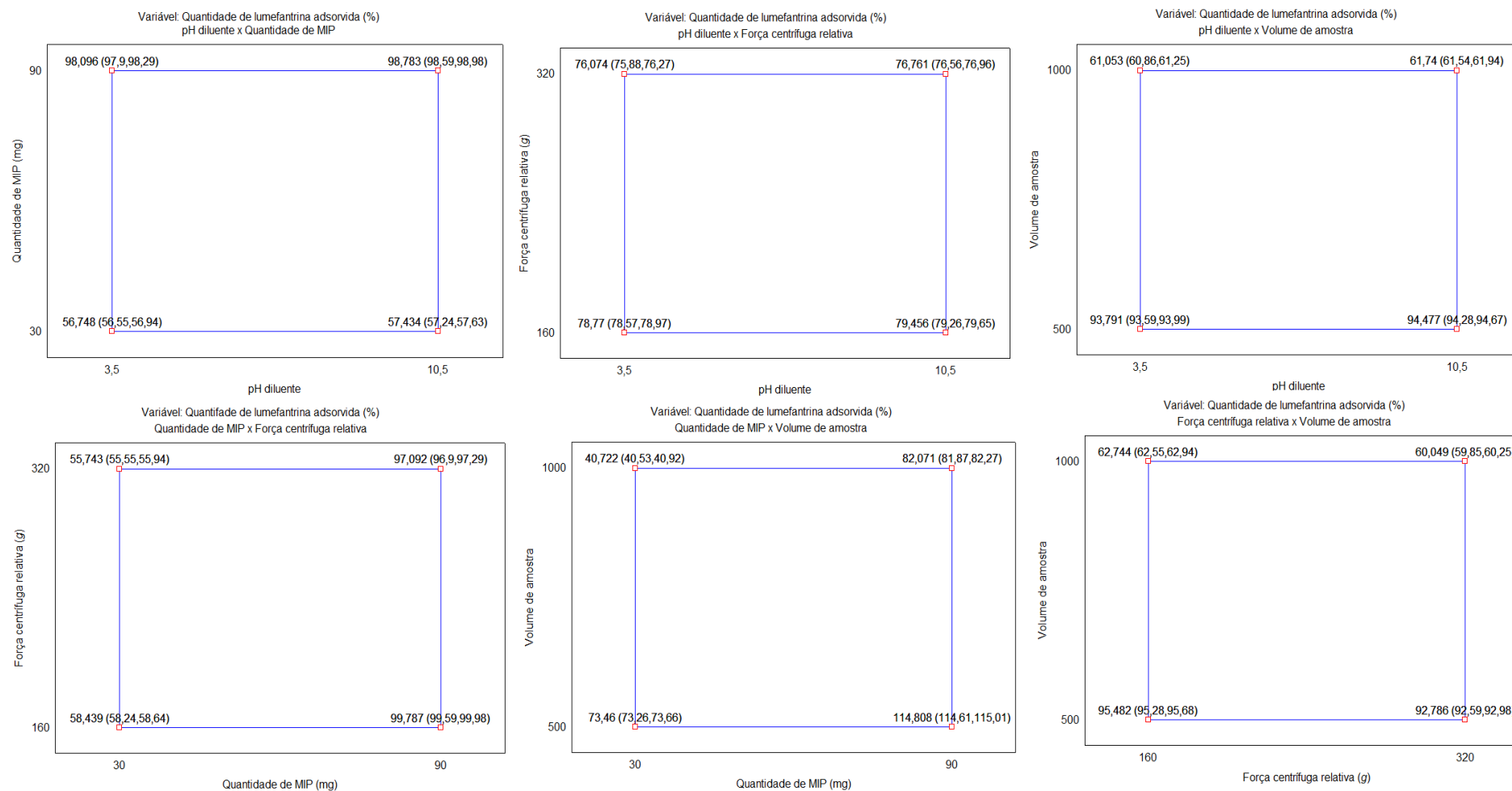
**Figura 46 – Diagramas de Pareto para quantidades sorvidas de lumefantrina (à esquerda) e halofantrina (à direita)**



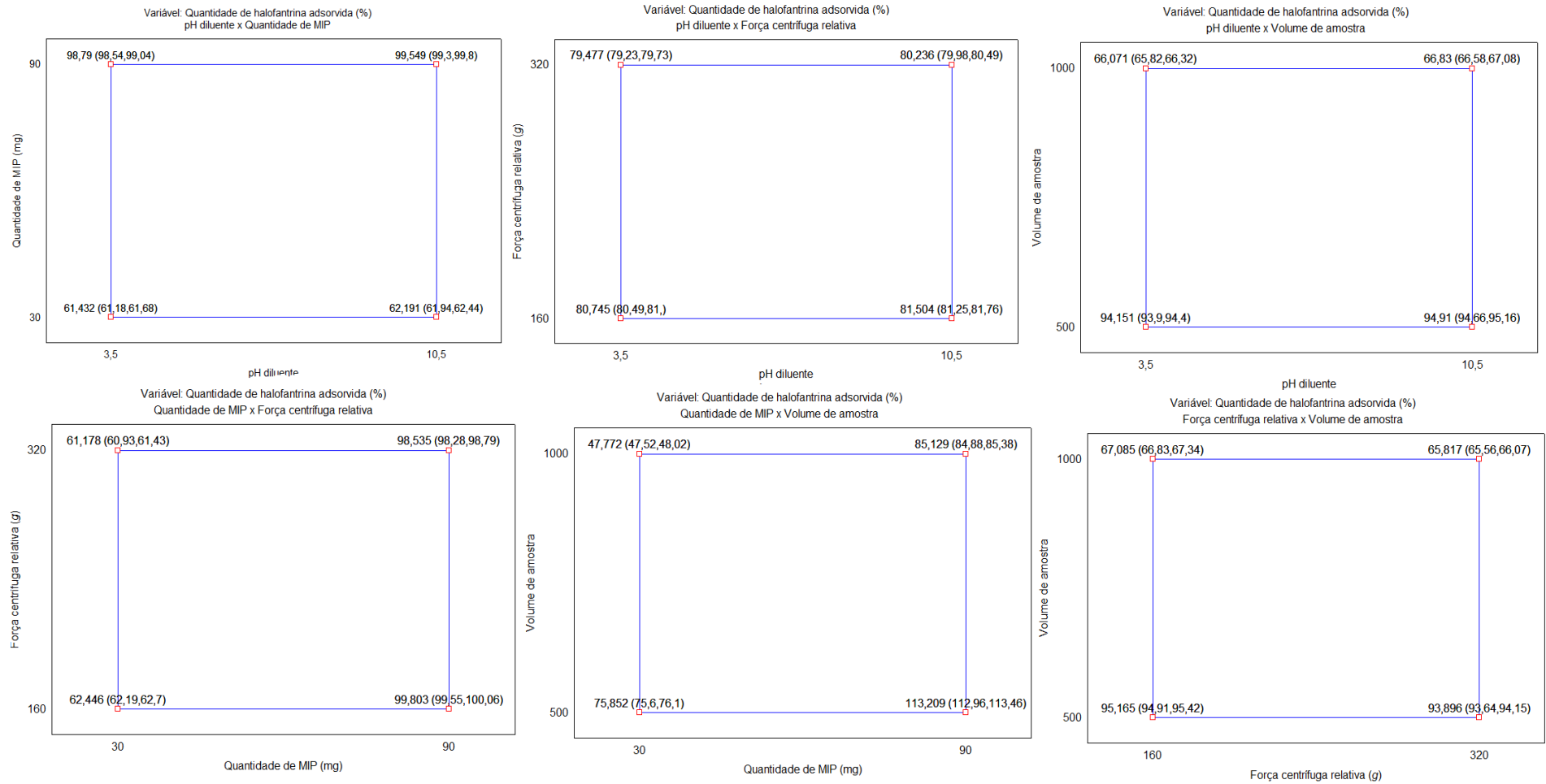
Gráficos do tipo *square plot* foram traçados para cada fármaco, correlacionando dois parâmetros por vez, enquanto os outros dois parâmetros eram mantidos constantes em seu ponto central. Os gráficos permitiram avaliar a direção, para cada parâmetro, que conduziu a maiores recuperações para analito e PI. Para ambos, lumefantrina e halofantrina, como se esperava, o planejamento PFF 2<sup>4-1</sup> indicou condições ótimas muito próximas, facilitando a otimização da etapa de *loading*. Buscou-se condições que permitissem recuperações próximas de 100%, embora valores menores que 100% foram consideradas aceitáveis, desde que reproduzíveis.

A análise dos gráficos *square plot* mostra que a recuperação de lumefantrina e halofantrina aumenta, atingindo valores próximos a 100%, quando a quantidade de MIP utilizada para formação dos cartuchos é aumentada. Em seu nível inferior (30 mg), os resultados encontrados são muito baixos e, portanto, inadequados. Contudo, a diferença entre recuperações quando se utiliza 60 ou 90 mg de polímero não é significativamente diferente: em ambos os casos, recuperações entre 98 e 100% foram obtidas, o que se evidencia na análise das recuperações obtidas para as replicatas do ponto central. Dessa forma, visando o desenvolvimento de um método mais econômico, definiu-se 60 mg como quantidade de polímero ideal.

Figura 47 – Gráficos *square plot* para quantidade sorvida de lumefantrina



**Figura 48 – Gráficos *square plot* para quantidade sorvida de halofantrina**



Em relação ao volume de amostra, a inspeção visual dos gráficos demonstra que, como esperado, menores volumes levam a recuperações mais desejáveis. Quando se emprega somente 500  $\mu\text{L}$ , por exemplo, as recuperações encontradas superam 99%. Números parecidos são encontrados para o ponto central (750  $\mu\text{L}$ ). No entanto, o volume foi definido como 500  $\mu\text{L}$  para assegurar uma extração mais eficiente, aumentar a vida útil dos cartuchos, diminuir o consumo de amostra e reagentes e propiciar cálculos mais diretos. A RCF demonstrou menor influência que os parâmetros discutidos acima, mas observou-se uma tendência no sentido que velocidades menores de centrifugação se associam a maiores recuperações, ao permitir que analitos e fase extratora interajam mais lentamente entre si, favorecendo os processos sortivos. Entretanto, redução muito grande da RCF aumentou consideravelmente o tempo necessário para o processamento das amostras. Por isso, uma vez que a diferença em relação à qualidade da sorção para analito e PI foi muito pequena para 160 e 240 x g, decidiu-se por 240 x g como força centrífuga relativa para diminuir o tempo consumido nas extrações – que ocorria em 10 minutos, geralmente.

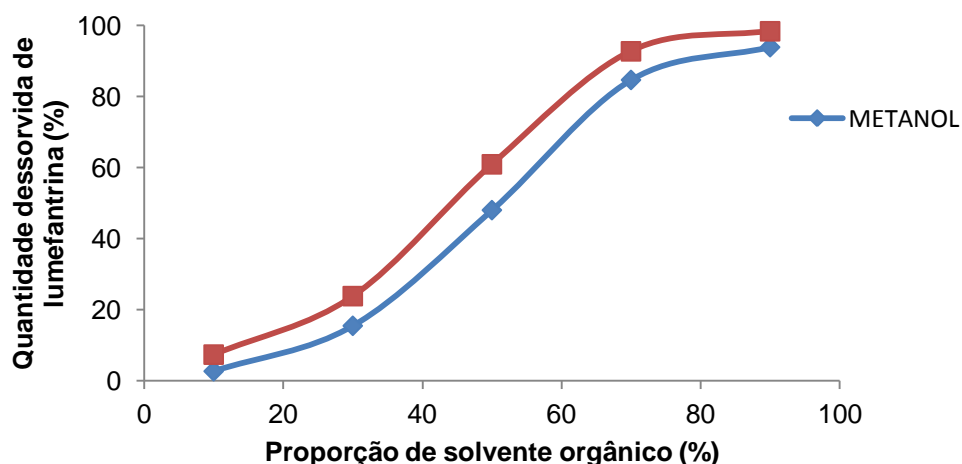
O pH demonstrou ser o parâmetro que menos influenciou na sorção dos fármacos, fortalecendo a hipótese de que as interações entre lumefantrina (e halofantrina) e 2-VP não ocorrem por ligações de hidrogênio, mas sim por interações entre dipolos e interações hidrofóbicas. Experimentalmente, observou-se que o emprego de pH básico é prejudicial ao formato do pico, aumentando sua assimetria, porque parte do fármaco encontrar-se-á na forma não ionizada e parte na forma ionizada. Em contrapartida, pH mais ácidos produzem picos mais simétricos, corroborando o que se observou durante otimização do método bioanalítico. Desse modo, definiu-se solução metanólica de ácido trifluoroacético a 0,01%, de pH igual a aproximadamente 3,5, como solução diluente para o preparo de amostras. A **Tabela 63** apresenta as condições de extração otimizadas para a etapa de preparo de amostras.

**Tabela 63 – Condições otimizadas para a etapa de extração de lumefantrina a partir de plasma humano**

Variável	Condição otimizada
pH aparente do diluente	7,0
Quantidade de polímero (mg)	60
Força centrífuga relativa (g)	800
Volume de amostra (µL)	500

Para definição de soluções ideais para limpeza e remoção de interferentes e para dessorção dos analitos de interesse, lumefantrina e halofantrina, foram testadas misturas de metanol ou acetonitrila e TFA 0,05%, determinando-se os percentuais de dessorção para cada solução após extração dos analitos em solução. Os resultados, expressos como quantidades percentuais dessorvidas, foram plotados em gráficos em relação às proporções de solvente orgânico, para metanol e acetonitrila, conforme **Figura 49**.

**Figura 49 – Dessorção de lumefantrina de cartuchos MISPE em função da proporção de metanol ou acetonitrila**



Pela análise do gráfico, observa-se que quantidades pequenas de solvente orgânico foram suficientes para dessorver a lumefantrina. Como a solubilidade do fármaco em acetonitrila é superior à sua solubilidade em metanol, os percentuais de dessorção foram mais pronunciados para misturas contendo acetonitrila, quando comparados em uma mesma proporção. Optou-se, portanto, por uma solução composta por 10% de metanol e 90% de TFA 0,05% como solução de limpeza, para remoção de interferentes, pois, entre as soluções testadas, foi a que apresentou dessorção menor do que 5%, igual a 2,78%, enquanto para uma mistura de acetonitrila e TFA 0,05% (10:90, v/v)



dessorveu 7,45% de lumefantrina, considerado inadequado. Proporções maiores de metanol dessorveram mais que 15%, não podendo, portanto, ser empregadas na etapa de *clean up*. Já para a solução de dessorção, escolheu-se, entre as soluções testadas, a que apresentou dessorções mais elevadas, preferencialmente muito próximas a 100%. Inicialmente, selecionou-se mistura de acetonitrila e TFA 0,05% (90:10, v/v) como solução para dessorção, por ter apresentado o maior percentual encontrado, de 98,35%. Em seguida, realizou-se o teste de dessorção para a fase móvel empregada no método bioanalítico, uma mistura de metanol, acetonitrila e TFA 0,05% a 50:33:17,(v/v/v), encontrando resultado de 98,17%, muito próximo ao anterior. Considerando que o ideal é que as soluções analíticas sejam preparadas na própria fase móvel, para se obter picos com formatos mais desejáveis (estreitos, altos e simétricos), e que a fase móvel mostrou-se tão eficaz para dessorção de acetonitrila quanto uma mistura de acetonitrila e TFA 0,05% (90:10 v/v), definiu-se a própria fase móvel como solução para dessorção, eliminando necessidade de etapas de evaporação de solvente e ressuspensão de amostra.

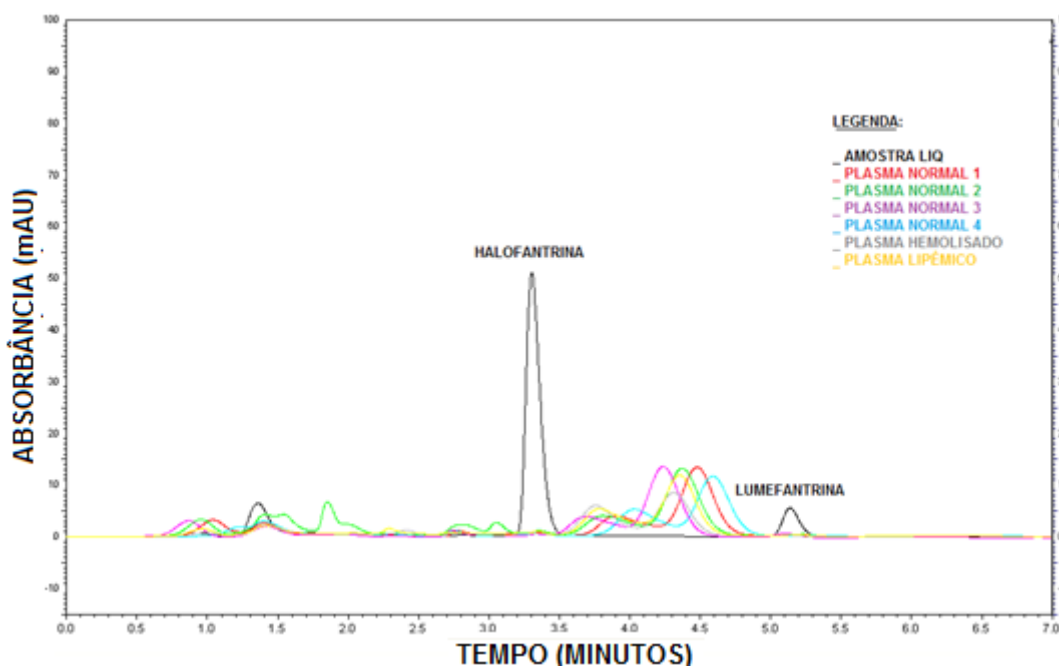
### **5.5.3 Validação do método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano empregando CLAE-UV e MISPE como etapa de preparo de amostras**

#### **5.5.3.1 Seletividade**

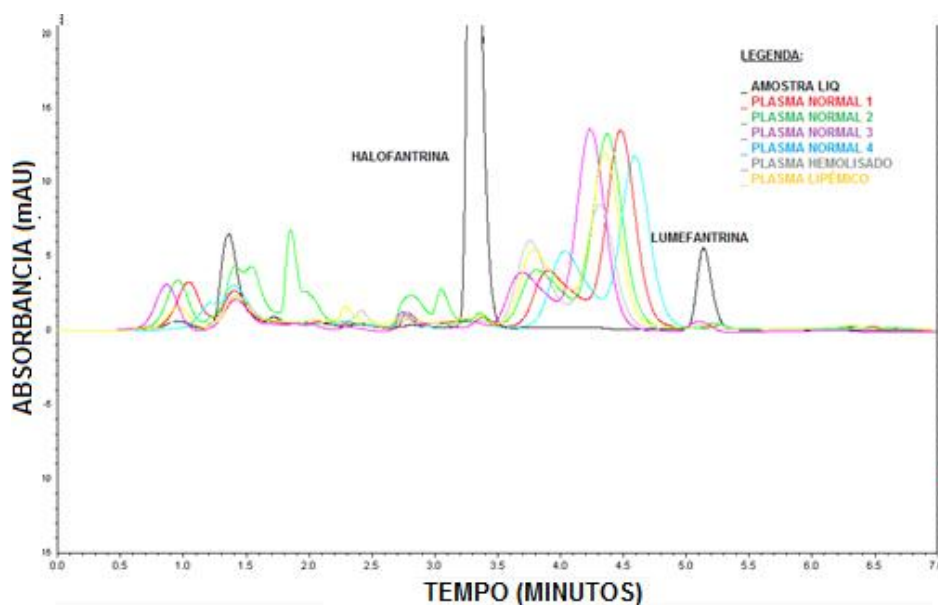
Os cromatogramas desenvolvidos para 6 amostras de plasma branco, sendo 4 amostras normais, uma hemolisada e uma lipêmica, foram sobrepostos ao cromatograma para amostras LIQ, para identificação de picos interferentes eventualmente presentes no plasma, como proteínas, lipídeos, sais inorgânicos e outros interferentes, como cafeína e fármacos. Os cromatogramas sobrepostos estão ilustrados na **Figura 50**. Um *zoom* na porção inferior dos cromatogramas sobrepostos foi realizado para facilitar a visualização de picos interferentes nos tempos de retenção de analito e PI (**Figura 51**). A inspeção visual dos cromatogramas sobrepostos indica que a maior parte dos picos interferentes aparece próximo ao tempo morto ou entre os picos de

lumefantrina e halofantrina. Foram observados, entretanto, pequenos picos interferentes nos tempos de retenção de analito e PI, em maiores ou menores intensidades, comuns a 6 amostras de plasma branco .

**Figura 50 – Cromatogramas de amostras de plasma normal, hemolisado e lipêmico sobrepostos ao cromatograma para amostra LIQ, para avaliação da seletividade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**



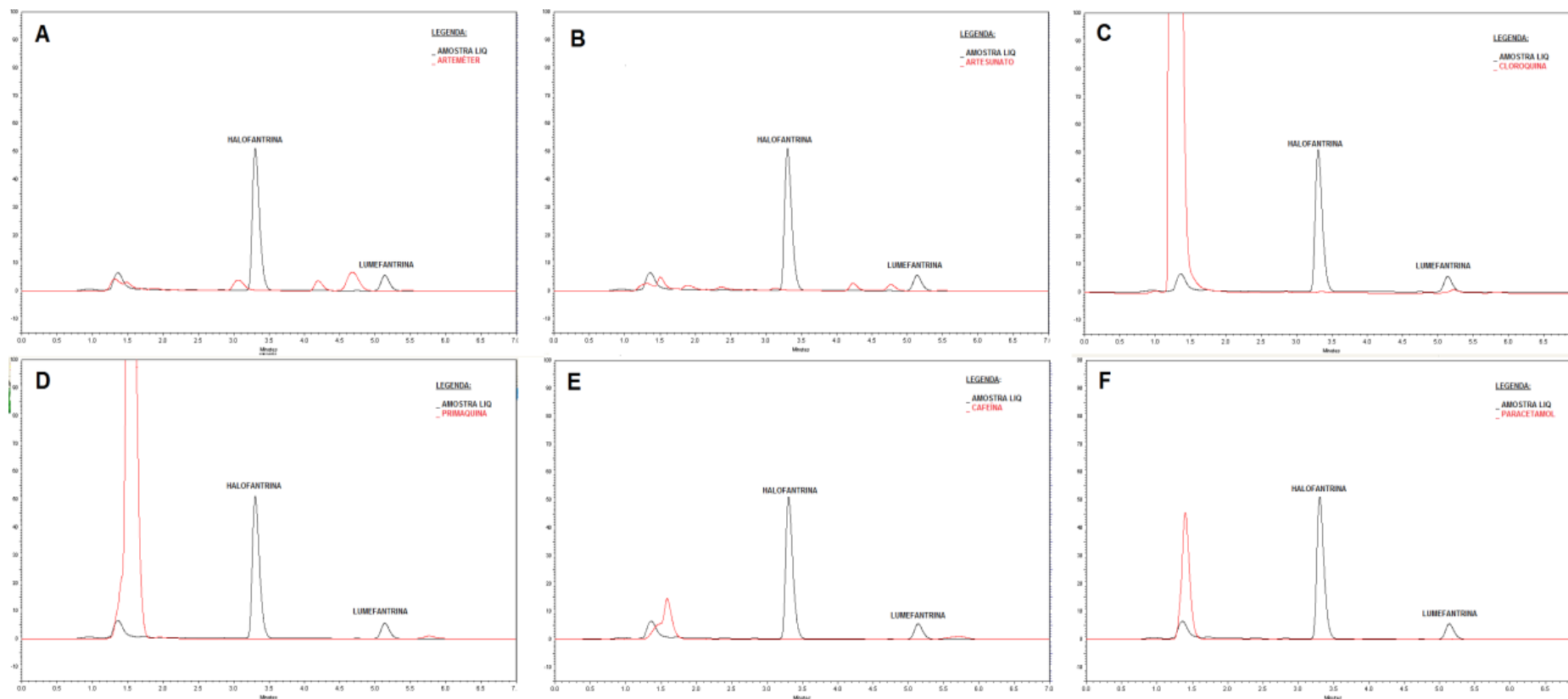
**Figura 51 – Ampliação dos cromatogramas de amostras de plasma normal, hemolisado e lipêmico sobrepostos ao cromatograma para amostra LIQ, para avaliação da seletividade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**



Os percentuais de resposta dos picos interferentes nos tempos de retenção de analito e PI foram determinados para as amostras de plasma branco, em relação às áreas encontradas para analito e PI na amostra LIQ. Em relação aos interferentes no tempo de retenção da lumefantrina, foram encontrados percentuais de interferência entre 2,86 e 6,15%; para os interferentes no tempo de retenção da halofantrina, os percentuais se estenderam da faixa de 0,56 a 1,38%. Em ambos os casos, as maiores interferências foram observadas para a amostra de plasma normal 3, enquanto as menores interferências foram verificadas para a amostra hemolisada. Como em nenhuma das amostras de plasma nenhum dos picos interferentes apresentou área superior a 20,0% em relação à resposta para a lumefantrina e superior a 5,0% em relação à resposta da halofantrina, nas amostras LIQ, a seletividade do método foi confirmada.

Adicionalmente, a seletividade do método bioanalítico foi avaliada frente a outros antimaláricos, como arteméter, artesunato, cloroquina e primaquina, frente a cafeína e frente ao analgésico de uso livre paracetamol, prováveis interferentes em amostras de voluntários que fizerem administração do medicamento. Os cromatogramas para cada substância foram sobrepostos ao cromatograma obtido a partir da amostra LIQ (**Figura 52**). Não foram identificados picos interferentes nos tempos de retenção do analito e PI nos cromatogramas obtidos para paracetamol, cafeína e primaquina. Já para o cromatograma desenvolvido para a cloroquina, embora o pico principal, referente ao fármaco, elua antes do tempo morto, um interferente foi identificado no tempo de retenção da lumefantrina. Contudo, a área desse pico interferente correspondeu somente a 3,97% da área do pico de lumefantrina obtida para a amostra LIQ, muito abaixo dos 20,0% permitidos. Comportamento semelhante ocorreu para os cromatogramas de arteméter e artesunato: os picos referentes aos fármacos não eluíram nos tempos de retenção de analito e PI, mas picos secundários interferentes no tempo de retenção da halofantrina foram observados, mas apresentaram resposta inferior aos 5,0% permitidos pela normatização (iguais a, respectivamente, 0,33 e 0,41%).

Figura 52 – Cromatogramas para antimaláricos, paracetamol e cafeína sobrepostos ao cromatograma para amostra LIQ, para avaliação da seletividade de método analítico para determinação de lumefantrina em plasma humano



A: cromatograma para arteméter; B: cromatograma para artesunato; C: cromatograma para cloroquina; D: cromatograma para primaquina; E: cromatograma para cafeína; F: cromatograma para paracetamol.

### 5.5.3.2 Efeito residual ou efeito de *carryover*

Para avaliação do efeito residual, também denominado *carryover*, sobrepôs-se os cromatogramas obtidos para 3 amostras de plasma normal, uma avaliada antes e duas após uma injeção de amostra LSQ, com o cromatograma para uma amostra LIQ. Procedeu-se à inspeção visual dos cromatogramas sobrepostos, para investigação do aparecimento ou aumento de picos interferentes nos tempos de retenção para analito e PI, que seria causado por contaminação proveniente de amostras anteriores. Os cromatogramas sobrepostos estão ilustrados na **Figura 53**, enquanto um *zoom* na porção inferior dos cromatogramas sobrepostos foi realizado para favorecer uma melhor visualização de prováveis interferentes (**Figura 54**).

Uma análise visual dos cromatogramas mostrou que não houve aparecimento ou aumento do pico nos tempos de retenção referentes ao analito e PI. Os picos interferentes observados haviam sido observados anteriormente, na avaliação da seletividade. Embora os sinais dos interferentes pareçam grandes, cabe ressaltar que a lumefantrina se encontra no limite inferior de quantificação. Foram determinadas as áreas desses picos interferentes e os percentuais de interferência, iguais a 2,87 e 1,71% não superaram os limites de 20,0% da resposta do analito e 5,0% da resposta do PI, em relação à amostra LIQ. Com isso, confirma-se que não há efeito residual no método, isto é, a solução de lavagem da agulha do autoinjeter e do *loop* do equipamento, que consiste em uma mistura de metanol e água ultrapura (80:20 v/v), mostrou-se adequada para o controle desse efeito.

Figura 53 – Cromatogramas de amostras de plasma normal analisados antes e após injeções de amostra LQS com o cromatograma para amostra LIQ, para avaliação do efeito residual de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano

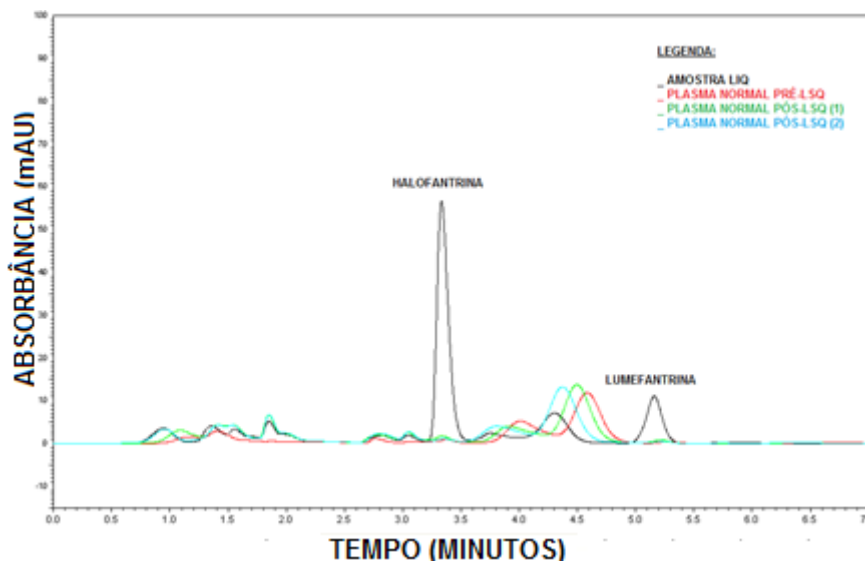
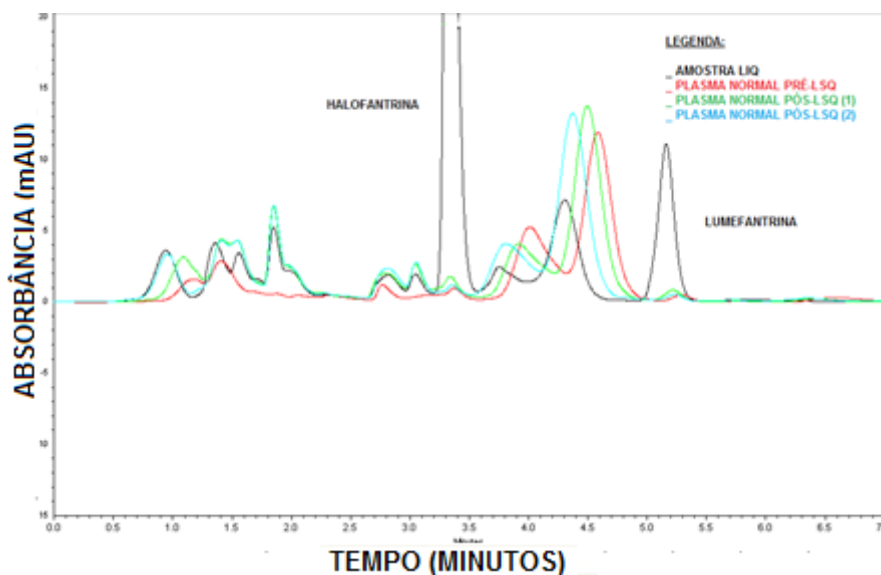


Figura 54 – Ampliação do cromatogramas de amostras de plasma normal analisados antes e após injeções de amostra LQS com o cromatograma para amostra LIQ, para avaliação do efeito residual de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano



### 5.5.3.3 Efeito de matriz

O ensaio para avaliação do efeito matriz se realizou pela determinação do fator de matriz normalizado (FMN), comparando-se respostas para lumefantrina e halofantrina em amostras CQB e CQA em 8 amostras de plasma, sendo 4 amostras de plasma normal, 2 amostras hemolisadas e 2 amostras lipêmicas com respostas para analito e PI em solução. Os resultados encontrados para FMN e para CV para amostras CQB e CQA estão descritos na **Tabela 64**.

**Tabela 64 – Fatores de matriz normalizados e coeficientes de variação para avaliação do efeito matriz de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Tipo de amostra de plasma	Fator de matriz normalizado (FMN)	
	CQB	CQA
NORMAL 1	1,02	1,03
NORMAL 2	0,99	0,98
NORMAL 3	0,98	1,01
NORMAL 4	1,02	0,97
LIPÊMICO 1	1,03	0,98
LIPÊMICO 2	1,00	1,02
HEMOLISADO 1	1,04	1,05
HEMOLISADO 2	1,05	1,04
<b>MÉDIA</b>	1,02	1,01
<b>CV (%)</b>	2,41	2,99
<b>MÉDIA GERAL</b>	1,01	
<b>CV GERAL (%)</b>	2,64	

O método não apresentou efeito matriz significativo ou o efeito matriz apresentado foi adequadamente compensado pelo uso de um PI adequado, uma vez que o CV geral foi inferior ao limite aceitável de 15,0%. Não se pode afirmar, entretanto, que não há efeito matriz absoluto para o método, pois o FMN considera a capacidade que o PI apresenta de corrigir um possível efeito matriz sobre o analito, garantindo, portanto, precisão e exatidão adequadas. Os valores médios para FMNs e os coeficientes de variação encontrados para CQB e CQA foram muito similares, indicando que o efeito matriz é independente de variações nas concentrações empregadas. Os FMNs maiores que 1 provavelmente estão relacionados ao fato de que o MIP-24 possui maior afinidade pela lumefantrina do que pela halofantrina, levando a recuperações sutilmente superiores para o analito que para o PI. Os valores de FMN para

amostras de plasma normal, hemolisado e lipêmico não diferiram significativamente, indicando que o aumento do grau de hemólise ou lipemia não exerceram influência substancial para o efeito matriz do método.

#### 5.5.3.4 Recuperação

O parâmetro recuperação não é preconizado pela RDC nº. 27/2012 da ANVISA, tendo sido avaliada nesse trabalho segundo o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA. A recuperação foi determinada pela comparação de respostas de amostras preparadas em plasma branco, nos níveis CQB, CQM e CQA, com respostas para analito e PI em solução, em quintuplicata, sendo determinados os percentuais de recuperação, conforme **Tabela 65**.

**Tabela 65 – Recuperações de lumefantrina nos níveis CQB, CQM e CQA para avaliação de recuperação de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Replicata	Recuperação (%)		
	CQB	CQM	CQA
1	86,18	84,55	84,16
2	84,81	85,01	83,82
3	87,12	82,94	82,79
4	84,08	83,77	83,98
5	84,93	83,43	83,67
<b>MÉDIA</b>	85,42	83,94	83,68
<b>CV (%)</b>	1,42	1,00	0,64

Os percentuais de recuperação de lumefantrina encontrados variaram entre 83,68 e 85,42%, superando os resultados encontrados pela maioria dos outros autores para lumefantrina. Considerando apenas os trabalhos que empregaram SPE, associada ou não a uma etapa de PPT, os resultados encontrados para o método por MISPE-CLAE-UV foram superiores aos encontrados por Lindegardh *et al.* (2005), Blessborn *et al.* (2007), Blessborn *et al.* (2010) e Sethi *et al.* (2011) e particularmente similares aos encontrados por Annenberg *et al.* (2005), empregando C<sub>8</sub> como fase estacionária. Os resultados podem ser considerados muito altos e, portanto, satisfatórios, pois não são necessárias recuperações próximas a 100%, apenas que o método apresente recuperação constante e reprodutível. Uma grande proximidade entre as recuperações e os baixos coeficientes de variação encontrados para os 3 níveis de concentração



comprovam que o procedimento de preparo de amostras por MISPE e, conseqüentemente, o polímero sintetizado, são capazes de fornecer resultados reprodutíveis e precisos por toda a faixa linear estudada. Conforme esperado, maiores CV foram encontrados para concentrações mais baixas.

### 5.5.3.5 Curva de calibração (linearidade)

Foram construídas 3 curvas de calibração independentemente, no intervalo de 50 a 10000 ng/mL para lumefantrina, mantendo-se fixa a concentração de halofantrina, a 2000 ng/mL. Os resultados, expressos como a razão entre a área do pico do analito por área do pico de PI, foram plotados em relação a concentração do analito, em gráficos de dispersão para cada curva, sendo obtidas ainda equações da reta e desvios em relação à concentração nominal. Primeiramente, os dados foram avaliados segundo Souza e Junqueira (2005) para linearidade, incluindo investigação e exclusão de *outliers* e verificação das premissas de normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos, para modelo de regressão linear por MMOQ. Posteriormente, utilizou-se ANOVA para avaliação da significância da regressão e desvio da linearidade, para se determinar ajuste dos dados ao modelo linear. Esse procedimento foi importante, principalmente, para determinar se a variância dos erros era constante por toda a faixa contemplada para curva de calibração, de modo a se decidir se um fator de ponderação deveria ser empregado na regressão ou se um modelo matemático mais simples seria suficiente. Um resumo dos resultados encontrados se apresenta na **Tabela 66**.

**Tabela 66 – Avaliação das curvas de calibração conforme proposto por Souza e Junqueira (2005) para avaliação de linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

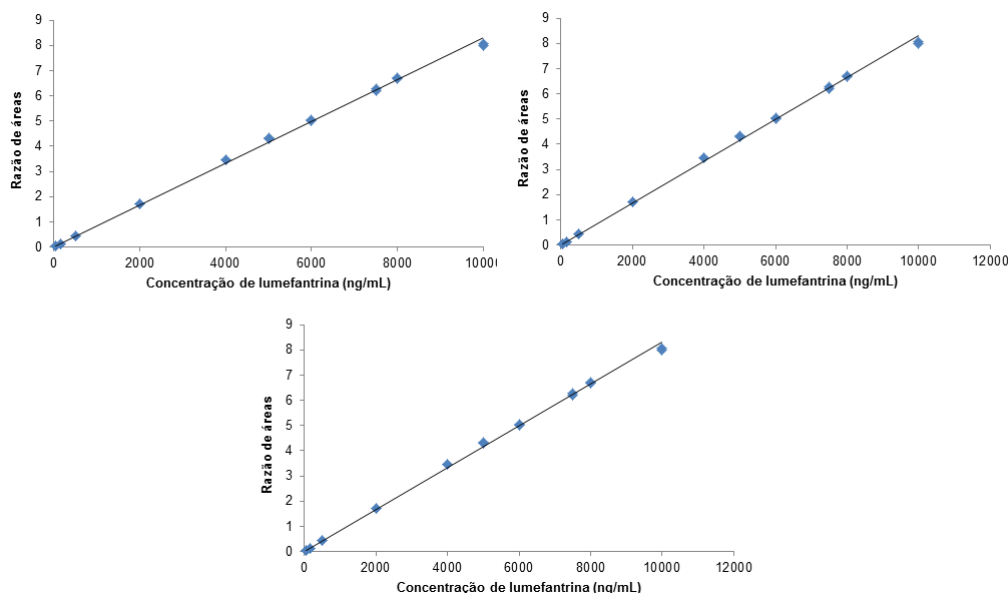
Parâmetro estatístico	Teste estatístico	Resultados		
		Curva Dia 1	Curva Dia 2	Curva Dia 3
Presença de <i>outliers</i>	Teste do resíduo padronizado de <i>Jackknife</i>	Sem <i>outliers</i> .	Sem <i>outliers</i> .	Sem <i>outliers</i> .
Normalidade	Teste de <i>Ryan-Joiner</i>	$R_{eq} = 0,9716$	$R_{eq} = 0,9837$	$R_{eq} = 0,9710$
Independência	Teste de <i>Durbin-Watson</i>	$d = 1,67$	$d = 1,54$	$d = 1,93$
Homocedasticidade	Teste de <i>Brown-Forsythe</i>	$p = 0,33$	$p = 0,42$	$p = 0,82$
Significância da regressão	ANOVA	$F = 9111$	$F = 14563$	$F = 39735$
Desvio da linearidade		$F = 2,46$	$F = 1,51$	$F = 0,19$

Não se identificou nenhum *outlier* em nenhuma das 3 curvas, pelo teste do resíduo padronizado de *Jackknife*. Confirmou-se que os resíduos seguem

distribuição normal, uma vez que os valores calculados para  $R_{e'q}$  foram maiores que o  $R_{crítico}$  de 0,9351. Para independência dos resíduos, os valores críticos para  $d_U$  e  $d_L$  foram determinados como 1,05 e 2,95, de modo que todos os valores calculados para a estatística de *Durbin-Watson* estiveram entre  $d_U$  e  $4-d_U$ , zona em que não há autocorrelação dos resíduos, havendo, portanto, independência. Já para a homocedasticidade, os valores de  $p$  superaram o nível de significância estabelecido de 0,05, não havendo, portanto, evidências para se rejeitar a hipótese nula, aceitando-se que os resíduos são homocedásticos. Com isso, não se fez necessário o uso de um fator de ponderação na regressão, adotando-se o modelo de regressão linear simples. Demonstrou-se que as regressões foram significativas para as 3 curvas, uma vez que os valores calculados para  $F$  foram muito superiores ao  $F_{crítico}$ , igual a 4,75, rejeitando-se a hipótese nula. Nenhuma das 3 curvas apresentou desvio de linearidade significativo, pois os valores de  $F$  calculados foram menores que o  $F_{crítico}$  de 3,84, não se rejeitando a hipótese nula. Com isso, prova-se que o modelo linear é o modelo mais adequado para descrever o conjunto de dados.

Em seguida, as 3 curvas foram plotadas individualmente em gráficos de dispersão, a partir das quais foram determinadas as equações da reta, concentrações experimentais e desvios em relação à concentração nominal, para confirmação da linearidade conforme preconizado pela RDC nº. 27/2012. Os gráficos de dispersão entre razão das áreas por concentração de lumefantrina são apresentados na **Figura 55**.

**Figura 55 – Curvas de calibração para lumefantrina, na faixa de 50 a 10000 ng/mL, para avaliação de linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**



Os parâmetros de regressão linear coeficiente angular, coeficiente linear, coeficiente de correlação ( $r$ ) e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) as equações da reta para as curvas de calibração são apresentados na **Tabela 67**. Os coeficientes de correlação e determinação foram superiores a 0,99 para as 3 curvas, indicando que mais que 99% da resposta medida se explica por variações na concentração do analito. Esse resultado demonstra ainda a qualidade do ajuste dos pontos à reta. Foram encontrados coeficientes angulares e lineares muito similares entre as 3 curvas, mesmo tendo sido preparadas em 3 dias diferentes e por analistas diferentes.

**Tabela 67 – Parâmetros de regressão para as 3 curvas de calibração na avaliação da linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Parâmetro	Resultados		
	Curva Dia 1	Curva Dia 2	Curva Dia 3
Coeficiente angular	0,000829 ± 0,042027	0,000808 ± 0,032346	0,000803 ± 0,019587
Coeficiente linear	0,001879 ± 0,000009	0,001788 ± 0,000007	0,001848 ± 0,000004
Coeficiente de correlação ( $r$ )	0,999342	0,999588	0,999849
Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	0,998685	0,999177	0,999698
Equação da reta	$y = 0,099509x + 0,000813$	$Y = 0,093919x + 0,000791$	$Y = 0,065893x + 0,000792$

Entretanto, os parâmetros determinados para linearidade são apenas informativos, tendo sido a linearidade avaliada prioritariamente pela análise dos desvios individuais das concentrações experimentalmente determinadas em relação à concentração nominal, conforme disposto na **Tabela 68**.

**Tabela 68 – Desvios em relação à concentração nominal para avaliação da linearidade de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Concentração nominal (ng/mL)	Curva Dia 1		Curva Dia 2		Curva Dia 3	
	Concentração medida (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração medida (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração medida (ng/mL)	Desvio (%)
50	57,89	15,77	56,72	13,45	55,03	10,06
50	56,95	13,91	57,49	14,97	54,34	8,68
500	538,44	7,69	535,80	7,16	528,04	5,61
500	537,13	7,43	530,85	6,17	531,41	6,28
2000	2047,08	2,35	2119,77	5,99	2127,72	6,39
2000	2041,23	2,06	2121,58	6,08	2121,85	6,09
4000	4170,40	4,26	4086,26	2,16	4031,53	0,79
4000	4154,67	3,87	4049,81	1,25	4081,76	2,04
6000	6102,17	1,70	6158,30	2,64	6023,15	0,39
6000	6037,57	0,63	6130,43	2,17	6063,58	1,06
8000	8114,46	1,43	7976,94	-0,29	7996,20	-0,05
8000	8067,66	0,85	7950,78	-0,62	7980,89	-0,24
10000	9746,19	-2,54	9763,56	-2,36	9822,09	-1,78
10000	9637,98	-3,62	9735,66	-2,64	9893,28	-1,07

A linearidade do método foi confirmada para o intervalo compreendido entre 50 e 10.000 ng/mL, para as 3 curvas, pois, para 100% dos pontos, os desvios não foram superiores a 20,0% para as amostras LIQ e ou a 15,0% para os demais níveis de concentração avaliados. Ademais, foram encontradas áreas para PI nas amostras zero muito parecidas às áreas encontradas para o PI nos outros níveis de concentração. Também não foram identificados quaisquer picos interferentes, nas amostras branco, que apresentassem áreas superiores a 20,0% da área referente ao pico de analito e a 15,0% da área referente ao pico de PI obtidas para amostras LIQ, nos respectivos tempos de retenção. Definiu-se 50 ng/mL como menor ponto da curva (limite de quantificação), pois a razão S/N se mostrou muito próxima a 10, de modo que concentrações menores não poderiam ser quantificadas com adequada precisão e exatidão.

### 5.5.3.6 Precisão e exatidão

Os parâmetros precisão e exatidão foram avaliados simultaneamente à curva de calibração, para amostras LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, analisadas em quintuplicata, em 3 corridas analíticas ocorridas em dias diferentes, por analistas diferentes. Os resultados para as concentrações experimentais determinadas, coeficientes de variação e erros padrão relativos encontrados para cada dia de análise se dispõem nas **Tabelas 69, 70 e 71** a seguir.

**Tabela 69 – Primeiro dia de avaliação da precisão e exatidão de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Replicata	Concentração determinada (ng/mL)				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	55,12	161,61	5334,17	7505,05	14879,87
2	59,48	158,34	5187,98	7621,33	14681,22
3	58,37	153,87	5087,90	7498,76	14699,80
4	55,77	164,33	5111,44	7614,18	15211,17
5	52,38	154,07	5041,88	7401,97	14801,38
<b>MÉDIA</b>	56,22	158,44	5152,67	7528,26	14854,69
<b>CV (%)</b>	4,98	2,90	2,22	1,21	1,45
<b>EPR (%)</b>	12,45	5,63	3,05	0,38	-0,97

**Tabela 70 – Segundo dia de avaliação da precisão e exatidão de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Replicata	Concentração determinada (ng/mL)				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	49,40	163,44	5289,32	7467,88	14566,80
2	53,48	158,71	5310,66	7340,40	14490,33
3	55,24	158,30	5202,50	7521,75	14500,45
4	55,54	152,97	5230,41	7509,92	14780,53
5	47,03	150,79	5087,41	7490,47	15001,87
<b>MÉDIA</b>	52,14	156,84	5224,06	7466,08	14668,00
<b>CV (%)</b>	7,21	3,20	1,68	0,98	1,50
<b>EPR (%)</b>	4,28	4,56	4,48	-0,45	-2,21

**Tabela 71 – Terceiro dia de avaliação da precisão e exatidão de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Replicata	Concentração determinada (ng/mL)				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	49,87	144,77	5000,15	7620,79	15887,40
2	47,58	143,96	4992,74	7396,34	15323,67
3	54,98	150,08	5100,93	7265,68	15060,41
4	47,13	150,32	5342,73	7379,11	15208,87
5	48,16	147,47	4978,60	7449,37	15243,05
<b>MÉDIA</b>	49,54	147,32	5083,03	7422,26	15344,68
<b>CV (%)</b>	6,48	1,99	3,01	1,75	2,07
<b>EPR (%)</b>	-0,91	-1,79	1,66	-1,04	2,30

Como previsto, as maiores dispersões e variações encontradas foram obtidas para as amostras de menor concentração (LIQ e CQB), que normalmente são susceptíveis a maiores variabilidades. O CQD, embora seja a amostra mais concentrada, apresentou variabilidade mais pronunciada quando comparada ao CQA e CQM por causa da etapa de diluição que precede seu processamento. Todavia, o método pode ser considerado preciso para quantificação de lumefantrina em plasma, pois os valores encontrados para CV nos 3 dias de análise foram inferiores a 20,0% para LIQ e a 15,0% para os controles de qualidade. Da mesma forma, o método apresentou adequada exatidão, uma vez que os EPR obtidos estão dentro da faixa de  $\pm 20,0\%$  em relação à concentração nominal para o LIQ e de  $\pm 15,0\%$  em relação à concentração nominal para as demais amostras.

### 5.5.3.7 Estabilidade dos analitos em matriz biológica

Determinou-se a estabilidade de lumefantrina e halofantrina em plasma por meio de estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração e estabilidade de pós-processamento, em triplicata, para amostras CQB e CQA. Os resultados médios de concentrações determinadas foram comparados às concentrações nominais, sendo usados para cálculo dos EPR, separadamente, conforme **Tabela 72**.

**Tabela 72 – Estabilidade de lumefantrina em plasma de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Nível	Replicata	ECC	ECD	ELD	EPP
		Concentração determinada (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)
CQB	1	143,87	146,76	142,24	155,25
	2	145,20	150,34	140,57	153,77
	3	144,23	145,89	143,84	152,34
	<b>MÉDIA</b>	144,54	148,55	141,41	154,51
	<b>EPR (%)</b>	-3,64	-0,97	-5,73	3,01
CQA	1	7544,37	7387,54	7287,66	7411,26
	2	7430,92	7353,72	7118,93	7383,44
	3	7427,45	7400,13	7203,39	7333,97
	<b>MÉDIA</b>	7467,58	7380,46	7203,33	7376,22
	<b>EPR (%)</b>	-0,43	-1,59	-3,96	-1,65

Todas as amostras empregadas apresentaram EPR determinados inferiores a 15,0%, de modo que nenhuma concentração determinada apresentou-se fora da faixa de  $\pm 15,0\%$  em relação à concentração nominal. Os maiores EPR encontrados ocorreram no ensaio de estabilidade de longa duração, para amostras CQB ou CQA, mas os EPR definidos, iguais a -5,73 e -3,96% ainda foram muito baixos. Esses resultados podem, inclusive, estar associados à própria variabilidade do método de preparo de amostras desenvolvido, uma vez que os resultados são muito similares aos resultados obtidos na avaliação da exatidão. Não há, por isso, forte indício de degradação na lumefantrina às condições analisadas, o que era esperado, pois a lumefantrina mostrou-se extremamente estável a condições muito mais drásticas durante a avaliação da seletividade do método analítico para quantificação desse fármaco em IFA.

Comprovou-se, portanto, que a lumefantrina é estável em plasma nas condições de análise e armazenamento de amostras. Durante a validação, nenhuma amostra foi submetida a mais que 3 ciclos de congelamento e descongelamento, foi mantida à temperatura ambiente por mais que 24 horas, mantidas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por mais de dias ou armazenadas na bandeja do autoinjeter por mais que 72 horas, o que garante a qualidade do estudo de estabilidade.

#### **5.5.3.8 Estabilidade dos analitos em solução (ES)**

Lumefantrina e halofantrina tiveram sua estabilidade avaliada para amostras, nas concentrações LIQ e LSQ, preparadas em solução. Tanto analito quanto PI mostraram-se estáveis, quando mantidas por 15 dias à temperatura ambiente ( $21 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), nos *vials* B, ou na geladeira ( $5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), nos *vials* C, uma vez que as variações das áreas dos picos para as amostras LIQ e LSQ em relação a amostras recém-preparadas foram sempre menores que 10,0%, conforme **Tabela 73**. Não se observou diferença considerável na estabilidade dos fármacos à temperatura ambiente ou na geladeira, pois as variações encontradas, além de muito baixas, foram muito próximas entre si.

**Tabela 73 – Estabilidade de lumefantrina e halofantrina em solução de método bioanalítico para determinação de lumefantrina em plasma humano**

Nível	Replicata	Vials A		Vials B		Vials C	
		Área LUMF (mAu.s)	Área HALO (mAu.s)	Área LUMF (mAu.s)	Área HALO (mAu.s)	Área LUMF (mAu.s)	Área HALO (mAu.s)
LIQ	1	20207	383407	19970	378070	20131	385400
	2	19985	383378	19688	380899	20198	383577
	3	20035	383412	19575	379404	21007	382975
	<b>MÉDIA</b>	20076	383399	19744	379458	20445	383984
	<b>Varição (%)</b>	–	–	-1,65	-1,03	1,84	0,15
LSQ	1	2988345	384570	2990218	380441	3029502	378522
	2	3020917	384496	3004545	379676	3017890	378667
	3	3020355	383984	2987665	379112	3016574	380233
	<b>MÉDIA</b>	3009872	384350	2994143	379743	3021322	379141
	<b>Varição (%)</b>	–	–	-0,52	-1,20	0,38	-1,36



## 6 CONCLUSÕES

- O insumo farmacêutico ativo lumefantrina foi devidamente caracterizado e padronizado para utilização nas etapas posteriores do estudo.
- Um protocolo de síntese de um polímero molecularmente impresso (MIP) utilizado na extração de lumefantrina em amostras de plasma humano foi otimizado por planejamento experimental Box-Benhken.
- É a primeira vez que um MIP foi desenvolvido para lumefantrina, tendo apresentado propriedades físico-químicas, seletividade e eficiência ideais para emprego no preparo de amostras de plasma humano por extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE).
- Método bioanalítico foi desenvolvido, otimizado por planejamento experimental Doehlert, e apropriadamente validado, segundo normatização específica, provando-se adequado para determinação de lumefantrina em plasma humano.
- O emprego de ferramentas quimiométricas, como planejamentos experimentais e metodologias de superfície de respostas, mostrou-se eficaz para otimização multivariada de parâmetros reacionais e respostas analíticas, de maneira racional, rápida e simples, por um número reduzido de testes.

## REFERÊNCIAS

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

ABDEL-REHIM, M.; DAHLGREN, M.; BLOMBERG, L.; CLAUDE, S.; TABACCHI, R. Microextraction in packed syringe (MEPS) utilizing methylcyanopropyl–silarylene as coating polymer for extraction of drugs in biological samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Milton Park, v. 29, p. 2537–2544, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Resolução da Diretoria Colegiada 64, de 28 de dezembro de 2012**. Publica a Lista das Denominações Comuns Brasileiras – DCB da Farmacopeia Brasileira. Brasília, 2012.

AHMADI, M.; VAHABZADEH, F. **Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation**. *Journal of Hazardous Materials*, Amsterdam, v. 123, n. 1-3, p. 187-195, 2005.

ALLENDER, C.J.; RICHARDSON, C.; WOODHOUSE, B.; HEARD, C.M.; BRAIN, K.R. Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.195, n.1-2, p. 39-43, 2000.

ALTUN, Z. et al. Drug screening using microextraction in a packed syringe (MEPS)/mass spectrometry utilizing monolithic-, polymer-, and silica-based sorbents. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 6, p. 829-840, 2006.

ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Molecularly imprinted polymers for drugs delivery. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.804, n.1, p.231-245, 2004.

AMGARTEN, D. R. **Determinação do volume específico de poros de sílicas cromatográficas por dessorção de líquidos em excesso**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ANDERSSON, L., PAPRICA, A., ARVIDSSON, T. A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting. **Chromatographia**, New York, v. 46, p. 57–62, 1997.

ANDERSSON, L.; SELLERGREN, B.; MOSBACH, K. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. **Tetrahedron Letters**, Amsterdam, v. 25, p. 5211-5214, 1984.

ANDERSSON, L. I. Selective Solid-Phase Extraction of Bio and Environmental Samples Using Molecularly Imprinted Polymers. **Bioseparation**, New York, v. 10, n. 6, p. 353-364, 2001.

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

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 877, p.2224-2234, 2009.

ARSHADY, R.; MOSBACH, K. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. **Macromolecular Chemistry and Physics**, New Jersey, v. 182, n. 2, p. 687-692, 1981.

AYDIN, O.; ATTILA, G.; DOGAN, A.; AYDIN, M.V.; CANACANKATAN, N.; KANIK, A. The effects of methyl methacrylate on nasal cavity, lung, and antioxidant system (an experimental inhalation study). **Toxicology Pathology**, New York, v.30, n.3, p.350-356, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

BELTRAN, A.; BORRULL, F.; CORMACK, P. A. G.; MARCÉ R. M. Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 29, p. 1363-1375, 2010.

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

BJARNASON, B.; CHIMUKA, L.; RAMSTROM, O. On-line solid phase extraction of triazine herbicides using a molecularly imprinted polymer for selective sample enrichment. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 71, n. 11, p. 2152-2156, 1999.

BLESSBORN, D.; ROEMSING, S.; ANNERBERG, A.; SUNDQUIST, D.; BJOERKMAN, A.; LINDEGARDH, N.; BERGQVIST, Y. Development and validation of an automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method for determination of lumefantrine in capillary blood on sampling paper. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 45, p. 282-287, 2007..

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

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

BLOMGREN, A.; BERGGREN, C.; HOLMBERG, A.; LARSSON, F.; SELLERGREN, B.; ENSING, K. **Extraction of clenbuterol from calf urine using a molecularly imprinted polymer followed by quantitation by high-performance liquid chromatography with UV detection.** Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 975, n. 1, p. 157-164, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária.** Colaboração de Agostinho Marques. Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência**, 1ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2002.

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, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 7ª Edição. Brasília, 2009, Caderno 10, p. 31-54.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil.** Brasília, 2010, 38 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 27, de 17 de maio de 2012. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.** Diário Oficial da União, Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico.** Volume 44, nº. 1. Brasília, 2013. 16 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário Terapêutico Nacional 2014: Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais (RENAME) 2014.** 9ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Consulta Pública nº. 129.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2016.

BRERETON, R.G. Chemometrics: **Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant.** New York: John Wiley & Sons, 2003. 489 p.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L.. **GOODMAN & GILMAN: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 11ª edição. Porto Alegre: AMGH, 2010. 1844 p.

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

CAMARGO, L. F. R.; MOREIRA, V.; VACCARO, G. L. R. Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos no desenvolvimento de

novos produtos em uma empresa de saneantes. **Estudos Tecnológicos**, Bauru, v. 5, n. 3, p. 404-420, 2009).

CANDIATI, L. V.; DE ZAN, M. M.; CÂMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, Amsterdam, v. 124, p. 123-138, 2014.

CANDISH, E; GOLEY, A.; WIRTH, H. J.; DAWES, P. A.; SHELLIE, R. A.; HILDER, E. F. A simplified approach to direct SPE-MS. **Journal of Separation Science**, New Jersey, v. 35, n. 18, p. 2399-2406, 2012.

CARO, E.; MARCE, R.M; BORRULL, F. Application of molecularly imprinted polymers to solid phase extraction of compounds from environmental and biological samples. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, p. 143-153, 2006.

CARVALHO, M. T. B. R. S. Preparação de materiais de impressão molecular para fármacos e a sua aplicação em técnicas de extração miniaturizada *lab-on-valve*. 2012. 126 f. **Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2012.**

CASSIANO, N. M.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 384, n. 7-8, p. 1462-1469, 2006.

CENNI, B.; MEYER, J.; BRANDT, R.; BETSCHART, B. The antimalarial drug halofantrina is mainly bound to low and high density lipoproteins in human serum. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 519-526, 1995.

CÉSAR, I. C. **Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano**. 2009. 273 f. Tese (Doutorado 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**, Amsterdam, v. 54, p. 114-120, 2011.

CHANG, M.S.; JI, Q.; ZHANG, J.; EL-SHOUBAGY, T.A. Historical Review of Sample Preparation for Chromatographic Bioanalysis: **Pros and Cons. Drug Development Research**, Chicago, v. 68, n. 3, p. 107-133, 2007.

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

COMARCK, P. A.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 804, n. 1, p. 173-182, 2004.

CUI, L.; MHARAKURWA, S.; NDIAYE, D.; RATHOD, P. K.; ROSENTHAL, P. J. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 93, n. 3, p. 57-68, 2015.

CURYLO, J.; WARDENCKI, W.; NAMIESNIK, J. Green aspects of sample preparation - a need for solvent reduction. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v. 16, n. 1, p. 5-16, 2007.

DA MATA, K. **Preparo e aplicação de poliacrilamida molecularmente impressa como adsorvente de glifosato e AMPA**. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2014.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica**. 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2008, 944 p.

DERRINGER, G; SUICH, R.; Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, Milwaukee, v. 12, n.4, p. 214-219, 1980.

DEVANSHU, S.; RAHUL, M.; ANNU, G.; KISHAN, S.; ANROOP, N. Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS: A Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**. Delhi, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2010.

DICKEY, F.H. The preparation of specific adsorbents. Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, v.35, n.5, p.227-229, 1949.

DOEHLERT, D. H. Uniform Shells Design. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 19, n. 3, p. 231-239, 1970.

DZYGIEL, P.; O'DONNELL, E.; FRAIER, D.; CHASSAING, C.; CORMACK, P. A. G. Evaluation of water-compatible molecularly imprinted polymers as solid-phase extraction sorbents for the selective extraction of sildenafil and its desmethyl metabolite from plasma samples. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 853, p. 346–353, 2007.

EL-GINDY, A.; HADAD, G. M. Chemometrics in Pharmaceutical analysis: an introduction, review, and future perspectives. **Journal AOAC International**, Rockville, v. 95, n. 3, p. 609-623, 2012.

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

EZZET, F.; VAN VUGT, M.; NOSTEN, F.; LOAAREESUWAN, S.; WHITE, N. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lumefantrine (benflumetol) in acute falciparum malaria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda, v. 44, n. 3, p. 697-704, 2000.

FERNANDES, R. M. T. **Polímeros de Impressão Molecular para Extração Seletiva de Fármacos em Matrizes Biológicas e Determinação por LC-MS/MS e MS/MS**. 2012. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2012.

FERNANDES, C.; SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; ALVES, C. LANÇAS, F. M. Solid-phase microextraction–liquid chromatography (SPME–LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 847, p. 217–223, 2007.

FERNANDES, J. C. B. **Função de desejabilidade na qualidade do biodiesel a partir de misturas de biodieseis de mamona e amendoim**. 2016. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 597, p. 179-186, 2007.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, p. 361-375, 2008.

FIGUEIREDO, E. C. **Emprego de Polímeros de Impressão Molecular (MIP) na Extração e Pré-concentração de Analitos Orgânicos em Amostras Biológicas seguido de Determinação Espectrofotométrica**. 2009. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Brasil. 2009.

FIUME, M.Z. Final report on the safety assessment of acrylates copolymer and 33 related cosmetic ingredients. **International Journal of Toxicology**, New York, v.21, n.3, p.1-50, 2002.

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

FREITAS, M. B. **Polímeros de Impressão Molecular no Preparo de Amostras por Extração em Fase Sólida na Determinação Cromatográfica de Amitriptilina e Nortriptilina em Plasma**. 2008. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brasil, 2008.

GALDAMEZ, E. V. C. **Aplicação de técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. 2002. 133f. Tese (Mestre em Engenharia de Produção) – Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

GÁZQUEZ, D.; SÁNCHEZ-VIÑA, M.; GRACIA BRAGUR, M.; GARCÍA, G. Application of Doehlert designs in the optimization of experimental variables

associated with the simultaneous solvent extraction metals. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 13, p. 105-108, 1998.

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

GRANADO, V. L. V. Polímeros Molecularmente Impressos para a Determinação da Difenilamina. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Qualidade) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2011.

GRASSI, V. **Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo**. 2008. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 2008.

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

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W. L.; FORD, N.; WHITE, N. J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 9, p. 564-573, 2002.

HAGINAKA, J. Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 866, p. 3-13, 2008.

HARRINGTON, E. C. J. The Desirability Function. **Industrial Quality Control**, Milwaukee, v. 21, n. 10, p. 494-498, 1965.

HODEL, E. M.; ZANOLARI, B.; MERCIER, T.; BIOLLAZ, J.; OLLIARO, P.; GENTON, B.; DECOSTERD, L. A. A single LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 14 antimalarial drugs and their metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, v. 877, p. 867-886, 2009.

HOPFGARTNER, G.; BOURGOGNE, E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 22, n. 3, 195-214, 2003.

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

HUGON-CHAPUIS, F.; MULLOT, J. U.; TUFFAL, G.; HENNION, M. C.; PICHON, V. Selective and automated sample pretreatment by molecularly imprinted polymer for the analysis of the basic drug alfuzosin from plasma. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1196–1197, p. 73–80, 2008.



HWANG, C. C.; LEE, W. C. Chromatographic resolution of the enantiomers of phenylpropanolamine by using molecularly imprinted polymer as the stationary phase. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 765, n. 1, p. 45-53, 2001.

INTERNATIONAL Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of Analytical Procedures: Methodology – Q2B**. Geneva, 1996.

JAHAN, A.; ISMAIL, M. Y.; NOOROSSANA, R. Multi response optimization in design of experiments considering capability index in bounded objectives method. **Journal of Scientific & Industrial Research**, Delhi, v. 69, p. 11-16, 2010.

JAVANBAKHTA, M.; ATTARAN, A. M.; NAMJUMANESH, M. H.; ESFANDYARI-MANESHA, M.; AKBARI-ADERGANI, B. Solid-phase extraction of tramadol from plasma and urine samples using a novel water-compatible molecularly imprinted polymer. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 878, p. 1700-1706, 2010.

JODLBAUER, J.; MAIER, N. M.; LINDNER, W. Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 945, p. 45-63, 2002.

KATZ, A.; Davis, M. E. Investigations into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers. **Macromolecules**, Washington, v. 32, p. 4113-4121, 1999.

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

KHUDA, F.; IQBAL, Z.; SHAH, Y.; AHMMAD, L.; NASIR, F.; KHAN, A. Z.; SHAHBAZ, N. AMANULLAH. Method development and validation for simultaneous determination of lumefantrine and its major metabolite, desbutyl lumefantrine in plasma. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 919, p. 52-60, 2014.

KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 11, n. 11, p. 942-950, 2000.

KOLE, P. L.; VENKATESH, G.; KOTECHA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, New York, v. 25, n. 1-2, p. 199-217, 2011.

KOOHPAEI, A. R.; SHAHTAHERI, S. J.; GANJALI, M. R.; FORUSHANI, A. R.; GOLBABAEI, F. Application of multivariate analysis to the screening of

molecularly imprinted polymers (MIPs) for ametryn. **Talanta**, v. 75, n. 978-986, 2008.

KUBO, T.; HOSOYA, K.; WATABE, Y.; IKEGAMI, T.; TANAKA, N.; SANO, T.; KAYA, K. Oncolumn concentration of bisphenol A with one-step removal of humic acids in water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 987, p. 389-394, 2003.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004, 96 p.

LASÁKOVÁ, M.; JANDERA, P. Molecularly imprinted polymers and their application in solid-phase extraction. **Journal of Separation Sciences**, New York, v. 32, n. 5-6, p. 799-812, 2009.

LASAKOVÁ, M.; THIÉBAUT, D.; JANDERA, P.; PICHON, V. Molecularly imprinted polymer for solid-phase extraction of ephedrine and analogs from human plasma. **Journal of Separation Sciences**, New York, v. 32, p. 1036–1042, 2009.

LEE, C.; YI, S.; KIM, J.; LEE, Y.; KIM, B. Improved immobilized enzyme systems using spherical micro silica sol-gel enzyme beads. **Biotechnology and Bioprocess**, New York, v. 11, n. 4, p. 277-281, 2006.

LI, K. M.; RIVORY, L. P.; CLARKE, S. J. Solid-phase extraction (SPE) techniques for sample preparation in clinical and pharmaceutical analysis: A brief overview. **Current Pharmaceutical Analysis**, Sharjah, v. 2, n. 2, p. 95-102, 2006.

LI, X. R.; WANG, X. L.; KOSEKI, H. Study on thermal decomposition characteristics of AIBN. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 13-18, 2008.

LINDEGARDH, N.; ANNERBERG, A.; BLESSBORN, D.; BERGQVIST, Y.; WHITE, N. J.; DAY, N.. Development and validation of a bioanalytical method using automated solid-phase extraction and LC-UV for the simultaneous determination of lumefantrine and its desbutyl metabolite in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 37, p. 1081-1088, 2005.

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

MAGIERA, S. ; GULMEZ, S.; MICHALIK, A.; BARANOWSKA, I. Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed sorbent for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1304, p. 1-9, 2013.

MAHONY, J. O.; NOLANA, K.; SMYTHA, M. R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers: potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 534, p. 31-39, 2005.

MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. **LC-GC**, New York, v. 9, p. 16-20, 1991.

MANSOR, S. M.; WERNSDORFER, W. H.; NAVARATNAM, V.; YAHAYA, N. NAIR, N. K.; DEGEN, P. H. Determination of a new antimalarial drug, benflumetol, in blood plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical applications**, Amsterdam, v. 682, n. 2, p. 321-325, 1996.

MARTENSSON, A.; STROMBERG, J.; SISOWATH, C.; MSELLEM, M. I.; GIL, J. P.; MONTGOMERY, S. M.; OLLIARO, P.; ALI, A. S.; BJORKMAN, A. Efficacy of artesunate plus amiodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 41, n. 8, p. 1079-1086, 2005.

MARTIN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 370, n. 7, p. 795-802, 2001.

MAYES, A. G.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 3769-3774, 1996.

MENA, M. L.; AGUÍ, L.; MARTINEZ-RUIZ, P.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Molecularly imprinted polymers for on-line clean up and preconcentration of chloramphenicol prior to its voltammetric determination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, New York, v. 376, n. 1, p. 18-25, 2003.

MITRA, S. (Ed.). **Sample preparation Techniques in Analytical Chemistry**. 1 ed., v. 162, New Jersey: John Wiley & Sons, 2003, 473 p.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 8 ed. New York: Wiley, 2012, 757p.

MOSBACH, K. Molecular imprinting. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 19, p. 9-14, 1994.

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

NATAL, S. Emergência da resistência às drogas. **Boletim de Pneumonia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, 2002.

NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITO/R, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 12ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2012. 494 p.

NIESSEN, W.M.A. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry**. 3 ed. New York: Taylor and Francis Group, LLC, 2006. 602 p.

NTALE, M.; OGWAL-OKENG, J. W.; MAHINDI, M.; GUSTAFSSON, L. L.; BECK, O. A field-adapted sampling and HPLC quantification method for lumefantrine and its desbutyl metabolite in whole blood spotted on filter paper. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 876, p. 261-265, 2008.

OLIVEIRA, I. M. G.; DA SILVA, L. M.; SANTOS NETO, A. J.; FLORENZANO, F. H.; FIGUEIREDO, E. C. A new restricted access molecularly imprinted polymer capped with albumin for direct extraction of drugs from biological matrices: the case of chlorpromazine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, New York, v. 405, n. 24, p. 7687-7696, 2013.

OMARI, A. A.; GAMBLE, C.; GARNER, P. Artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria: a systematic review. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 192-199, 2004.

PARREIRAS, M. Com seis casos de malária confirmados, Diamantina tem surto de malária. **Estado de Minas**. Belo Horizonte, 4 jan. 2017. Disponível em: <[http://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2017/01/04/interna\\_gerais,837044/com-seis-casos-confirmados-diamantina-tem-surto-de-malaria.shtml](http://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2017/01/04/interna_gerais,837044/com-seis-casos-confirmados-diamantina-tem-surto-de-malaria.shtml)>. Acesso em 18 janeiro 2017.

PAULING, L.J. A Theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemistry Society**, Washington, v.62, n.10, p.2643-2657, 1940.

PAVANI, S.; RAO, Y. M.; KUMAR, Y. S. Use of Box-Behnken Experimental Design for Optimaztion of process Variables in Iontophoretic delivery of Repaglinide. **Journal of Young Pharmacists**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 350-355, 2016.

PEÇANHA, B. R. B. **Síntese de Polímeros de Impressão Molecular e sua Aplicação na Técnica de Extração em Fase Sólida**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) – Faculdade Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil, 2012.

PEÇANHA, B. R. B.; DIAS, L. R. S.; SPINELLI, E.; MURI, E. M. F. Polímeros de Impressão Molecular Obtidos Através de Polimerização por Precipitação e sua Aplicação na Técnica de Extração em Fase Sólida. **Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, p. 1-14, 2012.

PEREIRA, L. A. **Desenvolvimento de um método de extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) para a determinação de fenitrotona em tomate**. 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2010.

PÉREZ-MORAL, N.; MAYES, A. G. Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 504, p. 15-21, 2004.

PICHON, V.; HAUPT, K. Affinity Separations on Molecularly Imprinted Polymers with Special Emphasis on Solid-Phase Extraction. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Milton Park, v. 29, p. 989-1023, 2006.

PILETSKY, S. A.; ALCOCK, S.; TURNER, P. F. Molecular imprinting: all the edge of third millennium. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 9-12, 2001.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 785, n. 2, p. 263-275, 2006.

PORTAL DA SAÚDE. **Sistema de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/>>. Acesso em: 10 dezembro 2016.

PRADO, L. M. F. **Avaliação de diferentes tipos de fases estacionárias para separações rápidas em cromatografia líquida utilizando antidiabéticos orais como modelo**. 2013. 189 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PUOCI, F.; IEMMA, E.; MUZZALUPO, R.; SPIZZIRRI, U.G.; TROMBINO, S.; CASSANO, R.; PICCI, N. Spherical Molecularly Imprinted Polymers (SMIPs) via a Novel Precipitation Polymerization in the Controlled Delivery of Sulfasalazine. *Macromolecular Bioscience*, New York, v.4, n.1, p.22-26, 2004.

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

QIAO, F.; SUN, H.; YAN, H.; ROW, K. H. Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction. **Chromatographia**, New York, v. 64, p. 625-634, 2006.

RANI, S.; MALIK, A. K.; SINGH, B. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. **Journal of Separation Science**, New Jersey, v. 35, n. 3, p. 359- 366, 2012.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011. 410 p.

RIVELLI, G. G. **Estudo de dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada para avaliação de correlação *in vitro-in vivo***. 2016. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

SANDHYA, S. M.; SHIJI KUMAR, P. S.; MEENA, S. A sensitive liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of lumefantrine and

artemether in human plasma. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, Ayush, v. 5, n. 2, 2015.

SANTOS NETO, A. J.; RODRIGUES, J. C.; FERNANDES, C.; TITATO, G. M.; ALVES, C. LANÇAS, F. M. Automated microcolumn-switching system for drug analysis by direct injection of human plasma. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1105, p. 71–76, 2006.

SANTOS NETO, A. J. Como obter maior eficiência com partículas superficialmente porosas em HPLC. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 3, n. 1, p. 65-87, 2011.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; RAZAVI, N. Application of a molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques. **Trends In Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 73, p. 81-90, 2015.

SAVOIE, N.; BOOTH, B.P.; BRADLEY, T.; GAROFOLO, F.; HUGHES, N.C.; HUSSAIN, S.; KING, S.P.; LINDSAY, M.; LOWES, S.; ORMSBY, E.; PHULL, R.; ROCCI ML, J.R.; VALLANO, P.T.; VIAU, A.; ZHU, Z. The 2nd Calibration and Validation Group workshop on recent issues in good laboratory practice bioanalysis. **Bioanalysis**, London, v. 1, n. 1, p. 19-30, 2009.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. **Nota técnica da Diretoria de Vigilância Ambiental/Superintendência de Vigilância Epidemiológica Ambiental e Saúde do Trabalhador/Subsecretaria de Vigilância e Proteção a Saúde sobre a ocorrência de malária na região de Garimpo Areinha, Regional de Diamantina, Minas Gerais**, 2016.

SELLERGREN, B. Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, n. 9, p. 1578-1582, 1994.

SELLERGREN, B. (Ed.). **Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their application in analytical chemistry**. 2 ed. Elsevier: Amsterdam, 2003, 582 p.

SENA, A. R.; VALASQUES JUNIOR, G. L.; BARRETTO, I. K. S. P.; ASSIS, S. A. Application of Doehlert experimental design in the optimization of experimental variables for the *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) and *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) cell lysis. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 32, n. 4, 2012.

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

SILVA, R. G. C. **Materiais Sorventes Impressos Molecularmente Preparados por Processos Sol-Gel**. 2009, 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2009.

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

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997, 765 p.

SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controle da liberação de fármacos. Parte 1: Síntese e Caracterização. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1609-1619, 2009.

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

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

SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, p. 1779-1794, 2005.

SWEETMAN, S. C. (Ed.). **Martindale: The complete drug reference**. 34<sup>a</sup> edição. London: Pharmaceutical Press, 2005. P. 44-463.

TAMAYO, F. G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solidphase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1152, p. 32-40, 2007.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de Extração e Separação. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 1076-1086, 2005.

TAYLOR, P.J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 38, n. 4, p. 328-334, 2005.

TAYLOR, W. R.; WHITE, N. J. Antimalarial drug toxicity: a review. **Drug Safety**, New York, v. 27, p. 25-61, 2004.

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.

URBANOWICZ, M.; ZABIEGALA, B.; NAMIESNIK, J. Solventless sample preparation techniques based on solid- and vapour-phase extraction.

**Analytical and Bioanalytical Chemistry**, New York, v. 399, n. 1, p. 277-300, 2011.

VALCÁRCEL, M.; LENDLL, B. Analytical Chemistry at the interface between metrology and problem solving. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 8, p. 527-534, 2004.

VAS, G.; VEKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, New Jersey, v. 39, n. 3, p. 233-254, mar. 2004.

VASAPOLLO, G.; DEL SOLE, R.; MERGOLA, R.; LAZZOI, M. R.; SCARDINO, A.; SCORRANO, S.; MELE, G. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 9, p. 5908-5945, 2011.

VERMA, J. K.; SYED, H. A. Spectrophotometric Method for Determination of Lumefantrine in Pharmaceutical Formulations. **Journal of Pharmacy Research**, Amsterdam, v. 2, n. 9, p. 1550-1551, 2009.

VISWANATHAN, C.T.; BANSAL, S.; BOOTH, B.; DESTEFANO, A.J.; ROSE, M.J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V.P.; SKELLY, J.P.; SWANN, P.G.; WEINER, R. Workshop/Conference Report – Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. **Pharmaceutical research**, New York, v. 24, n. 10, p. 1962-1973, 2007.

XU, R.N.; FAN, L.; RIESER, M.J.; EL-SHOUBAGY, T.A. Recent advances in highthroughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 44, n. 2, p. 342- 355, 2007.

WAHAJUDDIN, M.; SINGH, S. P.; JAIN, G. K. Determination of lumefantrine in rat plasma by liquid-liquid extraction using LC-MS/MS with electrospray ionization: Assay development, validation and application to a pharmacokinetic study, **Journal of Chromatography B**, Amsterdam v. 877, p. 1133-1139, 2009.

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

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

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.



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

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria**. 2<sup>nd</sup> edition. Geneva, 2010. 188 p.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO Expert Committee on Malaria, **Guidelines for the treatment of malaria**, 3<sup>rd</sup> edition, Geneva, 317 p., 2015.

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

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

WULFF, G.; SARHAN, A. **Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung**. *Angewandte Chemie, Weinheim*, v. 84, n. 8, p. 364-x, 1972.

YE, L.; RAMSTROM, O.; ANSELL, R. J.; MANSSON, M. O.; MOSBACH, K. **Use of molecularly imprinted polymer in a biotransformation process**. *Biotechnology and Bioengineering, New York*, v. 64, n. 6; p. 650-655, 1999.

YE, L. (Ed.). *Molecular Imprinting: Principles and Applications of Micro- and Nano-structured polymers*. **Boca Raton: Taylor & Francis, 2013. 273 p.**

YOSHIMATSU, K.; REIMHULT, K.; KROZER, A.; MOSBACH, K. SODE, K.; YE, L. **Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization: the control of particle size suitable for different analytical applications**. *Analytica Chimica Acta, Amsterdam*, v. 584, n. 1, p. 112-121, 2007.

YOUNDEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of AOAC** – Association of Official Analytical Chemistry. Washington: AOAC, 1975. 88 p.

ZHOU, S.; SONG, Q.; TANG, Y.; NAIDONG, W. Critical review of development, validation, and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. **Current Pharmaceutical Analysis**, Oak Park, v.1, n. 1, p. 3-14, 2005.

**ANEXO – Protocolo de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de Minas Gerais.**



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

Projeto: CAAE – 54567716.4.0000.5149

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

**DECISÃO**

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

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

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