

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

FERNANDO HENRIQUE ANDRADE NOGUEIRA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS
ANTIMALÁRICOS ARTESUNATO E MEFLOQUINA

Belo Horizonte

2013

FERNANDO HENRIQUE ANDRADE NOGUEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS ANTIMALÁRICOS ARTESUNATO E
MEFLOQUINA**

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

ALUNO: Fernando Henrique Andrade Nogueira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira

CO-ORIENTADORA: Dra. Isabela da Costa César

Belo Horizonte

2013

N778d Nogueira, Fernando Henrique Andrade.
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a
quantificação dos antimaláricos artesunato e mefloquina / Fernando
Henrique Andrade Nogueira. – 2013.
172 f. : il.

Orientador: Gerson Antônio Pianetti.

Co-orientadoras: Renata Barbosa de Oliveira, Isabela da Costa
César.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

1. Antimaláricos – Teses. 2. Cromatografia líquida de alta
eficiência – Teses. 3. Artesunato – Teses. 4. Cloridrato de
mefloquina – Teses. 5. Validação de método – Teses. 6. Tecnologia
farmacêutica – Teses. I. Pianetti, Gerson Antônio. II. Oliveira,
Renata Barbosa. III. César, Isabela da Costa. IV. Universidade
Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.4

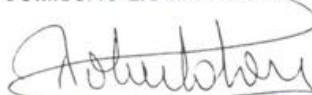
FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDO HENRIQUE ANDRADE NOGUEIRA

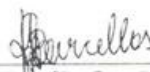
**"DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A
 QUANTIFICAÇÃO DOS ANTIMALÁRICOS ARTESUNATO E MEFLOQUINA"**

Tese, como requisito parcial para obter o título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em oito de julho de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Roberto Pontarolo - UFPR



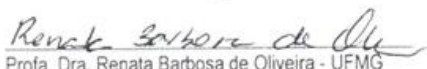
Prof. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos - UFOP



Prof. Dra. Josianne Nicácio Silveira - UFMG



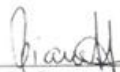
Prof. Dra. Maria Betânia de F. Marques - Faminas



Prof. Dra. Renata Barbosa de Oliveira - UFMG



Dra. Isabela da Costa César - UFMG



Prof. Dr. Gerson Antonio Pianetti - UFMG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ELE nada seria possível.

Ao Professor Gerson Antônio Pianetti que, mais uma vez, me possibilitou realizar este trabalho. Pela sua confiança, amizade e, principalmente, pelos vários ensinamentos.

À Professora Renata Barbosa de Oliveira pela co-orientação e colaboração no trabalho, especialmente, na avaliação do sal artesunato de mefloquina.

À Dra. Isabela da Costa César, pela co-orientação e colaboração no trabalho, especialmente, no desenvolvimento do método bioanalítico. Também, pela longa amizade e parceria.

À Professora Neila Márcia Silva Barcellos, Dra. Isabela da Costa César e Professor Ricardo José Alves pelas importantes contribuições ao meu exame de qualificação.

À Dra. Núbia Boechat, de Farmanguinhos, pela doação das amostras de MEFAS, excipientes do comprimido em dose fixa combinada e dos próprios comprimidos em dose fixa combinada para a realização deste trabalho. Também pelas discussões e contribuições ao trabalho.

Ao Gustavo Rodrigues Rezende, pela doação de amostras de plasma branco para a realização da validação do método bioanalítico. Também pela amizade e afinidade musical.

Ao Thiago Vinícius Costa Lara, estagiário do CEFET-MG no laboratório de Química Farmacêutica pela confecção dos espectros de MEFAS na região do infravermelho.

À Farmacopeia Brasileira, pelo apoio financeiro e principalmente pela inestimável oportunidade de aprendizado e crescimento profissional durante todos esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e CEDAFAR pela convivência diária, colaboração, troca de ideias e amizade desenvolvida neste período. Ao Luciano e Léo Marciano, pela convivência diária e amizade. Aos estagiários Naialy Reis, Camila Bretas e Nayara Lopes pela importante colaboração com este trabalho.

Ao Ricardo Byrro, chegado meu, pela colaboração neste trabalho e pela afinidade musical, representando a UBRI no meio acadêmico.

Aos meus amigos de pós-graduação Betânia e Guilherme. Percorremos este caminho juntos, nos apoiamos e vibramos com as nossas vitórias. Sou muito grato pela amizade de vocês.

À minha mãe, minha irmã, meus avós e minha família, pelo amor, incentivo e torcida que sempre tiveram por mim. Também à minha nova família de Muriaé, que me acolheu tão carinhosamente.

À Natália que, nesse período, de namorada tornou-se noiva e agora esposa, mas será para sempre meu amor, minha musa, minha música, minha vida.

“And in the end, the love you take
Is equal to the love you make”
(Lennon/Mccartney)

RESUMO

A malária é a doença parasitária mais importante do mundo, posicionando-se entre os maiores desafios para os países mais pobres na área de saúde e desenvolvimento. Estima-se que, em 2010, houve 216 milhões de casos de malária no mundo, sendo aproximadamente 81% dos casos na região africana. Também, estima-se que houve 655000 mortes causadas pela doença, das quais 91% ocorreram no continente Africano. Aproximadamente 86% das mortes causadas por malária foram em crianças com menos de 5 anos de idade. No Brasil, foram relatados ao Ministério da Saúde aproximadamente 330 mil casos da doença em 2010. A fim de prolongar a vida útil dos medicamentos, principalmente para retardar o aparecimento de resistência, o tratamento da infecção malárica é realizado utilizando-se combinações de medicamentos. Além disso, é necessário monitorar a concentração plasmática dos fármacos, correlacionando-a com a parasitemia. É recomendado, nos manuais de terapêutica da malária, a terapia combinada da artemisinina ou seus derivados com outros fármacos antimaláricos ou antibióticos. Neste estudo, foi avaliada a combinação entre artesunato e mefloquina na forma de sal e na em dose fixa combinada. Foi também desenvolvido e validado um método bioanalítico para a determinação de artesunato, diidroartemisinina (seu principal metabólito) e mefloquina em plasma humano. O sal artesunato de mefloquina (MEFAS) foi caracterizado quanto ao seu ponto de fusão, espectro na região do infravermelho e perfil cromatográfico, apresentando impurezas que não permitiram a sua utilização como matéria-prima farmacêutica. Um método analítico para a determinação de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos em dose fixa combinada foi desenvolvido e validado. Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, segundo a legislação vigente. Foi avaliada a estabilidade das soluções, sendo estas estáveis por, ao menos, 8 horas. Amostras de comprimidos de quatro lotes distintos foram analisadas utilizando-se o método desenvolvido e foram consideradas com teor de fármacos adequado. Um método bioanalítico para a determinação de artesunato, diidroartemisinina (metabólito do artesunato) e mefloquina em plasma foi desenvolvido e validado. Foi utilizada a espectrometria de massas acoplada à cromatografia a líquido para a detecção dos analitos. O método foi validado segundo a legislação vigente. Foram avaliados os parâmetros de seletividade, efeito residual (*carry over*), efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, e as estabilidades em matriz biológica, após ciclos de congelamento e descongelamento, de curta duração, pós-processamento e do analito e padrão interno em solução. O método bioanalítico desenvolvido se mostrou adequado, podendo ser utilizado em estudos de monitorização terapêutica.

Palavras-chave: Artesunato; Cloridrato de mefloquina; Diidroartemisinina; método analítico; comprimidos em dose fixa combinada; plasma humano; CLAE; CLAE-MS.

ABSTRACT

Malaria is the most important parasitic disease in the world, placing it among the biggest challenges for the poorest countries in the area of health and development. It is estimated that in 2010 there were 216 million cases of malaria worldwide, with approximately 81% of cases in the African region. Also, it is estimated that there were 655,000 deaths, 91% of which occurred on the African continent. Approximately 86% of deaths were caused by malaria in children under 5 years of age. In Brazil, were reported to the Ministry of Health about 330,000 cases of the disease in 2010. In order to prolong the life cycle of the drug, particularly for delaying the onset of resistance, the treatment of malaria infection is performed using drug combinations. Moreover, it is necessary to monitor the plasma concentration of the drugs, correlating it with parasitemia. It is recommended, in the therapeutic manuals of malaria, combination therapy of artemisinin or its derivatives with other antimalarial drugs or antibiotics. In this study, we evaluated the combination of artesunate and mefloquine in salt form and the fixed-dose combination. Also, a bioanalytical method was developed and validated for the determination of artesunate, dihydroartemisinin (artesunate's main metabolite) and mefloquine in human plasma. The salt artesunate mefloquine (MEFAS) was characterized as to its melting point, infrared spectrum and the chromatographic profile, with impurities that did not allow its use as pharmaceutical raw material. An analytical method for the determination of artesunate and mefloquine hydrochloride in fixed dose combination tablets was developed and validated. The parameters evaluated were selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness, according to current legislation. We evaluated the stability of the solutions, which remained stable for at least 8 hours. Samples of four different batches of tablets were analyzed using the developed method and presented adequate drugs content. A bioanalytical method for the determination of artesunate, dihydroartemisinin (metabolite of artesunate) and mefloquine in plasma was developed and validated. The detection was performed using liquid chromatography tandem mass spectrometry. The method was validated according to current legislation. The parameters evaluated were selectivity, residual effect (carry over), matrix effect, linearity, precision, accuracy, and stability in biological matrix, after cycles of freezing and thawing, short term, post-processing and in solution. The bioanalytical method developed is adequate and can be used in studies of therapeutic drug monitoring.

Keywords: Artesunate; Mefloquine hydrochloride; Dihydroartemisinin; analytical method; fixed-dose combination tablets; human plasma; HPLC; HPLC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> (SWEETMAN, 2009).	24
Figura 2 – Algoritmo de decisão para o aparecimento de resistência após falha do tratamento antimalárico.	30
Figura 3 – Fórmulas estruturais de fármacos utilizados no tratamento de malária.	33
Figura 4 – Representação esquemática do ciclo biológico dos plasmódios e indicação dos alvos de ação dos antimaláricos.....	34
Figura 5 – Fórmula estrutural do artesunato (FARMACOPEIA, 2010).	35
Figura 6 – Fórmula estrutural do cloridrato de mefloquina (FARMACOPEIA, 2010).	37
Figura 7 – Esquema da síntese e fórmula estrutural do artesunato de mefloquina (VAROTTI <i>et al.</i> , 2008).....	41
Figura 8 – Separação cromatográfica de duas substâncias (FARMACOPEIA, 2010).	51
Figura 9 – Pico cromatográfico assimétrico (FARMACOPEIA, 2010).	51
Figura 10 – Espectro na região do infravermelho do artesunato SQR.	53
Figura 11 – Espectro de referência do artesunato, obtido na região do infravermelho (THE INTERNATIONAL, 2006).	54
Figura 12 – Espectro na região do infravermelho do cloridrato de mefloquina SQR.	54
Figura 13 – Espectro de referência do cloridrato de mefloquina, obtido na região do infravermelho (THE JAPANESE, 2011).	55
Figura 14 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 004/08.	56
Figura 15 – Cromatograma obtido com a amostra MEFAS código 004/08, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 10 com detecção em 210 nm. O pico referente ao cloridrato de mefloquina está identificado como (MQ) e o pico referente ao artesunato está identificado como (AS).	57
Figura 16 – Expansão do cromatograma obtido com a amostra MEFAS código 004/08, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 10 e detecção em 210 nm. O pico referente à mefloquina está identificado como (MQ) e o pico referente ao artesunato está identificado como (AS).	58
Figura 17 – Nomógrafo utilizado para a substituição do solvente metanol (MeOH) por acetonitrila (ACN), mantendo-se a força eluente da fase móvel (SNYDER <i>et al.</i> , 1997).....	59
Figura 18 – Cromatograma obtido com a amostra MEFAS código 008/09A, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 11 com detecção em 210 nm. O pico referente	

ao cloridrato de mefloquina está identificado como (MQ) e o pico referente ao artesunato está identificado como (AS).....	60
Figura 19 – Cromatograma obtido com a amostra MEFAS código 008/09A, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 11 com detecção em 283 nm. O pico referente à mefloquina está identificado como (MQ).....	61
Figura 20 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em comprimento de onda de 210 nm, com a preparação contendo os excipientes do comprimido em dose fixa combinada (linha tracejada) e com a amostra de comprimidos de artesunato (AS) e cloridrato de mefloquina (MQ) (linha cheia).	73
Figura 21 –Curva analítica para a determinação de artesunato em comprimidos em dose fixa combinada com cloridrato de mefloquina.	74
Figura 22 – Representação gráfica da curva analítica para a determinação de cloridrato de mefloquina em comprimidos em dose fixa combinada com artesunato.	75
Figura 23 – Porcentagem remanescente das áreas sob os picos de artesunato (AS) e cloridrato de mefloquina (MQ) na solução amostra em função do tempo para avaliação da estabilidade dos analitos em solução.....	83
Figura 24 – Fórmulas estruturais das substâncias utilizadas como padrão interno arteméter (ATM) e indapamida (IND).	87
Figura 25 – Proposta de estrutura química para o íon produto m/z 267,1 obtido pela fragmentação de artesunato, diidroartemisinina e arteméter (CÉSAR, 2009).	98
Figura 26 – Espectros ESI(+) - MS de artesunato, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 403,057 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 267,074.	99
Figura 27 – Espectros ESI(+) - MS de diidroartemisinina, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 302,944 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 267,103.....	100
Figura 28 – Espectros ESI(+) - MS de arteméter, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 316,968 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 267,074.....	101
Figura 29 – Proposta de estrutura química para o íon produto m/z 361,2 obtido pela fragmentação de mefloquina.	102
Figura 30 – Espectros ESI(+) - MS de mefloquina, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 379,945 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 361,204.	103
Figura 31 – Espectros ESI(+) - MS de indapamida, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 366,805 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 131,800.	104

Figura 32 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma contendo artesunato (AS, 400 ng/mL), mefloquina (MQ, 1600 ng/mL), indapamida (IND, 1800 ng/mL), arteméter (ATM, 200 ng/mL) e diidroartemisinina (DHA, 400 ng/mL).	106
Figura 33 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma normal, para avaliação da seletividade do método.	109
Figura 34 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma lipêmico, para avaliação da seletividade do método.	110
Figura 35 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma hemolisado, para avaliação da seletividade do método.	110
Figura 36 –Gráfico de resíduos e curva analítica obtida para artesunato no primeiro dia de análise.....	112
Figura 37 – Gráfico de resíduos e curva analítica obtida para diidroartemisinina no primeiro dia de análise.	114
Figura 38 – Gráfico de resíduos e curva analítica obtida para mefloquina no primeiro dia de análise.....	116
Figura A.1 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 004/08.	136
Figura A.2 – Perfil cromatográfico da amostra 004/08.	136
Figura A.3 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 005/08.	137
Figura A.4 – Perfil cromatográfico da amostra 005/08.	137
Figura A.5 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 006/08.	138
Figura A.6 – Perfil cromatográfico da amostra 006/08.	138
Figura A.7 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 007/08.	139
Figura A.8 – Perfil cromatográfico da amostra 007/08.	139
Figura A.9 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 001/09S.	140
Figura A.10 – Perfil cromatográfico da amostra 001/09S.	140
Figura A.11 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 001/09S2.	141
Figura A.12 – Perfil cromatográfico da amostra 001/09S2.	141
Figura A.13 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 002/09.	142
Figura A.14 – Perfil cromatográfico da amostra 002/09.....	142
Figura A.15 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 004/09.	143

Figura A.16 – Perfil cromatográfico da amostra 004/09.....	143
Figura A.17 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 005/09.	144
Figura A.18 – Perfil cromatográfico da amostra 005/09	144
Figura A.19 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 008/09A.	145
Figura A.21 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 008/09B.	146
Figura A.23 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 009/10.	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema recomendado para o tratamento das infecções por <i>Plasmodium vivax</i> com comprimidos de cloroquina 150 mg em três dias e comprimidos de primaquina (infantil 5 mg e adulto 15 mg) em sete dias (BRASIL, 2010).....	27
Tabela 2 – Esquema recomendado para o tratamento das infecções por <i>Plasmodium falciparum</i> com comprimidos de dose fixa combinada de arteméter 20 mg e lumefantrina 120 mg em três dias e comprimidos de primaquina 15 mg em um dia (BRASIL, 2010).	28
Tabela 3 – Esquema recomendado para o tratamento das infecções por <i>Plasmodium falciparum</i> com comprimidos de dose fixa combinada de artesunato e cloridrato de mefloquina (25 mg + 55 mg infantil e 100 mg + 220 mg adulto) em três dias e primaquina 15 mg em um dia (BRASIL, 2010).	28
Tabela 4 – Principais fármacos antimaláricos organizados por grupo químico (SWEETMAN, 2009).	32
Tabela 5 – Parâmetros farmacocinéticos para diferentes apresentações de artesunato (Fonte: WHO, 2011a).....	36
Tabela 6 – Parâmetros farmacocinéticos para mefloquina (Fonte: WHO, 2011a).....	38
Tabela 7 – Condições cromatográficas para a determinação de artesunato em comprimidos, segundo a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010)	42
Tabela 8 – Condições cromatográficas para a determinação de cloridrato de mefloquina em comprimidos, segundo a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010).	43
Tabela 9 – Parâmetros para a detecção de arteméter, artesunato, diidroartemisinina e mefloquina por espectrometria de massas (HODEL <i>et al.</i> , 2009).....	45
Tabela 10 – Condições cromatográficas iniciais para a determinação de artesunato e mefloquina presentes no sal MEFAS.	49
Tabela 11 – Condições cromatográficas para a determinação de artesunato e mefloquina presentes no sal MEFAS.	49
Tabela 12 – Descrição, símbolos e fórmulas utilizados nos cálculos dos parâmetros cromatográficos (SNYDER <i>et al.</i> , 1997; THE UNITED, 2012).....	50
Tabela 13 – Valores de faixa de fusão medidos para diferentes amostras do sal MEFAS.	52
Tabela 14 – Tempos de retenção, fatores de retenção e relação dos picos cromatográficos obtidos em comprimento de onda de 210 nm para a amostra 004/08 do sal MEFAS.	59

Tabela 15 – Amostras de comprimidos de artesunato e cloridrato de mefloquina em dose fixa combinada utilizados no estudo.....	63
Tabela 16 – Excipientes utilizados na preparação do placebo para o comprimido de artesunato e cloridrato de mefloquina em dose fixa combinada.	65
Tabela 17 – Preparo das soluções de artesunato e cloridrato de mefloquina para avaliação da linearidade do método para doseamento por CLAE.....	66
Tabela 18 – Preparo das soluções fortificadas de artesunato (AS) para avaliação da exatidão do método para doseamento por CLAE.	68
Tabela 19 – Preparo das soluções fortificadas de cloridrato de mefloquina (MQ) para avaliação da exatidão do método para doseamento por CLAE.	68
Tabela 20 – Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez para o método cromatográfico de determinação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina.	69
Tabela 21 – Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para a avaliação da robustez do método cromatográfico pelo teste de Youden.	70
Tabela 22 – Concentrações de artesunato e valores de área para a construção da curva analítica do método de doseamento em comprimidos utilizando CLAE.....	74
Tabela 23 – Concentrações de cloridrato de mefloquina e valores de área para a construção da curva analítica do método de doseamento em comprimidos utilizando CLAE.	75
Tabela 24 – Valores de área e teor de artesunato em comprimidos para avaliação da precisão do método de doseamento por CLAE.	76
Tabela 25 – Valores de área e teor de cloridrato de mefloquina em comprimidos para avaliação da precisão do método de doseamento por CLAE.....	77
Tabela 26 – Porcentagens de recuperação do padrão de cloridrato de mefloquina (MQ) adicionado à amostra para avaliação da exatidão do método para doseamento por CLAE aplicado a comprimidos.	78
Tabela 27 – Porcentagens de recuperação do padrão de artesunato adicionado à amostra para avaliação da exatidão do método para doseamento por CLAE aplicado a comprimidos.	78
Tabela 28 – Resultados obtidos para os oito experimentos realizados para a avaliação da robustez do método, considerando o cloridrato de mefloquina (MQ).	79
Tabela 29 – Resultados obtidos para os oito experimentos realizados para a avaliação da robustez do método, considerando o artesunato (AS).	79
Tabela 30 – Efeitos da modificação dos parâmetros analíticos no tempo de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e conteúdo de cloridrato de mefloquina (MQ) do método cromatográfico.....	80

Tabela 31 – Efeitos da modificação dos parâmetros analíticos no tempo de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e conteúdo de artesunato (AS) do método cromatográfico.	81
Tabela 32 – Resultados das determinações de artesunato (AS) e cloridrato de mefloquina (MQ) em amostras de comprimidos em dose fixa combinada.	84
Tabela 33 – Condições cromatográficas iniciais para a determinação de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina em plasma humano.	87
Tabela 34 – Condições cromatográficas finais para a determinação de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina em plasma humano.	88
Tabela 35 – Preparação das soluções para a contaminação do plasma para a construção da curva analítica e para os controles de qualidade (CQB, CQM e CQA).	91
Tabela 36 – Preparação das soluções em plasma dos fármacos para a construção da curva analítica e para os controles de qualidade (CQB, CQM e CQA).	92
Tabela 37 – Valores de massa molar, relação massa/carga e voltagem do cone para a detecção dos íons precursores e de relação massa/carga e voltagem de colisão para a detecção dos íons produto.	97
Tabela 38 – Avaliação preliminar da porcentagem de recuperação na extração dos analitos do plasma.	107
Tabela 39 – Avaliação preliminar do efeito matriz para os analitos em plasma.	108
Tabela 40 – Dados para a construção da curva analítica para artesunato (AS), utilizando arteméter (ATM) como padrão interno, no primeiro dia de análise.	111
Tabela 41 – Valores de concentração experimental e porcentagem de desvio obtidos com as três curvas analíticas para artesunato (AS) nos três dias de análise.	112
Tabela 42 – Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para artesunato (AS) para avaliação da linearidade do método bioanalítico.	113
Tabela 43 – Dados para a construção da curva analítica para diidroartemisinina (DHA), utilizando arteméter (ATM) como padrão interno, no primeiro dia de análise.	113
Tabela 44 – Valores de concentração experimental e porcentagem de desvio obtidos com as três curvas analíticas para diidroartemisinina (DHA) nos três dias de análise.	114
Tabela 45 – Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para diidroartemisinina (DHA) para avaliação da linearidade do método bioanalítico.	115
Tabela 46 – Dados para a construção da curva analítica para mefloquina (MQ), utilizando indapamida (IND) como padrão interno, no primeiro dia de análise.	115
Tabela 47 – Valores de concentração experimental e porcentagem de desvio obtidos com as três curvas analíticas para mefloquina (MQ) nos três dias de análise.	116

Tabela 48 – Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para mefloquina (MQ) para avaliação da linearidade do método bioanalítico.	117
Tabela 49 – Resultados de precisão e exatidão para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina obtidos para o LIQ nos três dias de análise.....	118
Tabela 50 – Resultados de precisão e exatidão para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina obtidos para o CQB nos três dias de análise.	118
Tabela 51 – Resultados de precisão e exatidão para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina obtidos para o CQM nos três dias de análise.	118
Tabela 52 – Resultados de precisão e exatidão para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina obtidos para o CQA nos três dias de análise.	119
Tabela 53 – Resultados de recuperação para o método bioanalítico.	119
Tabela 54 – Avaliação do efeito matriz individual para artesunato.....	120
Tabela 55 – Avaliação do efeito matriz individual para diidroartemisinina.	121
Tabela 56 – Avaliação do efeito matriz individual para mefloquina.	121
Tabela 57 – Avaliação do efeito matriz individual para os padrões internos arteméter e indapamida.	122
Tabela 58 – Avaliação do efeito matriz utilizando os Fatores de Matriz Normalizados por Padrão Interno (FMN) para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.	123
Tabela 59 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade de curta duração (ECD) de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.	124
Tabela 60 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD) de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.	125
Tabela 61 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade pós-processamento (EPP) de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.	126
Tabela 62 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade das soluções (ES) de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.	127
Tabela 63 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade das soluções (ES) dos padrões internos arteméter e indapamida.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ACT	<i>Artemisinin combined therapy</i> ;Terapia combinada com a artemisinina
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Artesunato
ATM	Arteméter
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CQA	Amostra de controle de qualidade de alta concentração
CQB	Amostra de controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Amostra de controle de qualidade de média concentração
DAD	Detector de arranjo de diodos
DHA	Diidroartemisinina
DPR	Desvio padrão relativo
EMA	<i>European Medicines Agency</i> ; Agência Europeia de Medicamentos
EPR	Erro padrão relativo
eV	Elétron volt
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - EUA
FMN	Fator Matriz Normalizado
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i> ; Conferência Internacional de Harmonização
IND	Indapamida
LIQ	Limite inferior de quantificação
MEFAS	Artesunato de mefloquina (sal)
MeOH	Metanol
MQ	Cloridrato de mefloquina
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> ; Monitoramento múltiplo de reações
m/z	Relação massa/carga
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i> ; Organização Pan Americana da Saúde
PI	Padrão interno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SQR	Substância química de referência
THF	Tetraidrofurano
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> ; Farmacopeia Americana
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Ciclo biológico da malária.....	22
1.2 Diagnóstico da malária.....	25
1.3 Tratamento da malária.....	26
1.4 Resistência do plasmódio aos antimaláricos	28
1.4.1 Determinantes da resistência do plasmódio aos antimaláricos	28
1.4.2 Monitoramento da resistência do plasmódio aos antimaláricos.....	30
1.5 Agentes antimaláricos	31
1.5.1 Artesunato.....	34
1.5.2 Cloridrato de mefloquina	36
1.6 Associação de artesunato e mefloquina.....	38
1.6.1 O artesunato de mefloquina.....	40
1.7 Métodos analíticos para a determinação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos.....	41
1.8 Métodos bioanalíticos para a determinação de artesunato e cloridrato de mefloquina em plasma humano	43
2 OBJETIVOS	46
2.1 Geral.....	46
2.2 Específicos.....	46
3 CAPÍTULO I - ESTUDO PRELIMINAR COM O ARTESUNATO DE MEFLOQUINA	47
3.1 Material e métodos.....	47
3.1.1 Material.....	47
3.1.2 Métodos	48

3.2 Resultados e discussão	51
3.2.1 <i>Espectros na região do infravermelho e faixas de fusão das amostras de MEFAS</i>	51
3.2.2 <i>Seleção e otimização das condições cromatográficas</i>	57

4 CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO

ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DE ARTESUNATO E CLORIDRATO DE MEFLOQUINA EM COMPRIMIDOS EM DOSE FIXA COMBINADA.....	63
4.1 Material e métodos.....	63
4.1.1 <i>Material</i>	63
4.1.2 <i>Métodos</i>	64
4.2 Resultados e discussão	72
4.2.1 <i>Seleção e otimização das condições cromatográficas</i>	72
4.2.2 <i>Seletividade</i>	72
4.2.3 <i>Linearidade</i>	73
4.2.4 <i>Precisão intradia e interdias</i>	76
4.2.5 <i>Exatidão</i>	77
4.2.6 <i>Robustez</i>	78
4.2.7 <i>Estabilidade das soluções</i>	82
4.2.8 <i>Análises de comprimidos de artesunato e cloridrato de mefloquina em dose fixa combinada</i>	84

6 CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO

BIOANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ARTESUNATO, DIDROARTEMISININA E MEFLOQUINA EM PLASMA HUMANO	85
6.1 Material e métodos.....	85
6.1.1 <i>Material</i>	85
6.1.2 <i>Métodos</i>	86
6.2 Resultados e discussão	97
6.2.1 <i>Estabelecimento das condições de detecção por espectrometria de massas</i>	97
6.2.2 <i>Estabelecimento das condições cromatográficas</i>	105
6.2.3 <i>Estabelecimento das condições de extração dos fármacos do plasma</i>	106
6.2.4 <i>Validação do método bioanalítico</i>	108

7 CONCLUSÕES.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
APÊNDICE A - Valores de faixa de fusão, espectros na região do infravermelho e perfis cromatográficos das amostras de mefas analisadas.	135
APÊNDICE B - Participação e premiação no 23rd <i>International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis - PBA 2011.</i>	148
APÊNDICE C - Artigo submetido à <i>Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.</i>	150
APÊNDICE D - Projeto submetido à Plataforma Brasil para aplicação do método bioanalítico na monitorização terapêutica de pacientes em uso de artesunato e cloridrato de mefloquina em dose fixa combinada.....	165

1 INTRODUÇÃO

A malária é a doença parasitária mais importante do mundo, posicionando-se entre os maiores desafios para os países mais pobres na área de saúde e desenvolvimento. Mais de um terço da população mundial reside em áreas endêmicas e cerca de um bilhão de pessoas são portadoras do parasita em alguma fase da vida (GUERIN *et al.*, 2002). Relatos incluem ainda a possibilidade de reintrodução da doença em áreas não endêmicas (ROMI *et al.*, 2012). Estima-se que, em 2010, houve 216 milhões de casos de malária no mundo, sendo aproximadamente 81% dos casos na região africana. Também, estima-se que houve 655000 mortes causadas pela doença, das quais 91% ocorreram no continente Africano. Aproximadamente 86% das mortes causadas por malária foram em crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2011b). Entre os adultos, as mulheres grávidas constituem o principal grupo de risco (WHO, 2002).

A malária continua sendo um grave problema de saúde pública na Região Amazônica, devido à sua alta incidência e aos efeitos debilitantes para as pessoas acometidas por essa doença, com um importante potencial de influenciar o próprio desenvolvimento daquela região (LACERDA *et al.*, 2012). Em 2010, foram confirmados 330 mil casos de malária na Região Amazônica (BARBOSA, 2011).

1.1 Ciclo biológico da malária

Os parasitas causadores de malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Atualmente são conhecidas 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas, apenas quatro espécies parasitam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Este último ocorre apenas em regiões restritas do continente africano (BRAGA & FONTES, 2005). Nos últimos anos, infecções causadas por *P. knowlesi*, parasita natural dos macacos, vêm sendo relatadas em áreas florestais do sudeste asiático. (WHO, 2010)

Embora a malária possa ser transmitida por transfusão de sangue infectado e pelo compartilhamento de agulhas, os seres humanos habitualmente se infectam por esporozoítos injetados pela picada da fêmea do mosquito infectada (TRACY & WEBSTER, 2003). No

Brasil, a principal espécie transmissora é o *Anopheles darlingi*, presente em aproximadamente 80% da extensão territorial do país, embora 99,8% dos casos de malária aconteçam na Região Amazônica (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Estes esporozoítos saem rapidamente da circulação sanguínea e se localizam nos hepatócitos, onde se transformam, multiplicam e se desenvolvem em esquizontes tissulares. Este estágio tissular primário assintomático (pré-eritrocítico ou exoeritrocítico) da infecção dura de 5 a 15 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium*. Os esquizontes então se rompem, cada qual liberando milhares de merozoítos que penetram na circulação, invadem os eritrócitos e iniciam o estágio eritrocitário da infecção cíclica. Uma vez ocorrida a explosão de esquizontes tissulares na infecção por *P. falciparum* e por *P. malariae*, nenhuma forma do parasita permanece no fígado. Mas na infecção por *P. vivax* e *P. ovale*, persistem parasitas tissulares que podem causar recidivas da infecção eritrocítica meses a anos após a primeira crise. A origem dessas formas tissulares latentes não é clara. Nos eritrócitos, a maioria dos parasitas sofre desenvolvimento assexuado de formas anelares jovens até trofozoítos e finalmente até esquizontes maduros. Os eritrócitos contendo esquizontes se rompem, cada qual liberando 6 a 24 merozoítos, dependendo da espécie de *Plasmodium*. Os merozoítos liberados invadem mais eritrócitos para perpetuar o ciclo, que continua até a morte do hospedeiro ou a modulação por fármacos ou a imunidade parcial adquirida (TRACY & WEBSTER, 2003). Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuados, os gametócitos, que não mais se dividem e que seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem aos esporozoítos (BRAGA & FONTES, 2005).

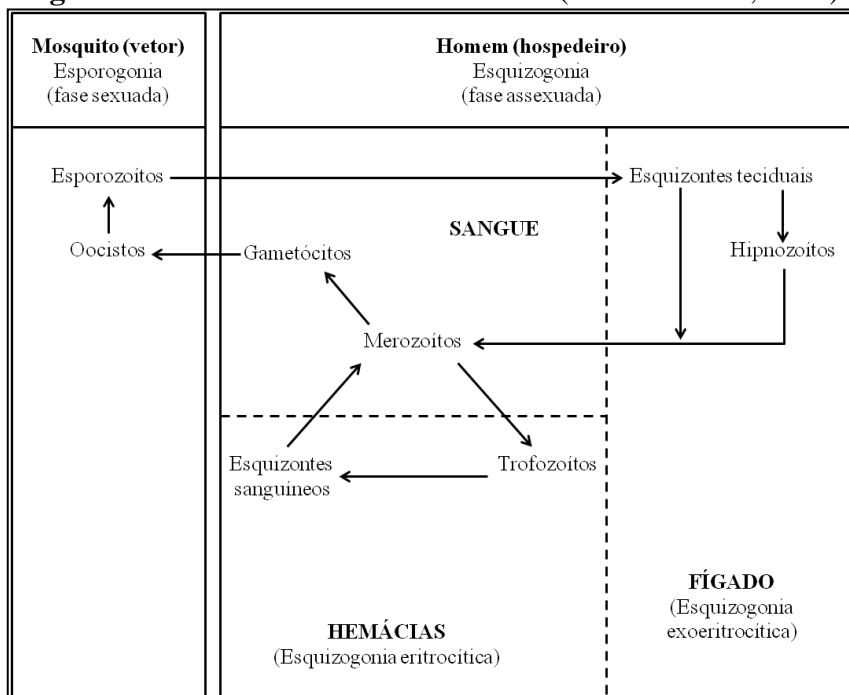
O ciclo sangüíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas, nas infecções pelo *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e a cada 72 horas, nas infecções pelo *P. malariae*. Na fêmea do anofelino, os gametócitos serão diferenciados em masculinos (microgameta) e feminino (macrogameta). Ocorrerá a fecundação e o zigoto (oocineto) ficará localizado no intestino médio do inseto. Inicia-se um processo de reprodução esporogônica, e após um período de 14 dias, ocorre a ruptura da parede do oocisto, sendo liberados os esporozoítos, os quais caminharão pela hemolinfa até as glândulas salivares do inseto (BRAGA & FONTES, 2005). O ciclo de vida do *Plasmodium* está representado na Figura 1.

Apenas o ciclo eritrocítico assexuado é responsável pelas manifestações clínicas e patologia da malária. A passagem do parasita pelo fígado (ciclo exoeritrocítico) não é patogênica e não é determinante para o aparecimento de sintomas. A destruição dos eritrócitos e consequente

liberação dos parasitas e seus metabólitos na circulação provocam uma resposta do hospedeiro, e causando as alterações morfológicas e funcionais observadas no indivíduo com malária. Os possíveis mecanismos determinantes das diferentes formas clínicas da doença baseiam-se fundamentalmente, na interação dos seguintes fenômenos patogênicos (BRAGA & FONTES, 2005):

- Destruição dos eritrócitos parasitados;
- Toxicidade resultante da liberação de citocinas;
- Seqüestro dos eritrócitos parasitados na rede capilar, no caso específico de *P. falciparum*;
- Lesão capilar por deposição de imunocomplexos, no caso de *P. malariae*.

Figura 1 – Ciclo de vida do *Plasmodium* (SWEETMAN, 2009).



O período de incubação de malária varia de acordo com a espécie de plasmódio, sendo de 8 a 12 dias para *P. falciparum*, 13 a 17 dias para *P. vivax* e 28 a 30 dias para *P. malariae*. Uma fase sintomática inicial, caracterizada por mal estar, cefaléia, cansaço e mialgia, geralmente precede a clássica febre da malária. Estes sintomas são comuns a muitas outras infecções, não permitindo um diagnóstico clínico seguro. O ataque paroxístico agudo (acesso malárico), coincidente com a ruptura das hemácias ao final da esquizogonia, é geralmente acompanhado de calafrio e sudorese. Esta fase dura de 15 minutos a uma hora, sendo seguida por uma fase

febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41 °C ou mais. Após um período de duas a seis horas, ocorre defervescência e o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza intensa. Depois de algumas horas, os sintomas desaparecem e o paciente sente-se melhor (BRAGA & FONTES, 2005).

Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente relacionado ao tempo de ruptura de uma quantidade suficiente de hemácias contendo esquizontes maduros. Portanto, a periodicidade dos sintomas está na dependência do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* (malária terçã) e 72 horas para *P. malariae* (malária quartã). Entretanto, a constatação desta regularidade é pouco comum nos dias atuais, em decorrência de tratamento precoce, realizado ainda na fase de assincronismo das esquizogonias sanguíneas. Desta forma, o padrão mais observado é o da febre cotidiana (BRAGA & FONTES, 2005).

1.2 Diagnóstico da malária

O diagnóstico da infecção malárica só é possível pela demonstração do parasita, ou de antígenos relacionados, no sangue periférico do paciente. No entanto, em virtude de seu padrão epidemiológico diverso, várias têm sido as abordagens diagnósticas da malária. A OMS, em suas orientações atuais para o controle da malária no mundo, preconiza tanto o diagnóstico clínico quanto o diagnóstico laboratorial como norteadores da terapêutica da doença (BRAGA & FONTES, 2005).

O elemento mais importante no diagnóstico clínico da malária, tanto nas áreas endêmicas como nas não endêmicas, é sempre cogitar a possibilidade da doença. Como a distribuição da malária não é homogênea, inclusive nos países onde sua prevalência é elevada, tornam-se importantes os fatores geográficos e os antecedentes de viagens que possam dar indicações sobre a exposição à doença. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de malária induzida, em consequência de transfusões ou utilização de agulhas contaminadas. Ainda, deve-se distinguir a malária de outras doenças de quadro clínico semelhante presentes nos países malarígenos (OMS, 2000).

Em relação ao diagnóstico parasitológico, na maioria dos casos, as lâminas de sangue de gota espessa ou o exame de esfregaço revelam a presença dos parasitas de malária. O exame de

gota espessa é mais útil que o esfregaço para detectar a parasitemia da malária, particularmente quando esta for baixa. Os meios e equipamentos necessários para o exame microscópico de lâminas de sangue podem ser instalados facilmente em um local próximo a um centro de saúde ou a um hospital e as lâminas podem ser analisadas por pessoal treinado. Isso reduz o atraso ocasionado ao se enviar as amostras a um laboratório distante (OMS, 2000).

Embora o custo ainda seja elevado, dispõe-se atualmente de novas provas diagnósticas rápidas. No entanto, elas não substituem o método padrão de microscopia para o diagnóstico da malária grave e o monitoramento do tratamento (OMS, 2000), pois, entre suas desvantagens, não permitem a distinção entre *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*; não permitem a medição do nível de parasitemia e não detectam infecções mistas que incluem o *P. falciparum*. Ainda, o kit de diagnóstico é sensível às condições de armazenamento locais, podendo perder sua capacidade com o tempo (BRASIL, 2010).

1.3 Tratamento da malária

O tratamento oportuno e eficaz da malária é provavelmente o elemento que tem a melhor relação custo/benefício nas estratégias de controle. A maior parte da terapia antimalárica no mundo é feita com medicamentos orais para malária causada por *P. falciparum*. O tratamento por via oral previne a progressão da doença, além de, se realizado a tempo e com eficácia, ser capaz de reduzir a sua morbidade e mortalidade. Entretanto, muitas pessoas que vivem em áreas endêmicas têm pouco ou nenhum acesso ao diagnóstico e tratamento, além disso, este último comumente é inadequado porque medicamentos de qualidade e eficazes não estão disponíveis para a população, ou, se estão, são ingeridos incorretamente (prescrição incorreta ou baixa adesão ao tratamento) ou são utilizados erroneamente (em pacientes que não possuem malária). Muitos países afetados pela malária incluem, em seus esquemas terapêuticos, fármacos que são parcialmente ou completamente ineficazes (GUERIN *et al.*, 2002).

Em relação aos seus objetivos, o tratamento da malária visa à interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do seu ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hipnozoítas) das espécies *P. vivax*

e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias. Além disso, a abordagem terapêutica de pacientes residentes em áreas endêmicas pode visar também à interrupção da transmissão, pelo uso de fármacos que eliminam as formas sexuadas dos parasitas (BRAGA & FONTES, 2005).

O tratamento da infecção malárica é recomendado de acordo com a espécie de plasmódio infectante. No Brasil, em 2008, cerca de 90% dos casos de malárica registrados foram causados por *P. vivax*, sendo 1,3% dos casos causados por *P. falciparum* (BRASIL, 2010).

O esquema de tratamento adotado atualmente no país para a infecção malárica não complicada causada por *P. vivax* está resumido na Tabela 1. Os esquemas de tratamento para a malária não complicada causada por *P. falciparum* estão resumidos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 1 – Esquema recomendado para o tratamento das infecções por *Plasmodium vivax* com comprimidos de cloroquina 150 mg em três dias e comprimidos de primaquina (infantil 5 mg e adulto 15 mg) em sete dias (BRASIL, 2010).

Idade / Peso	Número de comprimidos por medicamento por dia						
	1º dia		2º dia		3º dia		4º ao 7º dia
	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Cloroquina	Primaquina INFANTIL	Primaquina INFANTIL
6 – 11 meses (5 – 9 kg)	1/2	1	1/4	1	1/4	1	1/2
1 – 3 anos (10 – 14 Kg)	1	2	1/2	1	1/2	1	1
4 – 8 anos (15 – 24 Kg)	1	2	1	2	1	2	2
Idade / Peso	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Cloroquina	Primaquina ADULTO	Primaquina ADULTO
9 – 11 anos (25 -34 Kg)	2	1	2	1	2	1	1
12 – 14 anos (34 – 49 Kg)	3	2	2	2	2	2	1
≥ 15 anos (≥ 50 Kg)	4	2	3	2	3	2	2

Tabela 2 – Esquema recomendado para o tratamento das infecções por *Plasmodium falciparum* com comprimidos de dose fixa combinada de arteméter 20 mg e lumefantrina 120 mg em três dias e comprimidos de primaquina 15 mg em um dia (BRASIL, 2010).

Idade/Peso	Número de comprimidos por dia						
	1º dia			2º dia		3º dia	
	Manhã		Noite	Manhã	Noite	Manhã	Noite
	Arteméter + Lumefantrina	Primaquina		Arteméter + Lumefantrina			
6 meses – 2 anos (5 – 14 Kg)	1	1/2	1	1	1	1	1
3 – 8 anos (15 – 24 Kg)	2	1	2	2	2	2	2
9 – 14 anos (25 – 34 Kg)	3	1 e 1/2	3	3	3	3	3
≥ 15 anos (≥ 50 Kg)	4	3	4	4	4	4	4

Tabela 3 – Esquema recomendado para o tratamento das infecções por *Plasmodium falciparum* com comprimidos de dose fixa combinada de artesunato e cloridrato de mefloquina (25 mg + 55 mg infantil e 100 mg + 220 mg adulto) em três dias e primaquina 15 mg em um dia (BRASIL, 2010).

Idade/Peso	Número de comprimidos por dia						
	1º dia			2º dia		3º dia	
	Artesunato + Mefloquina		Primaquina	Infantil	Adulto	Infantil	Adulto
	Infantil	Adulto					
6 – 11 meses (5 – 8 Kg)	1	-	1/2	1	-	1	-
1 – 5 anos (9 – 17 Kg)	2	-	1	2	-	2	-
6 – 11 anos (18 – 29 Kg)	-	1	1 e 1/2	-	1	-	1
≥ 12 anos (≥ 30 Kg)	-	2	3	-	2	-	2

1.4 Resistência do plasmódio aos antimaláricos

1.4.1 Determinantes da resistência do plasmódio aos antimaláricos

Um dos maiores desafios encontrados para o controle mundial da malária é o crescimento e intensificação da resistência do parasita aos fármacos antimaláricos em uso atualmente. O número limitado desses fármacos aumenta as dificuldades no desenvolvimento de esquemas

terapêuticos eficazes e controle adequado da doença (WHO, 2000). A resistência múltipla aos antimaláricos tornou inúteis os esquemas terapêuticos baseados em apenas um fármaco, sendo necessários urgentemente novos tratamentos, como os que utilizam as combinações de antimaláricos (KREMSNER & KRISHNA, 2004).

As razões para o aparecimento e expansão da resistência aos fármacos envolve a interação dos padrões de uso dos medicamentos, características intrínsecas do fármaco, fatores relacionados ao hospedeiro (homem), e fatores ambientais do inseto vetor (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

As características dos fármacos são determinantes importantes da resistência. Primeiramente, fármacos com tempos longos de meia-vida de eliminação, como a mefloquina, podem exercer seleção residual em infecções novas contraídas após o tratamento da infecção primária, quando o fármaco persiste em concentrações subterapêuticas no plasma, especialmente em áreas com intensa transmissão de malária. Secundariamente, a manutenção de concentrações adequadas do fármaco por um tempo longo é necessária para a completa eliminação do parasita. Doses subterapêuticas eliminam os parasitas mais susceptíveis, deixando aqueles que conseguem se recuperar e reproduzir. Como resultado, a dose terapêutica necessária pode aumentar para valores além do máximo tolerado, demonstrando o aparecimento de resistência. Em terceiro lugar, o uso indiscriminado dos fármacos serve de determinante na seleção de populações de parasitas resistentes (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

As respostas imunes potentes aumentam a eficácia da quimioterapia. Um paciente semi-imune ainda pode ser curado por um medicamento, apesar de que os parasitas que o infectam podem ser parcialmente resistentes aos fármacos. Um indivíduo que nunca foi exposto à malária apresenta uma resposta imune não específica que não é tão eficaz quanto aquela apresentada por um indivíduo submetido a infecções repetidas. Deste modo, o aparecimento de malária em populações não imunes como refugiados ou migrantes aumenta a possibilidade de aparecimento e expansão da resistência, uma vez que parasitas com resistência baixa ou moderada seriam eliminados em populações semi-imunes (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

O nível da transmissão influencia a taxa de aparecimento e expansão da resistência aos fármacos, mas o seu papel exato é complexo e provavelmente multifatorial. Acredita-se que o

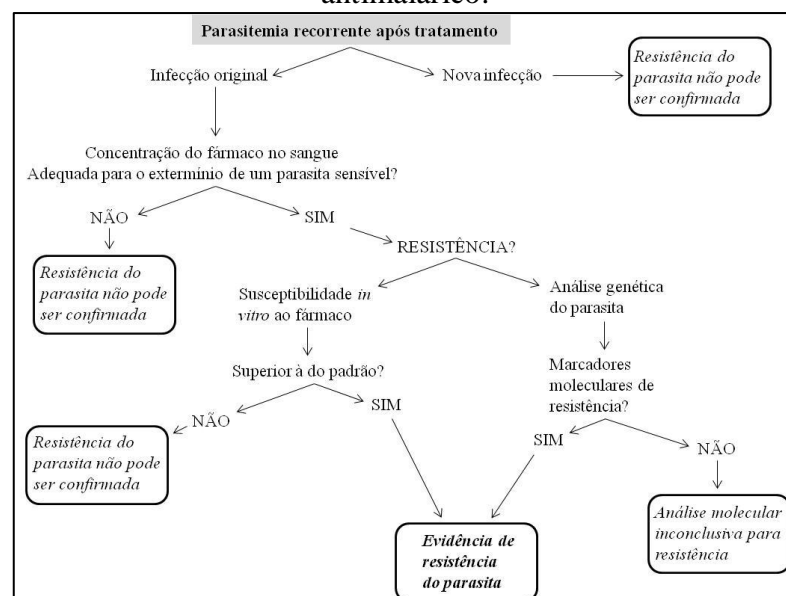
risco de desenvolvimento de resistência aos fármacos pode ocorrer tanto em áreas de baixa ou alta transmissão. Observou-se o aparecimento precoce de resistência em áreas de baixa transmissão (como Tailândia e Brasil). Como um exemplo da hipótese da resistência em áreas de alta transmissão, resistência total à cloroquina foi observada em dois anos e meio em uma área de alta transmissão no leste da África, a qual estava sob uma forte pressão medicamentosa (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002)

Finalmente, o inseto vetor e fatores ambientais podem influenciar a proliferação de parasitas resistentes. Por exemplo, parasitas resistentes à cloroquina podem se reproduzir mais facilmente em certos anofelinos do que cepas não resistentes (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

1.4.2 Monitoramento da resistência do plasmódio aos antimaláricos

Está esquematizado na Figura 2 um algoritmo de decisão sobre o aparecimento ou não de resistência do plasmódio aos antimaláricos. É sabido que a análise dos níveis sanguíneos dos antimaláricos é um ponto crítico para a descoberta da resistência do parasita aos fármacos. Ainda, a determinação dos derivados de artemisinina no sangue é tecnicamente complicada, requerendo equipamentos sofisticados que não são amplamente disponíveis (SIBLEY & PRICE, 2012).

Figura 2 – Algoritmo de decisão para o aparecimento de resistência após falha do tratamento antimalárico.



Fonte: SIBLEY & PRICE, 2012.

Os esquemas de tratamento antimalárico adotados por cada país devem ser estabelecidos com base em um programa eficiente de monitoramento da resistência do plasmódio aos antimaláricos. Uma correlação deve ser feita entre os níveis séricos dos antimaláricos no paciente, a susceptibilidade *in vitro* do plasmódio aos medicamentos administrados e a presença de marcadores moleculares de resistência no parasita (SIBLEY & PRICE, 2012).

1.5 Agentes antimaláricos

De acordo com SWEETMAN (2009), os principais fármacos antimaláricos podem ser classificados de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita que afetam:

- Esquizotocidas sanguíneos agem nos estágios eritrocíticos do parasita, responsáveis pelos sintomas clínicos da doença. Podem produzir uma cura clínica ou supressão da infecção por cepas suscetíveis das quatro espécies de plasmódio mas, não produzem uma cura radical das formas latentes das malárias vivax ou ovale;
- Esquizotocidas teciduais agem nos estágios exoeritrocíticos do parasita e são utilizados para profilaxia para prevenir a invasão das células sanguíneas, ou para promover a cura radical das malárias vivax e ovale;
- Gametocitocidas destroem as formas sexuadas do parasita para interromper a transmissão do homem para o inseto vetor;
- Esporontocidas não têm efeito direto sobre os gametócitos no hospedeiro, mas previnem a esporogonia no mosquito vetor.

Os fármacos antimaláricos podem também ser classificados de acordo com o grupo químico ao qual pertencem (Tabela 4).

Tabela 4 – Principais fármacos antimaláricos organizados por grupo químico (SWEETMAN, 2009).

<i>Grupo químico</i>	<i>Fármacos</i>	<i>Classe e mecanismo de ação</i>
4-Metanolquinolinas	Alcalóides da cinchona	Esquizonticidas sanguíneos de ação rápida. Atividade gametocitocida marginal
	Quinina	
	Quinidina	
4-Aminoquinolinas	Mefloquina	Esquizonticida sanguíneo
	Cloroquina	Esquizonticidas sanguíneos de ação rápida. Atividade gametocitocida marginal
	Hidroxicloroquina	
8-Aminoquinolinas	Amodiaquina	Esquizonticidas teciduais. Apresentam atividade gametocitocida e agem em outras fases do ciclo de vida do parasita.
	Primaquina	
Biguanidas	Tafenoquina	Esquizonticidas teciduais e esquizonticidas sanguíneos de ação lenta. Atividade esporocitocida marginal. Inibidores da diidrofolato redutase
	Proguanil	
Diaminopirimidinas	Chlorproguanil	Esquizonticida tecidual e esquizonticida sanguíneo de ação lenta. Inibidor da diidrofolato redutase. Usualmente empregado em associação com fármacos que inibem diferentes estágios da síntese do folato, para ação sinérgica.
	Pirimetamina	
Diclorobenzilidinas	Lumefantrina	Esquizonticida sanguíneo
Hidroxi-naftoquinonas	Atovaquona	Esquizonticida sanguíneo. Usualmente empregado em combinação com proguanil
9-Fenantrenometanóis	Halofantrina	Esquizonticida sanguíneo
Lactonas sesquiterpênicas	Artemisinina e seus derivados	Esquizonticidas sanguíneos
Sulfonamidas	Sulfadoxina	Esquizonticidas sanguíneos. Inibidores da síntese do diidropteroato e do folato. Usualmente empregados em combinação com pirimetamina.
	Sulfametopirazina	
Tetraciclina	Doxiciclina	Esquizonticidas sanguíneos. Atividade esquizonticida tecidual marginal.
	Tetraciclina	
Lincosamidas	Clindamicina	Esquizonticidas sanguíneos. Atividade esquizonticida tecidual marginal
Sulfonas	Dapsona	Esquizonticida sanguíneo. Inibidor da síntese do folato. Usualmente empregado em combinação com pirimetamina.

As fórmulas estruturais de alguns dos fármacos relacionados na Tabela 4 são apresentadas na Figura 3, e na Figura 4 é relacionado o ciclo de vida do parasita com os alvos de ação dos fármacos.

Figura 3 – Fórmulas estruturais de fármacos utilizados no tratamento de malária.

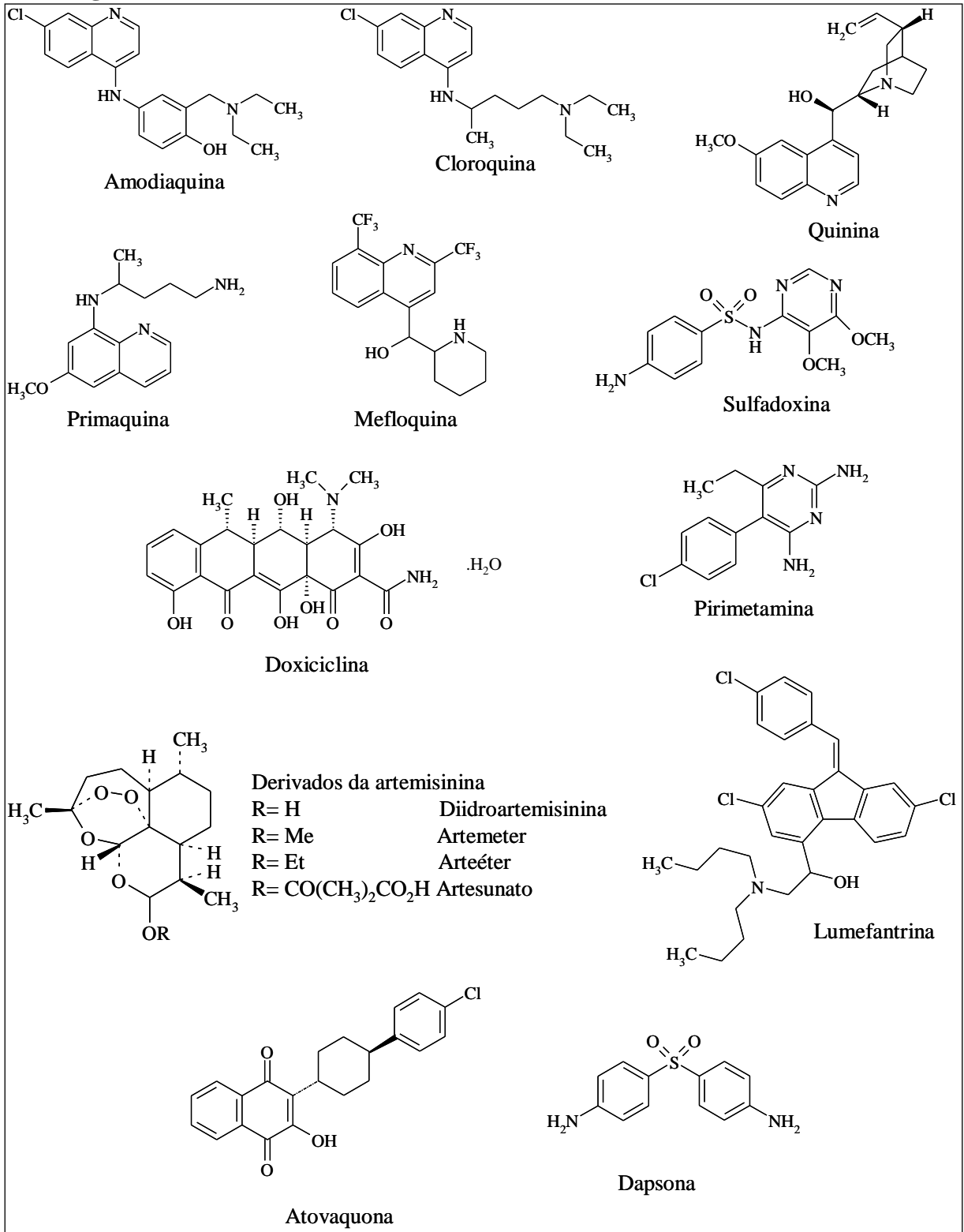
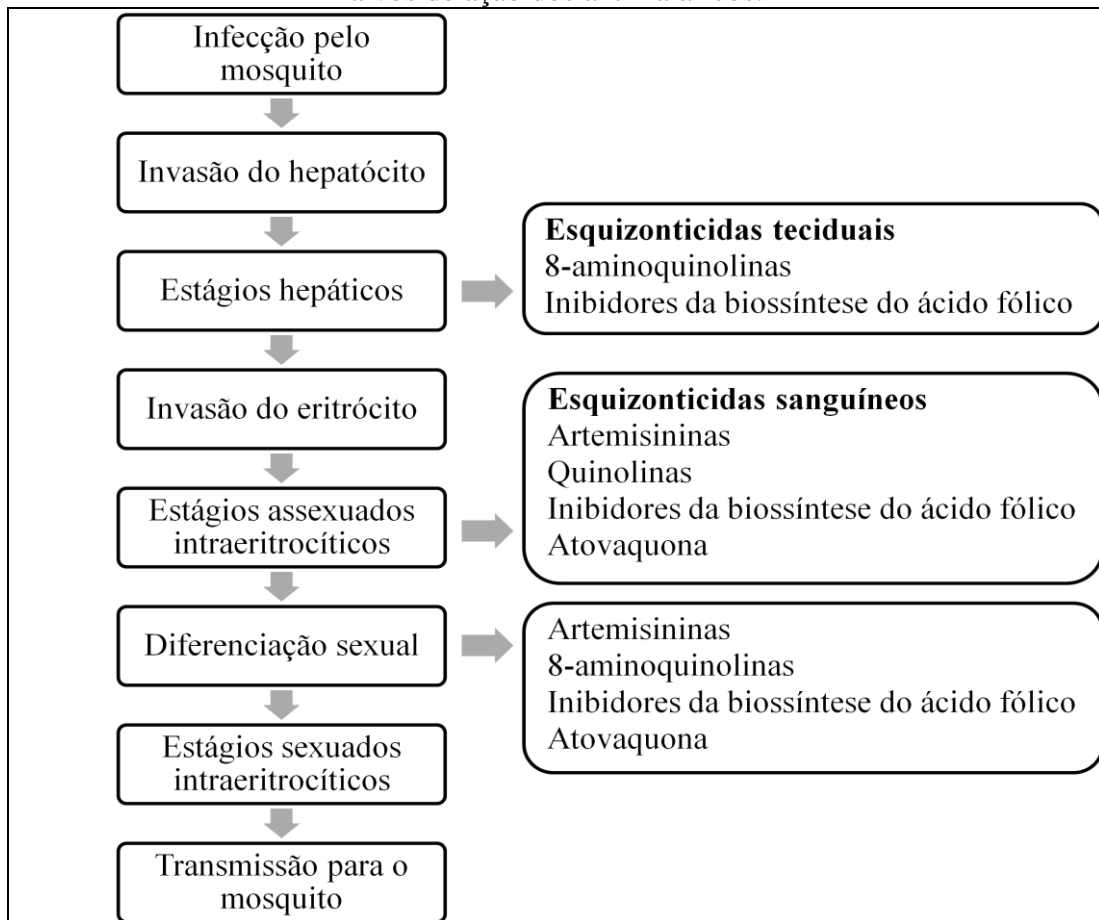


Figura 4 – Representação esquemática do ciclo biológico dos plasmódios e indicação dos alvos de ação dos antimaláricos.



Fonte: GUERIN *et al.*, 2002.

O mecanismo de ação dos antimaláricos é um tema que ainda hoje causa controvérsia. Várias são as teorias sobre como estes fármacos agem no parasita, como pode ser encontrado na literatura (FOLLEY & TILLEY, 1998; HYDE & MULLER, 2010; LI, 2006; RIDLEY, 2002).

A seguir são apresentadas descrições detalhadas dos antimaláricos utilizados neste estudo.

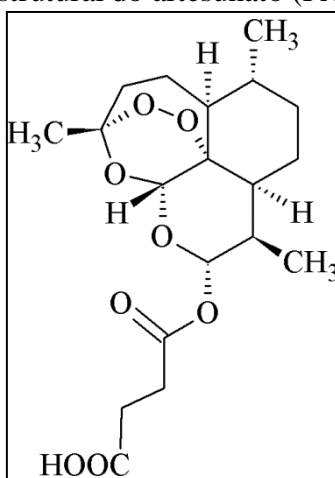
1.5.1 Artesunato

A artemisinina é uma lactona sesquiterpenoide com endoperóxido derivada da semente *qing hão* (*Artemisia annua*), também denominada absinto doce ou absinto anual. Os chineses atribuíram valor medicinal a essa planta há mais de 2000 anos. Em 340 d.c, essa planta já era prescrita para febres e, em 1596, recomendada para o tratamento de malária (TRACY & WEBSTER, 2003). As propriedades antimaláricas da artemisinina foram descobertas por

cientistas chineses em 1971, os quais fizeram extratos da *Artemisia annua* em éter etílico a baixa temperatura. Em um grande esforço de pesquisa, os cientistas identificaram o princípio ativo responsável pela ação antimalárica, descreveram suas características físico-químicas, conduziram estudos em animais e em humanos e sintetizaram derivados da diidroartemisinina, arteméter e artesunato. A artemisinina foi anunciada ao mundo em 1979 (WHITE, 2008).

O artesunato (Figura 5), quimicamente, é o ester 1-[(3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-decaidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12*H*-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepina-10-ílico] do ácido butanodióico, com massa molar de 384,42 g/mol. Apresenta-se como pó fino, cristalino, branco ou quase branco, com ponto de fusão entre 132 e 135 °C, muito pouco solúvel em água, muito solúvel em cloreto de metileno, facilmente solúvel em etanol e acetona (FARMACOPEIA, 2010). O artesunato apresenta instabilidade em água, etanol e outros solventes de uso farmacêutico (GAUDIN *et al.*, 2007).

Figura 5 – Fórmula estrutural do artesunato (FARMACOPEIA, 2010).



Em relação aos derivados da artemisinina, concentrações plasmáticas máximas de arteméter são obtidas em 3 horas após a administração oral e em 6 horas após administração intramuscular. Para a artemisinina, concentrações plasmáticas máximas são obtidas em 11 horas após a administração retal. Os derivados da artemisinina (incluindo o artesunato) são rapidamente hidrolisados dando origem ao metabólito ativo diidroartemisinina. Foram encontrados valores de meia vida de eliminação de 45 minutos após injeção endovenosa de artesunato, 4 horas após administração retal de artemisinina e de 4 a 11 horas após

administração intramuscular ou oral de arteméter (SWEETMAN, 2009). Os parâmetros farmacocinéticos para diferentes apresentações de artesunato estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros farmacocinéticos para diferentes apresentações de artesunato (Fonte: WHO, 2011a)

<i>Fármaco (metabólito)</i>	<i>C_{máx.}* (ng/mL)</i>	<i>T_{máx.}(h)</i>	<i>ASC (ng/mL x h)</i>	<i>K_a (por hora)</i>	<i>V/F (L/Kg)</i>	<i>CL/F (L/h por Kg)</i>	<i>T_{1/2} (h)</i>
Artesunato por via endovenosa (Diidroartemisinina)	11346 - 29681 (1279 - 3011)	- (0,01-0,2)	558-1146 (739 - 2559)	-	0,08-0,24 (0,47-1,01)	1,63 - 4,26 (0,73-2,16)	0,03 - 0,19 (0,3 - 1,1)
Artesunato por via retal (Diidroartemisinina)	269-507 (682 - 896)	0,8 - 0,9 (1,5 - 2,3)	692 (2402 - 2786)	0,3 (0,7)	2,1 (2,1 - 4,4)	6,0 (2,2 - 2,64)	0,9 (0,7 - 1,3)
Artesunato por via oral (Diidroartemisinina)	51 - 244 (251 -488)	0,5 (2)	113 - 232 (740-1671)	3,3 (1,19 - 4,27)	6,8 (2,3 - 4,6)	19,2 (0,6 - 4,0)	0,36 (0,64 - 2,5)

* C_{máx.} - concentração plasmática máxima; T_{máx.} - tempo para alcançar a concentração plasmática máxima; ASC - área sob a curva concentração-tempo; K_a - constante de absorção de primeira ordem; V/F - volume aparente de distribuição; CL/F - clearance aparente após administração oral; T_{1/2} - tempo de meia vida de eliminação.

Os derivados da artemisinina são geralmente bem tolerados e com baixa incidência de reações adversas (TAYLOR & WHITE, 2004). Em uma revisão envolvendo 108 estudos sobre o perfil de segurança do artesunato, de um total de 9241 pacientes, não foi observado nenhuma reação adversa grave, tampouco sinais graves de toxicidade. Os efeitos adversos mais comuns foram gastrintestinais, sendo também observados neutropenia (1,3% dos pacientes), reticulocitopenia (0,6%) e elevação das enzimas hepáticas (0,9%). Ainda, bradicardia transiente e intervalo QT prolongado foram observados em cerca de 1,1% dos pacientes monitorados (RIBEIRO & OLLIARO, 1998).

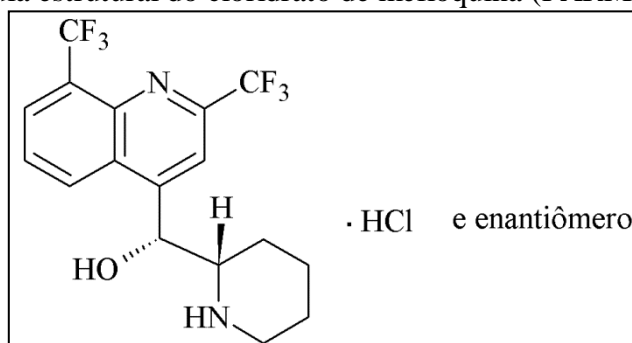
1.5.2 Cloridrato de mefloquina

A mefloquina é um produto do Programa de Pesquisa da Malária estabelecido em 1963 pelo *Walter Reed Institute for Medical Research* para desenvolver novos compostos promissores no combate de cepas emergentes de *P. falciparum* resistente aos medicamentos. Dentre os vários 4-quinolina metanóis testados com base em suas semelhanças estruturais com a quinina, a mefloquina apresentou grande atividade antimalárica em modelos animais e emergiu dos ensaios clínicos como segura e altamente eficaz contra cepas de *P. falciparum* resistentes aos demais medicamentos. A mefloquina foi utilizada pela primeira vez para se tratar a malária *falciparum* resistente à cloroquina na Tailândia, onde foi formulada com pirimetamina-sulfadoxina para retardar o desenvolvimento de parasitas resistentes aos

medicamentos. A estratégia falhou, em grande parte porque a eliminação lenta da mefloquina estimulou a seleção de parasitas resistentes em concentrações subterapêuticas do fármaco. A mefloquina é atualmente recomendada para uso oral exclusivamente na profilaxia e na quimioterapia da malária *falciparum* resistente à cloroquina ou multi-resistente. Essa quinolina é mais eficaz para tratar a malária *falciparum* sem complicações com resistência aos medicamentos quando administrada 48 h após a carga parasitária ter sido significativamente reduzida pela administração de um antimalárico artemisinínico (TRACY & WEBSTER, 2003).

O cloridrato de mefloquina (Figura 6), quimicamente, é o cloridrato de (αS)-rel- α -(2R)-piperidinil-2,8-bis(trifluorometil)-4-quinolinametanol, com fórmula molecular $C_{17}H_{16}F_6N_2O.HCl$ e massa molar de 414,77 g/mol. Apresenta-se como um pó branco, inodoro, de faixa de fusão entre 259 e 260 °C com decomposição, solúvel em etanol e acetato de etila e pouco solúvel em água. A solução metanólica de cloridrato de mefloquina apresenta máximos de absorção em 222, 283, 304 e 318 nm, com valores de absorvidade específica de 46700, 6600, 4000 e 3100 (THE MERCK, 2006).

Figura 6 – Fórmula estrutural do cloridrato de mefloquina (FARMACOPEIA, 2010).



A farmacocinética da mefloquina pode estar alterada pela infecção malárica de uma maneira similar às alterações da farmacocinética da quinina, sendo os efeitos mais pronunciados as reduções no volume de distribuição e na depuração. A mefloquina é bem absorvida pelo trato gastrintestinal, mas há uma clara variação individual no tempo necessário para alcançar a concentração plasmática máxima. A mefloquina é aproximadamente 98% ligada a proteínas plasmáticas e altas concentrações foram reportadas em células sanguíneas da série vermelha. A mefloquina é extensamente distribuída no organismo. Em alguns pacientes foi relatado que a meia-vida de eliminação da mefloquina é de 21 dias, embora os valores encontrados sejam

variáveis em outros estudos. Concentrações subterapêuticas de mefloquina persistem na circulação por vários meses. A mefloquina é metabolizada no fígado, sendo uma pequena parte excretada na urina. Estudos em animais sugerem que a excreção da mefloquina seja feita principalmente na bile e nas fezes. Uma pequena quantidade de mefloquina é distribuída para o leite materno (SWEETMAN, 2009). Estão relacionados na Tabela 6 os parâmetros farmacocinéticos para a mefloquina.

Tabela 6 – Parâmetros farmacocinéticos para mefloquina (Fonte: WHO, 2011a)

<i>Fármaco</i>	<i>C_{máx.}*</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>T_{máx.}(h)</i>	<i>ASC</i> ($\mu\text{g/mL} \times \text{h}$)	<i>K_a</i> (<i>por</i> <i>hora</i>)	<i>V/F</i> (L/Kg)	<i>CL/F</i> (L/h <i>por Kg</i>)	<i>T_{1/2}</i> (<i>dias</i>)
Mefloquina	1,62 - 2,70	15-45	307,2 - 1497	0,292	8,14-31,8	0,017- 0,174	8,5-19,3

* *C_{máx.}* - concentração plasmática máxima; *T_{máx.}* - tempo para alcançar a concentração plasmática máxima; *ASC* - área sob a curva concentração-tempo; *K_a* - constante de absorção de primeira ordem; *V/F* - volume aparente de distribuição; *CL/F* - *clearance* aparente após administração oral; *T_{1/2}* - tempo de meia vida de eliminação.

Reações adversas idiossincrásicas severas são raras, porém incluem reações ameaçadoras à vida como reações de pele e anemia aplásica. Em contraste, é comum o aparecimento de reações adversas dose-dependentes como distúrbios gastrintestinais e vertigem, sendo mais sérias reações como psicoses, convulsões, e encefalopatia aguda. Deve-se preocupar com o risco de cardiotoxicidade em pacientes que receberam quinina logo após o tratamento com mefloquina (como é comum no sudoeste da Ásia) (WINSTANLEY, 2001).

1.6 Associação de artesunato e mefloquina

No presente momento, nos manuais de terapêutica para o tratamento da malária no Brasil, encontra-se recomendada a terapia combinada da artemisinina ou seus derivados (*ACT - artemisinin based combination therapy*) com outros fármacos antimaláricos ou com antibióticos (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010). A razão para a escolha de combinações de fármacos é que eles agem em sinergia ou apresentam diferentes modos de ação para prevenir a evolução da resistência aos medicamentos (VAROTTI *et al.*, 2008). Assim, várias combinações de antimaláricos com derivados da artemisinina foram introduzidas na terapêutica, como artesunato e amodiaquina; artesunato, sulfadoxina e pirimetamina; arteméter e lumefantrina e, por fim, artesunato e mefloquina (KREMSNER & KRISHNA, 2004).

A formulação de arteméter e lumefantrina em dose fixa combinada foi introduzida no Brasil no ano de 2006, sendo utilizada como um dos tratamentos de 1ª escolha para infecções não complicadas por *Plasmodium falciparum* em toda a área endêmica (BRASIL, 2006). Neste mesmo ano foi introduzido somente no estado do Acre um medicamento contendo artesunato e mefloquina em dose fixa combinada, tendo apresentado resultados promissores e sendo, hoje em dia, também um tratamento de 1ª escolha para infecções por *P. falciparum* (SANTELLI *et al.*, 2011; BRASIL, 2010). Em 2005, os fármacos artesunato e mefloquina foram agrupados para formar o sal artesunato de mefloquina (VAROTTI *et al.*, 2008).

O princípio da ACT se baseia no uso de dois fármacos com diferentes mecanismos e tempos de ação: um derivado de artemisinina que causa redução da biomassa do parasita de forma rápida e efetiva, e um fármaco complementar que apresenta efeito de longa duração. Esses dois fármacos associados são capazes de promover efetiva cura clínica e parasitológica e reduzir o índice de transmissão da doença, além de evitar o desenvolvimento de resistência a ambos os fármacos pelo *P. falciparum*. (MARTENSSON *et al.*, 2005).

A razão mais simples para se combinar antimaláricos é para aumentar a eficácia. Adicionalmente, combinações de fármacos podem reduzir o tempo de tratamento e, desta forma, aumentar a adesão do paciente ao tratamento e diminuir o risco de seleção de parasitas resistentes (KREMSNER & KRISHNA, 2004).

O tratamento utilizando, separadamente, os fármacos artesunato e mefloquina tem sido o de escolha na Tailândia por quase uma década. É um esquema seguro, bem tolerado e altamente eficiente, sendo também investigado na América do Sul e África. Na Tailândia, a incidência de malária e a resistência *in vitro* à mefloquina foram reduzidas desde que este esquema de tratamento foi adotado. As desvantagens deste esquema de tratamento incluem o alto preço e a diferença entre os tempos de meia-vida dos dois fármacos. O artesunato tem um tempo de meia-vida curto, enquanto a meia vida de eliminação da mefloquina é de 21 dias. Desta forma, em uma área hiperendêmica, o tratamento com esta combinação pode levar à uma exposição prolongada do parasita a baixas doses de mefloquina (KREMSNER & KRISHNA, 2004).

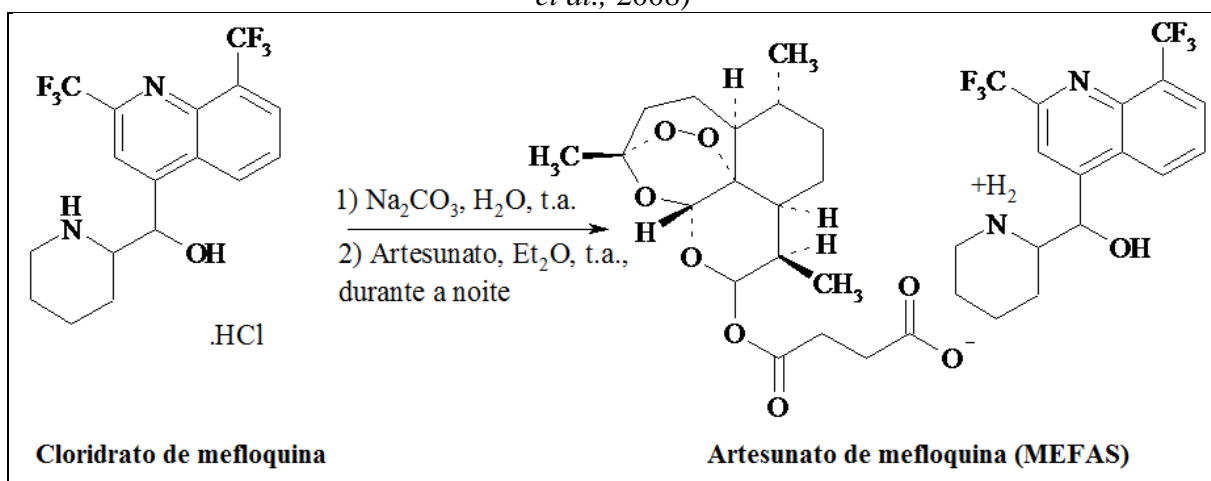
1.6.1 O artesunato de mefloquina

Outra abordagem da combinação de antimaláricos é o desenvolvimento de moléculas híbridas. Moléculas híbridas são definidas como entidades químicas com dois (ou mais de dois) domínios estruturais com diferentes funções biológicas. Estas diferentes funções biológicas indicam que a molécula híbrida age como possuindo dois grupos farmacofóricos distintos. Além disso, o ajuste na biodisponibilidade dos dois antimaláricos associados não é necessário na molécula híbrida. Neste intuito, mais de 100 moléculas híbridas de trioxanos ligados covalentemente a aminoquinolinas foram sintetizados (as trioxaquininas), sendo selecionada uma molécula para testes pré-clínicos de ação antimalárica (MEUNIER, 2008).

O artesunato de mefloquina (MEFAS) é um novo sal híbrido que contém duas funcionalidades de antimaláricos: o anel quinolínico proveniente da mefloquina e o anel endoperóxido do artesunato. A faixa de fusão do MEFAS foi de 122 a 125 °C, significativamente inferior às apresentadas por cloridrato de mefloquina e artesunato separadamente. Foram observados dois picos no espectro de massas: o pico molecular $[M^+]$ com relação massa/carga de 763 e um pico em 379 correspondente à mefloquina. No espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do artesunato de mefloquina não se observa a presença do sinal em δ 12,26 ppm referente ao hidrogênio do grupo ácido carboxílico. Além disso, no espectro na região do infravermelho não se observa a banda de absorção com número de onda de 3276 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação oxigênio-hidrogênio (vO-H) observada no espectro do artesunato (VAROTTI *et al.*, 2008).

O custo da produção deste composto foi menor que da aquisição de artesunato e mefloquina separadamente. Além disso, este composto apresentou atividade contra cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina superior à do artesunato e mefloquina combinados em diferentes proporções, *in vitro*. Em testes animais, o artesunato de mefloquina administrado em dose de 10 mg/kg/dia foi capaz de curar os camundongos e mantê-los curados até o 30º dia de administração, enquanto aqueles tratados com mefloquina ou uma combinação de artesunato e mefloquina nas doses de 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia não sobreviveram até este período (VAROTTI *et al.*, 2008). O esquema da síntese do artesunato de mefloquina e sua estrutura estão apresentados na Figura 7.

Figura 7 – Esquema da síntese e fórmula estrutural do artesunato de mefloquina (VAROTTI *et al.*, 2008)



1.7 Métodos analíticos para a determinação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos

Não foram encontrados, até o momento, métodos analíticos utilizando a cromatografia a líquido de alta eficiência para o doseamento simultâneo de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos em dose fixa combinada, nem na literatura científica nem em compêndios oficiais como as farmacopeias. Um método empregando a espectrofotometria na região do ultravioleta para a determinação desses fármacos em comprimidos foi descrito por KALYANKAR e colaboradores (2013).

Métodos analíticos para a determinação do artesunato matéria-prima e em comprimidos podem ser encontrados na Farmacopeia Internacional, 4ª edição (THE INTERNATIONAL, 2006) e na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010). As monografias constantes dessas farmacopeias são bastante semelhantes, trazendo, tanto para matéria-prima quanto para os comprimidos, um método volumétrico (volumetria de neutralização em meio aquoso) e um método cromatográfico (cromatografia a líquido de alta eficiência em fase reversa) para a determinação do artesunato. As condições cromatográficas descritas para a determinação do artesunato em comprimidos na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, estão resumidas na Tabela 7.

Tabela 7 – Condições cromatográficas para a determinação de artesunato em comprimidos, segundo a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010)

<i>Parâmetros</i>	<i>Condições</i>
Preparação do tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,0	Pesar 1,36 g de KH_2PO_4 e completar para 1000 mL com água ultrapura. Ajustar o pH para 3,0 com ácido fosfórico.
Fase móvel	Acetonitrila:tampão fosfato de potássio monobásico (50:50).
Fluxo da fase móvel	0,6 mL/min
Volume de injeção	20 μL
Coluna	Sílica ligada a octadecilsilano (C_{18}), 125 x 3 mm, 5 μm
Temperatura da coluna	30 °C
Comprimento de onda de detecção	216 nm
Concentração de trabalho	2 mg/mL de artesunato em acetonitrila (para a solução padrão) e o equivalente a 2 mg/mL de artesunato em Fase móvel (para a solução amostra).

Foram encontrados na literatura científica métodos analíticos utilizando a cromatografia líquida para a determinação de artesunato em matéria-prima e comprimidos (RANHER *et al.*, 2010); para a determinação simultânea de artesunato e amodiaquina em comprimidos (VAILLANT *et al.*, 2012) e um método colorimétrico para a verificação da autenticidade de comprimidos contendo artesunato (GREEN *et al.*, 2000).

Monografias para cloridrato de mefloquina matéria-prima podem ser encontradas nas farmacopeias Americana, 36ª edição (THE UNITED, 2012), Brasileira, 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010), Britânica, edição 2013 (BRITISH, 2012) e Europeia, 7ª edição (THE EUROPEAN, 2010). Monografias para cloridrato de mefloquina comprimidos podem ser encontradas nas farmacopeias Americana 36ª edição (THE UNITED, 2012) e Brasileira, 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010).

Nas farmacopeias Brasileira, Britânica e Europeia é descrito, para o doseamento de cloridrato de mefloquina matéria-prima, um método utilizando a volumetria de neutralização em meio não aquoso, empregando ácido perclórico 0,1 M como titulante (FARMACOPEIA, 2010; BRITISH, 2012; THE EUROPEAN, 2010). É descrito na farmacopeia Americana um método cromatográfico para a determinação do teor de cloridrato de mefloquina na matéria-prima (THE UNITED, 2012). Em relação à determinação de cloridrato de mefloquina em comprimidos, são descritos na farmacopeia Brasileira dois métodos, sendo um espectrofotométrico e o outro cromatográfico (FARMACOPEIA, 2010) e na farmacopeia

Americana é descrito um método cromatográfico (THE UNITED, 2012). As condições cromatográficas descritas para a determinação do cloridrato de mefloquina em comprimidos na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, estão resumidas na Tabela 8.

Tabela 8 – Condições cromatográficas para a determinação de cloridrato de mefloquina em comprimidos, segundo a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010).

<i>Parâmetros</i>	<i>Condições</i>
Preparação do tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,5	transferir cerca de 6,80 g de fosfato de potássio monobásico para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver e completar o volume com água. Ajustar o pH para 3,5 com ácido fosfórico
Fase móvel	Metanol:tampão fosfato de potássio monobásico (60:40).
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Coluna	Sílica ligada a octadecilsilano (C ₁₈), 250 x 4,6 mm, 5 µm
Temperatura da coluna	30 °C
Comprimento de onda de detecção	283 nm
Concentração de trabalho	0,1 mg/mL de cloridrato de mefloquina em Fase móvel (para a solução padrão) e o equivalente a 0,1 mg/mL de cloridrato de mefloquina em Fase móvel (para a solução amostra).

Na literatura científica, foi encontrado um método espectrofotométrico para o doseamento de cloridrato de mefloquina matéria-prima e em comprimidos (RAO & MURTHY, 2002). Um método cromatográfico para a determinação dos isômeros do cloridrato de mefloquina foi descrito por QIU e colaboradores (1992) e outro para a determinação tanto de cloridrato de mefloquina, quanto de difosfato de cloroquina e sulfato de quinina em comprimidos, utilizando a eluição em gradiente, foi descrito por GAUDIANO e colaboradores (2006).

1.8 Métodos bioanalíticos para a determinação de artesunato e cloridrato de mefloquina em plasma humano

Métodos bioanalíticos para a determinação simultânea de artesunato e mefloquina em plasma humano são escassos na literatura científica.

No método descrito por LAI e colaboradores (2007), é utilizado um único procedimento de extração dos fármacos do plasma, e empregados dois sistemas de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para a determinação de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.

As amostras de plasma foram extraídas utilizando-se a extração em fase sólida com um cartucho de sílica ligada a octadecilsilano, sendo o extrato evaporado até *secura*, reconstituído em mistura de etanol e água (1:1) e mantido a 4 °C até a sua utilização nas análises. Para a determinação de artesunato e diidroartemisinina, foi utilizado sistema CLAE em fase reversa sendo a detecção feita por meio de detector eletroquímico no modo redutivo. A determinação de mefloquina no plasma foi realizada com um sistema CLAE também em fase reversa, porém com parâmetros cromatográficos distintos e detecção por meio de detector ultravioleta a 284 nm.

Outro método encontrado na literatura é o descrito por HODEL e colaboradores (2009). Neste estudo, foi desenvolvido e validado um método para a determinação simultânea de 14 antimaláricos e seus metabólitos (arteméter, artesunato, diidroartemisinina, amodiaquina, N-desetil-amodiaquina, lumefantrina, desbutil-lumefantrina, piperaquina, pironaridina, melfoquina, cloroquina, quinina, pirimetamina e sulfadoxina) em plasma humano, se utilizando da espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida. As amostras biológicas foram obtidas de pacientes de um estudo farmacocinético internacional realizado no Camboja e Tanzânia.

Às amostras de plasma, foram acrescentados 700 µL de acetonitrila para a precipitação de proteínas, seguido de homogeneização e centrifugação. O sobrenadante (900 µL) foi evaporado até *secura* em corrente de nitrogênio à temperatura ambiente, e reconstituído com 150 µL de mistura de metanol e solução de formato de amônio 20 mM, na proporção de 1:1. Seguiu-se nova centrifugação, sendo 130 µL do sobrenadante transferido para vials e analisados (HODEL *et al.*, 2009)

As condições de detecção por espectrometria de massas empregadas por HODEL e colaboradores (2009) para arteméter, artesunato, diidroartemisinina e mefloquina foram as descritas na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros para a detecção de arteméter, artesunato, diidroartemisinina e mefloquina por espectrometria de massas (HODEL *et al.*, 2009).

<i>Fármaco</i>	<i>Íon precursor (m/z)</i>	<i>Íon produto (m/z)</i>	<i>Energia de colisão (eV)</i>
Arteméter	221,0	163,0	19
Artesunato	221,0	163,0	19
Diidroartemisinina	221,0	163,0	19
Mefloquina	379,0	361,0	31

Um estudo foi desenvolvido por CÉSAR e colaboradores (2011) para a determinação simultânea de arteméter e lumefantrina em plasma humano, utilizando o artesunato como padrão interno. Nesse estudo, 250 µL de plasma foram adicionados de 50 µL de uma solução contendo 5 µg/mL de artesunato em metanol, sendo a mistura levada a vórtex por 30 segundos para homogeneização. Em seguida, foi acrescentado 450 µL de solução de ácido acético glacial a 0,5% (v/v) em metanol e, em sequência, a mistura foi levada a vórtex por 40 segundos. A mistura foi então centrifugada, sendo o sobrenadante transferido para *vial* e injetado no cromatógrafo. Utilizando-se a detecção por espectrometria de massas, a transição empregada para o artesunato foi a de m/z 402 para o íon precursor (aduto de amônio) e m/z 267 para o íon produto.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver e validar métodos para a quantificação de artesunato e mefloquina no artesunato de mefloquina (MEFAS), em comprimidos em dose fixa combinada e em plasma humano.

2.2 Específicos

- Avaliar características físicas e físico-químicas do sal artesunato de mefloquina.
- Desenvolver e validar método analítico para a determinação de artesunato e mefloquina no sal MEFAS.
- Desenvolver e validar método analítico para a determinação de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos em dose fixa combinada.
- Desenvolver e validar método bioanalítico para a determinação de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina em plasma humano.

3 CAPÍTULO I - ESTUDO PRELIMINAR COM O ARTESUNATO DE MEFLOQUINA

3.1 Material e métodos

3.1.1 Material

3.1.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras

- Artesunato SQR (lote 103224), adquirido da Organização Mundial da Saúde e Cloridrato de mefloquina SQR (lote F1J249) adquirido da Farmacopeia Americana (USP), com validade indeterminada e teor de 100,0%; matérias-primas de artesunato, cloridrato de mefloquina e mefloquina base livre doados por Farmanguinhos
- Amostras de MEFAS fornecidas por Farmanguinhos e identificadas pelos códigos: 004/08, 005/08, 006/08, 007/08, 001/09S, 001/09S2, 002/09, 004/09, 005/09, 008/09A, 008/09B e 009/10.

3.1.1.2 Reagentes e vidraria

- Água ultrapura.
- Solventes e reagentes grau analítico: metanol, acetonitrila, fosfato monobásico de potássio, ácido fosfórico.
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres e kit de filtração.
- Membrana de celulose regenerada SARTORIUS com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 μm .
- Dispositivos filtrantes de celulose regenerada MINISART com 15 mm de diâmetro e poros de 0,45 μm .
- Vials para uso em cromatógrafo a líquido.
- Coluna cromatográfica XBridge WATERS C₁₈, 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 μm .

3.1.1.3 Equipamentos

- Aparelho para ponto de fusão MICROQUÍMICA modelo MQAPF 301.
- Aparelho de ultrassom UNIQUE 1400.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP210D.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência AGILENT 1200 equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível.
- Espectrofotômetro na região do infravermelho PERKIN-ELMER modelo Spectrum One IR-FT.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE Direct-Q.

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Espectros na região do infravermelho e faixas de fusão das amostras de MEFAS

Foram traçados espectros na região do infravermelho para todas as amostras de MEFAS recebidas. Para auxiliar a comparação, foram traçados também espectros do artesunato SQR, cloridrato de mefloquina SQR e da mefloquina base fornecida. Todos os espectros foram traçados utilizando-se o acessório do aparelho para medidas por reflectância. Os espectros das amostras de MEFAS foram analisados quanto às principais bandas de absorção apresentadas pelos compostos.

As faixas de fusão de cada uma das amostras recebidas foram determinadas e estes valores foram comparados aos obtidos por VAROTTI e colaboradores (2008) em seu estudo. Foram registradas a temperatura do início da fusão e a temperatura correspondente à fusão completa da amostra.

3.1.2.2 Seleção e otimização das condições cromatográficas

Inicialmente, foram utilizadas as condições cromatográficas descritas na Tabela 10 para a quantificação de artesunato e mefloquina no MEFAS. Estas condições foram as mesmas

empregadas para a determinação de cloridrato de mefloquina em comprimidos (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Soluções contendo artesunato e cloridrato de mefloquina matéria-prima foram injetadas para verificação de seus fatores de retenção e da resolução entre os picos. Amostras de MEFAS foram preparadas utilizando metanol como solvente, na concentração de 2 mg/mL do sal.

O tampão fosfato de potássio monobásico a 0,05 mol/L foi preparado pesando-se 6,8 g de KH_2PO_4 e transferindo-se para balão volumétrico de 1000 mL, utilizando-se água ultrapura como solvente. O pH foi ajustado para 3,0 utilizando-se ácido fosfórico. Foi utilizada uma solução de uracila a 0,1 mg/mL, tendo como solvente a fase móvel, para a determinação do tempo morto (t_0) e, com este valor, calcular os fatores de retenção (k) dos compostos.

Tabela 10 – Condições cromatográficas iniciais para a determinação de artesunato e mefloquina presentes no sal MEFAS.

<i>Parâmetros</i>	<i>Condições</i>
Fase móvel	Metanol:tampão fosfato de potássio monobásico (60:40).
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Volume de injeção	20 μL
Coluna	XBridge C_{18} 250 x 4,6 mm, 5 μm
Temperatura da coluna	30 °C
Comprimento de onda de detecção	210 nm, 283 nm com aquisição dos espectros na região do UV
Concentração de trabalho	2 mg/mL de MEFAS em metanol
Tempo de corrida	40 minutos

Posteriormente, as condições cromatográficas foram alteradas para as descritas na Tabela 11, com a substituição do solvente metanol por acetonitrila na constituição da fase móvel.

Tabela 11 – Condições cromatográficas para a determinação de artesunato e mefloquina presentes no sal MEFAS.

<i>Parâmetros</i>	<i>Condições</i>
Fase móvel	Acetonitrila:tampão fosfato de potássio monobásico (50:50).
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Volume de injeção	20 μL
Coluna	XBridge C_{18} 250 x 4,6 mm, 5 μm
Temperatura da coluna	30 °C
Comprimento de onda de detecção	210 nm, 283 nm com aquisição dos espectros na região do UV
Concentração de trabalho	2 mg/mL de MEFAS em fase móvel
Tempo de corrida	15 minutos

Perfis cromatográficos das amostras de sal MEFAS foram obtidos utilizando-se as condições descritas nas Tabelas 10 e 11.

3.1.2.3 Cálculos dos parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos como tempo morto, fator de retenção, número de pratos, resolução entre picos e outros foram calculados conforme os termos e fórmulas relacionados na Tabela 12 e a representação gráfica deles na Figura 8 e Figura 9.

Tabela 12 – Descrição, símbolos e fórmulas utilizados nos cálculos dos parâmetros cromatográficos (SNYDER *et al.*, 1997; THE UNITED, 2012).

Símbolos	Parâmetros
t_0	Tempo morto: tempo necessário para que um composto que não seja retido pela coluna alcance o detector.
t_r	Tempo de retenção: tempo necessário para que o analito percorra o trajeto injetor-coluna-detector. Fator de retenção: retenção do analito expressa como o número de volumes mortos.
k	$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$
α	Fator de separação: razão entre dois fatores de retenção $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$
W	Largura do pico: distância entre as duas tangentes às laterais do pico, medida à linha de base.
$W_{h/2}$	Largura a meia altura: distância entre as duas tangentes às laterais do pico, medida à meia altura.
$W_{0,05}$	Largura a 5% da altura: distância entre as duas tangentes às laterais do pico, medida a 5% da altura.
R	Resolução: grau de separação entre picos adjacentes. $R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$
N	Número de pratos: medida da eficiência da coluna. $N = 16\left(\frac{t_r}{W}\right)^2$
f	Distância da tangente esquerda até a linha perpendicular que liga o ápice do pico à linha de base Fator de cauda – compara a largura do pico a 5% da sua altura com a frente do pico (f)
T	$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$

Figura 8 – Separação cromatográfica de duas substâncias (FARMACOPEIA, 2010).

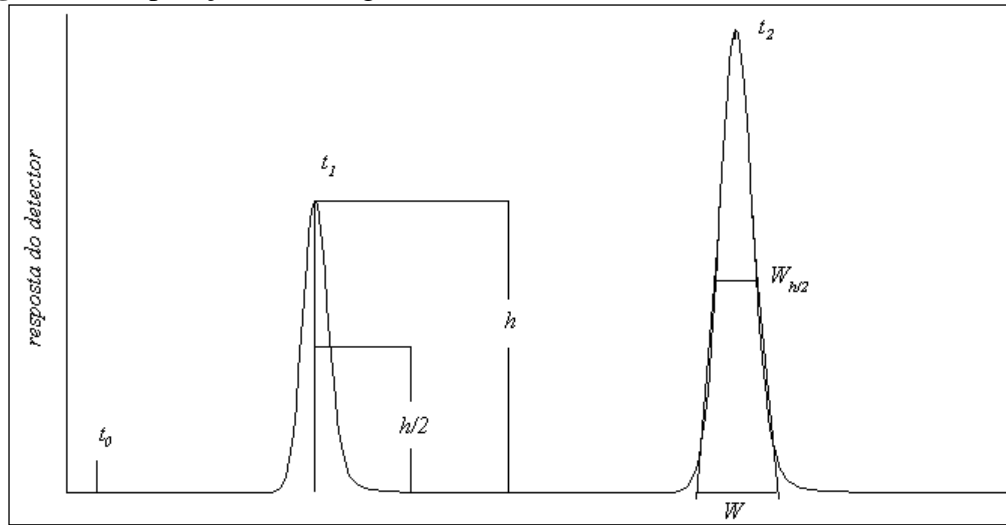
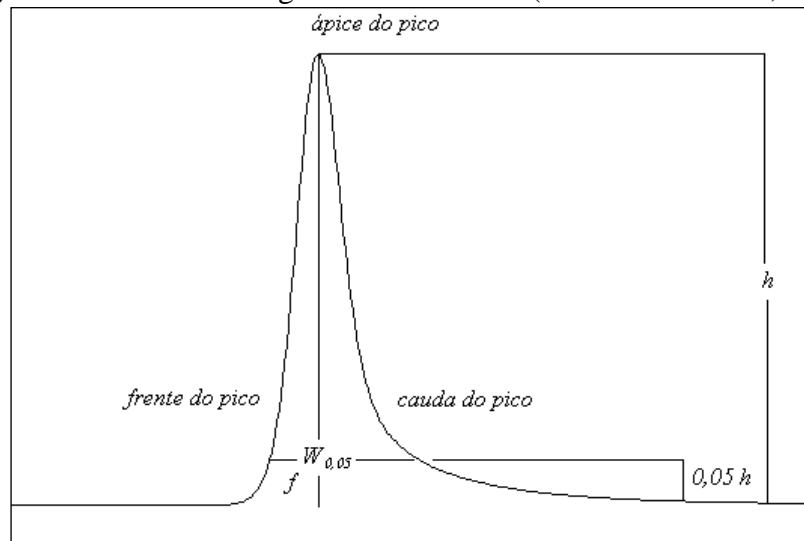


Figura 9 – Pico cromatográfico assimétrico (FARMACOPEIA, 2010).



3.2 Resultados e discussão

A seguir, são apresentados e discutidos os resultados para algumas amostras de MEFAS. Os resultados para todas as amostras de MEFAS analisadas podem ser encontrados no **APÊNDICE A**.

3.2.1 Espectros na região do infravermelho e faixas de fusão das amostras de MEFAS

3.2.1.1 Faixa de fusão

Os valores encontrados para a faixa de fusão das amostras de MEFAS recebidas estão relacionados na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores de faixa de fusão medidos para diferentes amostras do sal MEFAS.

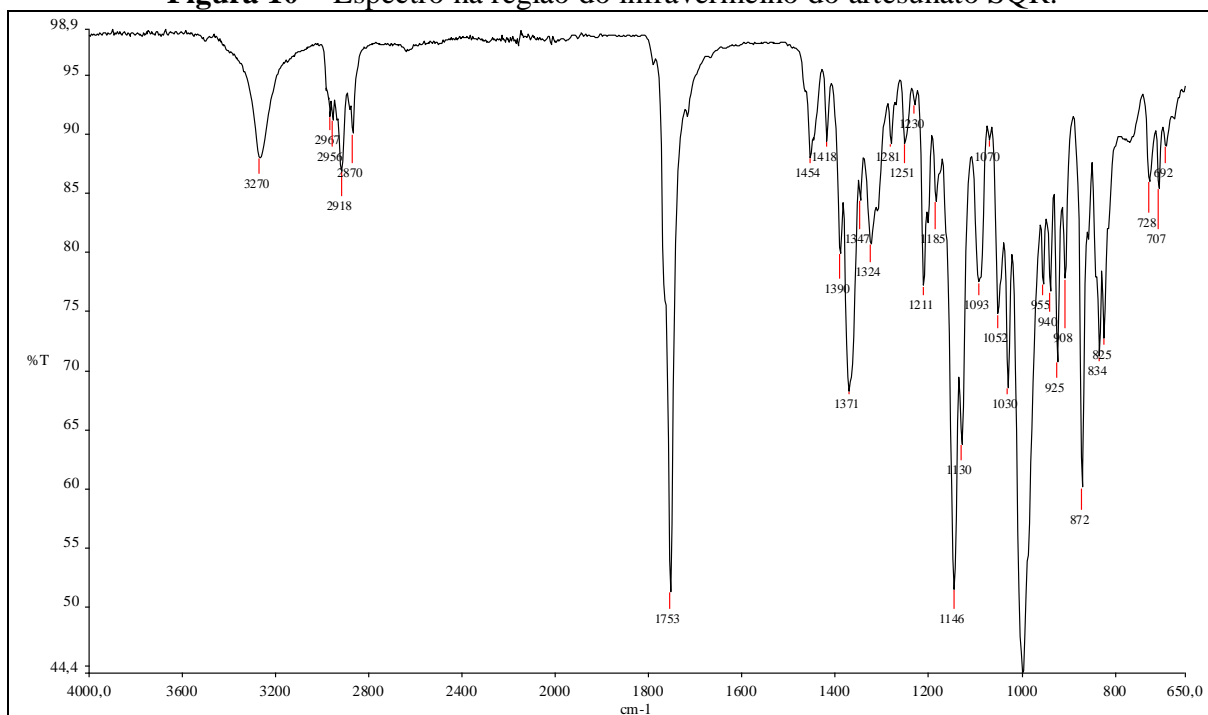
<i>Código da amostra</i>	<i>Faixa de fusão (°C)</i>
004/08	93,5 - 100,0
005/08	41,9 - 77,3
006/08	92,8 - 103,9
007/08	130,0 - 132,6
001/09S	42,5 - 64,0
001/09S2	99,2 - 107,6
002/09	99,5 - 105,5
004/09	92,0 - 99,0
005/09	129,4 - 132,0
008/09A	97,5 - 106,8
008/09B	93,2 - 98,2
009/10	90,0 - 151,9

Os valores de faixa de fusão encontrados para algumas amostras estão muito distantes da faixa obtida por VAROTTI e colaboradores (2008), que foi de 122 a 125 °C. Algumas amostras apresentaram uma faixa de fusão estreita, o que pode indicar um grau de pureza adequado, como a amostra 007/08, porém, outras amostras apresentaram faixas de fusão excessivamente amplas, como a amostra 009/10. Estes valores discrepantes podem ser explicados pela baixa pureza destas amostras, como observado nos perfis cromatográficos das mesmas, os quais apresentaram outros picos cromatográficos além dos de artesunato e mefloquina.

3.2.1.2 Espectros na região do infravermelho

Primeiramente, foram traçados espectros na região do infravermelho do artesunato SQR (Figura 10), cloridrato de mefloquina SQR (Figura 12) e da mefloquina base livre, a fim de serem utilizados como comparação na análise dos espectros do sal MEFAS.

Figura 10 – Espectro na região do infravermelho do artesunato SQR.



A seguir estão relacionadas as principais bandas de absorção observadas no espectro na região do infravermelho do artesunato SQR (Figura 10).

- 3270 cm^{-1} – banda de absorção referente ao estiramento da ligação oxigênio-hidrogênio do grupo funcional ácido carboxílico do artesunato.
- 2967 a 2870 cm^{-1} – bandas de absorção referentes ao estiramento da ligação carbono-hidrogênio de grupos CH_2 e CH_3 .
- 1753 cm^{-1} – banda de absorção referente ao estiramento da ligação dupla carbono-oxigênio de grupo funcional carbonila.

O espectro obtido para o artesunato SQR se mostrou idêntico ao espectro de referência da Farmacopeia Internacional (Figura 11) (THE INTERNATIONAL, 2006).

Figura 11 – Espectro de referência do artesunato, obtido na região do infravermelho (THE INTERNATIONAL, 2006).

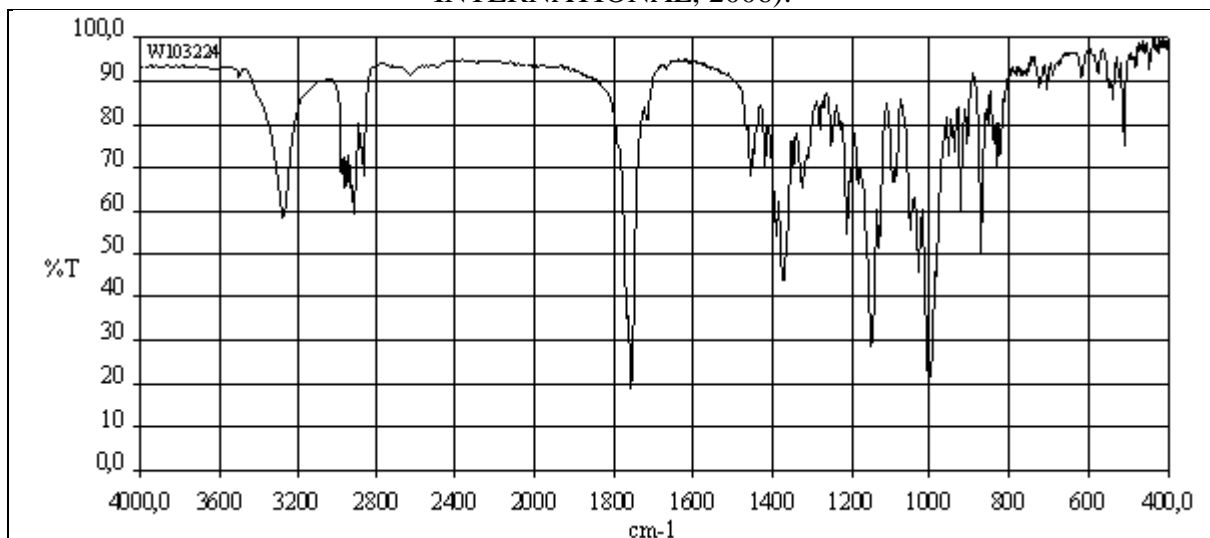
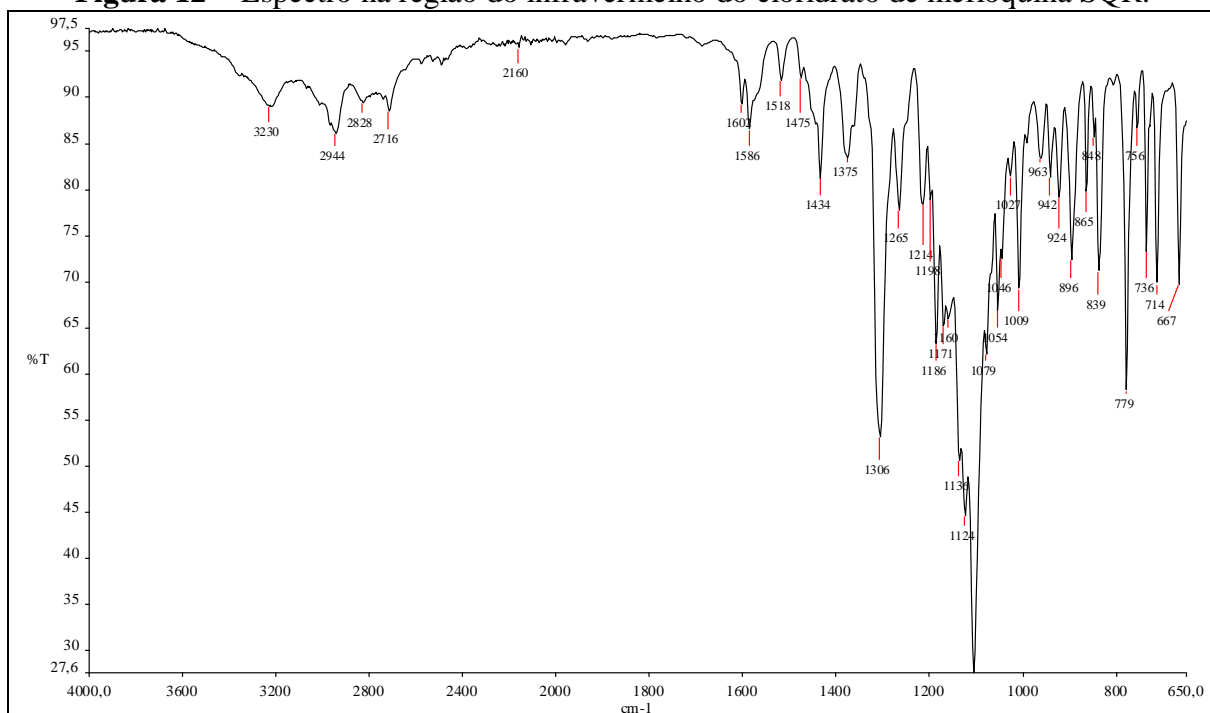


Figura 12 – Espectro na região do infravermelho do cloridrato de mefloquina SQR.



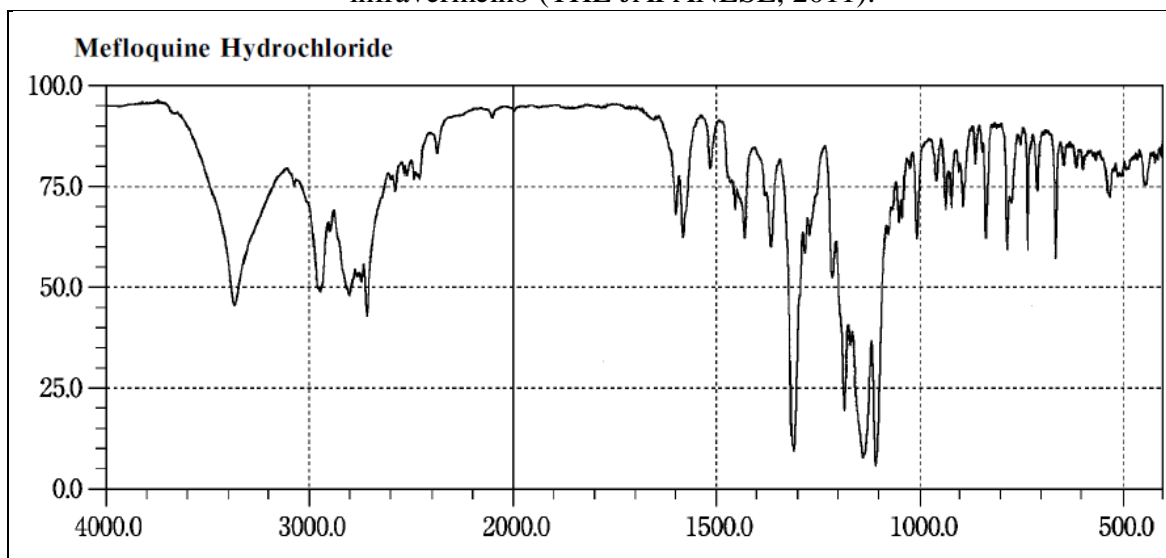
No espectro na região do infravermelho do cloridrato de mefloquina (Figura 12), foram observadas as principais bandas de absorção relacionadas a seguir:

- 3230 cm⁻¹ – banda de absorção referente ao estiramento da ligação oxigênio-hidrogênio do grupo funcional álcool secundário do cloridrato de mefloquina.

- 2944 cm^{-1} – banda de absorção referente ao estiramento da ligação carbono-hidrogênio de grupos CH_2 e CH_3 .
- 1602 e 1586 cm^{-1} – bandas de absorção referentes ao estiramento das ligações duplas carbono-carbono dos anéis aromáticos do cloridrato de mefloquina.

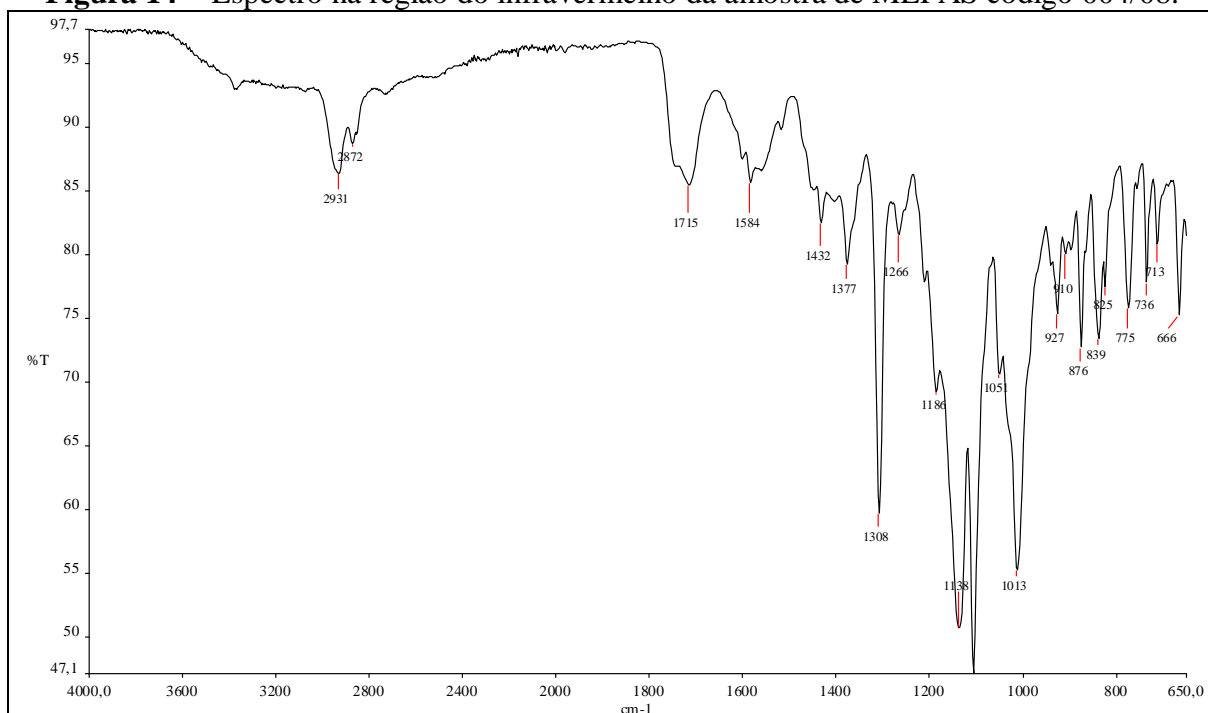
Da mesma forma que para o artesunato SQR, o espectro do cloridrato de mefloquina SQR mostrou-se idêntico ao espectro de referência obtido na Farmacopeia Japonesa 16^a edição (Figura 13) (THE JAPANESE, 2011).

Figura 13 – Espectro de referência do cloridrato de mefloquina, obtido na região do infravermelho (THE JAPANESE, 2011).



No espectro na região do infravermelho da mefloquina base livre (não mostrado), é possível observar praticamente as mesmas bandas de absorção do espectro do cloridrato de mefloquina (Figura 12).

Figura 14 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 004/08.



No espectro na região do infravermelho do sal MEFAS (Figura 14), foram observadas as principais bandas de absorção relacionadas a seguir:

- 2931 cm^{-1} e 2872 cm^{-1} – bandas de absorção referentes ao estiramento da ligação carbono-hidrogênio de grupos CH_2 e CH_3 , presentes nas porções artesunato e mefloquina da molécula.
- 1715 cm^{-1} – banda de absorção referentes ao estiramento da ligação dupla carbono-oxigênio do grupo funcional carbonila remanescente na porção artesunato da molécula.
- 1584 cm^{-1} – banda de absorção referente ao estiramento das ligações dupla carbono-carbono dos anéis aromáticos do cloridrato de mefloquina.

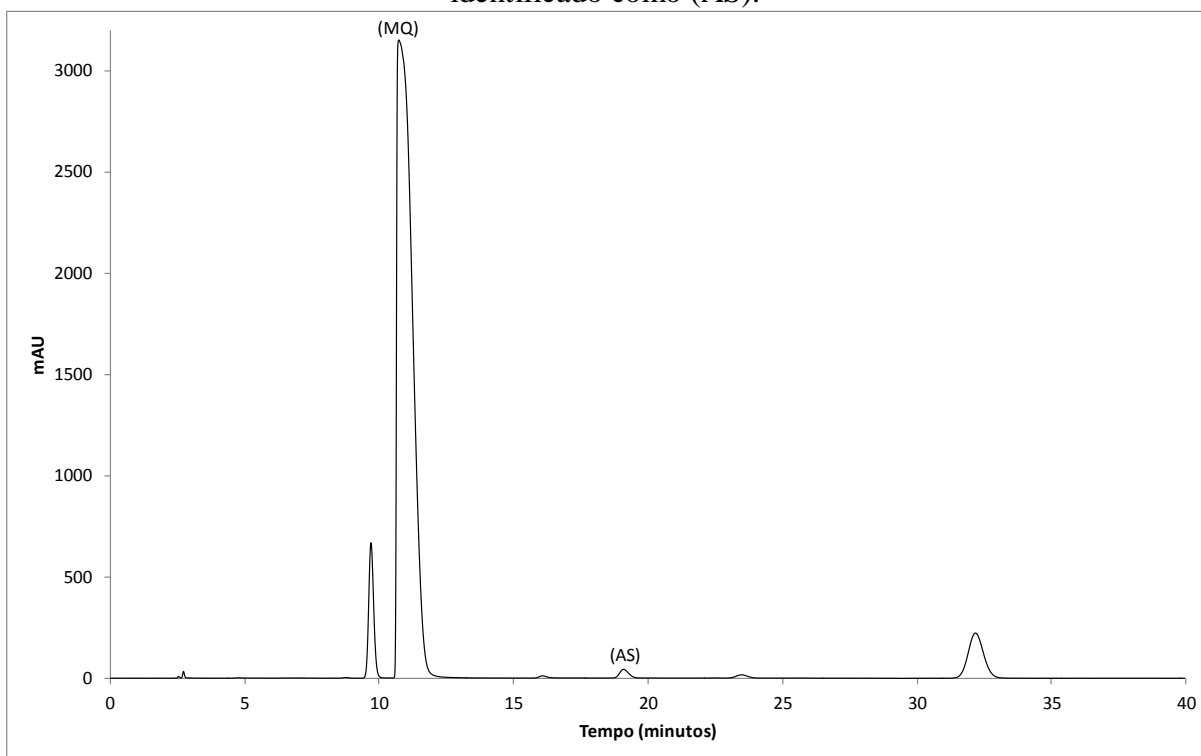
Pode-se perceber que o espectro do sal MEFAS traz bandas de absorção tanto da porção artesunato quanto da porção mefloquina da molécula. O não aparecimento, no espectro do sal MEFAS, da banda de absorção em 3270 cm^{-1} , presente no espectro do artesunato SQR, é um sinal de que o sal entre artesunato e mefloquina foi formado. No caso de haver uma mistura física entre artesunato e mefloquina, a banda de absorção nesse valor de número de onda seria visível.

Outro indício da formação do sal seria a observação da redução do número de onda da banda de absorção referente ao estiramento da ligação dupla carbono-oxigênio do grupo carbonila do artesunato, de um valor em torno de 1750 cm^{-1} para 1600 cm^{-1} . Esta redução não foi observada de maneira clara porque, provavelmente, houve sobreposição desta banda de absorção com as bandas referentes aos anéis aromáticos da mefloquina. Quando o grupo carboxila perde o seu próton, acontece ressonância dos elétrons entre as ligações simples dos dois átomos de oxigênio remanescentes, o que faz com que o caráter de ligação dupla do grupo funcional carbonila seja reduzido, reduzindo também o número de onda desta absorção (PAVIA *et al.*, 2001)

3.2.2 Seleção e otimização das condições cromatográficas

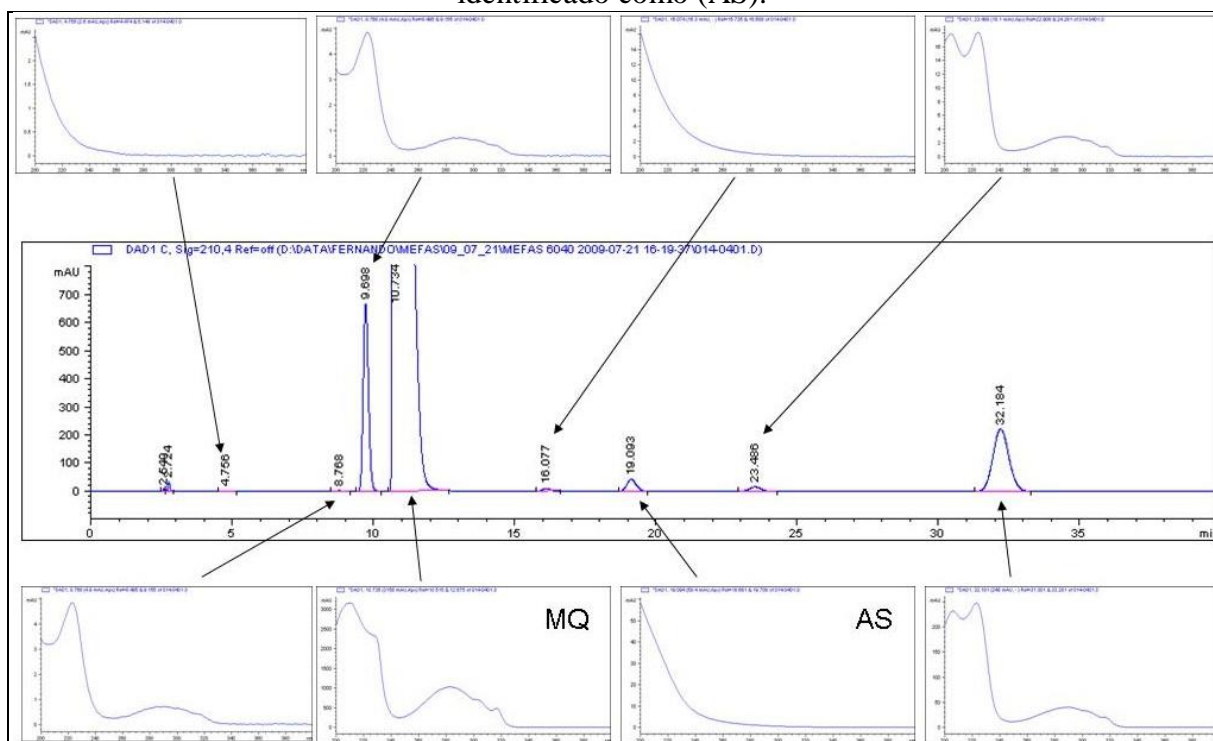
O cromatograma da amostra de sal MEFAS obtido utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 10 é mostrado na Figura 15. O valor do tempo morto (t_0) obtido com a solução de uracila a $0,1\text{ mg/mL}$ preparada em fase móvel foi de 2,66 minutos.

Figura 15 – Cromatograma obtido com a amostra MEFAS código 004/08, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 10 com detecção em 210 nm. O pico referente ao cloridrato de mefloquina está identificado como (MQ) e o pico referente ao artesunato está identificado como (AS).



Ao se observar o cromatograma, é possível visualizar outros picos presentes, além dos picos referentes ao artesunato e à mefloquina. Por ser um sal, o MEFAS se dissocia em água em artesunato e mefloquina base. Estes picos são, provavelmente, impurezas presentes nos materiais de partida ou subprodutos da reação entre artesunato e mefloquina. A expansão do cromatograma da Figura 15 é mostrado na Figura 16. Foram mostrados também os espectros na região do ultravioleta (nos comprimentos de onda de 200 a 400 nm) para os compostos.

Figura 16 – Expansão do cromatograma obtido com a amostra MEFAS código 004/08, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 10 e detecção em 210 nm. O pico referente à mefloquina está identificado como (MQ) e o pico referente ao artesunato está identificado como (AS).



Foram observados ao menos seis outros picos além dos picos referentes ao cloridrato de mefloquina e ao artesunato. A identificação dos picos, tempos de retenção e fatores de retenção está relacionada na Tabela 14.

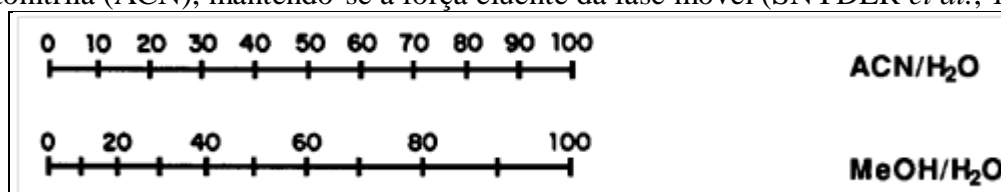
Tabela 14 – Tempos de retenção, fatores de retenção e relação dos picos cromatográficos obtidos em comprimento de onda de 210 nm para a amostra 004/08 do sal MEFAS.

<i>Tempo de retenção (min)</i>	<i>Fator de retenção (k)</i>	<i>Identificação do pico</i>
4,756	0,79	Desconhecido
8,768	2,30	Desconhecido
9,698	2,65	Desconhecido
10,734	3,04	Mefloquina
16,077	5,04	Desconhecido
19,093	6,18	Artesunato
23,486	7,83	Desconhecido
32,184	11,10	Desconhecido

Apesar da presença de picos extras, a resolução entre os picos de mefloquina e artesunato se mostrou adequada ($R > 10$), não sendo considerado o pico situado ($k = 5,04$) entre os picos de interesse.

Porém, o uso de metanol na fase móvel não se mostrou adequado para a separação de mefloquina e artesunato do sal MEFAS. O artesunato apresenta absorção na região do ultravioleta em comprimentos de onda próximos a 200 nm, o que coincide com a absorção do solvente metanol. Assim, o solvente metanol foi substituído por acetonitrila, utilizando-se um nomógrafo (Figura 17) para a manutenção da força eluente.

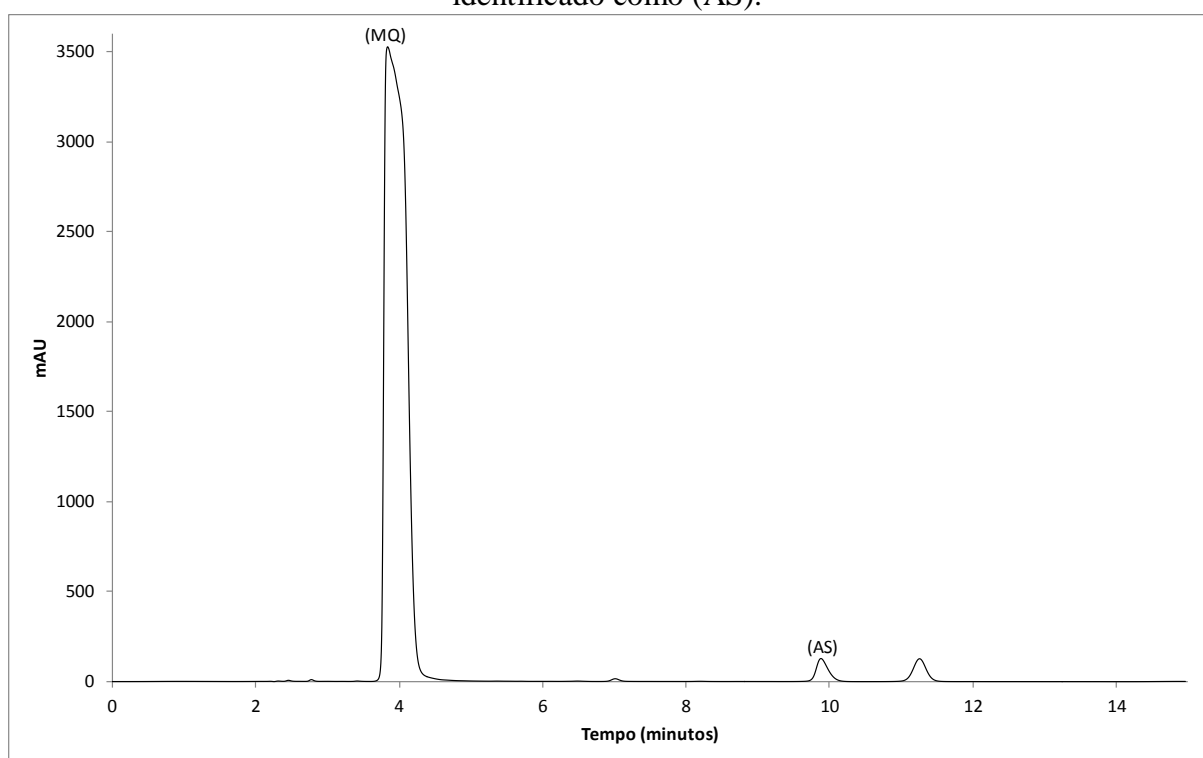
Figura 17 – Nomógrafo utilizado para a substituição do solvente metanol (MeOH) por acetonitrila (ACN), mantendo-se a força eluente da fase móvel (SNYDER *et al.*, 1997).



Sendo assim, e de acordo com o nomógrafo, os 60% de metanol na fase móvel foram substituídos por 50% de acetonitrila de modo a permitir a manutenção da força eluente da fase móvel. O tampão fosfato com o pH ajustado para 3,0 foi mantido, sendo sua proporção modificada para 50%. Desta forma, o solvente acetonitrila não interfere com a absorção do artesunato, pois não apresenta absorção significativa na região do ultravioleta em comprimentos de onda superiores a 190 nm.

Desta forma, as novas condições cromatográficas foram as descritas na Tabela 11. Com a substituição de metanol por acetonitrila na fase móvel, o tempo de corrida foi reduzido para 15 minutos. O valor do tempo morto (t_0) foi de 2,32 minutos. Foram obtidos picos cromatográficos para a mefloquina ($k = 0,66$; tempo de retenção de 3,840 minutos) e para o artesunato ($k = 3,26$; tempo de retenção de 9,881 minutos). Picos adicionais também foram observados com a mudança das condições cromatográficas. É mostrado na Figura 18 o cromatograma, em 210 nm, do sal MEFAS da amostra 008/09A.

Figura 18 – Cromatograma obtido com a amostra MEFAS código 008/09A, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 11 com detecção em 210 nm. O pico referente ao cloridrato de mefloquina está identificado como (MQ) e o pico referente ao artesunato está identificado como (AS).

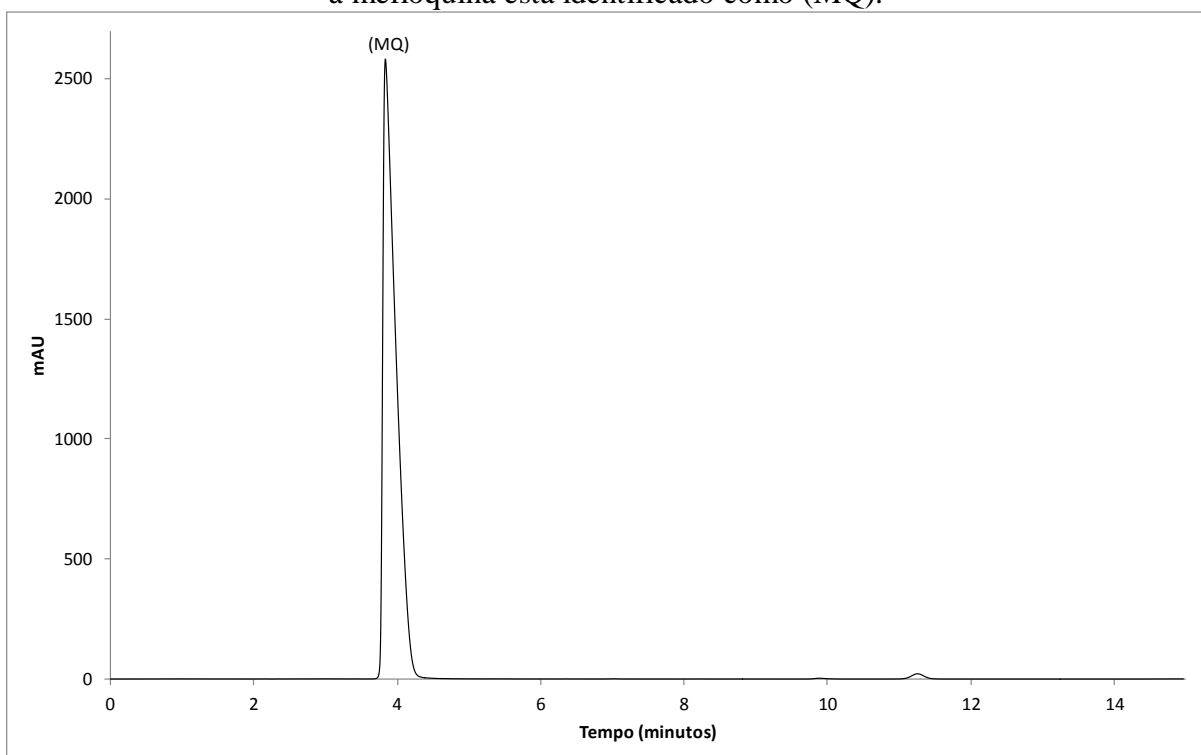


Pode-se observar na Figura 18 que a separação entre os picos de mefloquina e artesunato foi adequada ($R = 6,86$). A medida da resolução foi feita considerando-se o pico da mefloquina obtido com detecção em 283 nm e o pico do artesunato com detecção em 210 nm e desconsiderando-se os picos existentes entre eles. O pico referente à mefloquina apresentou um grande valor de fator de cauda, típico de picos de analitos injetados com massa em excesso. Para uma adequada detecção do artesunato, foi necessário aumentar a concentração das soluções e isso acarretou um aumento na concentração da mefloquina, visto que artesunato e mefloquina estão associados em forma de sal. Para a adequada detecção e

quantificação da mefloquina, foi empregada a detecção simultânea em 283 nm, como mostrado na Figura 19.

Desta forma, utilizando-se a detecção em dois comprimentos de onda, 210 nm para o artesunato e 283 nm para a mefloquina, foi possível a análise simultânea dos dois fármacos no sal MEFAS sem a necessidade de empregar um procedimento de adição de padrão semelhante ao empregado por CÉSAR e colaboradores (2008) para a quantificação, também simultânea, de arteméter e lumefantrina.

Figura 19 – Cromatograma obtido com a amostra MEFAS código 008/09A, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 11 com detecção em 283 nm. O pico referente à mefloquina está identificado como (MQ).



Ainda que as condições cromatográficas para a determinação de mefloquina e artesunato no sal MEFAS tenham sido modificadas, picos adicionais continuaram a ser observados nos cromatogramas, como era de se esperar, dado que as amostras do sal eram as mesmas. Esses picos adicionais foram considerados impurezas da matéria-prima enviada. Há de se considerar, ainda, a possível coeluição de compostos, visto que não são observados, nos perfis cromatográficos utilizando acetonitrila, o mesmo número de picos dos perfis cromatográficos obtidos utilizando-se metanol na fase móvel.

O perfil de impurezas de uma matéria-prima farmacêutica pode ser influenciado pela escolha da rota de síntese, qualidade dos materiais de partida, reagentes e solventes, pelas condições da reação química e das condições da purificação final (KRSTULOVIC & LEE, 2007). Pelo exposto, a obtenção da matéria-prima MEFAS pode ter sido influenciada por um ou mais desses fatores descritos, fazendo com que a substância não apresentasse pureza necessária para uso como insumo farmacêutico.

4 CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DE ARTESUNATO E CLORIDRATO DE MEFLOQUINA EM COMPRIMIDOS EM DOSE FIXA COMBINADA

4.1 Material e métodos

4.1.1 Material

4.1.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras

Artesunato SQR (lote 103224), adquirido da Organização Mundial da Saúde e Cloridrato de mefloquina SQR (lote F1J249) adquirido da Farmacopeia Americana (USP), com validade indeterminada e teor de 100,0%; matérias-primas de artesunato e cloridrato de mefloquina doados por Farmanguinhos. As amostras de comprimidos em dose fixa combinada, também doadas por Farmanguinhos, utilizadas no estudo estão relacionadas na Tabela 15. A amostra do lote 08070845 foi utilizada na validação do método, sendo as demais utilizadas apenas para a determinação do teor de artesunato e cloridrato de mefloquina.

Tabela 15 – Amostras de comprimidos de artesunato e cloridrato de mefloquina em dose fixa combinada utilizados no estudo.

<i>Amostra</i>	<i>Lote</i>	<i>Data de fabricação (mês/ano)</i>	<i>Data de validade (mês/ano)</i>
Artesunato + Mefloquina (25 + 55 mg)	08070845	Julho/2008	Julho/2011
Artesunato + Mefloquina (25 + 55 mg)	9070745	Julho/2009	Julho/2012
Artesunato + Mefloquina (100 + 220 mg)	9050547	Mai/2009	Mai/2012
Artesunato + Mefloquina (100 + 220 mg)	9070736	Julho/2009	Julho/2012
Artesunato + Mefloquina (100 + 220 mg)	9070743	Julho/2009	Julho/2012

4.1.1.2 Reagentes e vidraria

- Água ultrapura.

- Solventes e reagentes grau analítico: acetonitrílica, fosfato monobásico de potássio, ácido fosfórico.
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres e kit de filtração.
- Membrana de celulose regenerada SARTORIUS com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 μm .
- Dispositivos filtrantes de celulose regenerada MINISART com 15 mm de diâmetro e poros de 0,45 μm .
- *Vials* para uso em cromatógrafo a líquido.
- Coluna cromatográfica XBridge WATERS C₁₈, 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 μm .

4.1.1.3 Equipamentos

- Aparelho de ultrassom UNIQUE 1400.
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP210D.
- Coluna cromatográfica ACE C₁₈, 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 μm .
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência AGILENT 1200 equipado com degaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência HP 1100 equipado com degaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) na região do ultravioleta e visível.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE Direct-Q.

4.1.2 Métodos

4.1.2.1 Seleção e otimização das condições cromatográficas

Para a determinação de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos, foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas descritas para o sal MEFAS (Tabela 11). Foi

feito um ajuste na concentração das soluções, observando-se a quantidade dos fármacos no comprimido em dose fixa combinada. A validação foi conduzida segundo a legislação Brasileira (BRASIL, 2003) e literatura científica (GREEN, 1996).

4.1.2.2 Seletividade

Para a avaliação da seletividade do método cromatográfico, foi preparada uma mistura dos excipientes utilizados na fabricação do comprimido em dose fixa combinada. Foi pesada uma alíquota da mistura, contendo quantidade de excipientes correspondente a um peso médio dos comprimidos, e transferida para balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com fase móvel. A solução foi filtrada e injetada no cromatógrafo para avaliar a presença de picos interferentes nos tempos de retenção correspondentes aos analitos de interesse. Os excipientes e sua quantidade foram descritos na Tabela 16.

Tabela 16 – Excipientes utilizados na preparação do placebo para o comprimido de artesunato e cloridrato de mefloquina em dose fixa combinada.

<i>Excipiente</i>	<i>Porcentagem (%)</i>	<i>Quantidade (mg)</i>
Croscarmelose sódica	2	2,3
Celulose microcristalina	22,5	25,9
Estearato de magnésio	3	3,5
Opadry White	2	2,3
Corante azul laca FDC 2	0,5	0,6
Total de excipientes	30,0	34,6
Ingredientes farmacêuticos ativos (artesunato + cloridrato de mefloquina)	70,0	80,0
Peso total do comprimido	100,0	114,6

A pureza espectral dos picos cromatográficos de artesunato e cloridrato de mefloquina foi avaliada por meio do detector de arranjo de diodos (DAD). Utilizando-se o software do cromatógrafo, foram calculados os valores de pureza de pico para ambos os compostos, sendo desejável que este valor seja o mais próximo possível de 1000, segundo o manual de instruções do cromatógrafo.

4.1.2.3 Linearidade

Para a construção da curva analítica, foram preparadas três soluções estoque contendo artesunato matéria-prima na concentração de 2,5 mg/mL e cloridrato de mefloquina na concentração de 5,5 mg/mL cada uma, preparadas utilizando-se a fase móvel como solvente. Foram feitas diluições em fase móvel a partir da solução estoque para obter a faixa de concentração desejada de 50 a 150% da concentração de trabalho para cada fármaco. Cinco soluções diluídas foram preparadas a partir de cada uma das soluções estoque, totalizando 15 soluções, conforme apresentado na Tabela 17.

Tabela 17 – Preparo das soluções de artesunato e cloridrato de mefloquina para avaliação da linearidade do método para doseamento por CLAE.

<i>Volume de solução estoque (mL)</i>	<i>Fase móvel q.s.p. (mL)</i>	<i>Concentração AS (mg/mL)</i>	<i>Concentração MQ (mg/mL)</i>	<i>Nível de concentração(%)*</i>
2,50	25,0	0,250	0,550	50
3,75	25,0	0,375	0,825	75
5,00	25,0	0,500	1,100	100
6,25	25,0	0,625	1,375	125
7,50	25,0	0,750	1,650	150

* em relação à concentração de trabalho.

Em seguida, as soluções foram filtradas, transferidas para *vials* e injetadas uma vez no cromatógrafo, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 11.

A curva analítica foi construída com os valores de área sob os picos de artesunato e de cloridrato de mefloquina obtidos em cada nível de concentração. O gráfico da curva analítica foi examinado visualmente e a regressão linear foi calculada pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se o software GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc.). Foram avaliados o coeficiente de determinação (R^2), o intercepto com o eixo Y e a distribuição dos resíduos. Além disso, foi avaliado o desvio padrão relativo à média dos valores dos fatores de resposta calculados em cada ponto. O fator de resposta é a divisão da resposta obtida com a solução (neste caso, a área sob o pico) pela concentração do analito de interesse em cada ponto.

4.1.2.4 Precisão intradia e interdias

A avaliação da precisão intradia foi realizada pela preparação de 6 amostras a 100% da concentração de trabalho. A precisão interdias foi realizada pela repetição deste procedimento no dia seguinte. Os resultados foram agrupados e calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) das 12 determinações. Além disso, foi feito teste estatístico para comparação das médias dos teores de artesunato e cloridrato de mefloquina em cada um dos dias avaliados.

O peso médio de 20 comprimidos foi determinado e estes foram triturados. Pesou-se, do pó dos comprimidos, o equivalente a 25 mg de artesunato e 55 mg de cloridrato de mefloquina e transferiu-se para balões volumétricos de 50 mL. Foram adicionados cerca de 40 mL de fase móvel e os balões foram levados a banho de ultrassom por 10 minutos. Em seguida, os volumes dos balões foram completados com fase móvel e homogeneizou-se. As soluções, na concentração teórica de 0,5 mg/mL de artesunato e 1,1 mg/mL de cloridrato de mefloquina, foram filtradas, transferidas para *vials* e injetadas uma vez no cromatógrafo.

A solução padrão foi preparada pesando-se exatamente cerca de 25 mg de artesunato SQR e 55 mg de cloridrato de mefloquina SQR e transferindo-se para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados cerca de 40 mL de fase móvel e os balões foram levados a banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com fase móvel e agitou-se até homogeneização. As soluções, na concentração 0,5 mg/mL de artesunato e 1,1 mg/mL de cloridrato de mefloquina, foram filtradas, transferidas para *vials* e injetadas no cromatógrafo. A solução padrão foi injetada 5 vezes para a verificação da adequabilidade do sistema.

Os teores de artesunato e de cloridrato de mefloquina nos comprimidos foram calculados a partir das áreas dos picos obtidos com as soluções padrão e amostra.

4.1.2.5 Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada em 3 níveis de concentração com a adição de quantidades de artesunato e de cloridrato de mefloquina matéria-prima a uma quantidade conhecida de amostra de comprimidos.

Foram pesados e pulverizados 20 comprimidos e calculou-se o peso médio. Transferiu-se, em duplicata, quantidade do pó dos comprimidos, equivalente a 7,5 mg de artesunato e 16,5 mg de cloridrato de mefloquina para balões volumétricos de 50 mL e acrescentaram-se cerca de 40 mL de fase móvel. Os balões foram levados a banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com fase móvel. As soluções, contendo 0,15 mg/mL de artesunato e 0,33 mg/mL de cloridrato de mefloquina, foram filtradas, transferidas para *vials* e injetadas uma vez no cromatógrafo.

As soluções fortificadas correspondentes a 75%, 100% e 125% da concentração de trabalho foram preparadas pesando-se, em triplicata, as quantidades indicadas na Tabela 18 e na Tabela 19 transferindo-se para balões volumétricos de 50 mL. Foram acrescentados cerca de 40 mL de fase móvel e os balões foram levados a banho de ultrassom por 10 minutos. Completou-se o volume com fase móvel e as soluções foram filtradas, transferidas para *vials* e injetadas uma vez no cromatógrafo.

Tabela 18 – Preparo das soluções fortificadas de artesunato (AS) para avaliação da exatidão do método para doseamento por CLAE.

<i>Nível de concentração</i>	<i>Massa de AS da amostra (mg)</i>	<i>Massa de AS da matéria-prima adicionada (mg)</i>	<i>Concentração esperada de AS (mg/mL)</i>
75%	7,5	11,25	0,375
100%	7,5	17,50	0,500
125%	7,5	23,75	0,625

Tabela 19 – Preparo das soluções fortificadas de cloridrato de mefloquina (MQ) para avaliação da exatidão do método para doseamento por CLAE.

<i>Nível de concentração</i>	<i>Massa de MQ da amostra (mg)</i>	<i>Massa de MQ da matéria-prima adicionada (mg)</i>	<i>Concentração esperada de MQ (mg/mL)</i>
75%	16,5	24,75	0,825
100%	16,5	38,50	1,100
125%	16,5	52,25	1,375

A solução padrão foi preparada pesando-se exatamente cerca de 25 mg de artesunato SQR e 55 mg de cloridrato de mefloquina SQR e transferindo-se para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados cerca de 40 mL de fase móvel e os balões foram levados a banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com fase móvel e agitou-se até homogeneização. As soluções, na concentração 0,5 mg/mL de artesunato e 1,1 mg/mL de

cloridrato de mefloquina, foram filtradas, transferidas para *vials* e injetadas no cromatógrafo. A solução padrão foi injetada 5 vezes para a verificação da adequabilidade do sistema.

As porcentagens de recuperação foram calculadas pela relação entre as concentrações de artesunato e de cloridrato de mefloquina obtidas experimentalmente e as concentrações teóricas dos mesmos fármacos nas soluções fortificadas. Os valores de referência para a recuperação média em cada nível de concentração foram entre 98,0 e 102,0%, segundo GREEN (1996).

4.1.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada utilizando-se o teste de Youden (YOU DEN & STEINER, 1975) de maneira similar à empregada para lumefantrina em estudo publicado anteriormente (CÉSAR & PIANETTI, 2009). Por meio desse teste, foi possível avaliar sete parâmetros cromatográficos diferentes em oito experimentos. Os parâmetros utilizados foram a porcentagem de acetonitrila na fase móvel, o pH do tampão fosfato utilizado, a temperatura em que a coluna foi mantida, o fluxo da fase móvel, a marca da coluna cromatográfica utilizada, a marca do solvente acetonitrila utilizado e o modelo do cromatógrafo empregado nas análises. Os parâmetros e as variações utilizadas estão relacionadas na Tabela 20.

Tabela 20 – Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez para o método cromatográfico de determinação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina.

	<i>Parâmetro</i>	<i>Condição nominal</i>	<i>Variação</i>
A/a	Porcentagem de acetonitrila na fase móvel	50% - A	47% - a
B/b	pH do tampão da fase móvel	3,0 - B	3,5 - b
C/c	Temperatura da coluna (°C)	30 - C	35 - c
D/d	Fluxo da fase móvel (mL/min)	1,0 - D	1,2 - d
E/e	Marca da coluna	Waters - E	ACE - e
F/f	Marca do solvente acetonitrila utilizado	Tedia - F	HoneyWell - f
G/g	Modelo do cromatógrafo	1200 - G	1100 - g

Desta forma, os experimentos foram realizados de acordo com a combinação fatorial descrita na Tabela 21.

Tabela 21 – Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para a avaliação da robustez do método cromatográfico pelo teste de Youden.

<i>Parâmetro / Experimento</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
Porcentagem de acetonitrila na fase móvel	A	A	A	A	a	a	a	a
pH do tampão da fase móvel	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura da coluna (°C)	C	c	C	c	C	c	C	c
Fluxo da fase móvel (mL/min)	D	D	d	d	d	d	D	D
Marca da coluna	E	e	E	e	e	E	e	E
Marca do solvente acetonitrila utilizado	F	f	f	F	F	f	f	F
Modelo do cromatógrafo	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Para determinar a influência de cada parâmetro no resultado final, a média dos quatro valores correspondentes às letras maiúsculas do resultado (condição nominal) é comparada à média dos quatro valores obtidos para as letras minúsculas (condição alterada). Por exemplo, para a avaliação da influência da porcentagem de acetonitrila na fase móvel (parâmetro A), a fórmula empregada foi a seguinte:

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

Esta fórmula foi utilizada para a avaliação da influência das variações nos teores de artesunato e cloridrato de mefloquina, áreas sob os picos, tempos de retenção, fator de cauda e número de pratos teóricos.

Para a realização do teste foram preparadas uma solução padrão e uma solução amostra. As soluções continham 0,5 mg/mL de artesunato e 1,1 mg/mL de cloridrato de mefloquina, sendo o solvente fase móvel. As soluções padrão e amostra foram preparadas conforme descrito na seção 4.1.2.4 *Precisão intradia e interdias* e injetadas três vezes no cromatógrafo.

4.1.2.7 Estabilidade das soluções

Para avaliar a estabilidade dos picos dos analitos em solução, foram preparadas quatro soluções:

- Solução padrão, contendo artesunato SQR e cloridrato de mefloquina SQR a 0,5 mg/mL e 1,1 mg/mL, respectivamente, em fase móvel.
- Solução amostra, utilizando o pó dos comprimidos, contendo o equivalente a 0,5 mg/mL de artesunato e 1,1 mg/mL de cloridrato de mefloquina preparada em fase móvel.
- Solução de artesunato SQR a 0,5 mg/mL em fase móvel.
- Solução de cloridrato de mefloquina a 1,1 mg/mL em fase móvel.

Estas soluções foram injetadas a cada hora no cromatógrafo, durante 8 horas no total, para avaliação de redução de áreas sob os picos ou aparecimento de picos referentes à degradação das substâncias. As condições cromatográficas utilizadas foram as descritas na Tabela 11.

4.1.2.8 Análises de comprimidos de artesunato e cloridrato de mefloquina em dose fixa combinada

Amostras de comprimidos em dose fixa combinada contendo 25 e 55 mg; e 100 e 220 mg de artesunato e cloridrato de mefloquina, respectivamente, foram analisados utilizando-se o método proposto.

Foi realizada a determinação de peso em formas farmacêuticas para obtenção do valor do peso médio de 20 comprimidos e seus respectivos desvios percentuais, conforme método geral 5.1.1 da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010). As amostras dos comprimidos contendo 25 mg de artesunato e 55 mg de cloridrato de mefloquina foram preparadas conforme descrito na seção 4.1.2.4 *Precisão intradia e interdias*. As amostras dos comprimidos contendo 100 mg de artesunato e 220 mg de cloridrato de mefloquina foram preparadas de maneira semelhante à descrita, exceto por ter sido pesado o equivalente a 0,5 peso médio do comprimido e o volume inicial ter sido de 100 mL. As determinações foram realizadas em duplicata, sendo o resultado apresentado a média dos dois valores encontrados.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Seleção e otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas do sal MEFAS descritas anteriormente (Tabela 11).

Foi necessário realizar um ajuste nas concentrações das soluções, visto que, no sal MEFAS, a proporção molar entre artesunato e mefloquina é de 1:1, sendo aproximadamente a mesma proporção em massa, já que a massa molar do artesunato é de 384,42 g/mol e a massa molar da mefloquina base é de 378,28 g/mol.

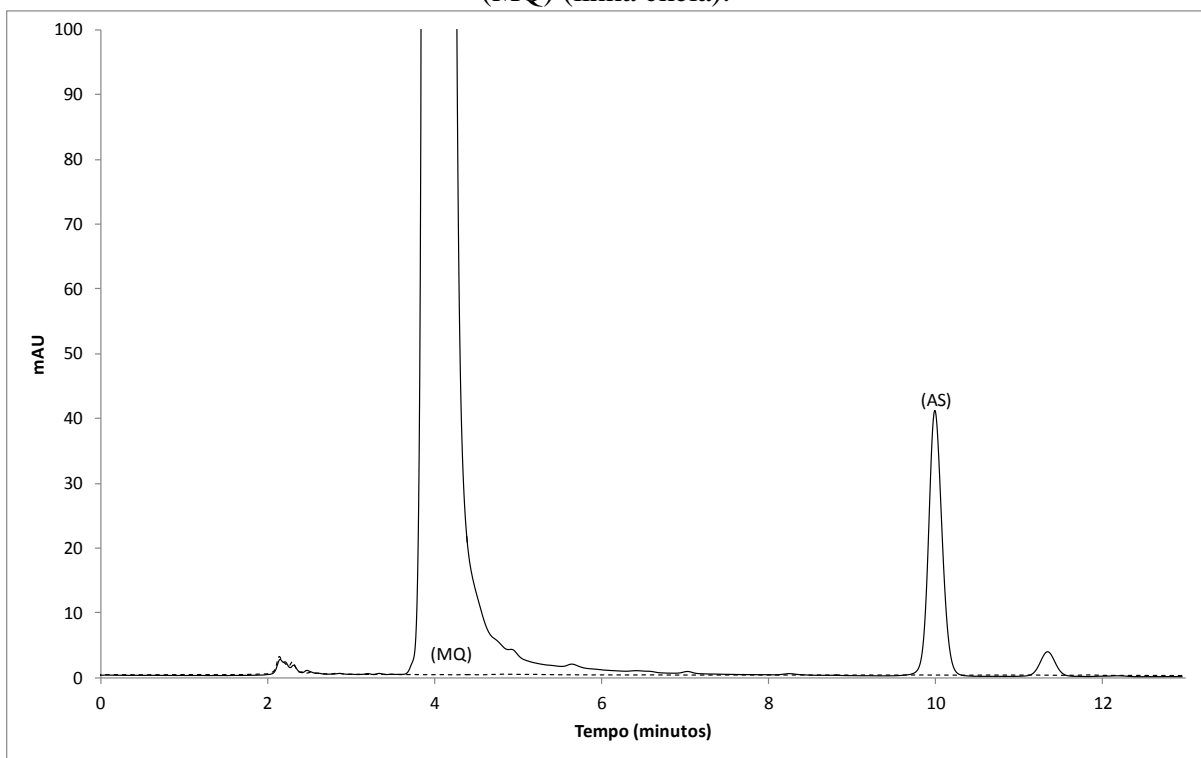
Existem duas apresentações para o comprimido em dose fixa combinada: uma contendo 25 mg de artesunato e 55 mg de cloridrato de mefloquina e outra contendo 100 mg de artesunato e 220 mg de cloridrato de mefloquina. Assim, as concentrações de cloridrato de mefloquina nas soluções serão sempre 1,1 vezes maiores que as concentrações de artesunato.

As concentrações de trabalho utilizadas foram então de 0,5 mg/mL para o artesunato e 1,1 mg/mL para o cloridrato de mefloquina.

4.2.2 Seletividade

Como mostrado na Figura 20, os excipientes não interferiram na determinação de artesunato e cloridrato de mefloquina. Observando-se o cromatograma, não há pico no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Figura 20 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos, em comprimento de onda de 210 nm, com a preparação contendo os excipientes do comprimido em dose fixa combinada (linha tracejada) e com a amostra de comprimidos de artesunato (AS) e cloridrato de mefloquina (MQ) (linha cheia).



Os fatores de pureza foram obtidos para os picos de artesunato e cloridrato de mefloquina. Para o artesunato, o fator foi de 999,795; evidenciando uma grande similaridade entre os espectros coletados ao longo do pico cromatográfico. O fator de pureza de pico para o cloridrato de mefloquina não pôde ser calculado devido à alta concentração empregada, sendo esta uma limitação para o cálculo feito pelo software do cromatógrafo.

4.2.3 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada utilizando-se a curva analítica construída com os valores de concentração de artesunato e cloridrato de mefloquina correspondentes à faixa de 50% a 150% da concentração de trabalho e seus respectivos valores de área sob os picos (Tabela 22 e Tabela 23). O método de regressão linear utilizado foi o dos mínimos quadrados.

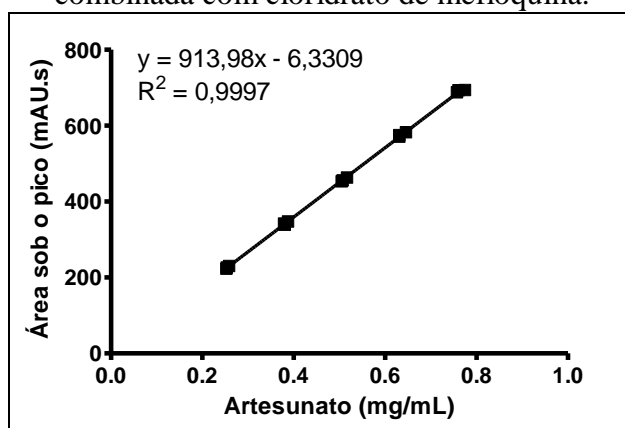
Tabela 22 – Concentrações de artesunato e valores de área para a construção da curva analítica do método de doseamento em comprimidos utilizando CLAE.

Artesunato (mg/mL)	Nível de concentração*	Replicata	Área (mAU.s)	Fator de resposta
0,2535	50%	1	226,4	893,0
0,2523		2	223,5	885,9
0,2583		3	230,1	891,0
0,3803	75%	1	339,1	891,7
0,3785		2	342,0	903,7
0,3874		3	347,8	897,8
0,5070	100%	1	456,1	899,5
0,5046		2	453,5	898,7
0,5165		3	463,2	896,8
0,6308	125%	1	575,2	911,9
0,6308		2	571,2	905,6
0,6457		3	582,5	902,2
0,7606	150%	1	693,4	911,7
0,7569		2	688,0	909,0
0,7748		3	693,8	895,5
<i>Média dos fatores de resposta</i>				899,6
<i>DPR (%)</i>				0,86

* em relação à concentração de trabalho

A curva analítica para o artesunato, construída com os dados da Tabela 22, está representada na Figura 21.

Figura 21 –Curva analítica para a determinação de artesunato em comprimidos em dose fixa combinada com cloridrato de mefloquina.



A distribuição dos resíduos foi normal ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) com valor P de 0,32 segundo o teste de Shapiro-Wilk. O coeficiente de determinação (R^2) foi adequado, acima de 0,99. A interseção com o eixo das ordenadas foi estatisticamente diferente de zero, representando 1,5% da área obtida com as soluções de artesunato a 100% da concentração de trabalho. Esta contribuição do intercepto deve ser a menor possível quando o mesmo não é

estatisticamente igual a zero, sendo aceitáveis valores inferiores a 2% (GREEN, 1996). O DPR dos fatores de resposta foi inferior a 1%, indicando homogeneidade entre a relação dos valores de área do pico de artesunato e seus respectivos valores de concentração. Os resultados apresentados para o artesunato indicam ajuste adequado aos modelos de regressão linear.

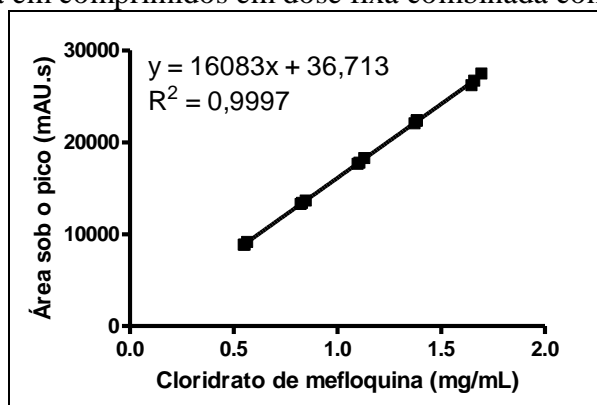
Tabela 23 – Concentrações de cloridrato de mefloquina e valores de área para a construção da curva analítica do método de doseamento em comprimidos utilizando CLAE.

<i>Cloridrato de mefloquina (mg/mL)</i>	<i>Nível de concentração*</i>	<i>Replicata</i>	<i>Área (mAU.s)</i>	<i>Fator de resposta</i>
0,5648	50%	1	9158,8	16216,0
0,5530		2	8853,2	16008,8
0,5488		3	8858,2	16142,2
0,8472	75%	1	13650,2	16112,1
0,8295		2	13401,7	16155,8
0,8231		3	13290,6	16146,2
1,1296	100%	1	18286,9	16188,8
1,1060		2	17777,6	16073,2
1,0975		3	17655,3	16086,5
1,3826	125%	1	22403,0	16204,1
1,3826		2	22331,1	16152,1
1,3719		3	22050,1	16072,7
1,6944	150%	1	27480,5	16218,4
1,6591		2	26708,7	16098,7
1,6463		3	26207,8	15919,4
<i>Média dos fatores de resposta</i>				16119,7
<i>DPR (%)</i>				0,51

* em relação à concentração de trabalho

A curva analítica para o cloridrato de mefloquina, construída com os dados da Tabela 23, está representada na Figura 22.

Figura 22 – Representação gráfica da curva analítica para a determinação de cloridrato de mefloquina em comprimidos em dose fixa combinada com artesunato.



A distribuição dos resíduos foi normal ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) com valor P de 0,08 segundo o teste de Shapiro-Wilk. O coeficiente de determinação (R^2) foi adequado, acima de 0,99. A interseção com o eixo das ordenadas não foi estatisticamente diferente de zero, não sendo necessário calcular a contribuição do intercepto para a resposta a 100% da concentração de trabalho (GREEN, 1996). O DPR dos fatores de resposta foi de, aproximadamente, 0,5%, indicando homogeneidade entre a relação dos valores de área do pico de cloridrato de mefloquina e seus respectivos valores de concentração. Os resultados apresentados para o cloridrato de mefloquina indicam ajuste adequado aos modelos de regressão linear.

4.2.4 Precisão intradia e interdias

A avaliação da precisão intradia e interdias foi realizada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) dos valores encontrados em dois dias consecutivos para o artesunato e para o cloridrato de mefloquina em uma amostra homogênea de comprimidos. Os resultados da precisão para o artesunato estão relacionados na Tabela 24 e para o cloridrato de mefloquina na Tabela 25.

Tabela 24 – Valores de área e teor de artesunato em comprimidos para avaliação da precisão do método de doseamento por CLAE.

Amostra	1º dia		2º dia	
	Área (mAU.s)	Teor de artesunato (%)	Área (mAU.s)	Teor de artesunato (%)
1	492,9	97,07	406,0	96,10
2	432,3	97,99	424,9	95,48
3	425,8	94,12	436,8	96,22
4	430,7	96,25	433,1	96,81
5	426,2	95,48	458,3	98,44
6	441,1	96,12	437,1	96,60
	Média (n = 6)	96,17	Média (n = 12)	96,39
	DPR (%)	1,38	DPR (%)	1,19

Para o artesunato, a média dos valores obtidos nos dois dias consecutivos ($n = 12$) foi de 96,39% e o DPR foi de 1,19%. Estes valores estão de acordo com a legislação brasileira e também com a literatura (BRASIL, 2003; GREEN, 1996; RIBANI *et al.*, 2004). As médias dos conteúdos de artesunato obtidas nos dias 1 e 2 foram comparadas estatisticamente, sendo consideradas iguais ($P > 0,05$).

Tabela 25 – Valores de área e teor de cloridrato de mefloquina em comprimidos para avaliação da precisão do método de doseamento por CLAE

Amostra	1º dia		2º dia	
	Área (mAU.s)	Teor de cloridrato de mefloquina (%)	Área (mAU.s)	Teor de cloridrato de mefloquina (%)
1	19867,8	100,13	16598,1	99,60
2	17626,0	102,25	17400,4	99,13
3	17289,5	97,80	17959,5	100,29
4	17474,2	99,93	17693,6	100,27
5	17444,7	100,01	18407,4	100,23
6	17985,6	100,30	17858,8	100,06
	Média (n = 6)	100,07	Média (n = 12)	100,00
	DPR (%)	1,41	DPR (%)	1,01

Para o cloridrato de mefloquina, a média dos valores obtidos nos dois dias consecutivos (n=12) foi de 100,00% e o DPR foi de 1,01%. Assim como para o artesunato, estes valores de conteúdo de cloridrato de mefloquina estão de acordo com a legislação brasileira e com a literatura (BRASIL, 2003; GREEN, 1996; RIBANI *et al.*, 2004). A comparação entre as médias dos conteúdos de cloridrato de mefloquina obtidas nos dias 1 e 2 não mostrou diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Desta forma, considerou-se que o método proposto apresenta precisão intradia e interdias adequada para a determinação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina.

4.2.5 Exatidão

Para a avaliação das quantidades de cada analito recuperadas, primeiramente foram determinados os conteúdos de artesunato e cloridrato de mefloquina presentes na amostra de comprimidos correspondente a 30% da concentração de trabalho, à qual foram adicionadas quantidades crescentes das matérias primas. Os valores de recuperação médios devem estar entre 98,0 e 102,0% (BRASIL, 2003; GREEN, 1996; RIBANI *et al.*, 2004) e, como apresentado na Tabela 26 e na Tabela 27, estão dentro da faixa especificada.

Tabela 26 – Porcentagens de recuperação do padrão de cloridrato de mefloquina (MQ) adicionado à amostra para avaliação da exatidão do método para doseamento por CLAE aplicado a comprimidos.

<i>Nível de concentração (MQ)</i>	<i>n</i>	<i>Concentração esperada (mg/mL)</i>	<i>Concentração recuperada (mg/mL)</i>	<i>Porcentagem de recuperação (%)</i>	<i>Médias; DPR (%)</i>
75% (0,375 mg/mL)	1	0,3733	0,3712	99,44	99,34; 0,15
	2	0,3725	0,3703	99,41	
	3	0,3812	0,3781	99,17	
100% (0,500 mg/mL)	1	0,5175	0,5178	100,06	100,09; 0,05
	2	0,4941	0,4948	100,15	
	3	0,5214	0,5217	100,06	
125% (0,625 mg/mL)	1	0,6124	0,6148	100,39	100,55; 0,13
	2	0,7071	0,7113	100,61	
	3	0,6266	0,6206	100,64	

Tabela 27 – Porcentagens de recuperação do padrão de artesunato adicionado à amostra para avaliação da exatidão do método para doseamento por CLAE aplicado a comprimidos.

<i>Nível de concentração (AS)</i>	<i>n</i>	<i>Concentração esperada (mg/mL)</i>	<i>Concentração recuperada (mg/mL)</i>	<i>Porcentagem de recuperação (%)</i>	<i>Médias; DPR (%)</i>
75% (0,825 mg/mL)	1	0,8425	0,8434	100,10	99,89; 0,18
	2	0,8468	0,8449	99,78	
	3	0,8573	0,8555	99,79	
100% (1,100 mg/mL)	1	1,1039	1,1068	100,26	100,36; 0,12
	2	1,1027	1,1062	100,31	
	3	1,0957	1,1011	100,49	
125% (1,375 mg/mL)	1	1,4071	1,4077	100,04	100,27; 0,21
	2	1,4132	1,4181	100,35	
	3	1,4502	1,4564	100,43	

4.2.6 Robustez

Para a avaliação da robustez foi empregado um experimento fatorial com a variação de sete parâmetros em oito experimentos. Os resultados obtidos para cloridrato de mefloquina e artesunato estão sumarizados na Tabela 28 e na Tabela 29, respectivamente.

Tabela 28 – Resultados obtidos para os oito experimentos realizados para a avaliação da robustez do método, considerando o cloridrato de mefloquina (MQ).

Condição	Area		Tempo de retenção (min)		Fator de cauda (T)		Número de pratos teóricos (N)		Conteúdo de MQ (%)
	Am	Pa	Am	Pa	Am	Pa	Am	Pa	
	1	18260,7	17754,0	3,724	3,717	2,44	2,43	3879,7	
2	17863,3	17346,6	4,042	4,040	2,43	2,40	4213,3	4284,3	101,39
3	14871,5	14436,3	3,449	3,446	2,44	2,44	3424,3	3468,3	101,42
4	15332,3	14826,6	3,705	3,666	2,48	2,45	3671,3	3761,7	101,81
5	15274,6	16048,8	5,741	5,677	3,48	3,57	3561,3	3488,5	100,39
6	15279,4	14833,9	3,964	3,953	2,76	2,76	3450,7	3541,3	101,41
7	18441,8	17848,4	3,890	3,893	2,52	2,50	3977,0	4058,7	101,73
8	17928,9	17383,7	3,938	3,931	2,56	2,51	3848,0	3914,3	101,54

Tabela 29 – Resultados obtidos para os oito experimentos realizados para a avaliação da robustez do método, considerando o artesunato (AS).

Condição	Area		Tempo de retenção (min)		Fator de cauda (T)		Número de pratos teóricos (N)		Conteúdo de AS (%)
	Am	Pa	Am	Pa	Am	Pa	Am	Pa	
	1	458,1	459,8	9,148	9,128	1,12	1,11	17789,0	
2	453,7	452,6	10,483	10,471	1,05	1,05	17091,7	17210,7	102,19
3	373,6	374,5	8,835	8,815	1,08	1,08	16997,7	16941,7	101,68
4	385,9	386,1	9,716	9,676	1,07	1,08	16339,7	16255,3	101,88
5	372,7	365,5	18,240	18,050	1,04	1,04	14937,7	16997,5	97,89
6	381,2	382,4	10,500	10,455	1,12	1,12	17964,7	17903,7	101,65
7	458,7	459,5	10,144	10,137	1,06	1,06	16923,3	16924,3	101,75
8	451,3	451,6	9,426	9,392	1,10	1,10	18500,7	18541,0	101,88

Para a análise dos efeitos provocados pela modificação de cada parâmetro, foi utilizada a fórmula descrita no item 4.1.2.6 *Robustez*. As contribuições de cada parâmetro foram calculadas utilizando-se os valores obtidos com as injeções da solução amostra, exceto para o conteúdo. Os conteúdos de cloridrato de mefloquina nos comprimidos foram obtidos utilizando-se o comprimento de onda de 283 nm, e os conteúdos de artesunato foram obtidos com o comprimento de onda de 210 nm, sendo que a detecção foi realizada simultaneamente. Os valores obtidos para os parâmetros analisados são mostrados na Tabela 30 para o cloridrato de mefloquina e na Tabela 31 para o artesunato.

Tabela 30 – Efeitos da modificação dos parâmetros analíticos no tempo de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e conteúdo de cloridrato de mefloquina (MQ) do método cromatográfico.

<i>Efeito</i>	<i>Tempo de retenção (min.)</i>	<i>Fator de cauda (T)</i>	<i>Número de pratos teóricos (N)</i>	<i>Conteúdo de MQ (%)</i>
Concentração de acetonitrila (A = 50%; a = 47%)	3,73-4,38 = -0,65	2,45-2,83 = -0,38	3797-3709 = 88	101,47-101,27 = 0,20
pH do tampão da fase móvel (B = 3,0; b = 3,5)	4,37-3,75 = 0,62	2,78-2,50 = 0,28	3776-3730 = 46	101,11-101,63 = -0,52
Temperatura da coluna (C = 30 °C; c = 35 °C)	4,20-3,91 = 0,29	2,72-2,55 = 0,17	3711-3796 = -85	101,20-101,54 = -0,34
Fluxo da fase móvel (D = 1,0 mL/min; d = 1,2 mL/min)	3,90-4,21 = -0,31	2,49-2,79 = -0,30	3979-3527 = 453	101,48-101,26 = 0,22
Marca da coluna (E = Waters; e = ACE)	3,77-4,34 = -0,57	2,55-2,73 = -0,18	3651-3856 = -205	101,41-101,33 = 0,08
Marca do solvente acetonitrila utilizado (F = Tedia; f = HoneyWell)	4,28-3,84 = 0,44	2,74-2,54 = 0,20	3740-3766 = -26	101,25-101,49 = -0,24
Modelo do cromatógrafo (G = 1200; g = 1100)	3,82-4,29 = -0,47	2,55-2,72 = -0,17	3745-3762 = -17	101,55-101,19 = 0,37

De maneira geral, o método cromatográfico desenvolvido se mostrou bastante robusto para a quantificação de cloridrato de mefloquina em comprimidos em dose fixa combinada com o artesunato.

Para o cloridrato de mefloquina, os maiores efeitos observados no tempo de retenção foram obtidos com as modificações na concentração de acetonitrila na fase móvel, com o consequente aumento do tempo de retenção, e modificação do pH da fase móvel, com sua redução. De fato, a redução da proporção de acetonitrila na fase móvel provocou um aumento do tempo de retenção do pico de cloridrato de mefloquina e, conseqüentemente, houve um alargamento do pico, evidenciado no aumento do fator de cauda com esta alteração. A redução do tempo de retenção com o aumento do pH pode ser explicada pela natureza iônica do cloridrato de mefloquina, que tem pKa de 4,5. O ajuste do pH da fase móvel para 3,5 compromete a ionização completa do analito, pois este valor encontra-se dentro da faixa compreendida entre 3,0 e 6,0 ($\pm 1,5$ unidades de pH em relação ao valor de pK_a) (SNYDER *et al.*, 1997).

Com relação ao fator de cauda, pouca variação foi observada. É necessário notar que o fator de cauda para o pico de cloridrato de mefloquina acontece devido à natureza iônica do

composto e tem um valor superior a 2,0 devido à grande quantidade de analito injetada, necessária para a determinação simultânea dos compostos.

Observando-se os efeitos das modificações no número de pratos teóricos, nota-se que houve uma redução deste número com o aumento do fluxo da fase móvel para 1,2 mL/min. Esta redução no número de pratos teóricos era esperada, já que um aumento na velocidade linear (neste caso, traduzido pelo aumento no fluxo da fase móvel) leva a uma redução no número de pratos teóricos.

Os teores de cloridrato de mefloquina sofreram pequenos efeitos, variando de uma redução de 0,52% com a mudança do valor de pH no tampão da fase móvel até 0,37% com a mudança no modelo de cromatógrafo utilizado. A obtenção de uma faixa estreita de valores de teor vem corroborar a baixa influência da variação dos parâmetros analíticos na determinação de cloridrato de mefloquina em comprimidos em dose fixa combinada com o artesunato.

Tabela 31 – Efeitos da modificação dos parâmetros analíticos no tempo de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e conteúdo de artesunato (AS) do método cromatográfico.

<i>Efeito</i>	<i>Tempo de retenção (min.)</i>	<i>Fator de cauda (T)</i>	<i>Número de pratos teóricos (N)</i>	<i>Conteúdo de AS (%)</i>
Concentração de acetonitrila (A = 50%; a = 47%)	9,55-12,08 = -2,53	1,08-1,08 = 0,00	17055-17082 = -27	101,83-100,79 = 1,04
pH do tampão da fase móvel (B = 3,0; b = 3,5)	12,09-9,53 = 2,56	1,08-1,08 = 0,00	16946-17190 = -244	100,82-101,80 = -0,98
Temperatura da coluna (C = 30 °C; c = 35 °C)	11,59-10,03 = 1,56	1,07-1,08 = -0,01	16662-17474 = -812	100,72-101,90 = -1,18
Fluxo da fase móvel (D = 1,0 mL/min; d = 1,2 mL/min)	9,80-11,82 = -2,02	1,08-1,08 = 0,00	17576-16560 = 1016	101,85-100,77 = 1,08
Marca da coluna (E = Waters; e = ACE)	9,48-12,15 = -2,67	1,10-1,05 = 0,05	17813-16323 = 1490	101,69-100,93 = 0,76
Marca do solvente acetonitrila utilizado (F = Tedia; f = HoneyWell)	11,63-9,99 = 1,64	1,08-1,08 = 0,00	16892-17244 = -352	100,80-101,82 = -1,02
Modelo do cromatógrafo (G = 1200; g = 1100)	9,88-11,75 = -1,87	1,09-1,06 = 0,03	17254-16882 = 372	101,71-100,91 = 0,80

O método cromatográfico desenvolvido se mostrou também bastante robusto para a determinação do artesunato em comprimidos quando foram modificados os parâmetros cromatográficos. O tempo de retenção do pico de artesunato sofreu as maiores alterações com

a redução da proporção de acetonitrila na fase móvel (aumento do tempo de retenção), com a modificação do pH do tampão (redução do tempo de retenção) e trocando-se a marca da coluna (aumento do tempo de retenção). De fato, a redução da proporção de acetonitrila na fase móvel provoca um aumento na retenção geral dos compostos. A modificação no pH do tampão influencia a retenção de compostos iônicos como o artesunato, o qual contém um grupo ácido carboxílico em sua estrutura, e o cloridrato de mefloquina, que é um sal de base nitrogenada.

Com relação ao fator de cauda, as modificações dos parâmetros cromatográficos produziram praticamente nenhum efeito, o que considera-se uma característica positiva do método. O mesmo pode-se dizer do número de pratos teóricos, as variações introduzidas produziram efeitos relativamente pequenos. Um aumento na temperatura em que a coluna foi mantida provocou um aumento no número de pratos teóricos mas, comparando-se o aumento com o valor original, pode-se concluir que este aumento foi pequeno, da ordem de 5%. A substituição da coluna cromatográfica provocou uma redução do número de pratos teóricos para o pico de artesunato, provavelmente influenciada pela diferente qualidade e tempo de uso das colunas cromatográficas empregadas no estudo.

Uma variação de aproximadamente 1% foi encontrada para o conteúdo de artesunato nos comprimidos em dose fixa combinada com o cloridrato de mefloquina. Este valor é considerável, o que exige, portanto, um controle rígido das condições cromatográficas. Entretanto, por se tratar de uma determinação de fármaco em produto acabado, esta variação torna-se menos significativa devido ao grande intervalo de teor permitido, geralmente valores entre 90% e 110% da quantidade rotulada dos fármacos.

4.2.7 Estabilidade das soluções

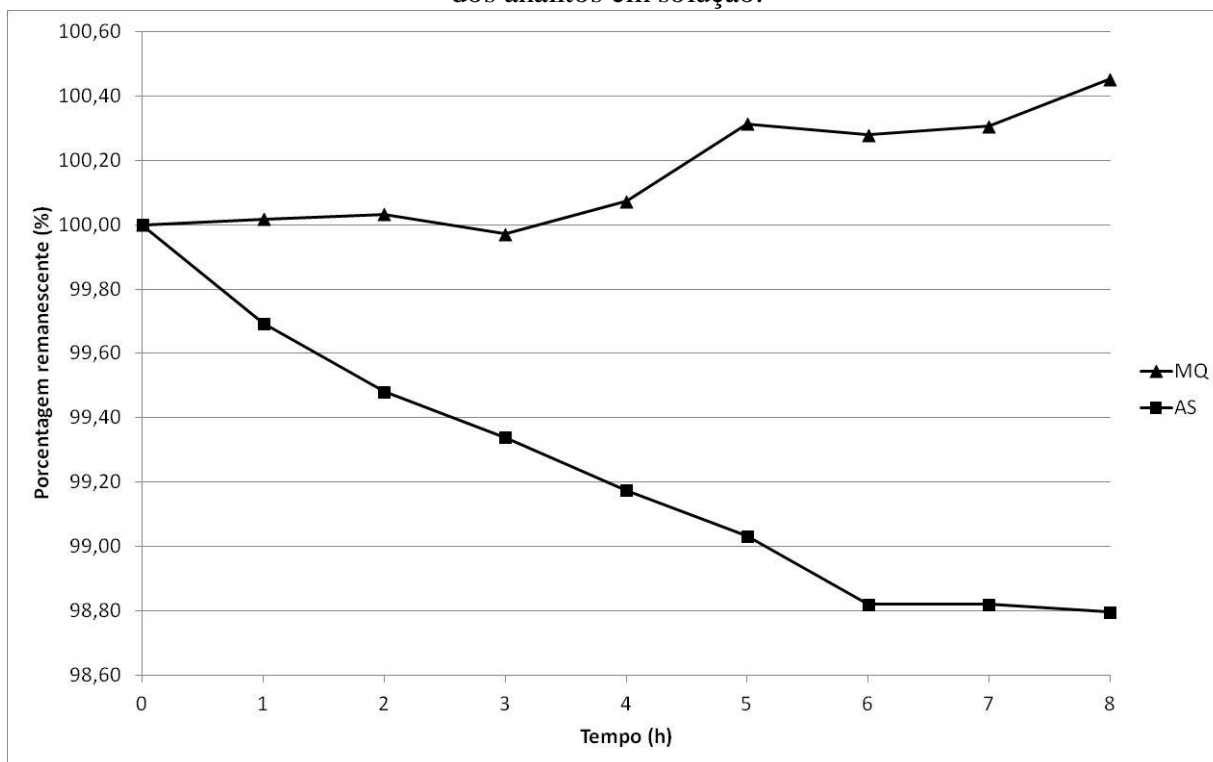
Não foram observadas mudanças no tempo de retenção dos picos de artesunato e cloridrato de mefloquina nos oito cromatogramas obtidos no estudo de estabilidade das soluções. Picos adicionais, além dos de artesunato e cloridrato de mefloquina, também não foram observados, mesmo após 8 horas de permanência do *vial* no cromatógrafo.

Foi observada uma redução de 1,2% do valor de área sob o pico de artesunato obtido com a injeção da solução amostra após 8 horas em comparação com a solução amostra injetada no

tempo de zero hora. A área sob os picos de cloridrato de mefloquina não sofreu alteração significativa.

Na Figura 23, pode ser observado o gráfico que relaciona as porcentagens remanescentes das áreas sob os picos de artesunato e cloridrato de mefloquina em função do tempo. Pode-se perceber que a redução do valor de área sob o pico de artesunato foi pequena, porém, como é sabido que este composto é instável em solventes aquosos (GAUDIN *et al.*, 2007), recomenda-se que as soluções padrão e amostra sejam injetadas no cromatógrafo assim que forem preparadas.

Figura 23 – Porcentagem remanescente das áreas sob os picos de artesunato (AS) e cloridrato de mefloquina (MQ) na solução amostra em função do tempo para avaliação da estabilidade dos analitos em solução.



4.2.8 Análises de comprimidos de artesunato e cloridrato de mefloquina em dose fixa combinada

Os resultados para os conteúdos de artesunato e cloridrato de mefloquina nas amostras de comprimidos em dose fixa combinada estão relacionados na Tabela 32.

Tabela 32 – Resultados das determinações de artesunato (AS) e cloridrato de mefloquina (MQ) em amostras de comprimidos em dose fixa combinada.

Amostra	Lote	Determinação de peso			Conteúdo de AS (%)	Conteúdo de MQ (%)
		Média (mg)	Menor desvio (%)	Maior desvio (%)		
Artesunato + Mefloquina (25 + 55 mg)	9070745	113,01	-3,86	4,97	100,14	95,20
Artesunato + Mefloquina (100 + 220 mg)	9050547	465,53	-3,09	3,58	102,04	102,54
Artesunato + Mefloquina (100 + 220 mg)	9070736	465,83	-1,80	1,88	96,90	103,79
Artesunato + Mefloquina (100 + 220 mg)	9070743	458,68	-3,24	2,52	97,34	101,33

Como pode ser observado na Tabela 32, os comprimidos em dose fixa de cloridrato de mefloquina e artesunato, quanto ao teor, podem ser considerados de qualidade satisfatória. O teor dos fármacos se manteve dentro da faixa de 90,0 a 110,0% do valor rotulado e os desvios dos pesos individuais dos comprimidos não superaram o intervalo de $\pm 7,5\%$ (para comprimidos com peso médio entre 80 e 250 mg), nem o intervalo de $\pm 5\%$ (para comprimidos com peso médio superior a 250 mg), conforme especificado na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010).

6 CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ARTESUNATO, DIIDROARTEMISININA E MEFLOQUINA EM PLASMA HUMANO

6.1 Material e métodos

6.1.1 Material

6.1.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras

Artesunato SQR (lote 103224), adquirido da Organização Mundial da Saúde e Cloridrato de mefloquina SQR (lote F1J249) adquirido da Farmacopeia Americana (USP), com validade indeterminada e teor de 100,0%; matérias-primas de artesunato e cloridrato de mefloquina doados por Farmanguinhos. Diidroartemisinina SQR, lote 060710-2091 e Arteméter SQR, lote 10203215, adquiridos da empresa Dafra Pharma (Bélgica). Indapamida SQR lote H, adquirido da Farmacopeia Americana (USP).

6.1.1.2 Reagentes e vidraria

- Água ultrapura.
- Solventes e reagentes grau cromatográfico: metanol, acetonitrila, acetato de amônio, ácido fórmico.
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres e kit de filtração.
- Minitubos EPPENDORF
- Membrana de celulose regenerada SARTORIUS com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 µm.
- Vials para uso em cromatógrafo a líquido.
- Coluna cromatográfica AGILENT modelo Zorbax SB-Ciano, 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 5 µm.

6.1.1.3 Equipamentos

- Aparelho de ultrassom BRANSONIC 220.
- Aparelho para infusão direta KD SCIENTIFIC
- Balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg modelo BP 210D
- Centrífuga JOUAN modelo MR 23i.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência WATERS, composto por bomba binária modelo 1525 μ , auto injetor modelo 2777, forno de colunas modelo DHM/CHM, acoplado a espectrômetro de massas WATERS modelo Quattro LC, software MassLynx versão 4.1.
- Micropipetas GILSON modelos P1000 e P200.
- Micropipeta THERMO modelo Finnpiette F3.
- Pipetador sequencial BRAND modelo Handy Step.
- Vórtex IKA modelo MS1.

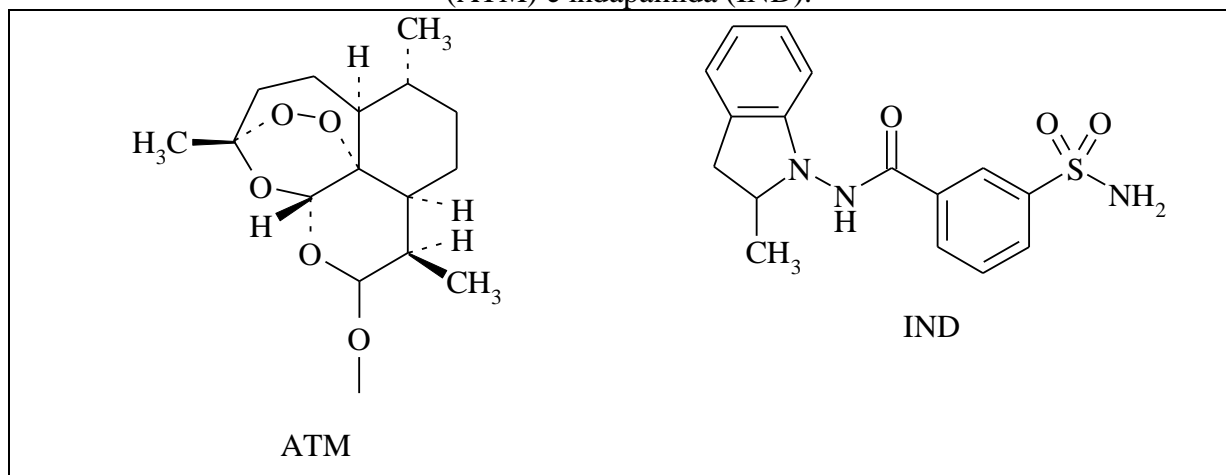
6.1.2 Métodos

6.1.2.1 Estabelecimento das condições de detecção por espectrometria de massas

Inicialmente, foi preparado o tampão acetato de amônio a 2 mM pesando-se 154 mg de acetato de amônio e transferindo-se para balão volumétrico de 1000 mL. Acrescentou-se cerca de 500 mL de água, seguida de agitação mecânica até dissolução do acetato de amônio. Em seguida, acrescentou-se 250 μ L de ácido fórmico, o volume foi completado com água e homogeneizou-se.

Foram preparadas, separadamente, soluções a 0,1 mg/mL de artesunato, arteméter, diidroartemisinina, cloridrato de mefloquina e indapamida em metanol. Em seguida, pipetou-se 50 μ L de cada solução e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL. O volume foi completado com uma mistura do tampão acetato de amônio a 2 mM e metanol (1:1, v/v). A substância arteméter (Figura 24) foi utilizada como padrão interno para artesunato e diidroartemisinina, e a substância indapamida foi utilizada como padrão interno para o cloridrato de mefloquina.

Figura 24 – Fórmulas estruturais das substâncias utilizadas como padrão interno arteméter (ATM) e indapamida (IND).



Estas soluções, na concentração de 500 ng/mL, foram infundidas diretamente no espectrômetro de massas à velocidade de 700 $\mu\text{L/h}$, com auxílio de uma bomba de infusão. O modo de ionização foi o elétronspray em modo positivo (ESI(+)) e foram feitas varreduras (*MS Scan*) para determinar as melhores condições para a ionização e detecção dos íons precursores dos fármacos. Foram avaliados a influência da voltagem do capilar, voltagem do cone, lentes RF, temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação e resolução LM-HM (*Low mass/High mass*). Para a avaliação dos íons produto, foi avaliada a influência da voltagem de colisão por meio de espectros de fragmentação (*Daughter Scan*) dos íons precursores.

6.1.2.2 Estabelecimento das condições cromatográficas

As condições cromatográficas iniciais são as descritas na Tabela 33.

Tabela 33 – Condições cromatográficas iniciais para a determinação de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina em plasma humano.

Parâmetros	Condições
Fase móvel	Mistura de metanol e tampão acetato de amônio 2 mM (70:30).
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Volume de injeção	20 μL
Coluna	Zorbax SB-CN, 150 x 4,6 mm, 5 μm
Temperatura da coluna	30 °C
Tempo de corrida	5 minutos

Para avaliar a separação cromatográfica, foi preparada a seguinte mistura: dentro de um vial, foi transferido 100 μL de cada uma das soluções dos fármacos e padrões internos a 500 ng/mL, sendo o volume final 600 μL e a concentração dos fármacos e padrões internos igual a aproximadamente 83,3 ng/mL. Injetou-se 20 μL desta mistura no cromatógrafo.

Desta maneira, foi possível fazer ajustes nas condições cromatográficas a fim de se alcançar uma separação ideal entre os fármacos e os padrões internos. Para tanto, foi necessário modificar a proporção dos solventes na fase móvel para 65:35, sendo esta proporção utilizada no restante do estudo, conforme descrito na Tabela 34.

Tabela 34 – Condições cromatográficas finais para a determinação de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina em plasma humano.

<i>Parâmetros</i>	<i>Condições</i>
Fase móvel	Mistura de metanol e tampão acetato de amônio 2 mM (65:35).
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Volume de injeção	20 μL
Coluna	Zorbax SB-CN, 150 x 4,6 mm, 5 μm
Temperatura da coluna	30 °C
Tempo de corrida	5 minutos

6.1.2.3 Estabelecimento das condições de extração dos fármacos do plasma

Primeiramente, foi preparada uma solução dos fármacos e dos padrões internos na concentração de 500 ng/mL. Para isso, foram acrescentados, ao mesmo balão volumétrico de 10 mL, 50 μL de cada solução a 0,1 mg/mL em metanol dos fármacos e padrões internos, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se.

O método utilizado para a extração das amostras de plasma foi a precipitação de proteínas, utilizando-se acetonitrila como solvente precipitador. Para estabelecer as condições de extração dos fármacos do plasma, transferiu-se 125 μL de uma amostra de plasma branco para um tubo eppendorf e acrescentou-se 25 μL da solução dos fármacos e padrões internos, seguido por agitação em vórtex por 5 segundos. Acrescentou-se 400 μL de acetonitrila e homogeneizou-se por 40 segundos. Os tubos eppendorf foram centrifugados por 5 minutos a 14000 rpm e à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido para vials utilizando-se

inserts de 400 μL . Injetou-se 20 μL no cromatógrafo. Este procedimento foi realizado em quintuplicata.

Para avaliação da porcentagem de recuperação, o mesmo procedimento foi realizado, porém substituindo-se o plasma branco por 125 μL de água. As áreas obtidas para os analitos no procedimento em que o plasma foi contaminado foi comparada com a média das áreas dos analitos obtida com o procedimento utilizando água. Foram calculadas a porcentagem de recuperação individual (para cada replicata) e a porcentagem de recuperação média para cada analito.

É desejável que a porcentagem de recuperação seja a mais próxima de 100% possível, porém, outros valores são aceitos caso a precisão e a exatidão do método sejam adequadas.

Para a avaliação preliminar do efeito matriz, 125 μL de plasma branco foram transferidos para tubo eppendorf, sendo adicionados 25 μL de metanol, seguidos por homogeneização em vórtex por 5 segundos. Em seguida, foram acrescentados 400 μL de acetonitrila, seguidos por 40 segundos de homogeneização em vórtex. Os tubos eppendorf foram centrifugados por 5 minutos a 14000 rpm e à temperatura de 4 °C. Transferiu-se 200 μL do sobrenadante para outro tubo eppendorf, e acrescentou-se 200 μL de uma solução dos analitos. Injetou-se 20 μL da mistura no cromatógrafo. Este procedimento foi realizado em triplicata.

O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se 200 μL de acetonitrila em substituição ao plasma. Foram calculadas os desvios (em porcentagem) entre as áreas individuais dos picos dos analitos obtidos nas misturas com o plasma extraído e a média das áreas obtidas com as misturas com acetonitrila. Os valores devem estar compreendidos na faixa entre -15% e +15%.

6.1.2.4 Validação do método bioanalítico

O método bioanalítico desenvolvido foi validado segundo a Resolução número 27 de 17 de Maio de 2012 da Anvisa (BRASIL, 2012) e pelo Guia para validação de métodos bioanalíticos da EMA - European Medicines Agency (EMA, 2011).

6.1.2.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada analisando-se 6 amostras de plasma de fontes distintas, ou seja, provenientes de voluntários diferentes. Das seis amostras analisadas, uma foi constituída por plasma lipêmico, outra por plasma hemolisado e as quatro restantes por plasma normal.

Os cromatogramas obtidos com estas amostras de plasma foram comparados com aqueles obtidos com os padrões internos na concentração de trabalho (Arteméter a 200 ng/mL e indapamida a 1800 ng/mL) e os analitos de interesse na concentração mais baixa da curva analítica, denominada limite inferior de quantificação (LIQ).

É permitido a detecção de compostos no mesmo tempo de retenção das substâncias analisadas. Para os fármacos principais, a área dos interferentes deve ser inferior a 20% da área obtida para estes na concentração do LIQ. No caso dos padrões internos, a área dos interferentes deve ser inferior a 5% da resposta destes na concentração de trabalho. Caso uma das amostras apresente interferência acima dos valores permitidos, o método deverá ser alterado de maneira a eliminá-la.

6.1.2.4.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de três curvas analíticas contendo 6 concentrações dos analitos artesunato, diidroartemisinina e mefloquina em dias distintos. As áreas dos analitos foram relacionadas com as áreas dos respectivos padrões internos, ou seja, as áreas de artesunato e diidroartemisinina foram medidas em relação às áreas de arteméter e as áreas de cloridrato de mefloquina foram medidas em relação às áreas obtidas para a indapamida.

Foram preparadas soluções estoque dos fármacos para serem adicionadas a plasma branco, de modo a obter as concentrações necessárias para a construção da curva em plasma. Separadamente, foram preparadas soluções a 0,2 mg/mL de artesunato e diidroartemisinina e a 0,8 mg/mL de cloridrato de mefloquina.

A partir das soluções estoque, foram preparadas soluções de concentração intermediária, de modo a permitir a preparação de soluções em plasma em todas as concentrações necessárias. Para artesunato e diidroartemisinina, a solução estoque (a 0,2 mg/mL) foi diluída, separadamente, transferindo-se 1 mL da solução estoque para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com metanol, sendo a concentração final de 0,02 mg/mL. Para o cloridrato de mefloquina, a solução também foi diluída transferindo-se 1 mL da solução estoque (a 0,8 mg/mL) para um balão de 10 mL, completando-se o volume com metanol, sendo a concentração desta solução de 0,08 mg/mL.

Foram preparadas soluções, utilizando metanol como solvente, dos três fármacos a partir das soluções estoque e intermediária para serem adicionadas ao plasma branco, resultando nas concentrações necessárias para a construção das curvas analíticas. A partir das mesmas soluções estoque, foram preparadas também soluções para a obtenção dos controles de qualidade em plasma. Os controles de qualidade foram preparados em três diferentes concentrações: baixa (CQB), correspondendo a três vezes a concentração do limite inferior de quantificação (LIQ); média (CQM), correspondendo à metade da concentração do controle de qualidade alto (CQA); e alta (CQA), correspondendo a 80% da concentração do limite superior de quantificação (LSQ). A preparação destas soluções está descrita na Tabela 35. Todas as soluções foram preparadas transferindo-se os volumes indicados para balões volumétricos de 10 mL.

Tabela 35 – Preparação das soluções para a contaminação do plasma para a construção da curva analítica e para os controles de qualidade (CQB, CQM e CQA).

<i>Solução</i>	<i>Artesunato e Diidroartemisinina</i>			<i>Cloridrato de mefloquina</i>		
	<i>Solução estoque (mg/mL)</i>	<i>Volume transferido (µL)</i>	<i>Concentração final (ng/mL)</i>	<i>Solução estoque (mg/mL)</i>	<i>Volume transferido (µL)</i>	<i>Concentração final (ng/mL)</i>
1	0,02	300	600	0,08	250	2000
2	0,2	125	2500	0,8	125	10000
3	0,2	250	5000	0,8	250	20000
4	0,2	500	10000	0,8	500	40000
5	0,2	750	15000	0,8	750	60000
6	0,2	1000	20000	0,8	1000	80000
CQB	0,02	900	1800	0,08	750	6000
CQM	0,2	400	8000	0,8	400	32000
CQA	0,2	800	16000	0,8	800	64000

As soluções preparadas segundo a Tabela 35 foram adicionadas a plasma branco conforme descrito na Tabela 36.

Tabela 36 – Preparação das soluções em plasma dos fármacos para a construção da curva analítica e para os controles de qualidade (CQB, CQM e CQA).

<i>Ponto da curva</i>	<i>Concentração de AS e DHA na solução estoque (ng/mL)</i>	<i>Concentração de MQ na solução estoque (ng/mL)</i>	<i>Volume transferido da solução estoque (µL)</i>	<i>Volume de plasma utilizado (mL)</i>	<i>Volume de plasma final (mL)</i>	<i>Concentração final de AS e DHA (ng/mL)</i>	<i>Concentração final de MQ (ng/mL)</i>
1	600	2000	250	4,75	5	30	100
2	2500	10000	100	1,90	2	125	500
3	5000	20000	100	1,90	2	250	1000
4	10000	40000	100	1,90	2	500	2000
5	15000	60000	100	1,90	2	750	3000
6	20000	80000	100	1,90	2	1000	4000
CQB	1800	6000	750	14,25	15	90	300
CQM	8000	32000	300	5,70	6	400	1600
CQA	16000	64000	750	14,25	15	800	3200

Foram transferidas alíquotas destas soluções para tubos eppendorf, os quais foram congelados a temperatura de -70 °C para posterior utilização.

Em cada dia de análise, foram realizadas extrações de plasma branco e extrações de plasma branco adicionadas de padrão interno, ambas em duplicata. Para extração do plasma branco, foram utilizados 125 µL de plasma branco acrescentados de 25 µL de metanol, sendo o procedimento de extração o mesmo descrito anteriormente. Para extração do plasma adicionado de padrão interno, foram utilizados 125 µL de plasma branco acrescentados de 25 µL da solução dos padrões internos (solução a 1200 ng/mL de arteméter e 10800 ng/mL de indapamida).

As soluções em plasma, correspondentes aos pontos da curva analítica, foram extraídas em duplicata, utilizando-se 125 µL de cada solução e 25 µL da solução dos padrões internos. As soluções dos controles de qualidade foram utilizadas para avaliação da precisão e exatidão, como descrito a seguir.

Para a avaliação da curva analítica, foram considerados os desvios dos pontos em relação à concentração nominal. O desvio máximo permitido para o limite inferior de quantificação

(LIQ) em relação à concentração nominal foi de 20%, sendo de 15% para as outras concentrações utilizadas. A curva analítica deve possuir 75% dos pontos com desvios inferiores aos descritos.

Além destes critérios, o coeficiente de correlação linear foi avaliado, devendo ser superior a 0,98. As curvas e os cálculos foram obtidos diretamente do software do cromatógrafo.

6.1.2.4.3 Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada em três dias consecutivos por meio da análise, em quintuplicata, das soluções em plasma do limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade na concentração baixa (CQB), controle de qualidade na concentração média (CQM) e controle de qualidade na concentração alta (CQA). Foram utilizados 125 μL de plasma e 25 μL da solução dos padrões internos, sendo o procedimento de extração o mesmo descrito anteriormente.

Foram calculados os valores de desvio padrão relativo (DPR) à média das concentrações obtidas para os fármacos analisados. O valor de DPR deve ser inferior a 20% quando se analisa o LIQ e de, no máximo, 15% para os controles de qualidade (CQB, CQM e CQA).

A exatidão do método bioanalítico foi avaliada utilizando-se as mesmas soluções em plasma da avaliação da precisão. Foi calculado o erro padrão relativo (EPR) para cada uma das soluções. O erro padrão relativo leva em consideração a concentração média experimental e o valor nominal (concentração teórica). O EPR para o LIQ deve ser de $\pm 20\%$, sendo de $\pm 15\%$ para as soluções de controle de qualidade, em relação às suas concentrações teóricas.

6.1.2.4.4 Recuperação

Para avaliar a eficiência do processo de extração, foram preparadas, em quintuplicata, amostras de plasma contendo os fármacos nos níveis de concentração dos controles de qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM, e CQA). Foram utilizados 125 μL de plasma e 25 μL da solução dos padrões internos, sendo o procedimento de extração o mesmo descrito anteriormente.

Para comparação, foi feita uma mistura de 125 μL de água e 25 μL da solução dos fármacos de forma a obter os três níveis de concentração. Esta mistura foi tratada da mesma maneira que as amostras de plasma. A média das áreas obtida com as soluções em água foi comparada com a média das áreas dos analitos obtida com a preparação em plasma.

Como mencionado anteriormente, é desejável que a porcentagem de recuperação seja a mais próxima de 100% possível.

6.1.2.4.5 Efeito residual (*carry over*)

Para avaliar o efeito residual, foi preparada uma amostra de plasma branco e esta foi injetada no cromatógrafo. Em seguida, uma amostra de plasma com os fármacos na concentração do limite superior de quantificação (LSQ) foi extraída e injetada no cromatógrafo, seguida de duas injeções da amostra de plasma branco.

As respostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% das respostas dos mesmos na concentração do LIQ. As respostas dos picos interferentes no tempo de retenção dos padrões internos devem ser inferiores a 5% das respostas dos padrões internos.

6.1.2.4.6 Efeito de matriz

Para avaliação do efeito de matriz, foram utilizadas oito amostras de plasma diferentes, sendo 4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados. Utilizaram-se 125 μL de cada amostra de plasma e a estas amostras foram acrescentados 25 μL de metanol, sendo cada amostra extraída separadamente segundo o método descrito. A 200 μL do sobrenadante do plasma extraído, foram acrescentados 200 μL de solução dos fármacos e padrão interno, de modo a obter concentrações semelhantes ao CQB e ao CQA, separadamente.

De maneira semelhante, foram acrescentados 200 μL de acetonitrila a 200 μL das soluções dos fármacos, separadamente, para comparação.

O efeito matriz foi avaliado de duas maneiras. Primeiramente, comparou-se as áreas dos picos dos analitos obtidas com as soluções adicionadas ao plasma extraído com as mesmas áreas

obtidas das soluções adicionadas à acetoneitrila. O critério de aceitação foi de que o desvio entre as áreas deve estar compreendido na faixa de $\pm 15\%$. Esta avaliação é preconizada no guia da agência europeia de medicamentos (EMA, 2011).

Outra avaliação do efeito matriz foi a realizada por meio do Fator de Matriz Normalizado por Padrão Interno (FMN), segundo a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = (\text{área do analito em matriz} / \text{área do PI em matriz}) / (\text{média das áreas do analito em solução} / \text{média das áreas do PI em solução})$$

O critério de aceitação é que o DPR dos FMN relativos a todas as amostras de cada nível de controle deve ser inferior a 15%. A avaliação utilizando o FMN é preconizada pelo guia da Anvisa e pelo guia da agência europeia de medicamentos (BRASIL, 2012; EMA, 2011).

6.1.2.4.7 Estabilidade dos analitos

Para a avaliação da estabilidade dos analitos, foram feitas extrações em quintuplicata das amostras de plasma correspondentes aos controles de qualidade baixo e alto (CQB e CQA). Foi avaliado o desvio das concentrações obtidas em relação aos seus valores nominais, devendo este desvio estar na faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal.

6.1.2.4.7.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada pela análise de três amostras de CQB e CQA cerca de 6 horas após seu descongelamento. Os valores obtidos para os analitos foram calculados utilizando-se a curva analítica e comparados com amostras recém-preparadas.

6.1.2.4.7.2 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade das amostras foi avaliada após três ciclos de congelamento e descongelamento. A cada ciclo, as amostras foram mantidas congeladas por pelo menos 12 horas. As amostras de plasma nas concentrações de CQB e CQA foram congeladas a temperatura de -70°C por 24 horas. Após esse período, foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente quando,

então, foram congeladas novamente. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, sendo as amostras analisadas ao final.

6.1.2.4.7.3 Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento foi avaliada pela injeção de três amostras processadas do CQB e CQA em um prazo de 24 horas após sua preparação. Durante este período, os vials permaneceram à temperatura de 4 °C dentro do compartimento de amostras do injetor automático. Os valores de concentração para os analitos foram comparados com os valores obtidos com as mesmas amostras injetadas logo após sua preparação.

6.1.2.4.7.4 Estabilidade das soluções

Foi preparada uma solução contendo os três analitos e também os padrões internos, a qual foi analisada em comparação com as soluções utilizadas inicialmente para a contaminação do plasma com os fármacos.

Foi feita uma diluição das soluções estoque já preparadas, acrescidas dos padrões internos, de modo a atingir a concentração do CQM (artesanato e diidroartemisinina a 400 ng/mL e mefloquina a 1600 ng/mL). As soluções estoque dos padrões internos também foram acrescentadas de modo a obter as concentrações de 200 ng/mL para arteméter e 1800 ng/mL para indapamida.

Novas soluções estoque e diluídas da mesma maneira para servir de comparação. A avaliação foi realizada por meio do cálculo do desvio entre os fatores de resposta para cada substância analisada. O fator de resposta é a divisão da resposta do analito (área) por sua concentração (em ng/mL). O desvio entre os fatores de resposta devem estar compreendidos na faixa de $\pm 10\%$.

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Estabelecimento das condições de detecção por espectrometria de massas

Na detecção simultânea de fármacos por espectrometria de massas, é exigido que alguns parâmetros do detector sejam os mesmos para todos os fármacos, podendo-se variar apenas as energias do cone para o íon precursor e as energias de colisão para os íons produto.

A voltagem do capilar utilizada foi de 3,5 kV, a voltagem do extrator foi de 2 V, as lentes RF em 0,5 V, a resolução LM/HM foi de 10/7,5, a temperatura da fonte de 80 °C e a temperatura de dessolvatação de 150 °C. Estes parâmetros foram mantidos constantes durante todas as análises, sendo os valores os mesmos empregados por CÉSAR e colaboradores (2011) para a determinação simultânea de arteméter e lumefantrina empregando o artesunato como padrão interno.

Os parâmetros de relação massa/carga (m/z) e voltagem do cone para os íons precursores e de relação massa/carga e voltagem de colisão para os íons produto estão relacionados na Tabela 37, onde também podem ser encontrados os valores de massa molar para os compostos.

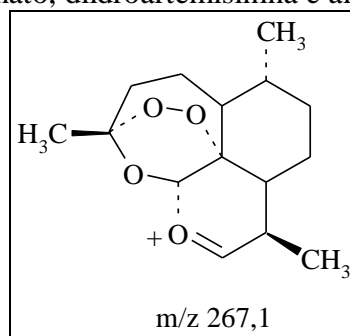
Tabela 37 – Valores de massa molar, relação massa/carga e voltagem do cone para a detecção dos íons precursores e de relação massa/carga e voltagem de colisão para a detecção dos íons produto.

<i>Substância</i>	<i>Massa molar (g/mol)</i>	<i>Íon precursor</i>		<i>Íon produto</i>	
		<i>Relação massa/carga (m/z)</i>	<i>Voltagem do cone (V)</i>	<i>Relação massa/carga (m/z)</i>	<i>Voltagem de colisão (V)</i>
Arteméter	298,37	317,0	10	267,1	8
Artesunato	384,42	403,1	10	267,1	10
Diidroartemisinina	284,35	303,0	12	267,1	8
Mefloquina	378,28	379,9	38	361,2	23
Indapamida	365,84	366,8	25	131,8	15

A detecção do íon precursor do artesunato foi realizada em m/z 403,1, correspondente ao seu aduto de amônio $[M+NH_4]^+$, sendo 384 g/mol provenientes do artesunato e 18 g/mol provenientes do íon amônio presente na fase móvel utilizada. Com relação ao íon produto obtido, o fragmento mais intenso apresentou m/z 267,1. A estrutura do fragmento

correspondente foi estudada por CÉSAR (2009), sendo apresentada na Figura 25. Os espectros obtidos para o íon precursor e íon produto do artesunato são mostrados na Figura 26.

Figura 25 – Proposta de estrutura química para o íon produto m/z 267,1 obtido pela fragmentação de artesunato, diidroartemisinina e arteméter (CÉSAR, 2009).



O mesmo aconteceu para a diidroartemisinina e arteméter. Os íons detectados para ambos também foram os adutos de amônio, aumentando a relação massa/carga esperada em 18 unidades. Da mesma forma que para o artesunato, os íons produtos de diidroartemisinina e arteméter apresentaram m/z 267,1. Os espectros para a diidroartemisinina e para o arteméter são mostrados na Figura 27 e na Figura 28, respectivamente.

Figura 26 – Espectros ESI(+)-MS de artesunato, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 403,057 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 267,074.

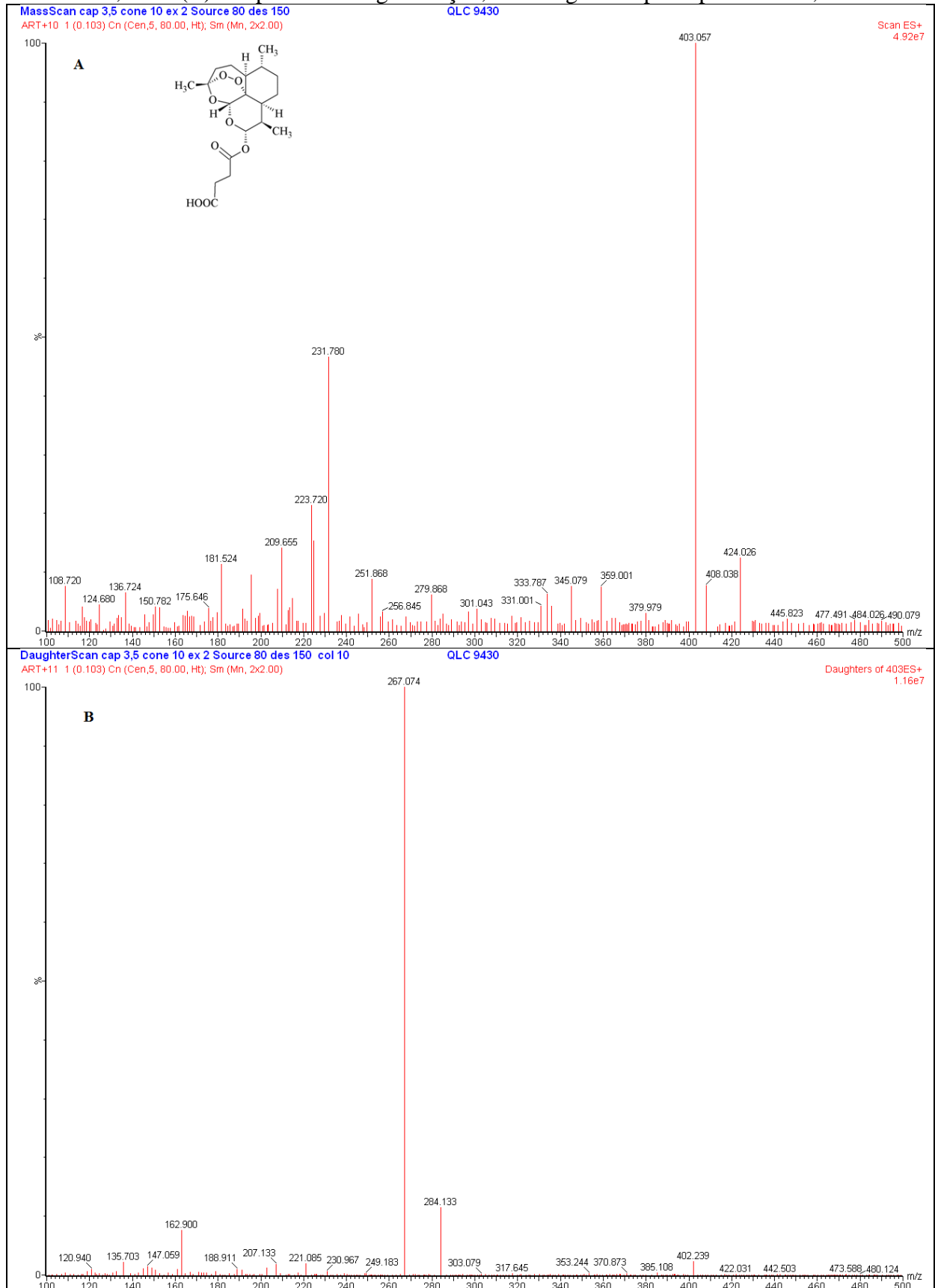


Figura 27 – Espectros ESI(+)-MS de diidroartemisinina, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 302,944 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 267,103.

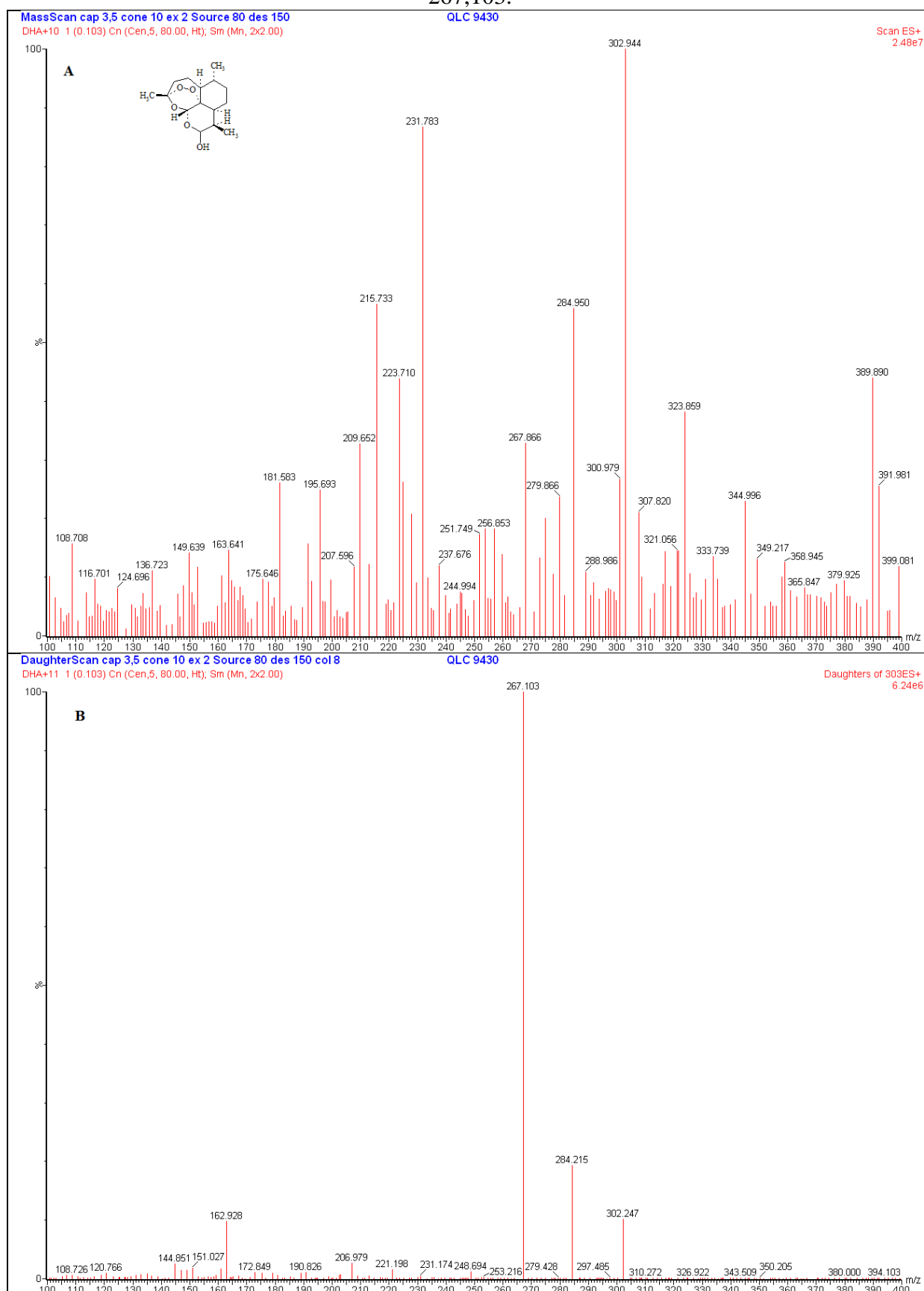
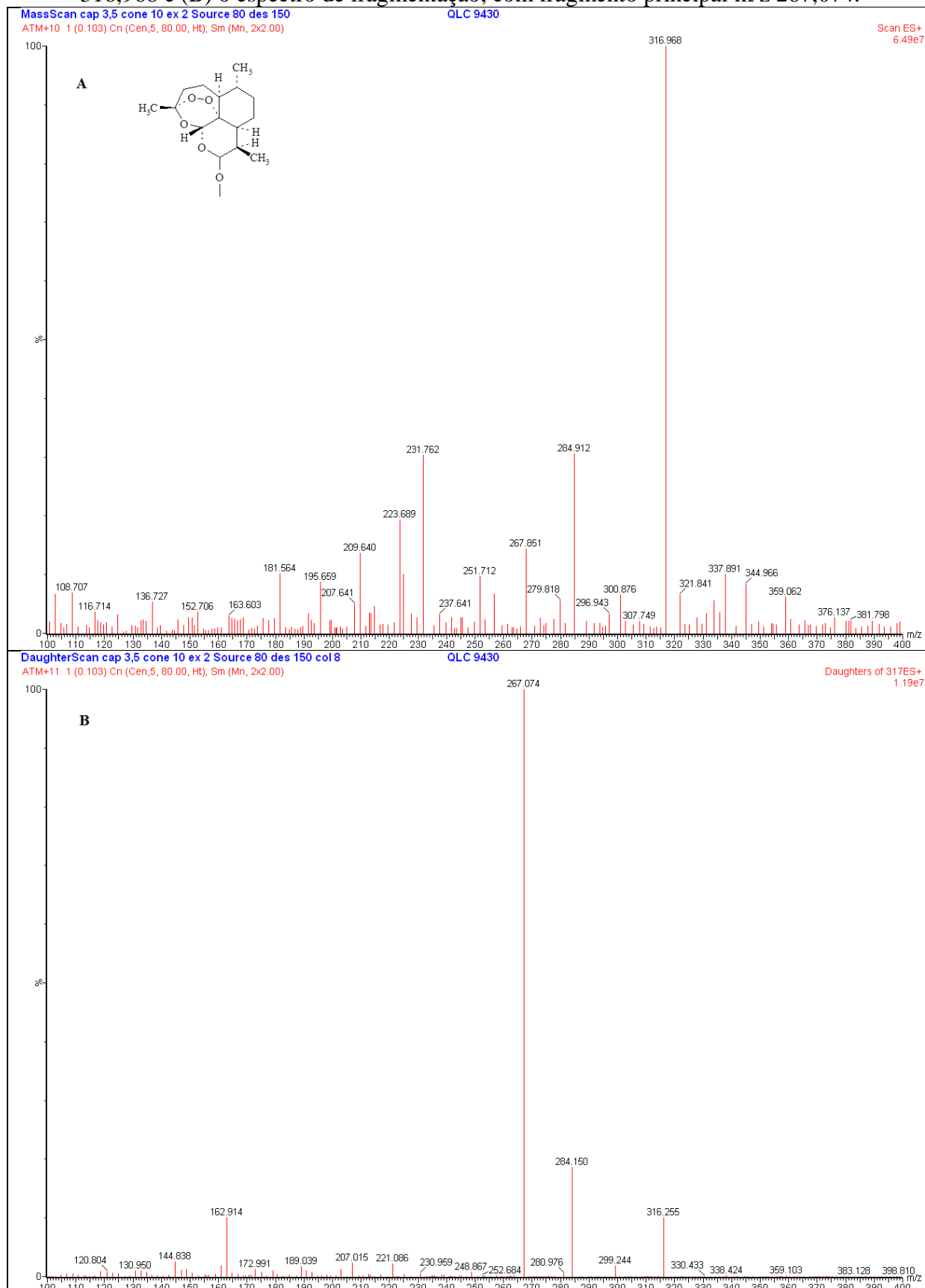
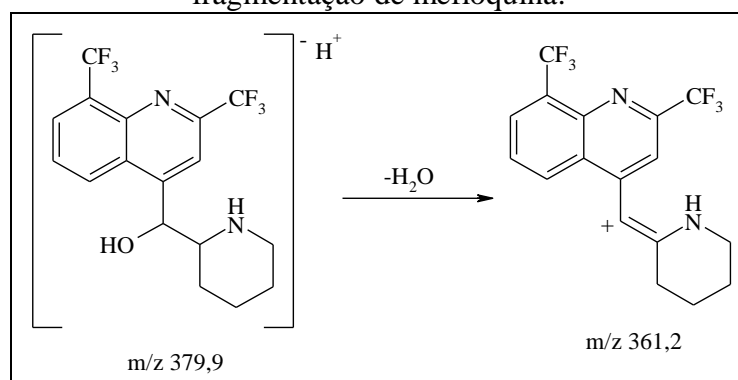


Figura 28 – Espectros ESI(+)-MS de arteméter, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 316,968 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 267,074.



A mefloquina apresentou íon precursor $[M+H]^+$ em m/z 379,9 e o íon produto de maior intensidade em m/z 361,2. A redução de 18 unidades de massa no íon produto, provavelmente, foi devido à perda de uma molécula de água pelo íon precursor. De fato, a mefloquina possui uma hidroxila ligada a carbono secundário em sua cadeia lateral. A molécula, então, poderia sofrer desidratação, reduzindo sua massa em 18 unidades. A proposta para o fragmento está mostrada na Figura 29.

Figura 29 – Proposta de estrutura química para o íon produto m/z 361,2 obtido pela fragmentação de mefloquina.



Os espectros obtidos para o íon precursor e íon produto da mefloquina são mostrados na Figura 30. Os espectros obtidos para a indapamida são mostrados na Figura 31.

Figura 30 – Espectros ESI(+)-MS de mefloquina, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 379,945 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 361,204.

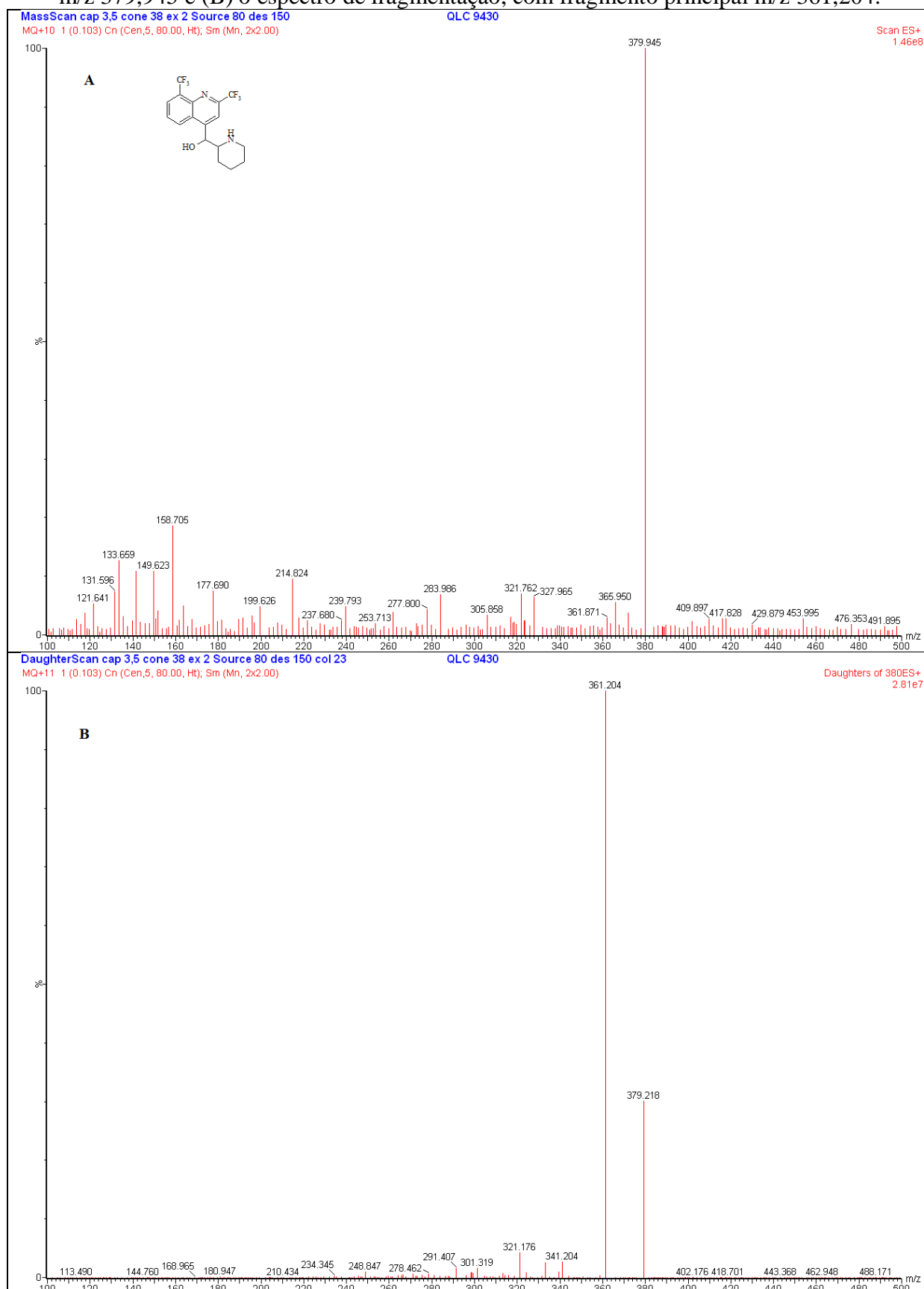
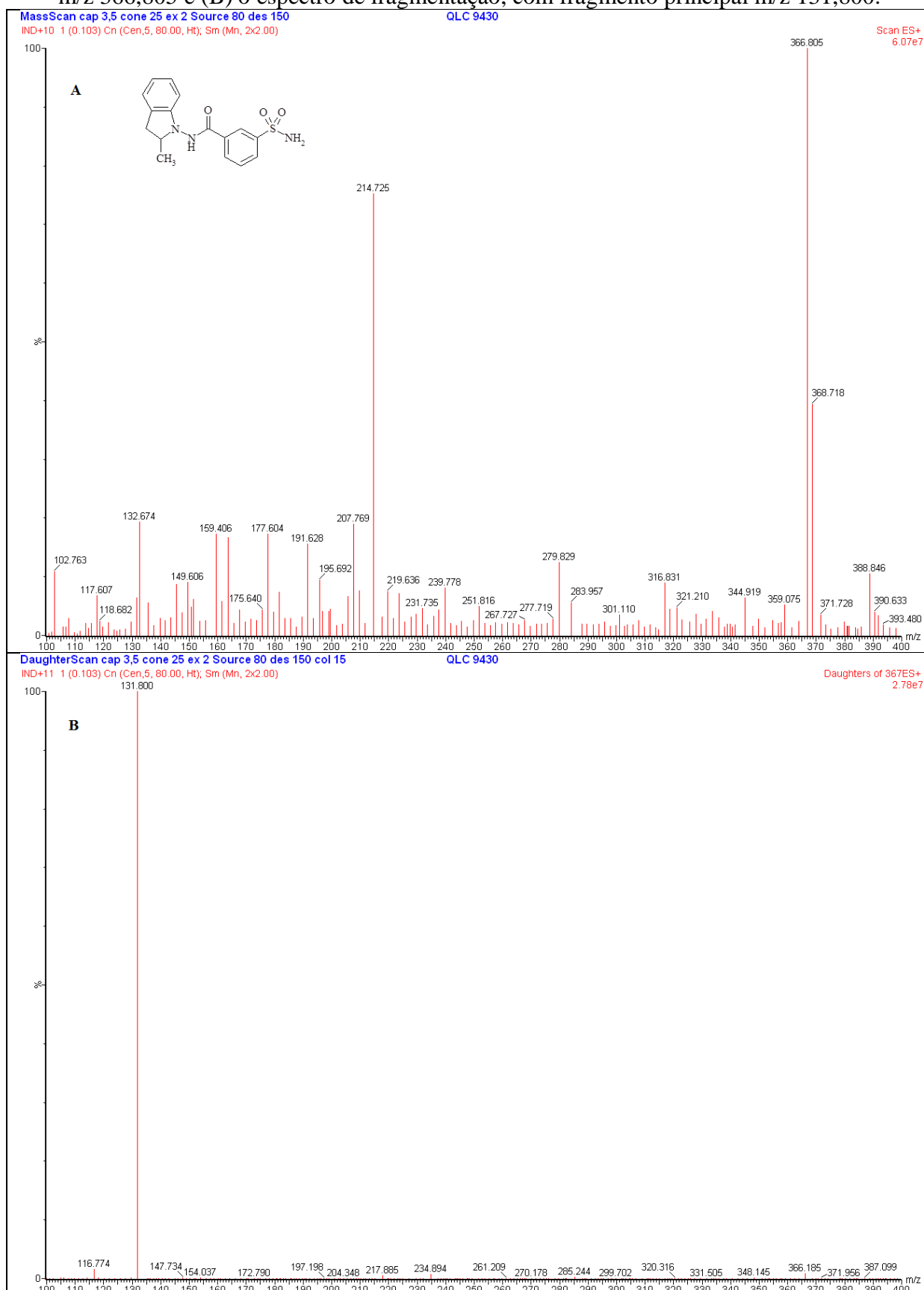


Figura 31 – Espectros ESI(+)-MS de indapamida, sendo (A) o espectro do íon precursor, m/z 366,805 e (B) o espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 131,800.



6.2.2 Estabelecimento das condições cromatográficas

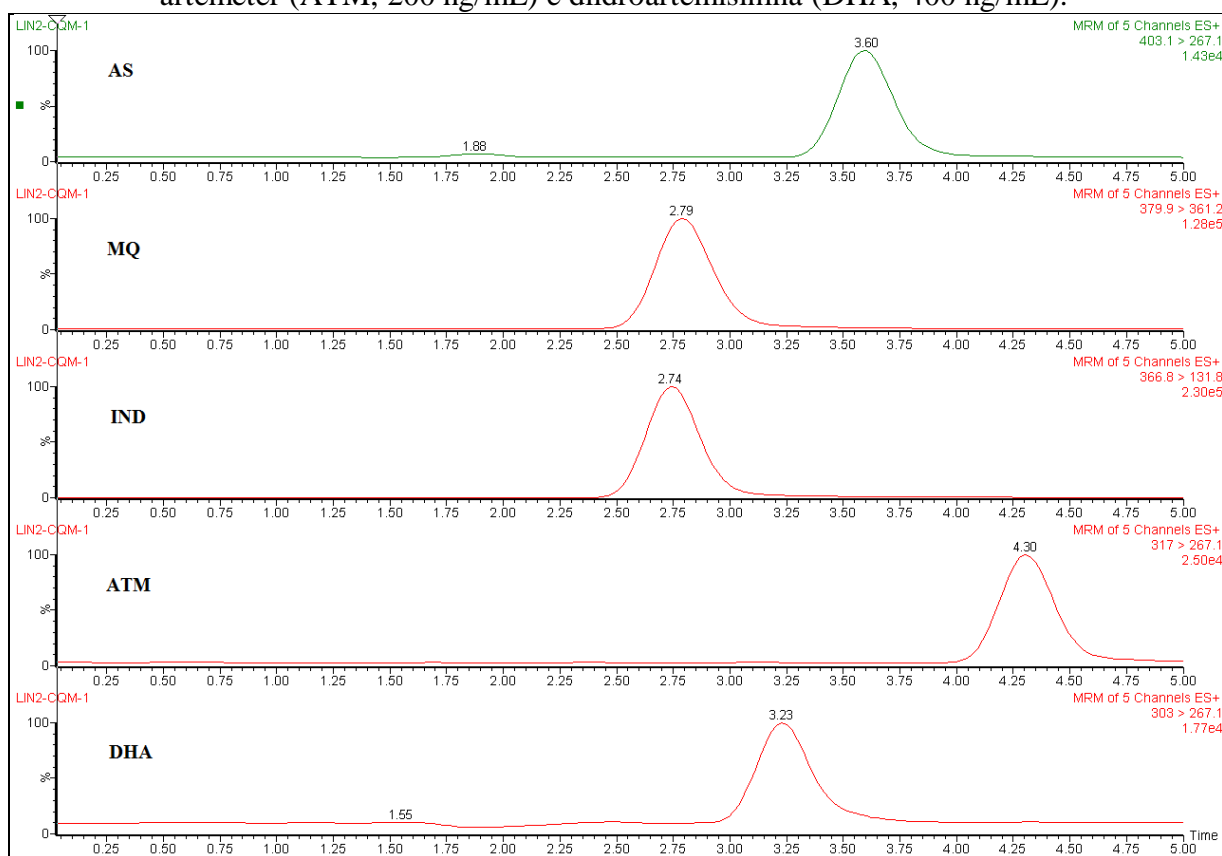
As condições cromatográficas foram ajustadas de forma a obter uma separação adequada para os fármacos e padrões internos de maneira a propiciar uma adequada detecção destes utilizando a cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas.

Um dos objetivos do ajuste das condições cromatográficas foi de evitar o aparecimento de efeito matriz. O efeito matriz é resultado da coeluição de elementos da matriz, que afetam a ionização do analito de interesse resultando em supressão ou amplificação de sua ionização. Este efeito pode ser evitado quando os fármacos e padrões internos são retidos na coluna de forma a não serem inseridos no detector de massas ao mesmo tempo que outros componentes do plasma, os quais podem não ter sido completamente eliminados na extração (CHAMBERS *et al.*, 2007)

Outro objetivo do ajuste das condições cromatográficas foi evitar o fenômeno da detecção cruzada (*cross-talk*), dado que três compostos (artesunato, diidroartemisinina e arteméter) analisados apresentaram os íons produto com a mesma relação massa/carga de 267,1. A detecção cruzada pode ocorrer quando várias transições de massa levam a íons produto de relação massa/carga idêntica (VOGESER & SEGER, 2010). Se estes íons fossem analisados ao mesmo tempo, poderia haver interferência de um sobre os outros no segundo quadrupolo do detector de massas.

Desta forma, foi necessário ajustar a proporção de metanol para 65%, sendo 35% a proporção do tampão acetato de amônio. Obteve-se, então, uma separação adequada dos analitos com um tempo de corrida de 5 minutos (Figura 32).

Figura 32 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma contendo artesunato (AS, 400 ng/mL), mefloquina (MQ, 1600 ng/mL), indapamida (IND, 1800 ng/mL), arteméter (ATM, 200 ng/mL) e diidroartemisinina (DHA, 400 ng/mL).



6.2.3 Estabelecimento das condições de extração dos fármacos do plasma

O procedimento de extração dos fármacos do plasma foi avaliado preliminarmente quanto à porcentagem de recuperação alcançada e também quanto à ocorrência de efeito matriz. Ajustes na quantidade de solvente precipitante (acetonitrila) acrescentada foram feitos a fim de que os parâmetros citados fossem satisfatórios. As condições de extração foram semelhantes às empregadas por CÉSAR e colaboradores (2011) para a quantificação simultânea de arteméter e lumefantrina em plasma humano.

As porcentagens de recuperação obtidas neste estudo preliminar estão relacionadas na Tabela 38. Como mencionado, é desejável que as porcentagens médias de recuperação dos analitos esteja o mais próximo possível de 100%, porém, não é estritamente necessário que isto aconteça. As porcentagens médias de recuperação obtidas foram consideradas satisfatórias para todos os compostos analisados, sendo muito próximas a 100% para artesunato,

mefloquina e indapamida, e ligeiramente superiores a 100% para arteméter e diidroartemisinina.

Tabela 38 – Avaliação preliminar da porcentagem de recuperação na extração dos analitos do plasma.

<i>Analito</i>	<i>Média das áreas obtidas com a solução</i>	<i>Áreas obtidas com as amostras de plasma extraídas</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Recuperação média(%)</i>
Artesunato	1685,0	1821	108,07	99,77
		1715	101,78	
		1607	95,37	
		1581	93,83	
		1682	99,82	
Mefloquina	4532,4	4814	106,21	99,06
		4539	100,15	
		4292	94,70	
		4509	99,48	
		4295	94,76	
Arteméter	2892,6	3815	131,89	111,90
		3160	109,24	
		3161	109,28	
		3159	109,21	
		2889	99,88	
Diidroartemisinina	1488,2	1795	120,62	110,36
		1823	122,50	
		1498	100,66	
		1519	102,07	
		1577	105,97	
Indapamida	4106,6	4607	112,19	97,79
		4180	101,79	
		3875	94,36	
		3729	90,81	
		3688	89,81	

Uma avaliação preliminar do efeito matriz também foi realizada. Os resultados são apresentados na Tabela 39. Como pode ser observado na tabela, todos os valores de desvio se mantiveram dentro da faixa de $\pm 15\%$, ou seja, não houve supressão nem amplificação da ionização em uma extensão inadequada.

Tabela 39 – Avaliação preliminar do efeito matriz para os analitos em plasma.

<i>Analito</i>	<i>Áreas obtidas com a solução dos analitos</i>	<i>Áreas obtidas com o plasma extraído</i>	<i>Desvio (%)</i>
Artesunato	1952	1828	-2,47%
	1832	1855	-1,03%
	1839	1907	1,74%
Mefloquina	5305	4548	-10,77%
	5035	4851	-4,83%
	4951	4642	-8,93%
Arteméter	3489	3570	2,19%
	3647	3621	3,65%
	3344	3620	3,63%
Diidroartemisinina	1907	3570	2,19%
	1947	3621	3,65%
	1983	3620	3,63%
Indapamida	5017	4243	-13,92%
	4900	4510	-8,50%
	4870	4339	-11,97%

6.2.4 Validação do método bioanalítico

Em seguida ao estabelecimento das condições de detecção, cromatográficas e de extração dos analitos, foi realizada a validação do método bioanalítico.

6.2.4.1 Seletividade

A seletividade foi demonstrada utilizando-se amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado. De maneira geral, não foram observados picos de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos. Um pico com tempo de retenção de, aproximadamente, 1,9 minuto foi observado nos cromatogramas obtidos com o plasma normal e lipêmico, na transição correspondente ao artesunato. Entretanto, como o artesunato apresentou tempo de retenção de 3,6 minutos, não houve interferência do pico em 1,9 minuto. Os cromatogramas obtidos com plasma normal, lipêmico e hemolisado são mostrados na Figura 33, Figura 34 e Figura 35, respectivamente.

A seletividade adequada era esperada devido ao uso do espectrômetro de massas como detector. O uso de espectrômetros de massa equipados com duplo quadrupolo permite um ganho em seletividade na detecção dos compostos. Estes detectores permitem o monitoramento de múltiplas reações (MRM - *multiple reaction monitoring*), no qual o espectrômetro seleciona um íon precursor baseado em sua relação massa/carga e, posteriormente, seleciona o íon produto deste precursor, baseado também na relação massa/carga deste último (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

Figura 33 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma normal, para avaliação da seletividade do método.

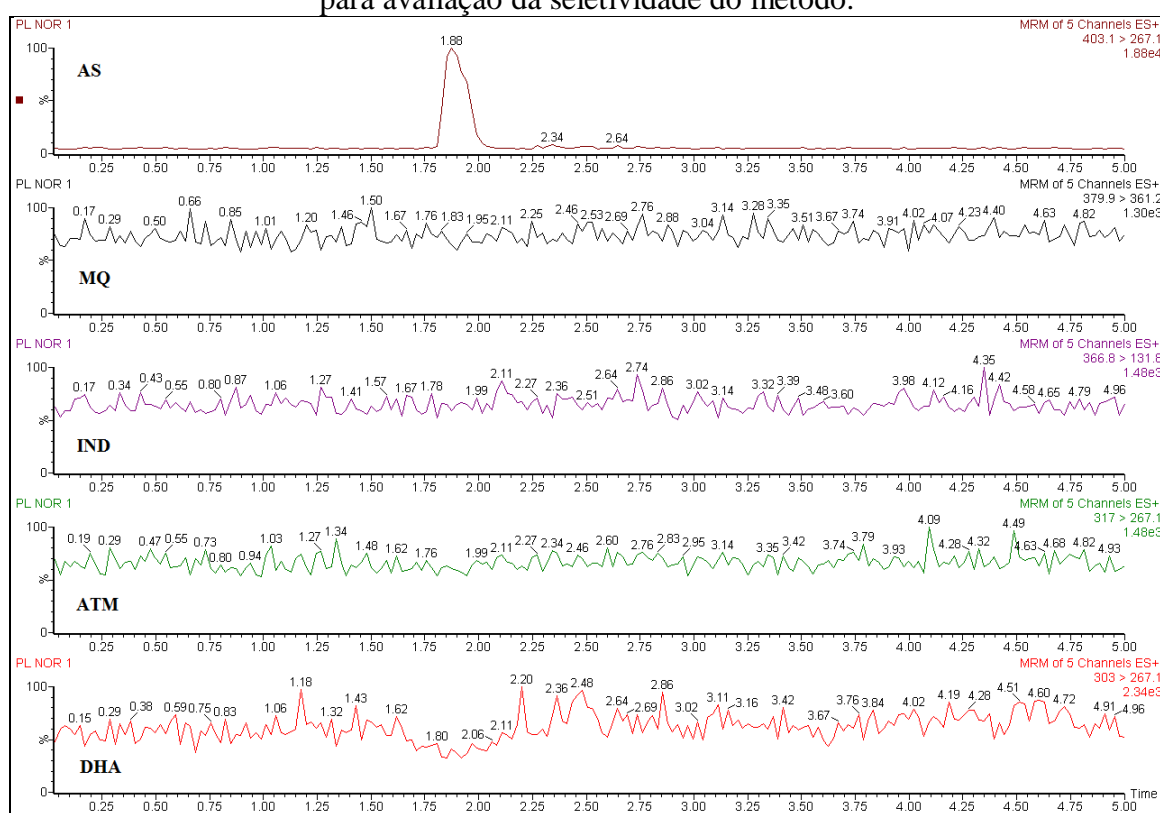


Figura 34 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma lipêmico, para avaliação da seletividade do método.

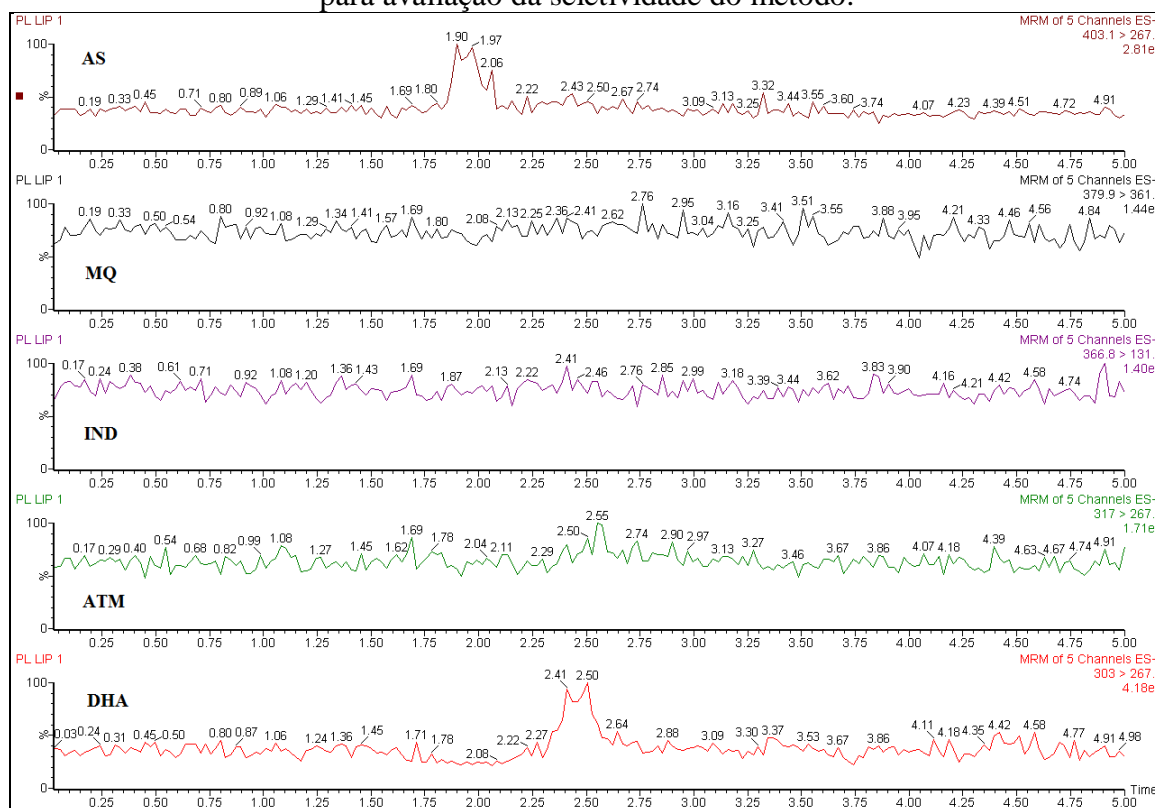
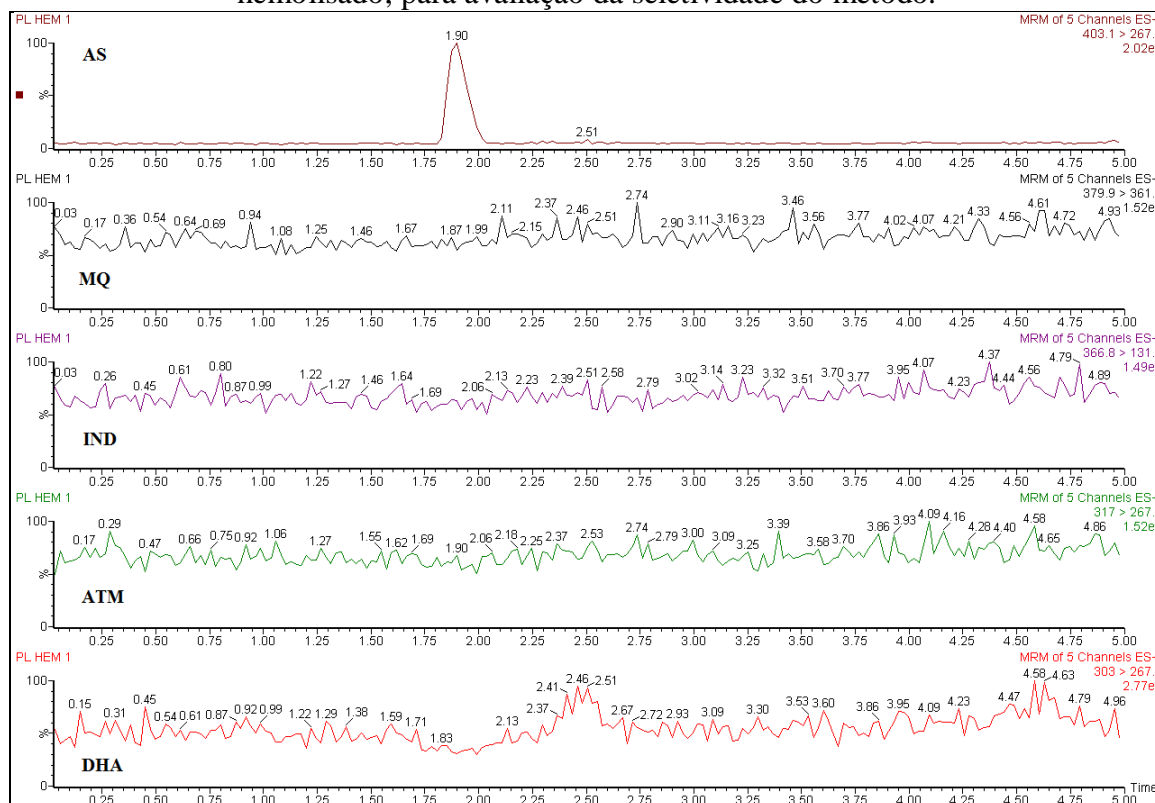


Figura 35 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma hemolisado, para avaliação da seletividade do método.



6.2.4.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada na faixa de concentrações de 30 ng/mL a 1000 ng/mL para artesunato e diidroartemisinina e de 100 ng/mL a 4000 ng/mL para mefloquina. Foram feitas três curvas analíticas, cada uma em um dia para a avaliação da linearidade do método.

Amostras de plasma branco foram contaminadas com soluções dos fármacos preparadas em metanol, de modo a obter as 6 concentrações necessárias para a construção das curvas analíticas. A quantidade de solução metanólica adicionada foi de 5% do volume de plasma utilizado, a fim de minimizar a precipitação de proteínas que o solvente orgânico poderia produzir.

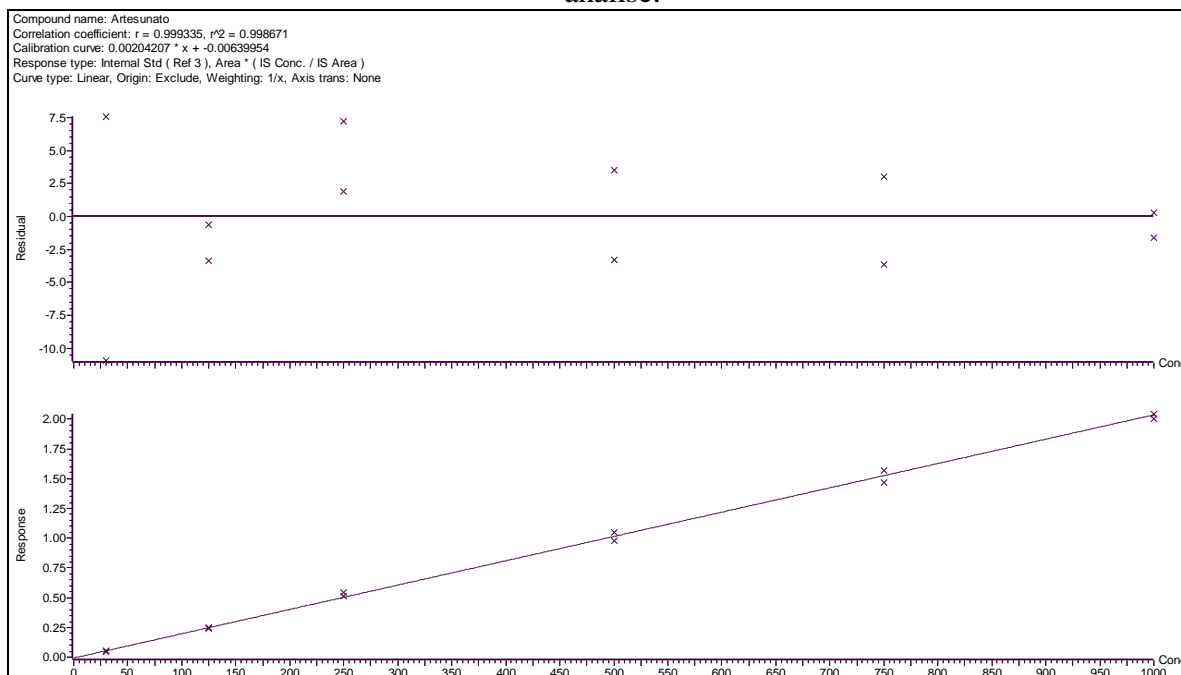
Os dados para a construção da curva analítica para o artesunato no primeiro dia estão relacionados na Tabela 40.

Tabela 40 – Dados para a construção da curva analítica para artesunato (AS), utilizando arteméter (ATM) como padrão interno, no primeiro dia de análise.

<i>Ponto</i>	<i>Concentração nominal de AS (ng/mL)</i>	<i>Área do pico de AS</i>	<i>Área do padrão interno (ATM)</i>	<i>Resposta</i>	<i>Concentração experimental (ng/mL)</i>	<i>Desvio (%)</i>
1-1	30	354	5947	0,059	32,269	7,6
1-2	30	279	5799	0,048	26,720	-10,9
2-1	125	1247	5043	0,247	124,198	-0,6
2-2	125	1495	6222	0,240	120,812	-3,4
3-1	250	2238	4357	0,514	254,672	1,9
3-2	250	2043	3778	0,541	268,026	7,2
4-1	500	6086	6204	0,981	483,526	-3,3
4-2	500	4591	4371	1,050	517,528	3,5
5-1	750	6763	4601	1,470	722,874	-3,6
5-2	750	8338	5307	1,571	772,464	3,0
6-1	1000	10343	5163	2,003	984,052	-1,6
6-2	1000	13276	6503	2,042	1002,858	0,3

A curva analítica construída com os dados da Tabela 40 está representada na Figura 36.

Figura 36 –Gráfico de resíduos e curva analítica obtida para artesunato no primeiro dia de análise.



Os valores de concentração experimental e porcentagem de desvio obtidos com as três curvas analíticas de artesunato estão relacionados na Tabela 41.

Tabela 41 – Valores de concentração experimental e porcentagem de desvio obtidos com as três curvas analíticas para artesunato (AS) nos três dias de análise.

Ponto	Concentração nominal de AS (ng/mL)	1º dia		2º dia		3º dia	
		Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)
1-1	30	32,269	7,6	29,929	-0,2	29,865	-0,4
1-2	30	26,720	-10,9	27,468	-8,4	30,317	1,1
2-1	125	124,198	-0,6	125,941	0,8	117,798	-5,8
2-2	125	120,812	-3,4	126,864	1,5	134,466	7,6
3-1	250	254,672	1,9	264,774	5,9	256,912	2,8
3-2	250	268,026	7,2	261,051	4,4	250,443	0,2
4-1	500	483,526	-3,3	521,86	4,4	441,504	-11,7
4-2	500	517,528	3,5	459,653	-8,1	462,768	-7,4
5-1	750	722,874	-3,6	740,956	-1,2	853,377	13,8
5-2	750	772,464	3,0	775,656	3,4	802,428	7,0
6-1	1000	984,052	-1,6	1005,404	0,5	946,232	-5,4
6-2	1000	1002,858	0,3	970,444	-3,0	983,891	-1,6

Pode-se observar que, para o artesunato, nenhum ponto apresentou valor fora dos desvios preconizados pela legislação (BRASIL, 2012), ou seja, se mantiveram na faixa de $\pm 20\%$ para o LIQ e de $\pm 15\%$ para os demais pontos.

Os parâmetros de regressão foram calculados utilizando-se o método dos mínimos quadrados ponderados, onde foi utilizado o fator de ponderação $1/x$ para o artesunato e os demais analitos. Os dados de regressão das três curvas analíticas obtidas são apresentados na Tabela 42. Os valores de coeficiente de determinação obtidos foram superiores a 0,99, indicando ajuste adequado do modelo linear.

Tabela 42 – Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para artesunato (AS) para avaliação da linearidade do método bioanalítico.

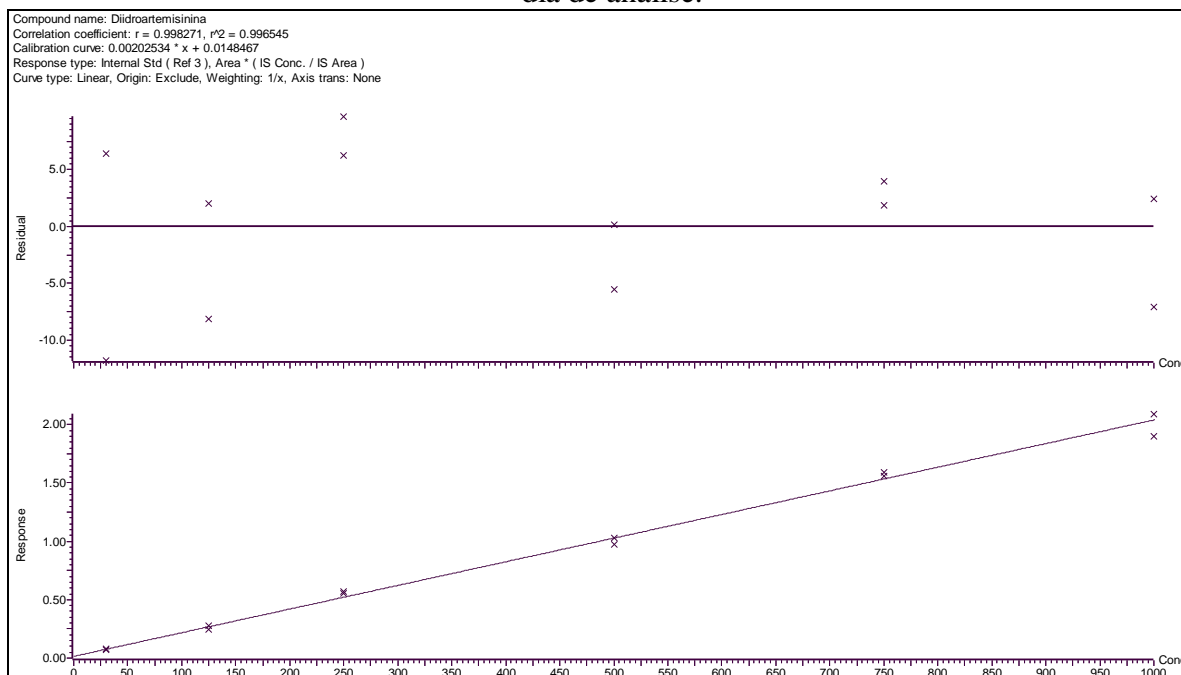
<i>Curva analítica</i>	<i>Equação da reta para AS</i>	<i>Coefficiente de determinação (R²)</i>
1	0,00204207x + 0,00639954	0,9986
2	0,00172719x + 0,00358745	0,9980
3	0,00210911x + 0,00218627	0,9918

Os dados para a construção da curva analítica para a diidroartemisinina no primeiro dia estão relacionados na Tabela 43. A representação gráfica é apresentada na Figura 37.

Tabela 43 – Dados para a construção da curva analítica para diidroartemisinina (DHA), utilizando arteméter (ATM) como padrão interno, no primeiro dia de análise.

<i>Ponto</i>	<i>Concentração nominal de DHA (ng/mL)</i>	<i>Área do pico de DHA</i>	<i>Área do padrão interno (ATM)</i>	<i>Resposta</i>	<i>Concentração experimental (ng/mL)</i>	<i>Desvio (%)</i>
1-1	30	473	5947	0,079	31,917	6,4
1-2	30	397	5799	0,068	26,456	-11,8
2-1	125	1377	5043	0,273	127,515	2,0
2-2	125	1539	6222	0,247	114,774	-8,2
3-1	250	2408	4357	0,553	265,580	6,2
3-2	250	2154	3778	0,570	274,182	9,7
4-1	500	6024	6204	0,971	472,077	-5,6
4-2	500	4497	4371	1,029	500,696	0,1
5-1	750	7187	4601	1,562	763,816	1,8
5-2	750	8460	5307	1,594	779,680	4,0
6-1	1000	10790	5163	2,090	1024,437	2,4
6-2	1000	12331	6503	1,896	928,869	-7,1

Figura 37 – Gráfico de resíduos e curva analítica obtida para diidroartemisinina no primeiro dia de análise.



Os valores de concentração experimental e porcentagem de desvio obtidos com as três curvas analíticas de diidroartemisinina estão relacionados na Tabela 44.

Tabela 44 – Valores de concentração experimental e porcentagem de desvio obtidos com as três curvas analíticas para diidroartemisinina (DHA) nos três dias de análise.

Ponto	Concentração nominal de DHA (ng/mL)	1º dia		2º dia		3º dia	
		Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)
1-1	30	31,917	6,4	34,892	16,3	33,329	11,1
1-2	30	26,456	-11,8	27,858	-7,1	33,816	12,7
2-1	125	127,515	2,0	109,274	-12,6	106,517	-14,8
2-2	125	114,774	-8,2	115,229	-7,8	122,893	-1,7
3-1	250	265,580	6,2	250,575	0,2	226,880	-9,2
3-2	250	274,182	9,7	272,257	8,9	244,401	-2,2
4-1	500	472,077	-5,6	452,424	-9,5	416,784	-16,6*
4-2	500	500,696	0,1	511,928	2,4	456,369	-8,7
5-1	750	763,816	1,8	819,263	9,2	843,194	12,4
5-2	750	779,680	4,0	850,892	13,5	785,441	4,7
6-1	1000	1024,437	2,4	1008,954	0,9	935,940	-6,4
6-2	1000	928,869	-7,1	856,455	-14,4	1021,218	2,1

Assim como para o artesunato, os desvios obtidos com as curvas analíticas para diidroartemisinina se mantiveram dentro da faixa especificada, com exceção do ponto 4-1 no terceiro dia, o qual foi excluído, sendo a curva recalculada com os pontos remanescentes.

Da mesma forma, como mostrado na Tabela 45, os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,98.

Tabela 45 – Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para diidroartemisinina (DHA) para avaliação da linearidade do método bioanalítico.

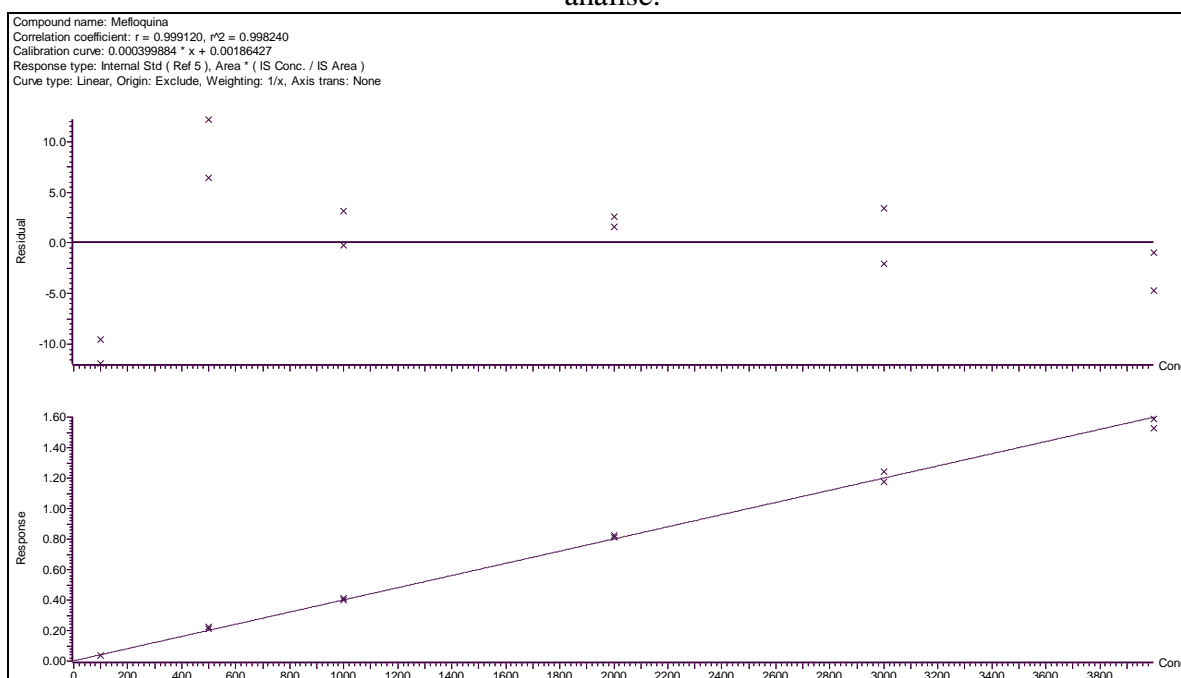
<i>Curva analítica</i>	<i>Equação da reta para DHA</i>	<i>Coefficiente de determinação (R²)</i>
1	0,00202534x + 0,0148467	0,9965
2	0,00195615x + 0,00193652	0,9869
3	0,00221537x + 0,00519805	0,9923

Os dados para a construção da curva analítica para a mefloquina no primeiro dia de análise estão relacionados na Tabela 46. A representação gráfica é apresentada na Figura 38.

Tabela 46 – Dados para a construção da curva analítica para mefloquina (MQ), utilizando indapamida (IND) como padrão interno, no primeiro dia de análise.

<i>Ponto</i>	<i>Concentração nominal de MQ (ng/mL)</i>	<i>Área do pico de MQ</i>	<i>Área do padrão interno (IND)</i>	<i>Resposta</i>	<i>Concentração experimental (ng/mL)</i>	<i>Desvio (%)</i>
1-1	100	2311	60748	0,038	90,458	-9,5
1-2	100	2110	56873	0,037	88,109	-11,9
2-1	500	11142	51898	0,215	532,201	6,4
2-2	500	13504	59720	0,226	560,823	12,2
3-1	1000	17819	44454	0,401	997,720	-0,2
3-2	1000	16525	39874	0,414	1031,710	3,2
4-1	2000	47122	57871	0,814	2031,560	1,6
4-2	2000	34630	42123	0,822	2051,215	2,6
5-1	3000	52733	44787	1,177	2939,745	-2,0
5-2	3000	63972	51507	1,242	3101,221	3,4
6-1	4000	80164	50532	1,586	3962,531	-0,9
6-2	4000	97964	64176	1,527	3812,706	-4,7

Figura 38 – Gráfico de resíduos e curva analítica obtida para mefloquina no primeiro dia de análise.



Os valores de concentração experimental e porcentagem de desvio obtidos com as três curvas analíticas de mefloquina estão relacionados na Tabela 47.

Tabela 47 – Valores de concentração experimental e porcentagem de desvio obtidos com as três curvas analíticas para mefloquina (MQ) nos três dias de análise.

Ponto	Concentração nominal de MQ (ng/mL)	1º dia		2º dia		3º dia	
		Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)	Concentração experimental (ng/mL)	Desvio (%)
1-1	100	90,458	-9,5	90,661	-9,3	107,005	7,0
1-2	100	88,109	-11,9	87,842	-12,2	80,058	-19,9
2-1	500	532,201	6,4	500,330	0,1	517,343	3,5
2-2	500	560,823	12,2	539,638	7,9	500,947	0,2
3-1	1000	997,720	-0,2	1051,524	5,2	1104,195	10,4
3-2	1000	1031,710	3,2	1087,590	8,8	1031,330	3,1
4-1	2000	2031,560	1,6	2094,515	4,7	1904,334	-4,8
4-2	2000	2051,215	2,6	2086,971	4,3	1949,696	-2,5
5-1	3000	2939,745	-2,0	3061,525	2,1	3288,625	9,6
5-2	3000	3101,221	3,4	2817,797	-6,1	3058,998	2,0
6-1	4000	3962,531	-0,9	3770,434	-5,7	3582,226	-10,4
6-2	4000	3812,706	-4,7	4011,172	0,3	4075,242	1,9

Os desvios obtidos com as curvas analíticas para mefloquina nos três dias de análise se mostraram adequados, assim como os valores de coeficiente de determinação obtidos (Tabela 48), todos superiores a 0,99.

Tabela 48 – Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para mefloquina (MQ) para avaliação da linearidade do método bioanalítico.

<i>Curva analítica</i>	<i>Equação da reta para MQ</i>	<i>Coefficiente de determinação (R²)</i>
1	0,000399884x + 0,00186427	0,9982
2	0,000391475x + 0,00722547	0,9969
3	0,000531401x + 0,00565621	0,9940

6.2.4.3 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método bioanalítico foram avaliados pela análise de amostras de plasma contendo os fármacos nas concentrações do limite inferior de quantificação (LIQ) e dos controles de qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM e CQA, respectivamente). Para a precisão, avaliou-se o desvio padrão relativo (DPR) para as determinações intradia e interdias nos três dias de análise. Os valores de DPR devem ser menores que 20% para o LIQ e menores que 15% para as amostras de controle de qualidade.

A exatidão foi avaliada calculando-se o erro padrão relativo (EPR) intradia e interdias. O EPR é a distância, em porcentagem, entre o valor nominal e o valor encontrado nas determinações. São aceitáveis valores de EPR na faixa de $\pm 20\%$ para o LIQ e $\pm 15\%$ para as amostras de controle de qualidade.

Os resultados obtidos para a avaliação da precisão e exatidão do método são apresentados a partir da Tabela 49 para o LIQ até a Tabela 52 para o CQA. Pode-se observar que o método apresentou precisão e exatidão aceitáveis em todos os níveis de concentração avaliados.

Tabela 49 – Resultados de precisão e exatidão para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina obtidos para o LIQ nos três dias de análise.

Amostras	Artesunato (30 ng/mL)			Diidroartemisinina (30 ng/mL)			Mefloquina (100 ng/mL)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
1	34,408	26,982	33,305	23,543	28,132	33,175	96,459	73,118	104,425
2	31,663	35,968	34,072	26,863	32,890	34,224	90,489	76,738	109,186
3	29,668	29,717	33,617	28,464	29,312	34,238	91,840	80,269	78,431
4	34,870	29,306	33,931	24,568	27,339	35,540	89,127	96,390	85,878
5	34,248	36,185	34,005	30,452	35,782	26,800	103,343	83,525	79,986
Média intradia	32,971	31,632	33,786	26,778	30,691	32,795	94,252	82,008	91,581
DPR intradia (%)	6,77	13,25	0,95	10,51	11,57	10,53	6,14	10,89	15,58
EPR intradia (%)	9,90	5,44	12,62	-10,74	2,30	9,32	-5,75	-17,99	-8,42
Média interdias		32,796			30,088			89,280	
DPR interdias (%)		7,57			12,53			11,41	
EPR interdias (%)		8,53			0,29			-12,01	

Tabela 50 – Resultados de precisão e exatidão para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina obtidos para o CQB nos três dias de análise.

Amostras	Artesunato (90 ng/mL)			Diidroartemisinina (90 ng/mL)			Mefloquina (300 ng/mL)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
1	94,245	95,671	97,668	87,491	89,661	99,714	281,919	303,220	349,945
2	95,890	95,068	93,954	90,761	81,206	88,553	287,456	273,890	290,661
3	90,682	96,865	89,605	96,159	92,508	97,140	266,460	289,510	305,126
4	94,944	96,321	88,138	84,431	103,394	97,524	279,547	317,751	278,356
5	100,880	94,210	87,685	81,047	89,272	99,818	309,462	300,084	278,502
Média intradia	95,328	95,627	91,410	87,978	91,208	96,550	284,969	296,891	300,518
DPR intradia (%)	3,86	1,09	4,69	6,62	8,78	4,80	5,51	5,51	9,90
EPR intradia (%)	5,92	6,25	1,57	-2,25	1,34	7,28	-5,01	-1,04	0,17
Média interdias		94,122			91,912			294,126	
DPR interdias (%)		3,63			7,00			6,59	
EPR interdias (%)		4,38			2,08			-2,00	

Tabela 51 – Resultados de precisão e exatidão para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina obtidos para o CQM nos três dias de análise.

Amostras	Artesunato (400 ng/mL)			Diidroartemisinina (400 ng/mL)			Mefloquina (1600 ng/mL)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
1	400,021	430,712	488,198	438,529	428,221	497,234	1609,075	1565,373	1813,970
2	434,313	391,905	466,646	443,913	399,035	503,571	1534,736	1630,152	1741,104
3	417,674	410,760	442,721	451,120	404,714	461,092	1543,852	1634,207	1596,237
4	444,191	408,218	447,508	465,133	381,974	414,535	1626,571	1635,536	1672,252
5	403,942	411,475	452,516	394,915	431,491	415,505	1583,331	1549,750	1796,420
Média intradia	420,028	410,614	459,518	438,722	409,087	458,387	1579,513	1603,004	1723,997
DPR intradia (%)	4,54	3,36	4,00	6,03	5,07	9,33	2,53	2,61	5,24
EPR intradia (%)	5,01	2,65	14,88	9,68	2,27	14,60	-1,28	0,19	7,75
Média interdias		430,053			435,399			1635,504	
DPR interdias (%)		6,08			7,72			5,10	
EPR interdias (%)		6,99			8,13			2,17	

Tabela 52 – Resultados de precisão e exatidão para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina obtidos para o CQA nos três dias de análise.

<i>Amostras</i>	<i>Artesunato (800 ng/mL)</i>			<i>Diidroartemisinina (800 ng/mL)</i>			<i>Mefloquina (3200 ng/mL)</i>		
	<i>1º dia</i>	<i>2º dia</i>	<i>3º dia</i>	<i>1º dia</i>	<i>2º dia</i>	<i>3º dia</i>	<i>1º dia</i>	<i>2º dia</i>	<i>3º dia</i>
1	789,559	830,963	857,208	779,033	810,177	807,968	3273,885	3209,705	3389,053
2	923,492	834,285	909,552	888,141	829,186	873,121	3144,626	3177,892	3550,303
3	907,423	797,321	812,801	878,725	767,006	1053,497	3261,755	3106,049	4018,094
4	840,849	923,202	838,586	924,541	852,180	848,286	3134,954	3218,821	3429,729
5	803,453	841,678	922,210	869,537	771,743	885,452	3324,795	2985,361	3548,131
Média intradia	852,955	845,490	868,071	867,995	806,058	893,665	3228,003	3139,566	3587,062
DPR intradia (%)	7,07	5,52	5,37	6,21	4,55	10,53	2,60	3,09	7,01
EPR intradia (%)	6,62	5,69	8,51	8,50	0,76	11,71	0,88	-1,89	12,10
Média interdias		855,505			855,906			3318,210	
DPR interdias (%)		5,19			7,85			7,28	
EPR interdias (%)		6,49			6,53			3,56	

6.2.4.4 Recuperação

Na Tabela 53, estão relacionados os valores de recuperação obtidos para os fármacos e para os padrões internos (PI). Observa-se a recuperação geral foi adequada, com valores médios de recuperação superiores a 90%.

Tabela 53 – Resultados de recuperação para o método bioanalítico.

<i>Fármaco</i>	<i>Concentração (ng/mL)</i>	<i>Área média das amostras extraídas</i>	<i>Área média das amostras em água</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Recuperação média</i>
Artesunato	90	1102,2	1267,6	87,0	94,0
	400	4652,4	4581,0	101,6	
	800	9612,0	10281,4	93,5	
Diidroartemisinina	90	1160,0	1247,0	93,0	93,8
	400	4782,6	4819,6	99,2	
	800	9345,4	10495,2	89,0	
Mefloquina	300	4472,6	5021,6	89,1	95,5
	1600	34887,2	36380,8	95,9	
	3200	72262,4	71217,2	101,5	
Arteméter (PI)	200	5613,7	5908,8	95,0	95,0
Indapamida (PI)	1800	56214,5	59552,5	94,4	94,4

6.2.4.5 Efeito residual (*carry over*)

Não foram observados, nas injeções de plasma branco subsequentes à injeção de uma amostra de plasma no limite superior de quantificação (LSQ), picos em nenhuma das transições de massa estudadas. Portanto, não foi observado o efeito residual (*carry over*). O efeito residual acontece quando picos cromatográficos são observados em cromatogramas de plasma branco obtidos após a injeção de amostra LSQ.

6.2.4.6 Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado de duas maneiras: primeiramente foi feita uma avaliação do efeito de matriz individual entre as áreas obtidas com a mistura com plasma extraído e com a mistura com acetonitrila, a outra avaliação foi por meio do cálculo do Fator de Matriz Normalizado por padrão interno (FMN). As avaliações foram feitas nos níveis de concentração do CQB e do CQA.

O efeito matriz individual foi avaliado para os fármacos e para os padrões internos, sendo apresentados a partir da Tabela 54 até a Tabela 57.

Tabela 54 – Avaliação do efeito matriz individual para artesunato.

Amostra*	CQB (90 ng/mL)			CQA (300 ng/mL)		
	Média das áreas em acetonitrila (n=8)	Áreas do analito em plasma	Desvio (%)	Média das áreas em acetonitrila (n=8)	Áreas do analito em plasma	Desvio (%)
1 N		3858	0,4		45591	6,7
2 N		4321	12,5		44901	5,0
3 N		4100	6,7		43241	1,2
4 N	3841,1	3809	-0,8	42745,9	44379	3,8
5 L		4268	11,1		45589	6,7
6 L		4276	11,3		47020	10,0
7 H		4230	10,1		47095	10,2
8 H		4417	15,0		40995	-4,1

* N = plasma normal; L = plasma lipêmico; H = plasma hemolisado

Tabela 55 – Avaliação do efeito matriz individual para diidroartemisinina.

<i>Amostra</i> [*]	<i>CQB (90 ng/mL)</i>			<i>CQA (300 ng/mL)</i>		
	<i>Média das áreas em acetoneitrila (n=8)</i>	<i>Áreas do analito em plasma</i>	<i>Desvio (%)</i>	<i>Média das áreas em acetoneitrila (n=8)</i>	<i>Áreas do analito em plasma</i>	<i>Desvio (%)</i>
1 N		4297	8,2		39237	3,4
2 N		3939	-0,8		37988	0,1
3 N		4033	1,6		38860	2,4
4 N	3970,5	3778	-4,8	37960,4	38425	1,2
5 L		4341	9,3		41194	8,5
6 L		4313	8,6		38777	2,2
7 H		4090	3,0		39904	5,1
8 H		3564	-10,2		36380	-4,2

^{*} N = plasma normal; L = plasma lipêmico; H = plasma hemolisado

Tabela 56 – Avaliação do efeito matriz individual para mefloquina.

<i>Amostra</i> [*]	<i>CQB (300 ng/mL)</i>			<i>CQA (3200 ng/mL)</i>		
	<i>Média das áreas em acetoneitrila (n=8)</i>	<i>Áreas do analito em plasma</i>	<i>Desvio (%)</i>	<i>Média das áreas em acetoneitrila (n=8)</i>	<i>Áreas do analito em plasma</i>	<i>Desvio (%)</i>
1 N		2796	-8,0		339111	-0,4
2 N		2948	-3,0		340647	0,0
3 N		2998	-1,4		334529	-1,8
4 N	3039,6	2583	-15,0	340545,4	315622	-7,3
5 L		2851	-6,2		314259	-7,7
6 L		2666	-12,3		355749	4,5
7 H		2919	-4,0		352145	3,4
8 H		2957	-2,7		329240	-3,3

^{*} N = plasma normal; L = plasma lipêmico; H = plasma hemolisado

Tabela 57 – Avaliação do efeito matriz individual para os padrões internos arteméter e indapamida.

Amostra*	Arteméter (200 ng/mL)			Indapamida (1800 ng/mL)		
	Média das áreas	Áreas do analito	Desvio (%)	Média das áreas	Áreas do analito	Desvio (%)
	em acetonitrila (n=8)	em plasma		em acetonitrila (n=8)	em plasma	
1 N		10539	-2,2		18486	-0,7
2 N		10977	1,8		18733	0,6
3 N		11468	6,4		19885	6,8
4 N		10206	-5,3		18410	-1,1
5 L		12391	15,0		18353	-1,4
6 L		11730	8,8		17731	-4,8
7 H		10612	-1,5		18909	1,6
8 H	10777,6	11664	8,2	18620,2	19535	4,9
9 N		12394	15,0		18375	-1,3
10 N		11960	11,0		18376	-1,3
11 N		11549	7,2		18561	-0,3
12 N		11079	2,8		18028	-3,2
13 L		11818	9,7		17000	-8,7
14 L		12222	13,4		17735	-4,8
15 H		10986	1,9		18159	-2,5
16 H		11492	6,6		17538	-5,8

* N = plasma normal; L = plasma lipêmico; H = plasma hemolisado

O efeito matriz individual não foi observado para nenhum dos compostos analisados nas amostras de plasma preconizadas, seja na concentração alta (CQA) ou na concentração baixa (CQB). Todos os valores de desvio encontrados estavam dentro da faixa de $\pm 15\%$.

Na Tabela 58 são apresentados os valores de Fator de Matriz Normalizado por padrão interno (FMN) para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.

Como se esperava, os valores de desvio padrão relativo dos FMN calculados para os fármacos foram inferiores a 15%, tanto para as amostras de concentração alta (CQA) quanto baixa (CQB). O FMN leva em consideração que, se o efeito matriz se manifestar nos padrões internos da mesma maneira que nos analitos, não há problema para a detecção adequada dos analitos. Assim, como não foi observado efeito matriz apreciável na avaliação individual, também não foi observado efeito matriz quando a avaliação foi feita por meio do FMN.

Tabela 58 – Avaliação do efeito matriz utilizando os Fatores de Matriz Normalizados por Padrão Interno (FMN) para artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.

Amostra*	Artesunato		Diidroartemisinina		Mefloquina	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
	(90 ng/mL)	(300 ng/mL)	(90 ng/mL)	(300 ng/mL)	(300 ng/mL)	(3200 ng/mL)
1 N	0,9314	0,9991	0,9312	0,8197	0,3900	5,0583
2 N	1,0149	1,0160	0,8761	0,8149	0,4057	5,0809
3 N	0,9125	1,0245	0,8501	0,8612	0,3887	4,9399
4 N	0,9584	1,0824	0,9289	0,8539	0,3617	4,7985
5 L	0,9449	1,0465	0,8670	0,8787	0,4005	5,0667
6 L	0,9365	1,0484	0,8730	0,8180	0,3846	5,4979
7 H	1,0277	1,0782	0,8895	0,8028	0,3980	5,2558
8 H	0,9614	0,9572	0,7758	0,8114	0,3903	5,2081
Média	0,9610	1,0315	0,8739	0,8326	0,3899	5,1133
DPR (%)	4,21	4,04	5,61	3,34	3,43	4,13

* N = plasma normal; L = plasma lipêmico; H = plasma hemolisado

6.2.4.7 Estabilidade dos analitos

6.2.4.7.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi avaliada pela análise de amostras de plasma contendo os fármacos após 6 horas de permanência destas à temperatura ambiente. A comparação foi feita com amostras de plasma recém-descongeladas. Para a quantificação, foi utilizada a curva analítica do dia da análise.

Os desvios entre as concentrações obtidas nas amostras de estabilidade de curta duração (ECD) devem ser inferiores a 15%, quando estas amostras forem comparadas com amostras recém-preparadas.

Como observado na Tabela 59, os fármacos se apresentaram estáveis mesmo após 6 horas de permanência em temperatura ambiente. Este tempo é suficiente para a manipulação das amostras prévia à extração e análise cromatográfica.

Tabela 59 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade de curta duração (ECD) de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.

<i>Parâmetros</i>	<i>Artesunato CQB (90 ng/mL)</i>		<i>Artesunato CQA (800 ng/mL)</i>	
	<i>Amostra ECD</i>	<i>Amostra recente</i>	<i>Amostra ECD</i>	<i>Amostra recente</i>
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	94,497	89,926	789,179	890,116
DPR (%)	4,46	3,89	2,48	5,06
Exatidão (%)	5,00	-0,08	-1,35	11,26
Desvio (%)	5,08		-11,34	
<i>Parâmetros</i>	<i>Diidroartemisinina CQB (90 ng/mL)</i>		<i>Diidroartemisinina CQA (800 ng/mL)</i>	
	<i>Amostra ECD</i>	<i>Amostra recente</i>	<i>Amostra ECD</i>	<i>Amostra recente</i>
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	92,195	95,136	741,954	843,125
DPR (%)	2,59	6,14	1,58	3,90
Exatidão (%)	2,44	5,71	-7,26	5,39
Desvio (%)	-3,09		-12,00	
<i>Parâmetros</i>	<i>Mefloquina CQB (300 ng/mL)</i>		<i>Mefloquina CQA (3200 ng/mL)</i>	
	<i>Amostra ECD</i>	<i>Amostra recente</i>	<i>Amostra ECD</i>	<i>Amostra recente</i>
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	343,525	305,126	2959,488	3389,053
DPR (%)	4,56	5,05	9,24	2,44
Exatidão (%)	14,51	1,71	-7,52	5,91
Desvio (%)	12,58		-12,68	

6.2.4.7.2 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi realizada após três ciclos de congelamento e descongelamento, tendo permanecido, em cada ciclo de congelamento, em temperatura de -70 °C por 24 horas. As concentrações obtidas com estas amostras foram comparadas com as obtidas de amostras recém-descongeladas. Foi utilizada a curva analítica do dia da análise na quantificação.

Os critérios de aceitação foram os mesmos que para a estabilidade de curta duração, ou seja, os desvios entre as concentrações obtidas nas amostras de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD) devem ser inferiores a 15%, quando estas amostras forem comparadas com amostras recém-preparadas.

Como pode ser observado na Tabela 60, os fármacos se mantiveram estáveis no plasma mesmo sendo congeladas e descongeladas três vezes.

Tabela 60 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD) de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.

<i>Parâmetros</i>	<i>Artesunato CQB (90 ng/mL)</i>		<i>Artesunato CQA (800 ng/mL)</i>	
	<i>Amostra ECCD</i>	<i>Amostra recente</i>	<i>Amostra ECCD</i>	<i>Amostra recente</i>
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	92,381	89,926	875,817	890,116
DPR (%)	3,49	3,89	7,12	5,06
Exatidão (%)	2,65	-0,08	9,48	11,26
Desvio (%)	2,73		-1,61	
<i>Parâmetros</i>	<i>Diidroartemisinina CQB (90 ng/mL)</i>		<i>Diidroartemisinina CQA (800 ng/mL)</i>	
	<i>Amostra ECCD</i>	<i>Amostra recente</i>	<i>Amostra ECCD</i>	<i>Amostra recente</i>
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	94,601	95,136	816,585	843,125
DPR (%)	4,97	6,14	3,76	3,90
Exatidão (%)	5,11	5,71	2,07	5,39
Desvio (%)	-0,56		-3,15	
<i>Parâmetros</i>	<i>Mefloquina CQB (300 ng/mL)</i>		<i>Mefloquina CQA (3200 ng/mL)</i>	
	<i>Amostra ECCD</i>	<i>Amostra recente</i>	<i>Amostra ECCD</i>	<i>Amostra recente</i>
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	330,342	305,126	3343,677	3389,053
DPR (%)	1,20	5,05	4,61	2,44
Exatidão (%)	10,11	1,71	4,49	5,91
Desvio (%)	8,26		-1,34	

6.2.4.7.3 Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento (EPP) foi avaliada pela injeção das amostras processadas 24 horas após sua preparação. A avaliação foi feita comparando-se as concentrações obtidas com as concentrações obtidas com as amostras recém-preparadas.

É interessante avaliar a estabilidade pós-processamento pois a etapa de processamento das amostras é relativamente rápida, porém, o tempo necessário para as corridas cromatográficas, mesmo com uma duração de 5 minutos cada uma, pode ser excessivamente longo. Como

observado na Tabela 61, os analitos se mostraram estáveis mesmo após 24 horas de permanência no compartimento de amostras do injetor automático.

Tabela 61 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade pós-processamento (EPP) de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.

<i>Parâmetros</i>	<i>Artesunato CQB (90 ng/mL)</i>		<i>Artesunato CQA (800 ng/mL)</i>	
	<i>Amostra EPP</i>	<i>Amostra recente</i>	<i>Amostra EPP</i>	<i>Amostra recente</i>
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	97,296	89,926	873,665	890,116
DPR (%)	4,80	3,89	6,82	5,06
Exatidão (%)	8,11	-0,08	9,21	11,26
Desvio (%)	8,20		-1,85	
<i>Parâmetros</i>	<i>Diidroartemisinina CQB (90 ng/mL)</i>		<i>Diidroartemisinina CQA (800 ng/mL)</i>	
	<i>Amostra EPP</i>	<i>Amostra recente</i>	<i>Amostra EPP</i>	<i>Amostra recente</i>
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	100,171	95,136	864,631	843,125
DPR (%)	7,11	6,14	1,36	3,90
Exatidão (%)	11,30	5,71	8,08	5,39
Desvio (%)	5,29		2,55	
<i>Parâmetros</i>	<i>Mefloquina CQB (300 ng/mL)</i>		<i>Mefloquina CQA (3200 ng/mL)</i>	
	<i>Amostra EPP</i>	<i>Amostra recente</i>	<i>Amostra EPP</i>	<i>Amostra recente</i>
Concentração média (ng/mL) (n = 3)	335,110	305,126	3601,268	3389,053
DPR (%)	5,68	5,05	0,45	2,44
Exatidão (%)	11,70	1,71	12,54	5,91
Desvio (%)	9,83		6,26	

6.2.4.7.4 Estabilidade das soluções

A estabilidade das soluções estoque foi avaliada por meio da comparação entre os fatores de resposta de soluções recém-preparadas com soluções utilizadas durante a validação do método. São aceitáveis valores de desvio entre $\pm 10\%$.

Os resultados para os analitos estão relacionados na Tabela 62 e para os padrões internos na Tabela 63. Pode-se observar que todos os valores de desvio calculados se mantiveram dentro da faixa especificada, indicando estabilidade das soluções estoque. Isto é particularmente importante para os derivados da artemisinina, os quais são instáveis em água (GAUDIN,

2007). Entretanto, como as soluções estoque foram preparadas em metanol, a extensão da degradação não foi acima da permitida.

Tabela 62 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade das soluções (ES) de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina.

<i>Parâmetros</i>	<i>Artesunato (400 ng/mL)</i>		<i>Diidroartemisinina (400 ng/mL)</i>		<i>Mefloquina (1600 ng/mL)</i>	
	<i>Solução ES</i>	<i>Solução recente</i>	<i>Solução ES</i>	<i>Solução recente</i>	<i>Solução ES</i>	<i>Solução recente</i>
Média das áreas (n = 3)	21928	19507,3	19584,3	19634,7	166277,3	172033,4
Concentração (ng/mL)	415,2	390,4	398,4	390,4	1596,8	1615,2
Fator de resposta	52,8131	49,9676	49,1575	50,2938	104,1316	106,5090
Desvio (%)		5,69		-2,26		-2,23

Tabela 63 – Resultados obtidos para a avaliação da estabilidade das soluções (ES) dos padrões internos arteméter e indapamida

<i>Parâmetros</i>	<i>Arteméter (200 ng/mL)</i>		<i>Indapamida (1800 ng/mL)</i>	
	<i>Solução ES</i>	<i>Solução recente</i>	<i>Solução ES</i>	<i>Solução recente</i>
Média das áreas (n = 3)	17621	16237	135501	132024
Concentração (ng/mL)	288,0	244,0	1854,0	1728,0
Fator de resposta	61,1840	66,5451	73,0858	76,4028
Desvio (%)		-8,06		-4,34

7 CONCLUSÕES

- Um método para a separação de artesunato e mefloquina no MEFAS foi desenvolvido, entretanto, as amostras recebidas não apresentaram pureza adequada para sua utilização como matéria-prima farmacêutica devido à presença de outros compostos detectados por meio de vários picos adicionais nos cromatogramas.
- Um método para a determinação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos em dose fixa combinada foi desenvolvido e validado, apresentando seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. As soluções dos analitos foram consideradas estáveis por pelo menos 8 horas após sua preparação;
- Um método para a determinação simultânea de artesunato, diidroartemisinina e mefloquina em plasma humano foi desenvolvido e validado, podendo ser empregado em estudos de monitorização terapêutica de pacientes em uso dos comprimidos de artesunato e mefloquina em dose fixa combinada;
- Desta forma, as condições analíticas necessárias para o desenvolvimento de um novo medicamento, baseado no sal MEFAS, ou para a avaliação da qualidade e eficácia terapêutica dos comprimidos em dose fixa combinada foram estabelecidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, J. Situação epidemiológica da malária na Amazônia. Apresentação. Brasília, 2011. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2011/Set/05/jarbas_malaria_050911.pdf. Acesso em Ago/2012.

BRAGA, E. M., FONTES, C. J. F. Plasmodium-malária. In: NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 143-161.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE no. 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Poder Executivo, de 02 de Junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Malária. *Esquemas recomendados para o tratamento da malária não complicada no Brasil*. Folder. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 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, DF, Poder Executivo, de 22 de Maio de 2012.

BRITISH Pharmacopoeia 2013. London: Her majesty's Stationary Office, 2012.

CAMARGO, E. P. Malária, Maleita, Paludismo. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 26-29, 2003.

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

CÉSAR, I. C. *Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano*. [Tese] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

CÉSAR, I. C., PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, n. 2, p. 235-240, 2009.

CÉSAR, I. C., RIBEIRO, J. A. A., TEIXEIRA, L. S., BELLORIO, K. B., ABREU, F. C., MOREIRA, J. M., CHELLINI, P. R., PIANETTI, G. A. Liquid chromatography-tandem mass

spectrometry for the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in human plasma: application for a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, p. 114-120, 2011.

CHAMBERS, E., WAGROWSKI-DIEHL, D. M., LU, Z., MAZZEO, J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*, v. 852, p. 22-34, 2007.

EMA. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. London, Julho de 2011. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. Acesso em Junho/2013.

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

FOLLEY, M., TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacology and Therapeutics*, Oxford, v. 79, n. 1, p. 57-88, 1998.

GAUDIANO, M. C., ANTONIELLA, E., BERTOCCHI, P., VALVO, L. Development and validation of a reversed-phase LC method for analysing potentially counterfeit antimalarial medicines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 42, p. 132-135, 2006.

GAUDIN, K., LANGLOIS, M. H., BARBAUD, A., BOYER, C., MILLET, P., FAWAZ, F., DUBOST, J. P. Stability of artesunate in pharmaceutical solvents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p. 1019-1024, 2007.

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

GREEN, M.D., MOUNT, D.L., WIRTZ, R.A., WHITE, N.J. A colorimetric field method to assess the authenticity of drugs sold as the antimalarial artesunate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 65-70, 2000.

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, p.564-573, 2002.

HODEL, E. M., ZANOLARI, B., MERCIER, T., BIOLLAZ, J., KEISER, 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*, v. 877, p. 867-886, 2009.

HOFFMANN, E., STROOBANT, V. Mass spectrometry principles and applications. 3a ed., Chichester: John Wiley & Sons, 2007. p. 230.

HYDE, J. E., MULLER, I. B. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. *Future Microbiology*, v. 5, n. 12, p. 1857, 2010.

KALYANKAR, T.M., KAKADE, R.B., ATTAR, M.S., KAMBLE, A.R. Simultaneous spectrophotometric estimation of artesunate and mefloquine. *Journal of Chemistry*, v. 2013, id 679857, 2013.

KREMSNER, P. G., KRISHNA, S. Antimalarial combinations. *Lancet*, London, n. 364, p. 285-294, 2004.

KRSTULOVIC, A. M., LEE, C. R. Defining drug purity through chromatographic and related methods: current status and perspectives. *Journal of Chromatography B*, v. 689, p. 137-153, 2007.

LACERDA, M. V. G., MOURÃO, M. P. G., ALEXANDRE, M. A. A., SIQUEIRA, A. M., MAGALHÃES, B. M. L., MARTINEZ-ESPINOSA, F. E., FILHO, F. S. S., BRASIL, P., VENTURA, A. M. R. S., TADA, M. S., COUTO, V. S. C. D., SILVA, A. R., SILVA, R. S. U., ALECRIM, M. G. C. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria Journal*, v. 11, p. 12, 2012.

LAI, C., NAIR, N. K., MANSOR, S. M., OLLIARO, P. L., NAVARATNAM, V. An analytical method with a single extraction procedure and two separate high performance liquid chromatographic systems for the determination of artesunate, dihydroartemisinin and mefloquine in the human plasma for application in clinical pharmacological studies for the drug combination. *Journal of Chromatography B*, v. 857, p. 308-314, 2007.

LI, G. Nucleus may be the key site of chloroquine antimalarial action and resistance development. *Medical Hypotheses*, Penrith, v. 67, p. 323-326, 2006.

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 amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 41, p. 1079-1086, 2005.

MEUNIER, B. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? *Accounts of Chemical Research*, Washington, v.41, n.1, p. 69-77, 2008.

NOGUEIRA, F. H. A., GOULART, L. P. L., CÉSAR, I. C., CAMPOS, L. M. M., PIANETTI, G. A. Development and validation of an HPLC method for mefloquine hydrochloride determination in tablet dosage form. *Journal of AOAC*, v. 94, n. 4, p. 1089-1093, 2011.

OLIVEIRA-FERREIRA, J., LACERDA, M. V. G., BRASIL, P., LADISLAU, J. L. B., TAUIL, P. L., DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, v. 9, p. 115, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. *Tratamento da malária grave e complicada. Guia de condutas práticas*. 2 ed. Genebra: OMS, 2000. p. 38-39.

PAVIA, D., LAMPMAN, G., KRIZ, G. *Introduction to spectroscopy*. 3 ed., Washington: Thomson Learning Inc., 2001. p. 78.

RANHER, S. S., GANDHI, S. V., KADUKAR, S. S., RANJANE, P. N. A validated HPLC method for the determination of artesunate in bulk and tablet formulation. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 65, n. 5, p. 507-510, 2010.

RAO, A. B., MURTHY, R. S. R. A rapid spectrophotometric method for the determination of mefloquine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.27, p. 959-965, 2002.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, I. R., OLLIARO, P. Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials. *Médecine Tropicale*, v. 58, s. 3, p. 50-53, 1998.

RIDLEY, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, London, v. 415, p. 686-693, 2002.

ROMI, R., BOCCOLINI, D., VALLORANI, R., SEVERINI, F., TOMA, L., COCCHI, M., TAMBURRO, A., MESSERI, G., CRISCI, A., ANGELI, L., COSTANTINI, R., RAFFAELLI, I., PONTUALE, G., THIÉRY, I., LANDIER, A., LE GOFF, G., FAUSTO, A. M., DI LUCA, M. Assessment of the risk of malaria re-introduction in the Maremma plain (Central Italy) using a multi-factorial approach. *Malaria Journal*, v. 11, p. 98, 2012.

SANTELLI, A. C., RIBEIRO, I., DAHLER, A., BOULOS, M., MARCHESINI, P., LA CORTE, R., BARBOSA, M., LUCENA, F., MAGALHÃES, I., DE LEON, A. P., JUNGER, W., KIECHEL, J. R., LADISLAU, J. L. B. Effect of artesunate-mefloquine fixed dose combination in malaria transmission in Amazon basin communities. *Tropical Medicine and International Health*, v. 16, s. 1, p. 375-376, 2011.

SIBLEY, C. H., PRICE, R. N. Monitoring antimalarial drug resistance: applying lessons learned from the past in a fast-moving present. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 2, p. 126-133, 2012.

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

SWEETMAN, S. C. (Ed.). *Martindale: The complete drug reference*. 36 ed., London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 594-615.

TAYLOR, W. R. J., WHITE, N. J. Antimalarial drug toxicity. *Drug Safety*, v. 27, n. 1, p. 25-61, 2004.

THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 7 ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), 2010.

THE INTERNATIONAL Pharmacopoeia. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 2006.

THE JAPANESE Pharmacopoeia, Sixteenth Edition. 16 ed. Tóquio: The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, 2011.

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

THE UNITED States Pharmacopeia. *USP 36*. 36 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2012.

TRACY, J. W., WEBSTER JR., L. T. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários Malária. In: HARDMAN, J.G.; LIMBRID,L.E.(ED.) *Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Mac GrawHill, 2003. p. 803-822.

VAILLANT, Y., BRENIER, C., GRANGE, Y., NICOLAS, A., BONNET, P. A., MASSINGBIAS, L. R., RAKOTOMANGA, P., KOUMARÉ, B., MAHLY, A., ABSI, M., CISS, M., LOUESLATI, M. H., CHAUVEY, D. Simultaneous determination of artesunate and amodiaquine in fixed-dose combination by a RP-HPLC method with double UV detection: Implementation in interlaboratory study involving seven African national quality control laboratories. *Chromatographia*, v. 75, n. 11-12, p. 617-628, 2012.

VAROTTI, F. P., BOTELHO, A. C. C., ANDRADE, A. A., PAULA, R. C., FAGUNDES, E. M. S., VALVERDE, A., MAYER, L. M. U., MENDONÇA, J. S. M., SOUZA, M. V. N., BOECHAT, N., KRETTLI, A. U. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Bethesda (EUA), v. 52, n. 11, p. 3868-3874, 2008.

VOGESER, M., SEGER, C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, v. 56, n. 8, p. 1234-1244, 2010.

WHITE, N. J. Qinghaosu (Artemisinin): the price of success. *Science*, v. 320, p. 330-334, 2008.

WHO - World Health Organization. The global malaria situation: current tools for prevention and control. 55th World Health Assembly. Global funds to fight AIDS, Tuberculosis & Malaria, 2002. Disponível em <<http://who.int/topics/malaria/en>>. Acesso em Ago/2012.

WHO – World Health Organization. *Guidelines for the treatment of malaria*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 2010. 210 p.

WHO - World Health Organization. *Methods and techniques for assessing exposure to antimalarial drugs in clinical field studies*. Geneva: World Health Organization, 2011a. 162 p.

WHO - World Health Organization. *World Malaria Report 2011*. Geneva: World Health Organization, 2011b. 278 p.

WINSTANLEY, P. Modern chemotherapeutic options for malaria. *The Lancet Infectious Diseases*, London, v.1,. p. 242-250, 2001.

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

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. *Statistical manual of AOAC* – Association of Official Analytical Chemistry. Washington: AOAC, 1975. 88 p.

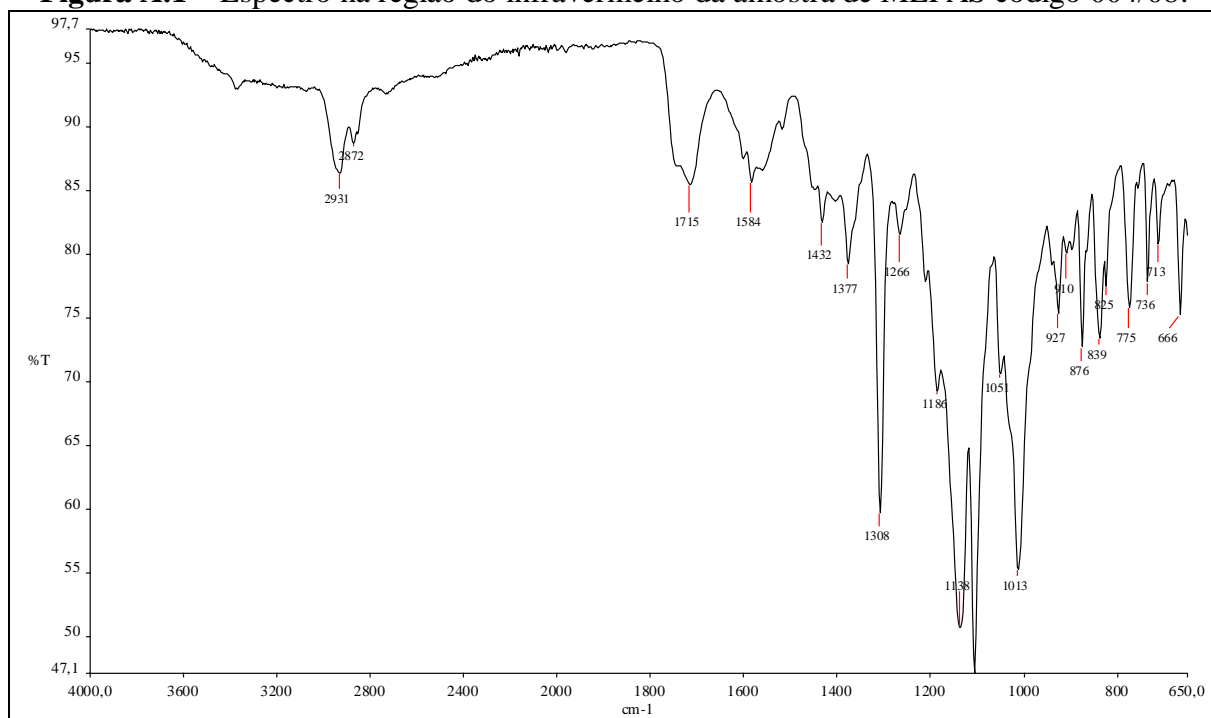
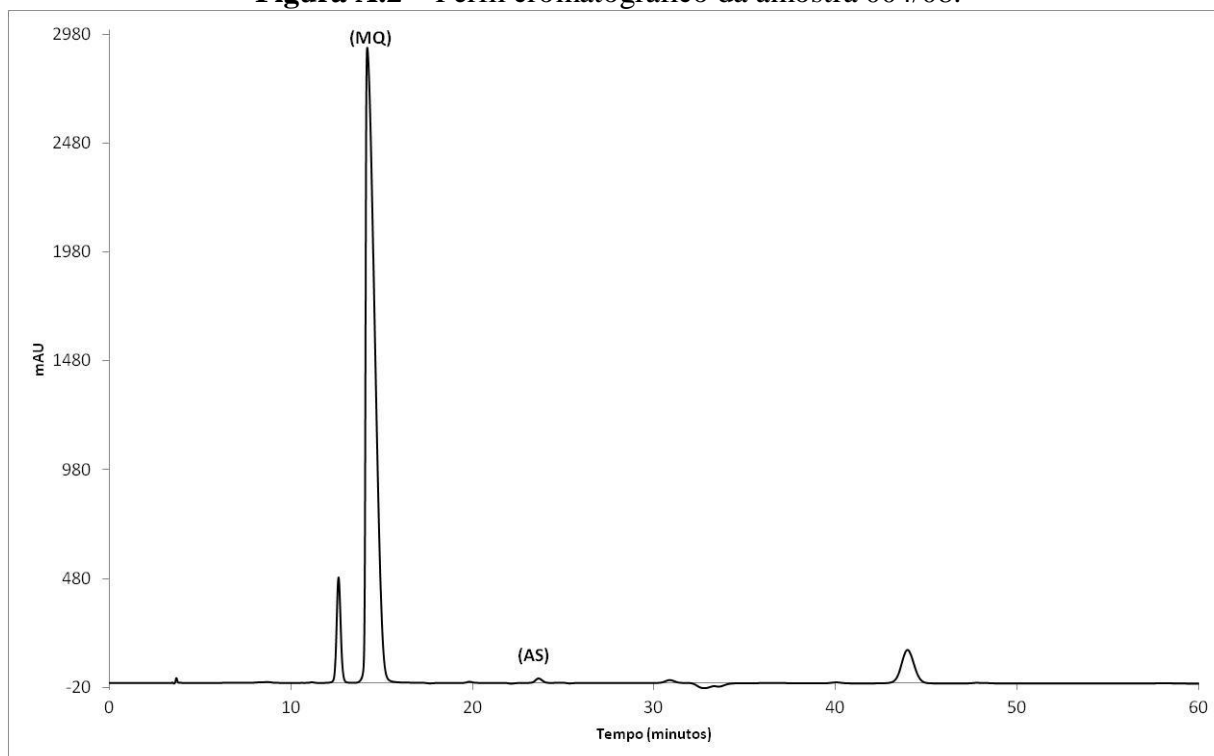
APÊNDICE A - Valores de faixa de fusão, espectros na região do infravermelho e perfis cromatográficos das amostras de MEFAS analisadas.

A seguir, são apresentados os valores de faixa de fusão, os espectros na região do infravermelho e os perfis cromatográficos das amostras do sal artesunato de mefloquina (MEFAS) analisadas.

Os valores de faixa de fusão foram obtidos conforme descrito no Capítulo I. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos por meio de acessório de reflectância e os perfis cromatográficos foram obtidos segundo as condições descritas na Tabela 10. Os picos referentes ao cloridrato de mefloquina estão identificados como MQ e os picos referentes ao artesunato estão identificados como AS.

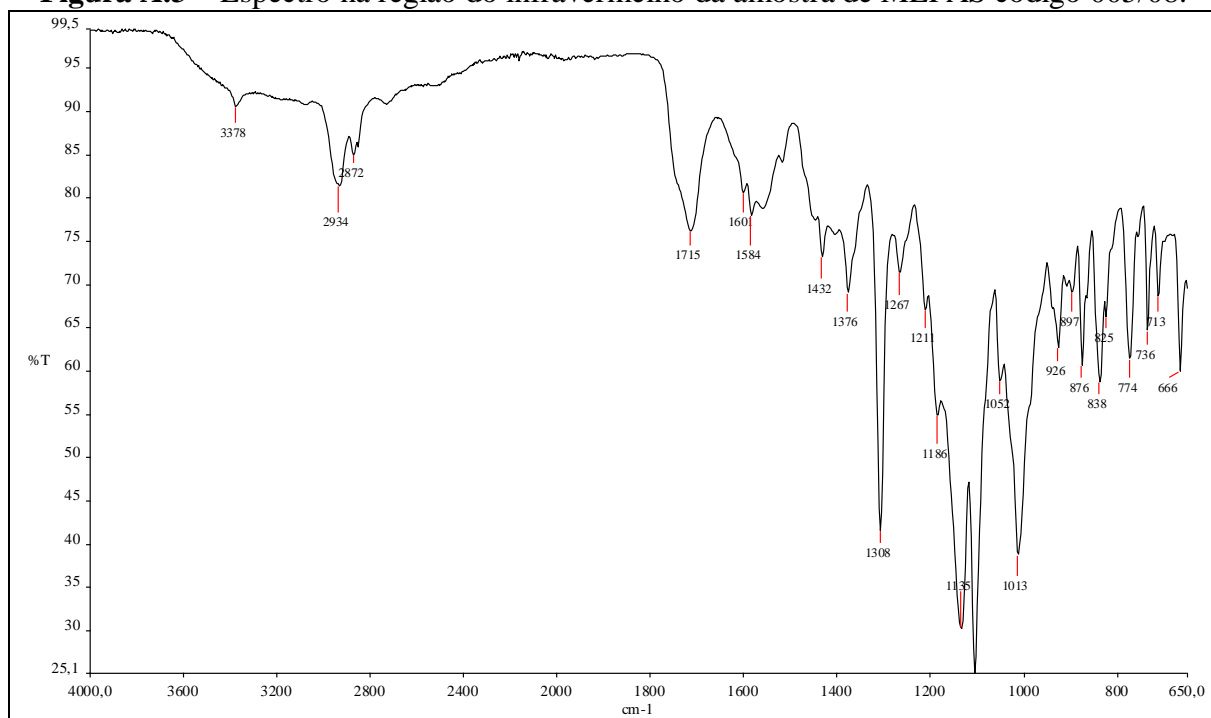
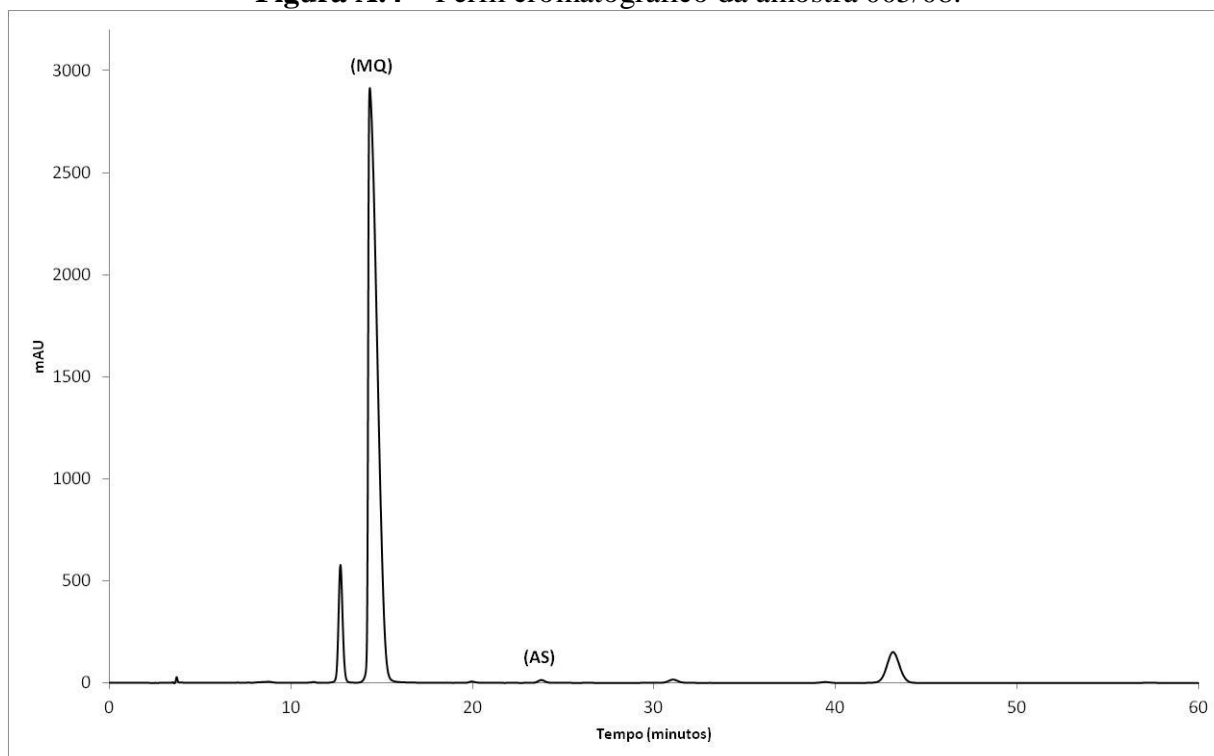
Amostra 004/08

Faixa de fusão: 93,5 - 100,0 °C

Figura A.1 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 004/08.**Figura A.2** – Perfil cromatográfico da amostra 004/08.

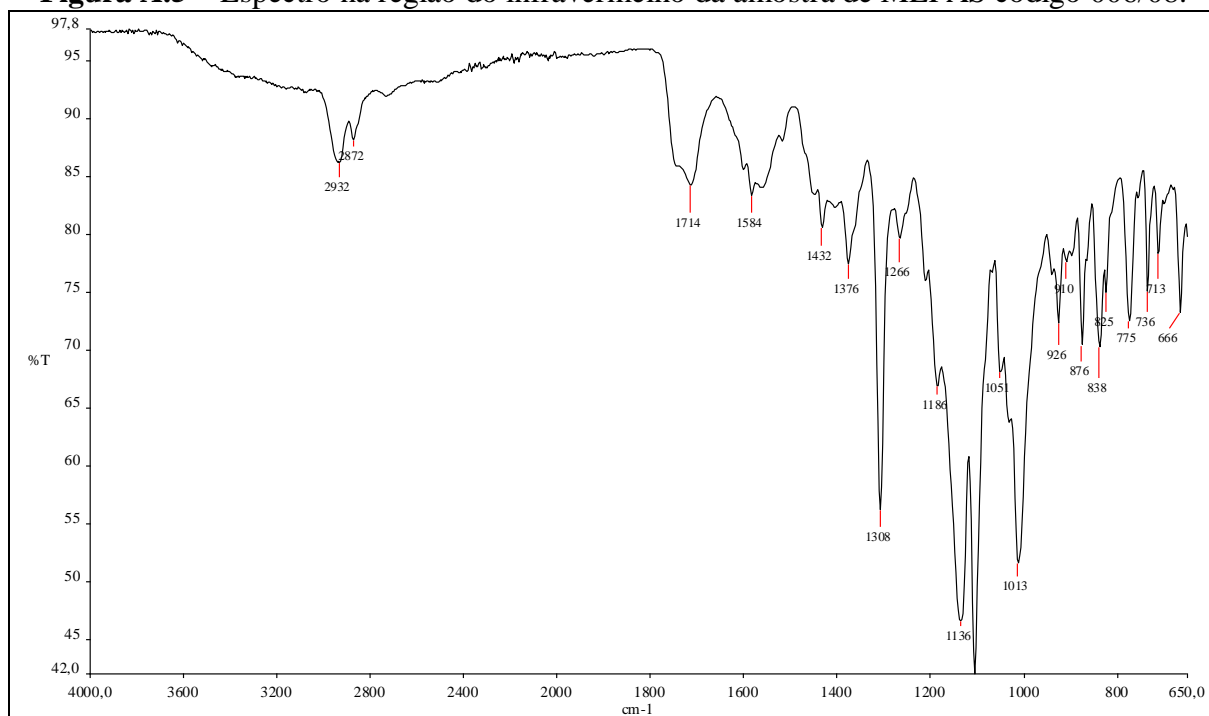
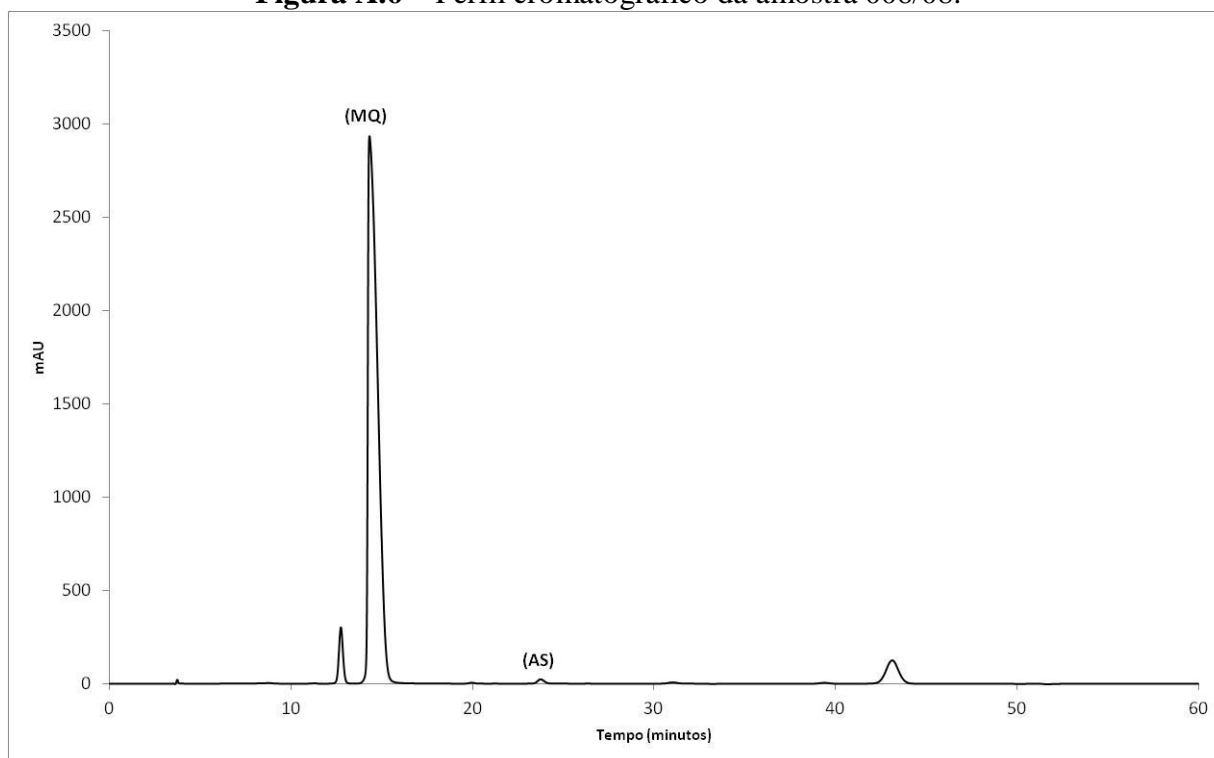
Amostra 005/08

Faixa de fusão: 41,9 - 77,3 °C

Figura A.3 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 005/08.**Figura A.4** – Perfil cromatográfico da amostra 005/08.

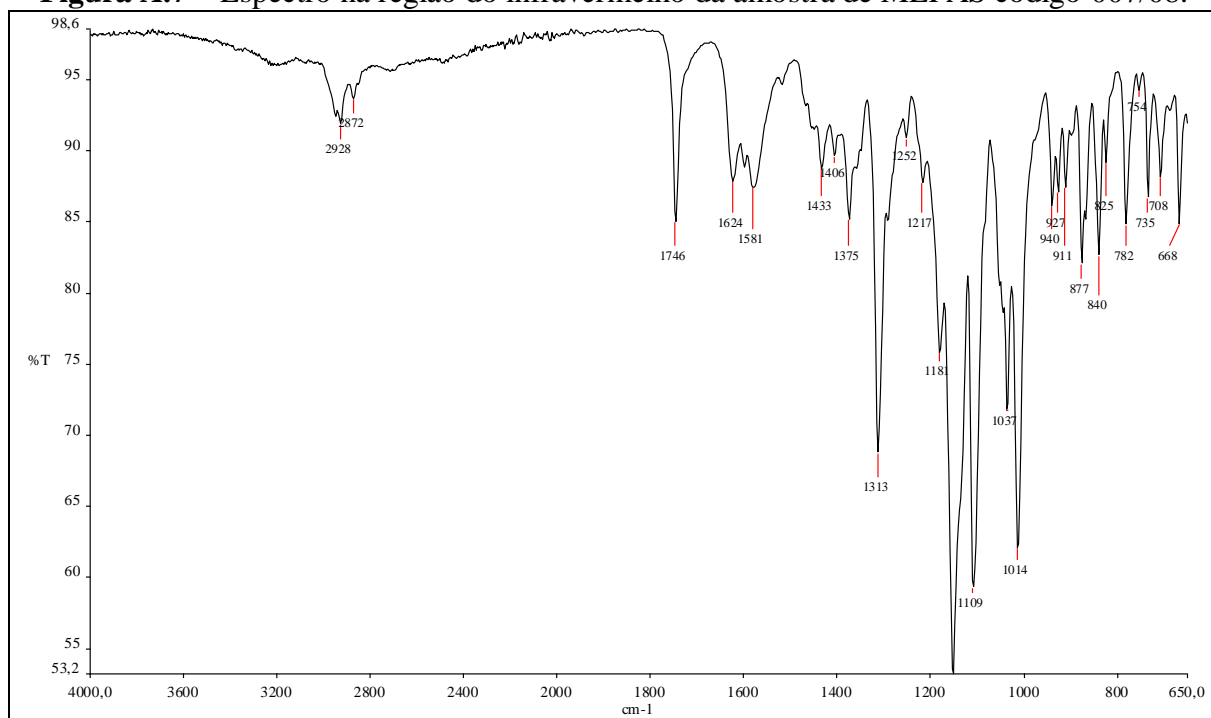
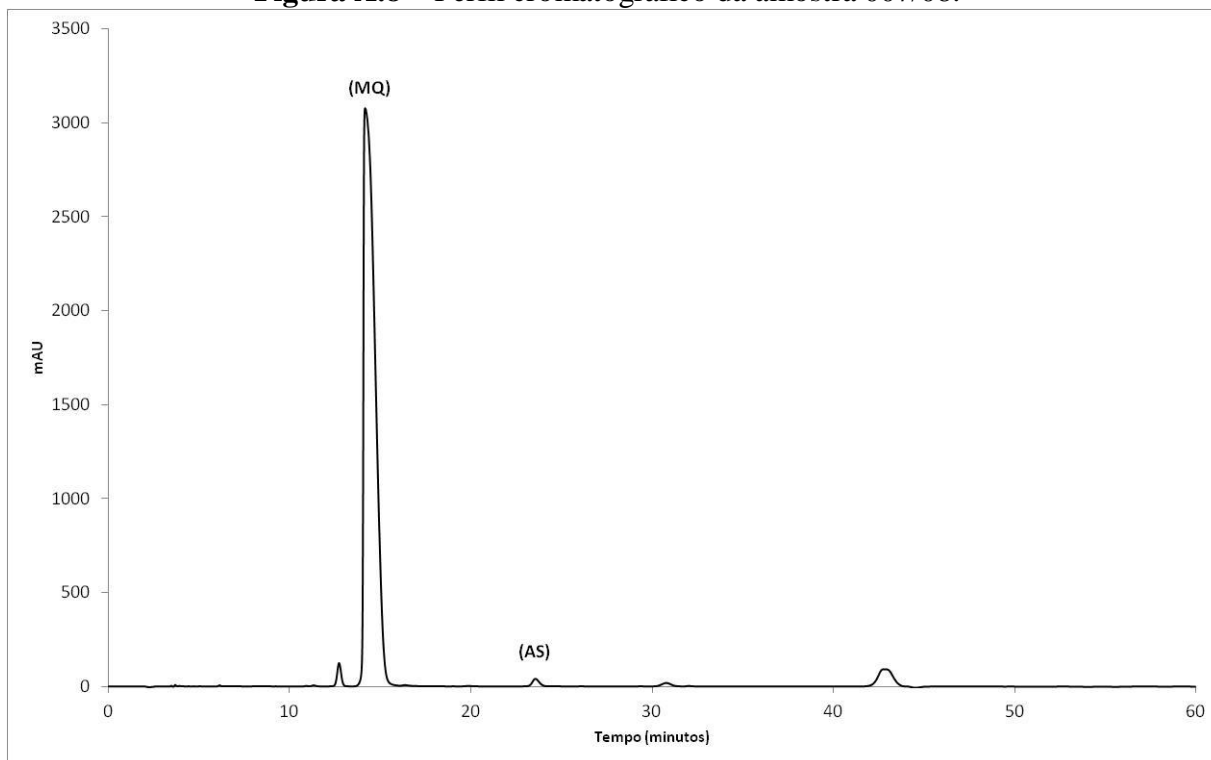
Amostra 006/08

Faixa de fusão: 92,8 - 103,9 °C

Figura A.5 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 006/08.**Figura A.6** – Perfil cromatográfico da amostra 006/08.

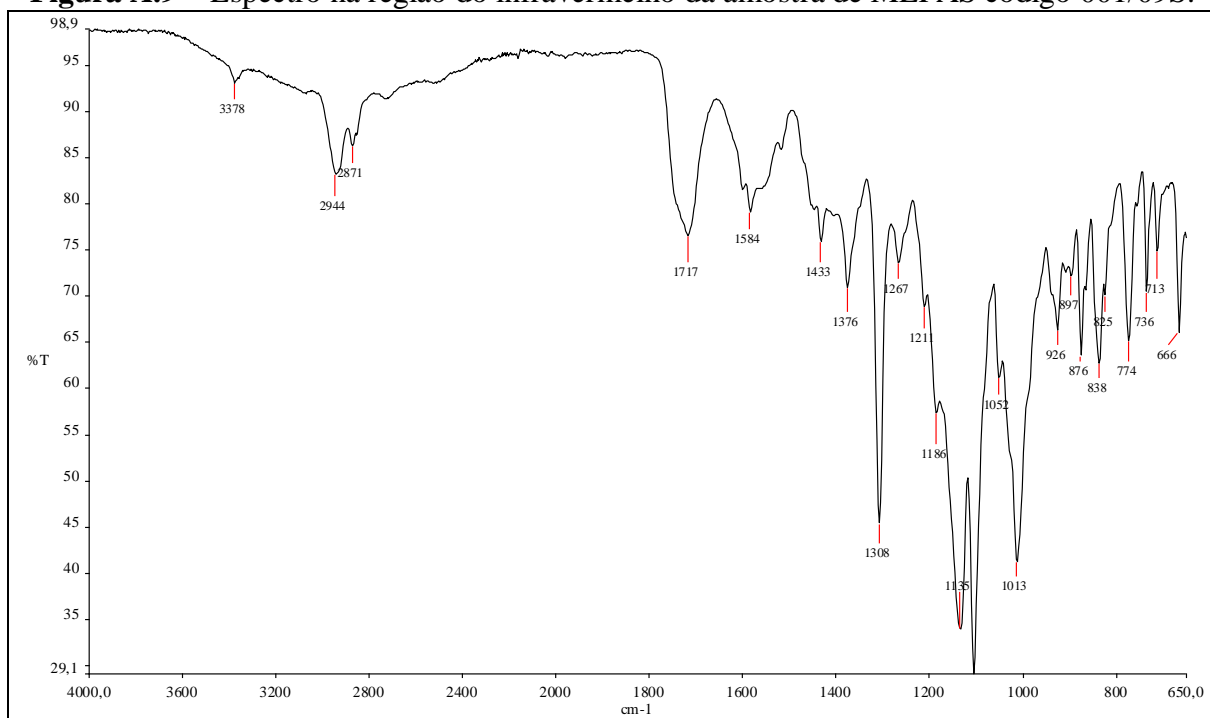
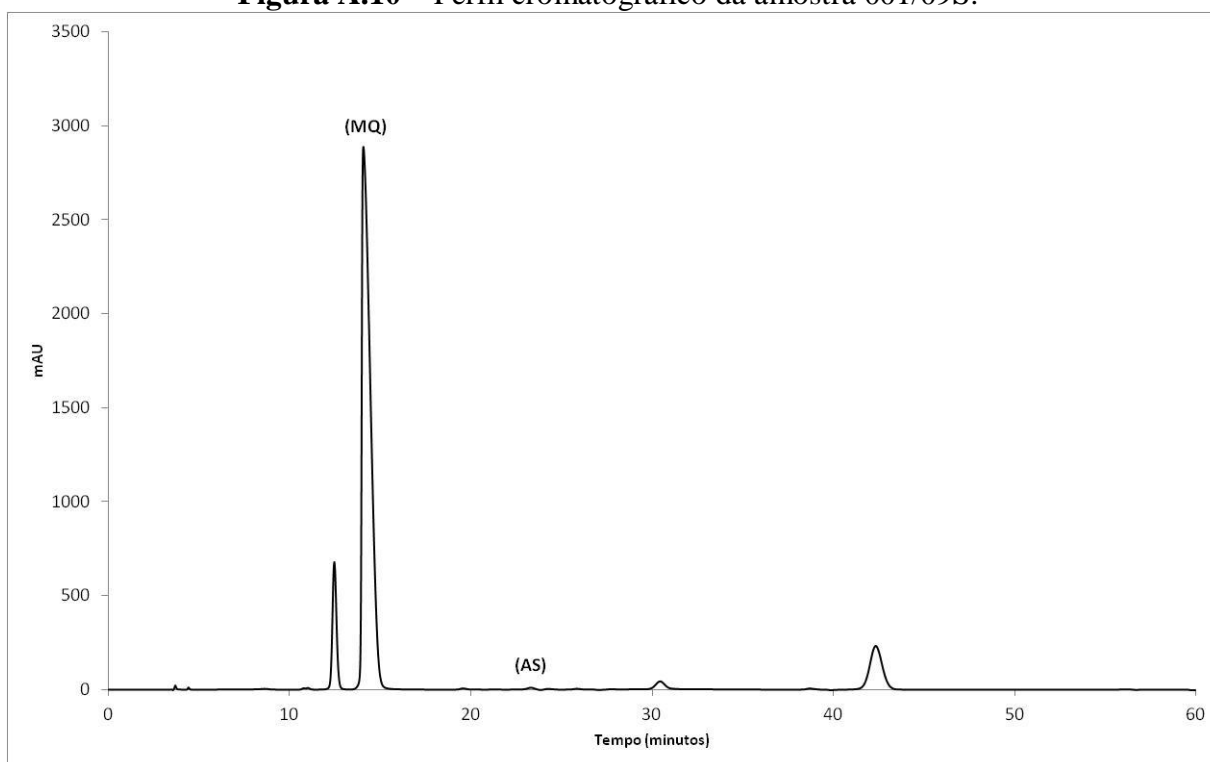
Amostra 007/08

Faixa de fusão: 130,0 - 132,6 °C

Figura A.7 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 007/08.**Figura A.8** – Perfil cromatográfico da amostra 007/08.

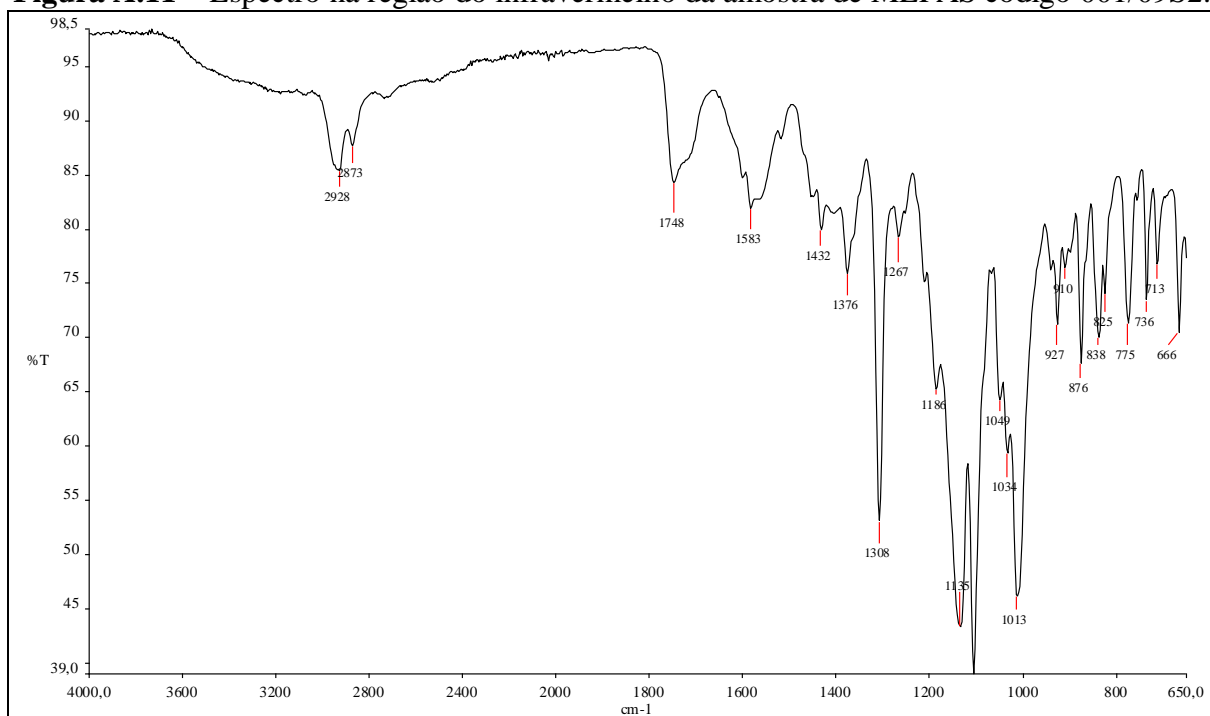
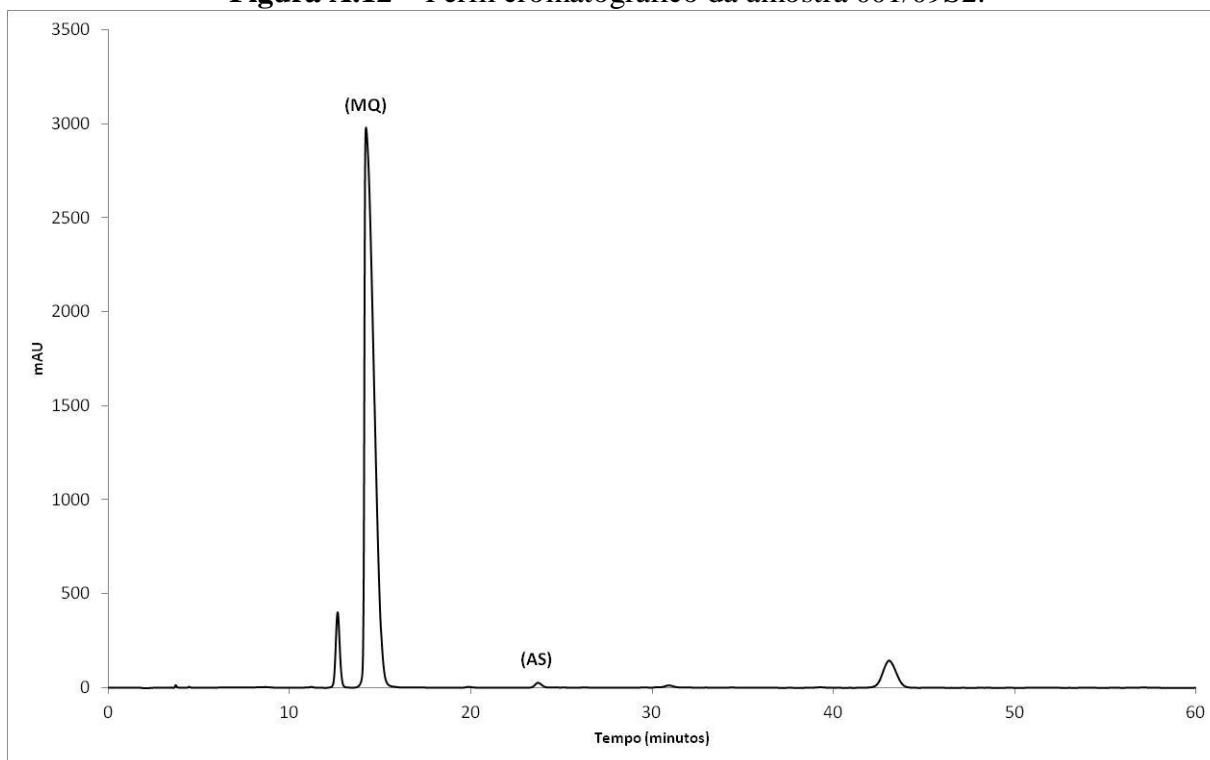
Amostra 001/09S

Faixa de fusão: 42,5 - 64,0 °C

Figura A.9 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 001/09S.**Figura A.10** – Perfil cromatográfico da amostra 001/09S.

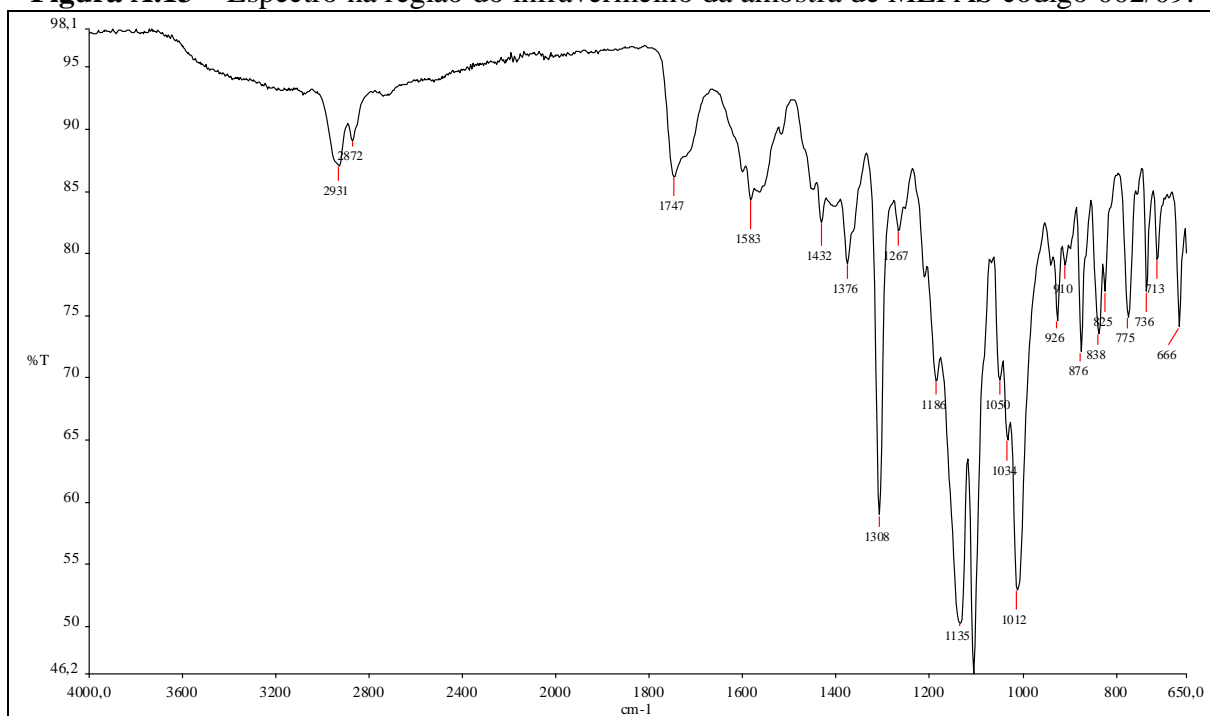
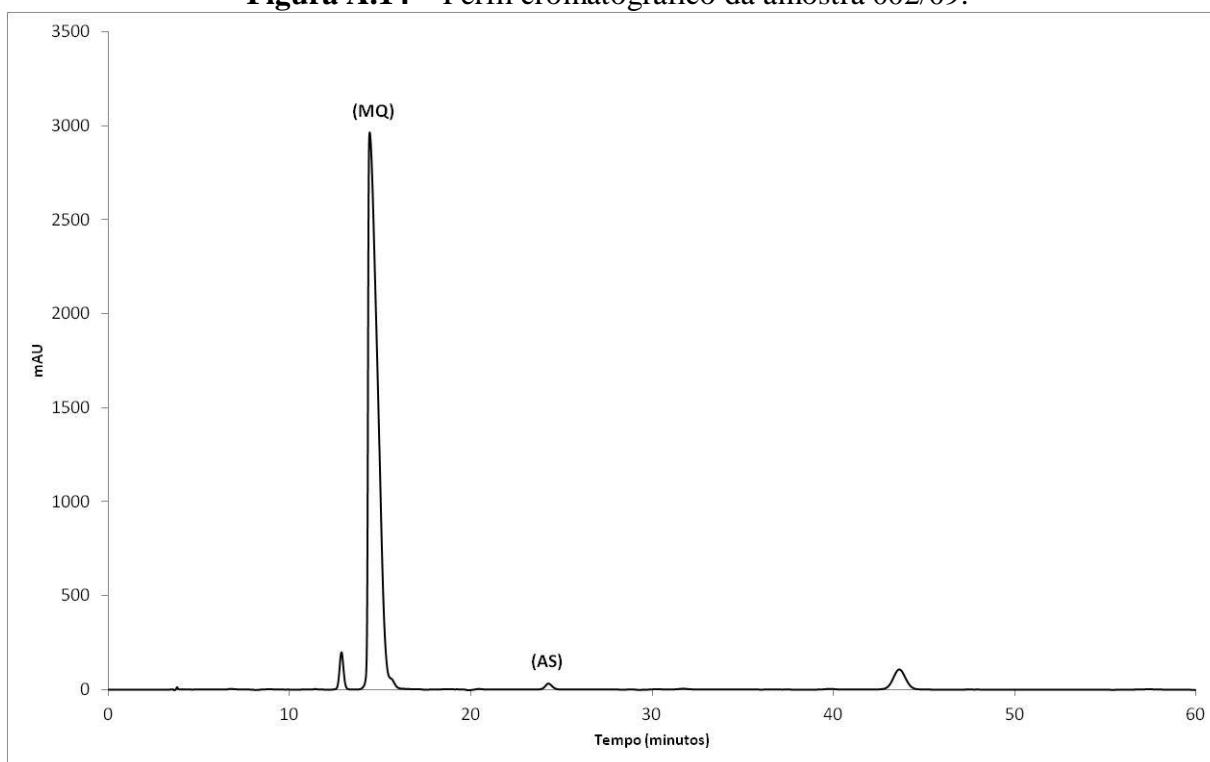
Amostra 001/09S2

Faixa de fusão: 99,2 - 107,6 °C

Figura A.11 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 001/09S2.**Figura A.12** – Perfil cromatográfico da amostra 001/09S2.

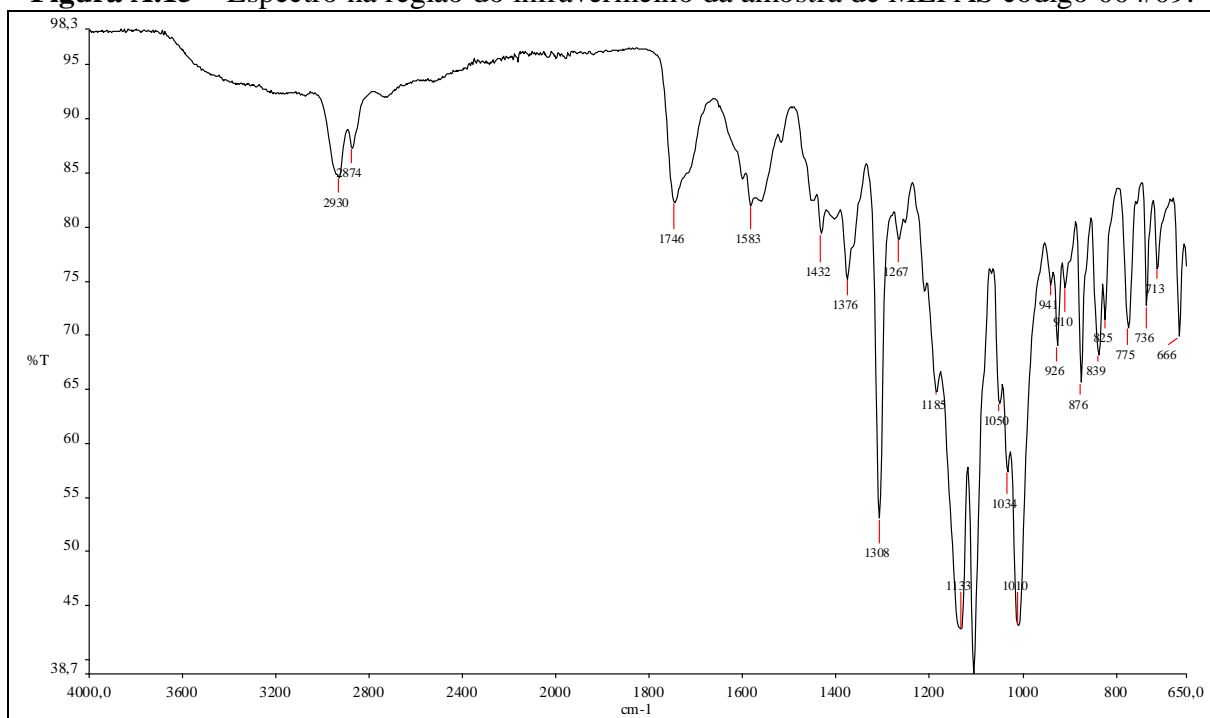
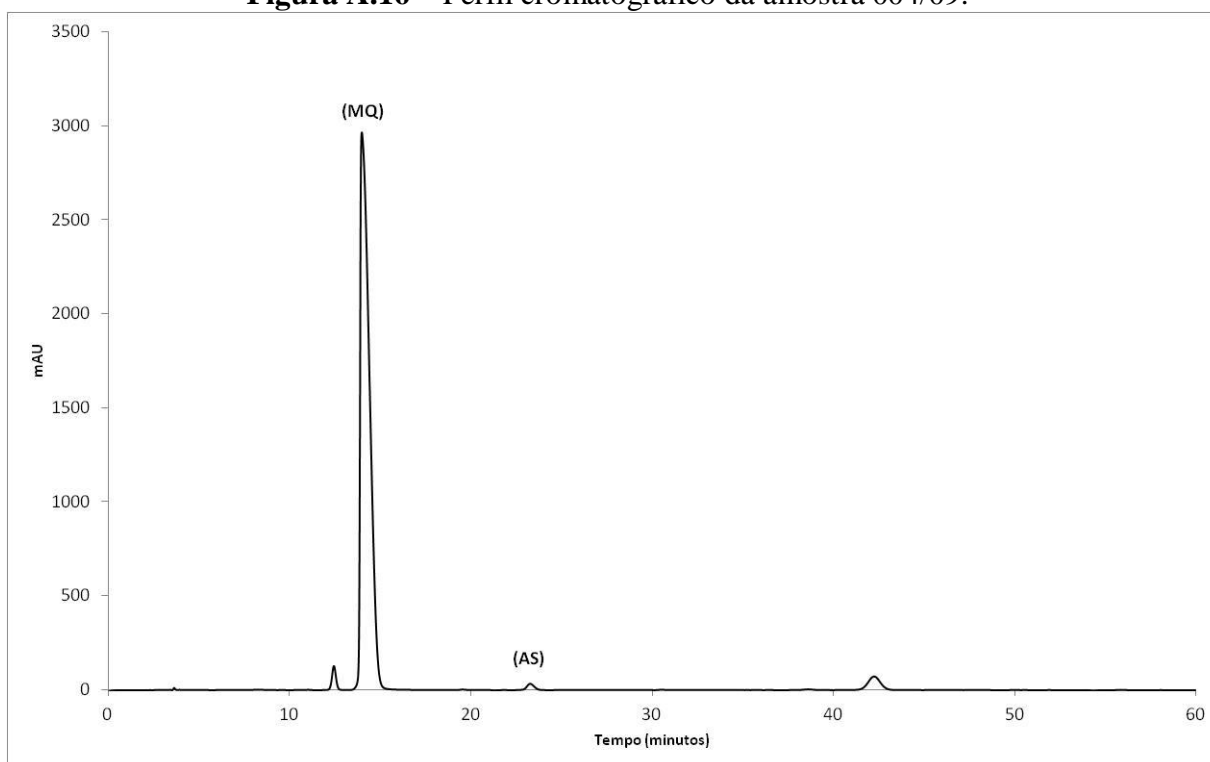
Amostra 002/09

Faixa de fusão: 99,5 - 105,5 °C

Figura A.13 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 002/09.**Figura A.14** – Perfil cromatográfico da amostra 002/09.

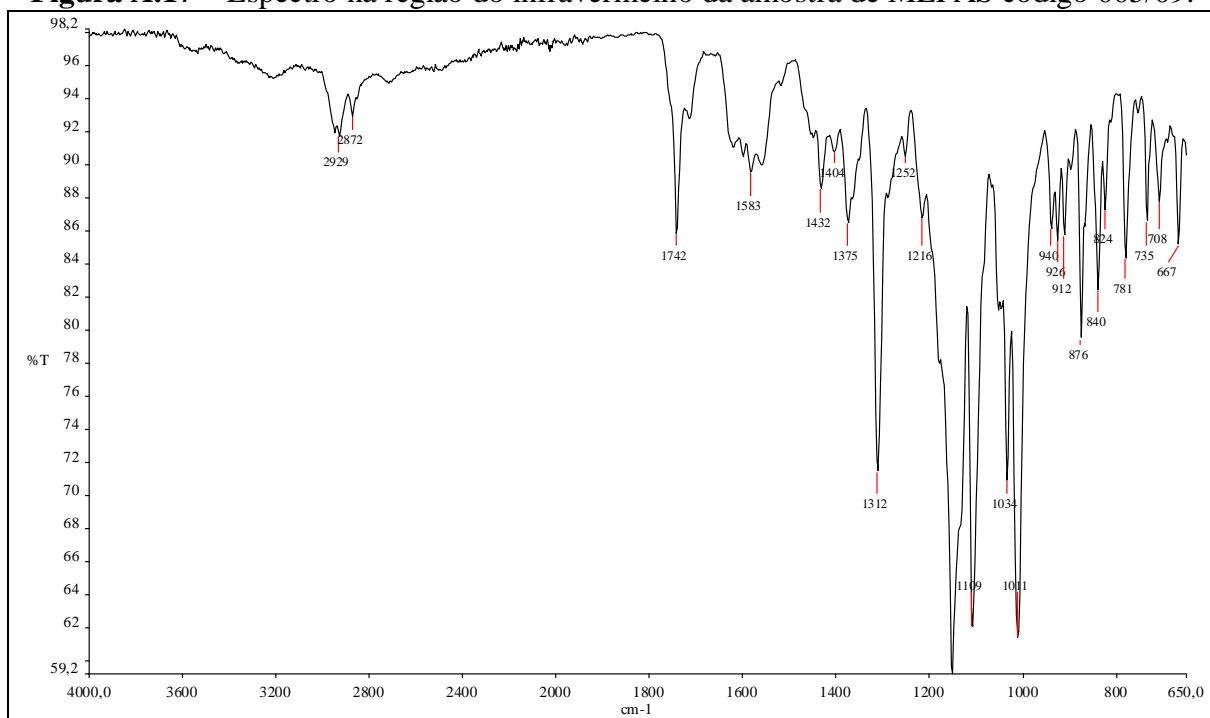
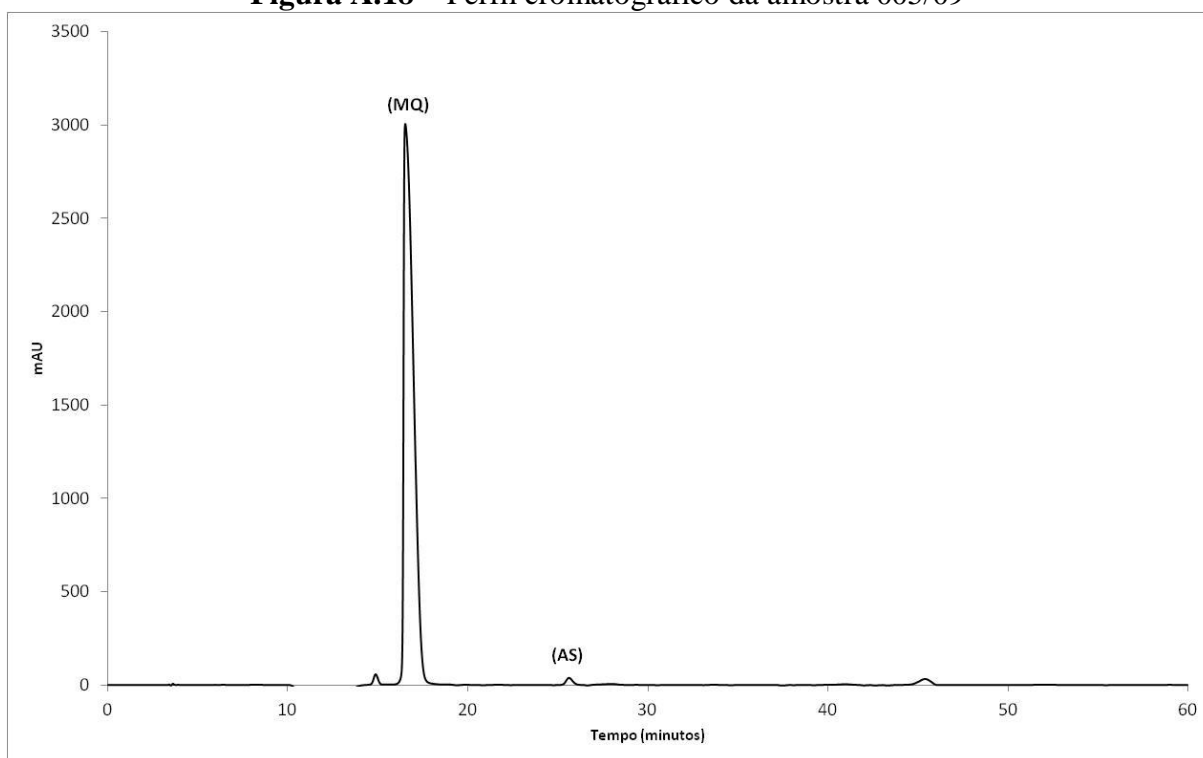
Amostra 004/09

Faixa de fusão: 92,0 - 99,9 °C

Figura A.15 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 004/09.**Figura A.16** – Perfil cromatográfico da amostra 004/09.

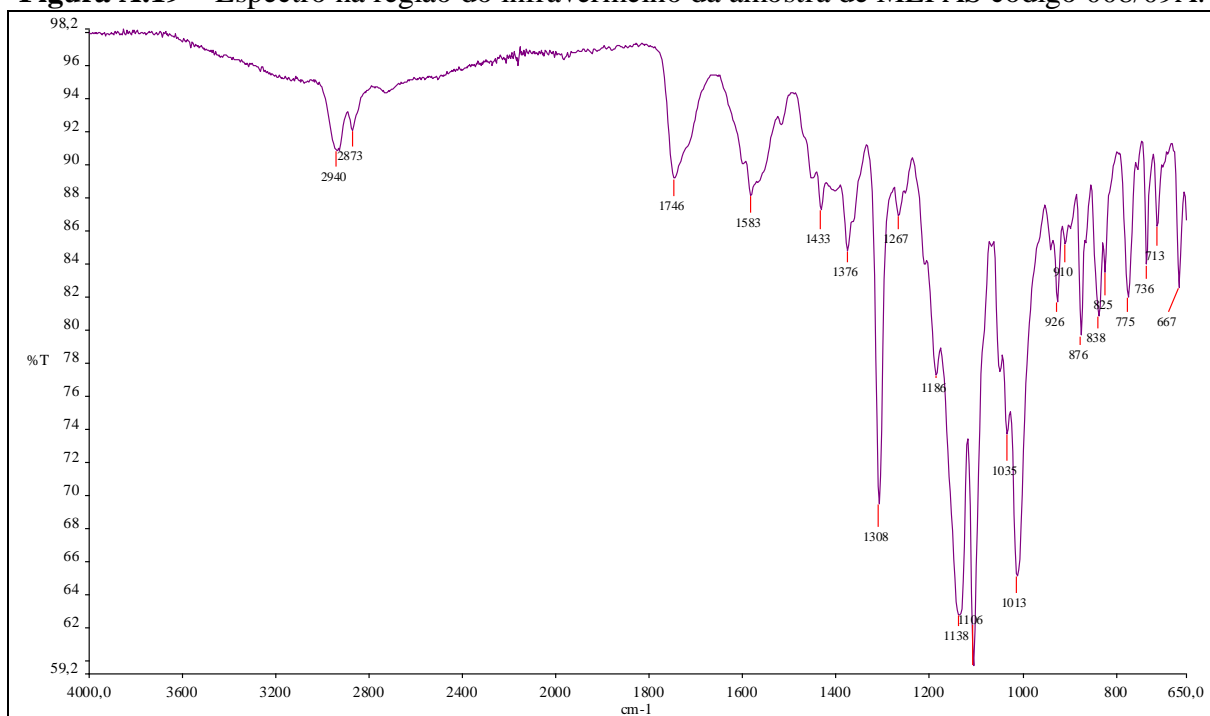
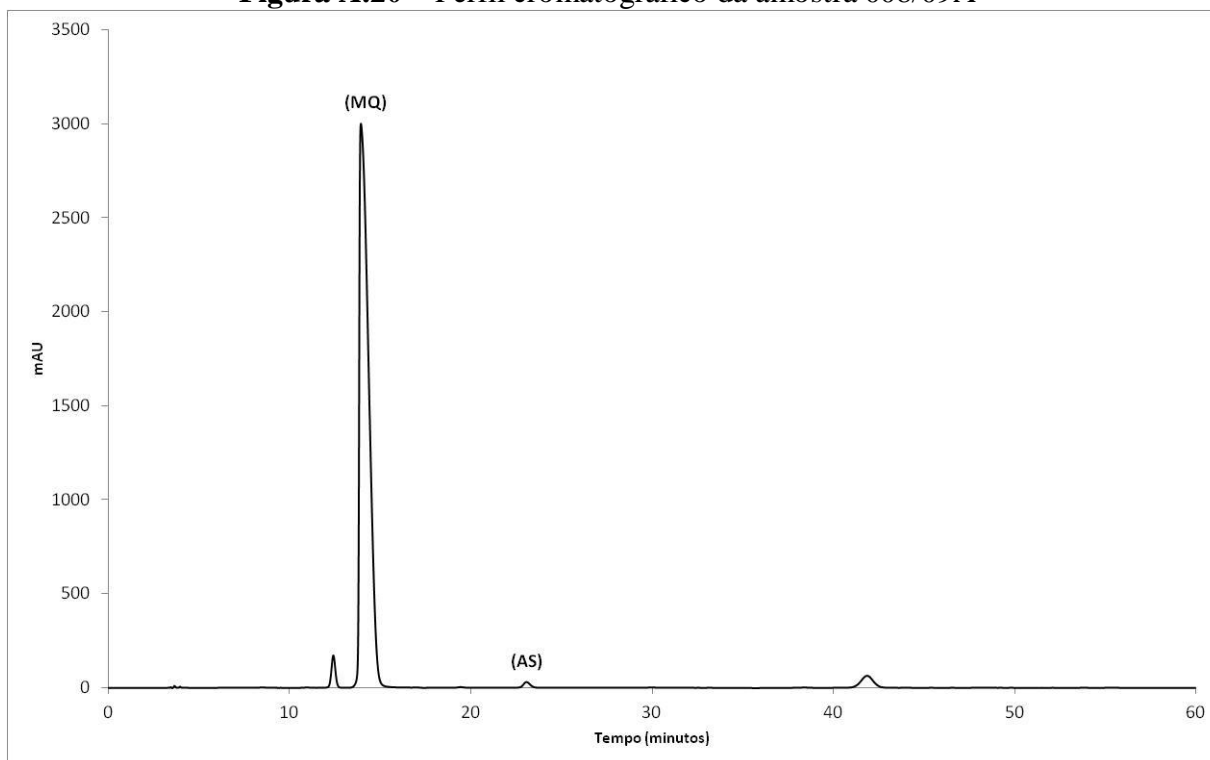
Amostra 005/09

Faixa de fusão: 129,4 - 132,0 °C

Figura A.17 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 005/09.**Figura A.18** – Perfil cromatográfico da amostra 005/09

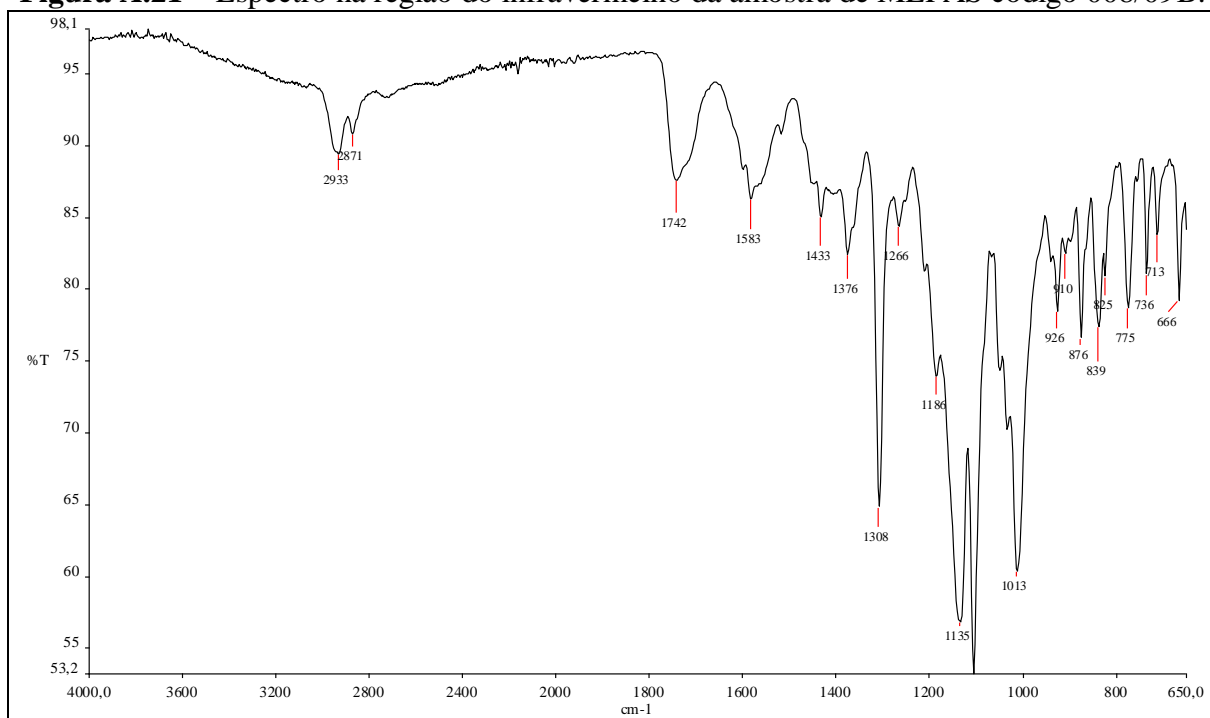
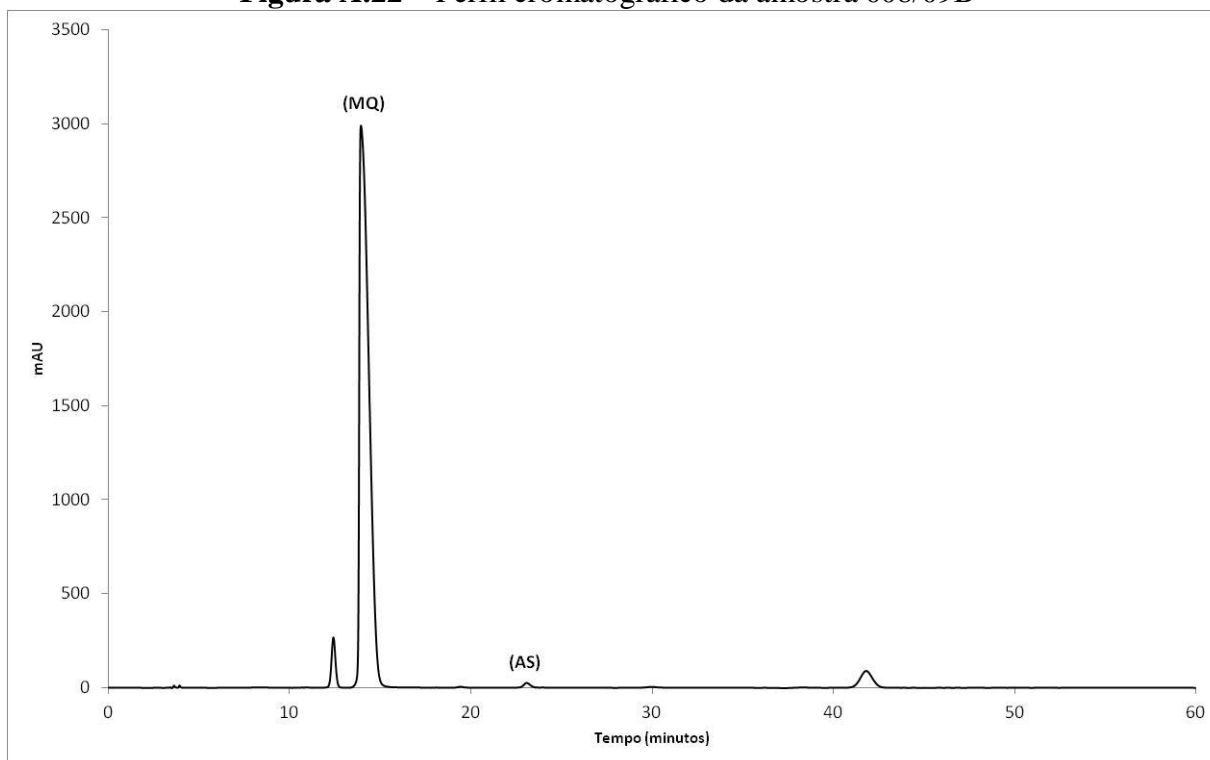
Amostra 008/09A

Faixa de fusão: 97,5 - 106,8 °C

Figura A.19 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 008/09A.**Figura A.20** – Perfil cromatográfico da amostra 008/09A

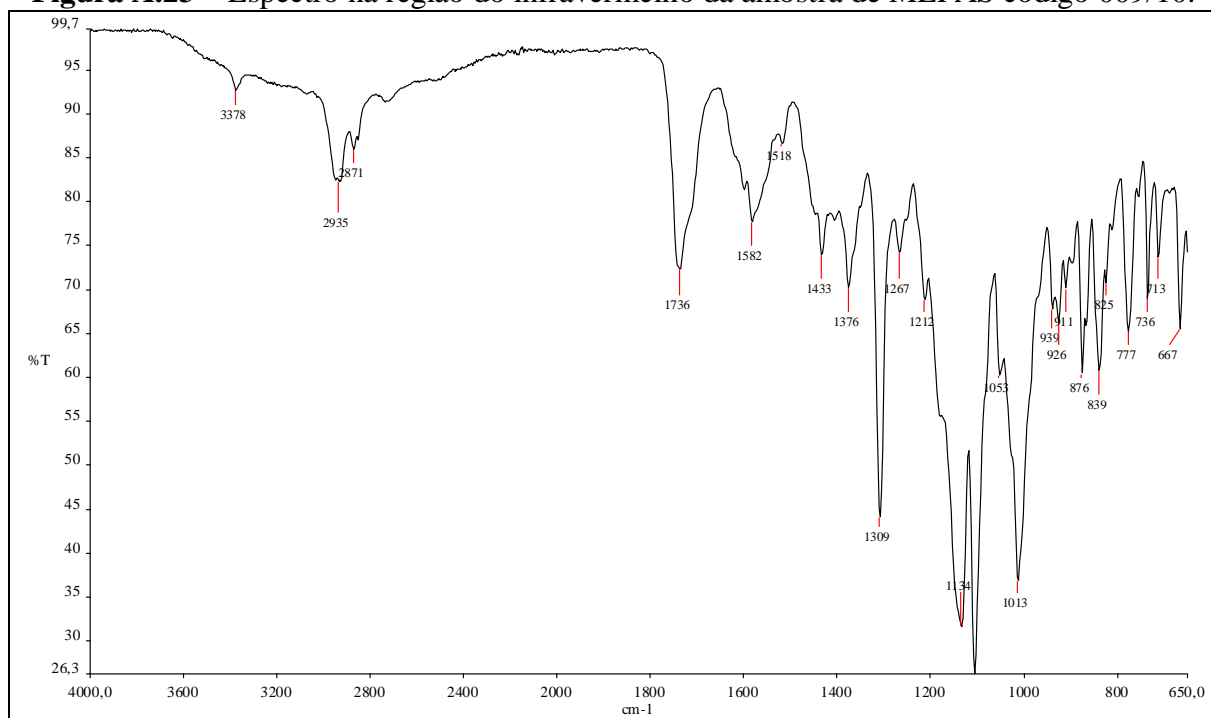
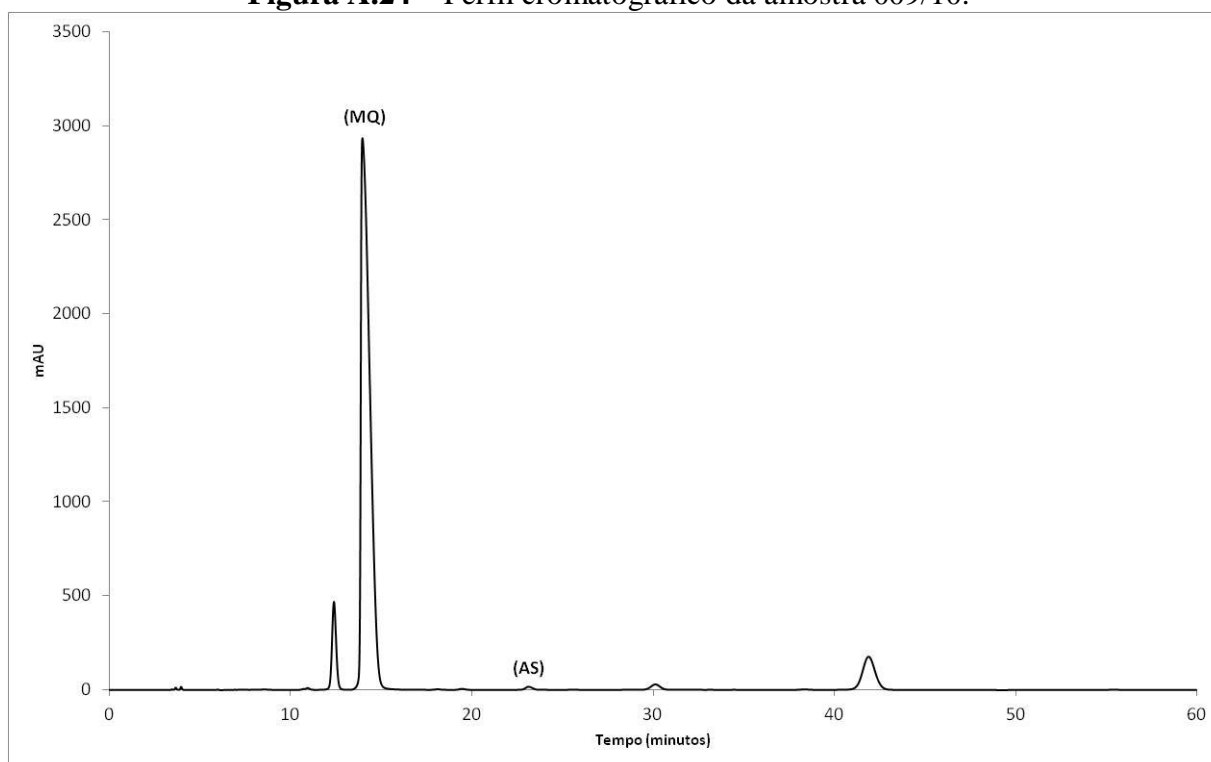
Amostra 008/09B

Faixa de fusão: 93,2 - 98,2 °C

Figura A.21 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 008/09B.**Figura A.22** – Perfil cromatográfico da amostra 008/09B

Amostra 009/10

Faixa de fusão: 90,0 - 151,9 °C

Figura A.23 – Espectro na região do infravermelho da amostra de MEFAS código 009/10.**Figura A.24** – Perfil cromatográfico da amostra 009/10.

APÊNDICE B - Participação e premiação no 23rd *International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis - PBA 2011.*

23rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis

105

Simultaneous determination of artesunate and mefloquine in fixed dose combination tablets by HPLC with dual-wavelength UV detection

Fernando H. A. Nogueira, Naialy F. A. Reis, Paula R. Chellini, Isabela C. César, Renata B. Oliveira, Gerson A. Pianetti

Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

Keywords: Artesunate; Mefloquine; Antimalarials; HPLC-UV; Fixed dose combination tablets

INTRODUCTION

Malaria drug combination therapy is a rational approach to the containment of drug resistance in malaria [1]. An artesunate-mefloquine fixed dose combination tablet (ASMQ) was introduced in Brazil in 2006 for the treatment of *Plasmodium falciparum* infections [2]. A simple HPLC method for the simultaneous determination of artesunate (AS) and mefloquine hydrochloride (MQ) in fixed dose combination tablets (ASMQ) was developed and validated.

MATERIALS AND METHODS

The separation was carried out on a XBridge RP 18 (250 x 4.6 mm id, 5 µm particle size, Waters) analytical column. The mobile phase was 0.05 M monobasic potassium phosphate buffer (pH 3.0)-acetonitrile (50:50, v/v). The flow rate was 1.0 ml/min. AS detection was performed at 210 nm and MQ was detected at 283 nm, using DAD. Standard solutions at 0.5 mg/ml (AS) and 1.1 mg/ml (MQ) were prepared in mobile phase. Sample solutions were prepared at the same concentration. The method was validated according to ICH guidelines [3] and scientific literature [4].

RESULTS AND DISCUSSION

The method showed selectivity against tablet excipients. Regression coefficients (r^2) for AS and MQ were higher than 0.99, attesting the linearity of the method. The method showed adequate intra-day (RSD = 1.38% for AS and 1.41% for MQ) and inter day (RSD = 1.19% for AS and 1.38% for MQ). Accuracy was evaluated in a standard addition experiment. Recoveries obtained for both AS and MQ were around 100.0% in three levels (75%, 100% and 125%). The method showed robustness with deliberate variations of acetonitrile proportion, buffer pH, oven temperature, flow rate, column supplier, solvent supplier and chromatographic system. These parameters were evaluated with a factorial design [4].

CONCLUSIONS

A simple and isocratic HPLC method for the simultaneous assay of AS and MQ in fixed dose combination tablets was developed. The method proved to be specific, linear, precise, accurate and robust.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by the Brazilian Pharmacopeia. The authors would like to thank Dr. Núbia Boechat, at Farmanguinhos/FIOCRUZ for sample donations.

REFERENCES

- [1] N.J. White, P.L. Olliaro, Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: Rationale for combination therapy in malaria, *Parasitol Today* 12 (1996) 399-401.
- [2] Brazilian Ministry of Health, Guide for health professionals about malaria prevention in travelers, first ed, Brazilian Ministry of Health, Brasília, 2009.
- [3] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva, 2005
- [4] W.J. Youden, E.H. Steiner, Statistical manual of AOAC, AOAC, Washington, 1975.

nsis

o;

nazonensis
toxicity of
macrophage
toxicity of
sterization
formed by
ng marker
chloroform
en 7.5 and
istic bands
vismione,
e GC-MS
showed as
and trans-

fractions
es against
ese results
his species
rthermore,
nce of the
y GC and
ng of active
er studies
use of this

T projects)
he CNPq

Nat. Prod.

2007) 461-

POSTERS
ABSTRACTS

187



*23rd International Symposium on
Pharmaceutical & Biomedical Analysis*

Is pleased to present the certificate award to the poster

*Simultaneous determination of artesunate and mefloquine in fixed dose
combination tablets by HPLC with dualwavelength UV detection*

authored by

*Fernando H. A. Nogueira, Nayaly F. A. Reis, Paula R. Chellini, Isabela C.
César, Renata B. Oliveira, Gerson A. Pianetti*

*at the 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical
Analysis.*

João Pessoa, 12 October 2011.

Quezia B. Cass

PBA 2011 Organizing Committee

APÊNDICE C - Artigo submetido à Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Development and validation of an HPLC method for the simultaneous determination of artesunate and mefloquine hydrochloride in fixed-dose combination tablets

Fernando Henrique Andrade Nogueira^{*}, Naialy Fernandes Araújo Reis, Paula Rocha Chellini, Isabela da Costa César, Gerson Antônio Pianetti

Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

***Correspondence:**

F. H. A. Nogueira

Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos

Departamento de Produtos Farmacêuticos

Faculdade de Farmácia - UFMG

Av. Pres. Antônio Carlos 6627, Sala 4029 Bloco 2

31270-901 - Belo Horizonte - MG, Brasil

Phone: +55 31 34096982

Fax: +55 31 34096976

E-mail: fhanogueira@gmail.com

The present study developed and validated an HPLC method for the simultaneous determination of artesunate (AS) and mefloquine hydrochloride (MQ) in fixed-dose combination tablets, according to ICH guidelines. The chromatographic separation was carried out on an XBridge C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size, Waters) analytical column. The mobile phase included a 0.05 M monobasic potassium phosphate buffer (pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid) and acetonitrile (50 + 50, v/v). The flow rate was 1.0 mL/min, and the run time was 13 minutes. A dual-wavelength approach was employed: AS detection was performed at 210 nm and MQ was detected at 283 nm, using a diode array detector. Stability of sample solutions was evaluated for 8 hours after preparation, during which time the solutions remained stable. Youden's test was employed to evaluate robustness.

The method proved to be linear ($r^2 > 0.99$), precise (RSD $< 2.0\%$), accurate, selective, and robust, proving to be appropriate for routine drug quality control analysis.

Uniterms: Artesunate. Mefloquine hydrochloride. Liquid chromatography. Validation. Fixed-dose combination tablets.

Um método por CLAE para a determinação simultânea de artesunato (AS) e cloridrato de mefloquina (MQ) em comprimidos em dose fixa combinada foi desenvolvido e validado, de acordo com as normas do ICH. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna analítica XBridge C18 (250 x 4,6 mm d.i., partículas de 5 μm , Waters). A fase móvel foi constituída de tampão fosfato monobásico de potássio 0,05 M (pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico) e acetonitrila (50 + 50, v/v). O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min. e o tempo de corrida foi de 13 minutos. Foram utilizados dois comprimentos de onda: a detecção do AS foi realizada em 210 nm e a de MQ foi realizada em 283 nm, utilizando-se um detector de arranjo de diodos. A estabilidade das soluções padrão e amostra foi avaliada por 8 horas após sua preparação e as soluções permaneceram estáveis nesse período. O teste de Youden foi empregado para a avaliação da robustez do método. O método se mostrou linear ($r^2 > 0,99$), preciso (DPR $< 2,0\%$), exato, seletivo e robusto, sendo adequado para análises rotineiras de controle de qualidade dos medicamentos.

Unitermos: Artesunato. Cloridrato de mefloquina. Cromatografia líquida. Validação. Comprimidos em dose fixa combinada.

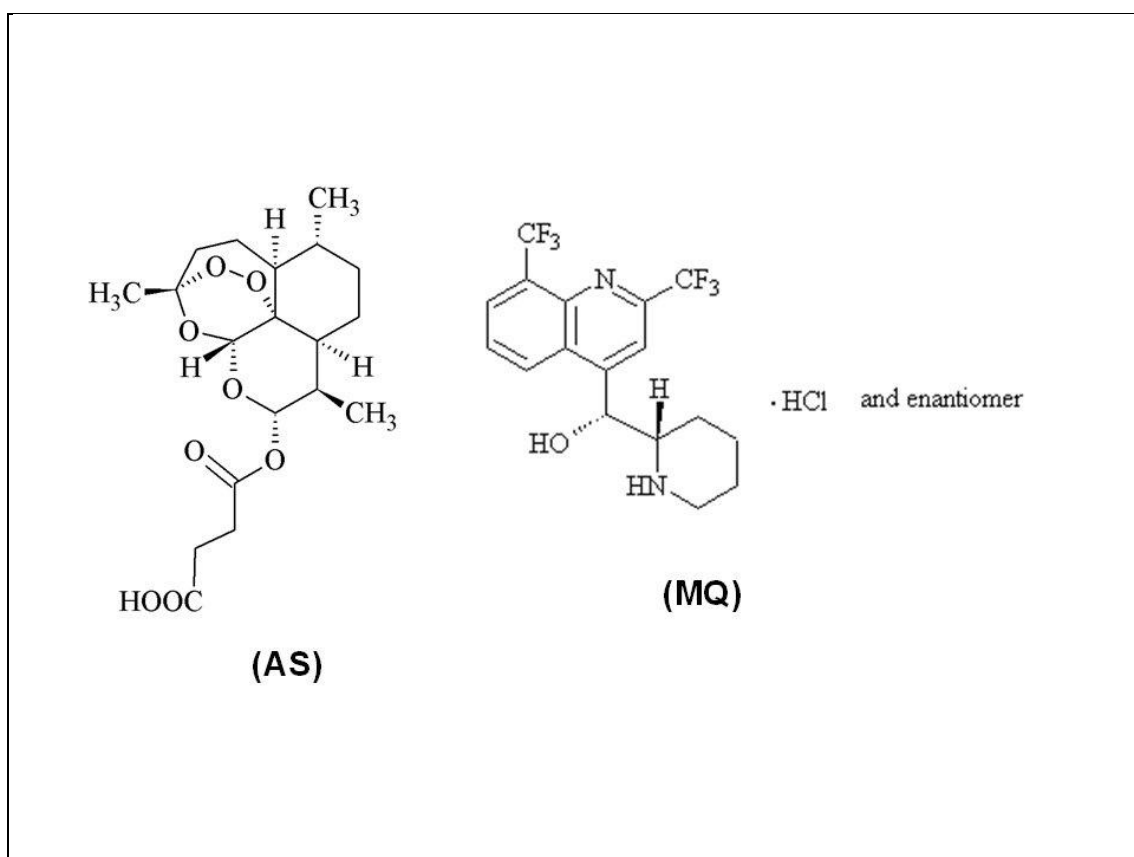
INTRODUCTION

New antimalarial regimens have been deemed necessary ever since the worldwide emergence of *Plasmodium falciparum*'s resistance to drugs used in monotherapy (Kremsner, Krishna, 2004). The main strategy to reduce and/or prevent antimalarial drug resistance is the use of drug combinations (White, 1998). The rationale is twofold: clinical efficacy is increased, and the evolution of resistance is slowed (Hastings, 2011). Artemisinin-based combination therapies (ACTs), such as artemether-lumefantrine, artesunate-amodiaquine, artesunate-sulfadoxine-pyrimethamine, and artesunate-mefloquine are recommended by the World Health Organization (WHO) for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria (World, 2011a). ACT is based on the use of two drugs with different modes of action: an

artemisinin-derivative that rapidly clears asexual blood stage parasites and gametocytes, as well as a partner drug that has a longer half-life, thus eliminating residual parasites (Varotti *et al.*, 2008).

Artesunate (AS) - Mefloquine hydrochloride (MQ) - ASMQ – fixed-dose combination tablets are Brazil's ACT choice for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Two tablet strengths are currently available: 25 mg of AS and 55 mg of MQ (corresponding to 50 mg of mefloquine base) for children and 100 mg of AS and 220 mg of MQ (corresponding to 200 mg of mefloquine base) for adults. The use of AS and MQ in a fixed-dose tablet formulation considerably reduces the possible appearance of a resistant parasite, given that the parasites are never exposed to the artemisinin derivative alone and that mefloquine contains a small residual biomass to eradicate at a time of maximum blood concentration (White, Olliaro, 1996). Chemical structures of AS and MQ are shown on Figure 1.

FIGURE 1 - Chemical structures of artesunate (AS) and mefloquine hydrochloride (MQ).



To date, neither pharmacopeial monographs nor methods have been reported in scientific literature to determine AS and MQ in fixed-dose combination tablets. Analytical methods to determine AS and MQ in fixed-dose combination tablets are needed to evaluate their quality in endemic areas, as well as to detect counterfeit drug products (Martino, 2010).

One method in which to determine AS in tablets is described in the International Pharmacopoeia (World, 2011b), whereas a method to determine MQ in tablets is described in the Brazilian Pharmacopoeia (Agência, 2010). Methods for the single determination of AS or MQ in tablets were also found in prior scientific literature (Nogueira *et al.*, 2011; Gaudiano *et al.*, 2006; Ranher *et al.*, 2010). In addition, the simultaneous assay of AS and MQ in plasma (Hodel *et al.*, 2009) and a method presenting a single extraction procedure and two HPLC systems to determine AS and MQ in human plasma have been published in the literature (Lai *et al.*, 2007).

Hence, the present study aimed to develop and validate an HPLC method, using dual-wavelength UV detection, to simultaneously quantify AS and MQ in fixed-dose combination tablets. As AS and MQ present different maximum wavelengths in their UV spectra, detection was performed at 210 nm (for AS quantification) and 283 nm (for MQ quantification). The dual wavelength approach eliminated the standard addition procedure performed in a previous study of artemether and lumefantrine in a fixed-dose combination tablet (César *et al.*, 2008). Stability of standard and sample solutions was also investigated due the instability of AS in aqueous solutions (Gaudin *et al.*, 2007). The validated method was applied to the analysis of tablets containing the AS and MQ associations (25 + 55 mg).

EXPERIMENTAL

Material and reagents

AS and MQ reference standards were purchased from U.S. Pharmacopeial Convention (Rockville, MD, USA). ASMQ tablets containing 25 mg of AS and 55 mg of MQ were produced by Farmanguinhos/FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brazil). Concerning croscarmellose sodium, microcrystalline cellulose, magnesium stearate, opadry white and blue lake FDC 2, all excipients of the formulation, were donated by Farmanguinhos/FIOCRUZ. Acetonitrile was obtained from Tedia (Fairfield, OH, USA) and from Honeywell (Seelze, Germany), the latter used only in the robustness study. Ultrapure water was obtained from a Millipore Direct-Q system (Billerica, MA, USA). Monobasic potassium phosphate and phosphoric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Instrumental and Analytical Conditions

The HPLC analyses were carried out using an Agilent 1100 system (Santa Clara, CA, USA), composed of quaternary pump, autosampler, diode array detector (DAD), and HP ChemStation Software. Chromatographic separation was carried out on an XBridge C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size) analytical column from Waters (Milford, MA, USA), maintained at 30°C. UV detection was performed at 210 nm for AS quantification and at 283 nm for MQ quantification. UV spectra from 200 to 400 nm were online recorded for peak identification. The injection volume for all solutions was 20 μ l. The optimized mobile phase was a mixture of 0.05 M monobasic potassium phosphate (pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid) and acetonitrile (50 + 50, v/v). To determine k , t_0 was estimated by injecting a 0.01% (w/v) NaNO₃ solution onto the chromatograph.

An Agilent 1200 system and an ACE column (250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size) from Advanced Chromatography Technologies – ACT (Aberdeen, Scotland, UK) were also employed in the robustness study.

Preparation of standard solutions

Approximately 12.5 mg of AS and 27.5 mg of MQ reference standards were accurately weighed and transferred to a 25 mL volumetric flask, followed by the addition of 20 mL of mobile phase. The flask was sonicated for 10 minutes and then filled to the mark with mobile phase to obtain a solution at 0.5 mg/mL of AS and 1.1 mg/mL of MQ.

Analysis of fixed-dose combination tablets

Twenty tablets, containing 25 mg of AS and 55 mg of MQ each, were crushed, and an accurately weighed portion of the powder, equivalent to about 25 mg of AS, was transferred to a 50 mL volumetric flask followed by the addition of 40 mL of mobile phase. The flask was sonicated for 10 minutes and filled to the mark with mobile phase, with theoretical sample concentrations of AS and MQ registered at 0.5 mg/mL and 1.1 mg/mL, respectively. The amounts of AS and MQ in the samples were calculated using a one-point calibration. Standard solutions were injected five times and sample solutions once. AS and MQ peak areas were measured, and their concentration was calculated using the average standard response factor (peak area divided by standard concentration).

Validation of the method

Selectivity

Spectral purities of AS and MQ chromatographic peaks were evaluated using the UV spectra recorded by a diode array detector. A solution containing a mixture of tablet excipients was also prepared according to the sample preparation procedure and injected onto the chromatograph to evaluate possible interfering peaks.

Linearity

Standard solutions containing 2.5 mg/mL of AS and 5.5 mg/mL of MQ were prepared in triplicate. Aliquots of these solutions were diluted in the mobile phase to five different concentrations: 0.250, 0.375, 0.500, 0.625, and 0.750 mg/mL of AS and 0.550, 0.825, 1.100, 1.375, and 1.650 mg/mL of MQ. Calibration curves of concentration versus area were plotted, and the obtained data were subjected to regression analysis using the least-squares method.

Precision

The intra-day precision was evaluated by analyzing six samples ($n = 6$) at 100% of the test concentration (0.5 mg/mL of AS and 1.1 mg/mL of MQ). Samples were prepared as set forth in *Analysis of fixed-dose combination tablets*. Similarly, the inter-day precision was evaluated on two consecutive days ($n = 12$). The AS and MQ contents (% of labeled amount) were determined, and the RSD was calculated. A Student's t test was employed to compare the average content of AS and MQ obtained in the two consecutive days.

Accuracy

Accuracy was investigated by means of a standard addition experiment. Amounts of AS (11.25, 17.50, and 23.75 mg) and MQ (24.75, 38.50, and 68.75 mg) were added to tablet powder, corresponding to 7.5 mg of AS and 16.5 mg of MQ (0.3 average tablet weight). The mixture was transferred to a 50 mL volumetric flask, and the volume was completed with mobile phase. The accuracy was investigated at three concentration levels: 75, 100, and 125 percent of the theoretical concentrations of AS and MQ. At each level, the solutions were prepared in triplicate, and the recovery percentage was calculated.

Robustness

Method robustness was assessed by determining the AS and MQ contents in tablets through a series of eight experiments following a factorial design (Youden, Steiner, 1975).

The seven analytical parameters employed, as well as the introduced variations, are shown in Table I. A standard and a sample solution were prepared for each condition, and were injected three times onto the chromatograph. Peak area, retention time, tailing factor, theoretical plate number, and the contents of AS and MQ in the tablets were evaluated for each condition.

TABLE I - Analytical parameters and variations for the robustness evaluation of the chromatographic method for simultaneous AS and MQ quantification.

Parameter	Nominal condition	Variation
Acetonitrile concentration in the mobile phase	50%	47%
pH buffer	3.0	3.5
Column temperature	30 °C	35 °C
Mobile phase flow rate	1.0 mL/min	1.2 mL/min
Column supplier	Waters	ACE
Acetonitrile supplier	Tedia	Honeywell
Chromatograph model	Agilent 1100	Agilent 1200

Stability of solutions

A standard and a sample solution were prepared as described above, and were injected onto the chromatograph, at each hour, for 8 consecutive hours. The presence of additional peaks that could indicate AS or MQ degradation and/or the decrease of AS or MQ peak areas were evaluated.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the chromatographic conditions

Initial experiments were carried out with the chromatographic conditions to determine the mefloquine hydrochloride content in tablets (Nogueira *et al.*, 2011). The mobile phase was a mixture of 0.05 M phosphate buffer pH 3.5 and methanol (40 + 60, v/v). MQ and AS retention factors (k) were 3.04 and 6.18, respectively. The resolution between the two peaks was greater than 10.0, and the run time was 40 minutes. Methanol presents a UV cutoff at 205 nm, which could therefore not be employed in the mobile phase to determine the AS content,

given that AS only presents UV absorption in the initial wavelengths of the UV spectrum (200 – 220nm) due to the absence of chromophores in its structure. Thus, methanol was replaced by acetonitrile in the mobile phase. The acetonitrile proportion was adjusted to 50% to maintain the same solvent strength of the previous mobile phase (methanol + buffer). The acetonitrile proportion was calculated using a nomograph.

A simultaneous quantification of AS and MQ, using the wavelength of 210 nm, proved to be impossible due to the excessive broadening of the MQ peak at this wavelength. Thus, simultaneous quantification proved to be possible, using a wavelength of 210nm to quantify AS and a wavelength of 283nm to quantify MQ. The run time was 13 minutes, and the retention factors (k) for MQ and AS were approximately 0.66 and 3.26, respectively. The resolution between MQ and AS peaks was 6.9.

Method Validation

Selectivity

Peak purity of higher than 99.0% was obtained for AS in the chromatograms of sample solutions, demonstrating that other compounds did not co-elute. MQ peak purity could not be assessed due to the large analyte concentration used. The chromatograms obtained with the mixture of tablet excipients showed no interfering peaks in the same retention time of AS and MQ. The overlaid chromatograms of the sample solution and the mixture of excipients, at 283 nm and at 210 nm, are shown in Figure 2 and Figure 3, respectively.

FIGURE 2 - Overlay of the chromatogram of the sample solution (full line, $\lambda = 283$ nm) and the chromatogram of the mixture of excipients (dotted line), using the optimized mobile phase, showing the mefloquine hydrochloride (MQ) peak.

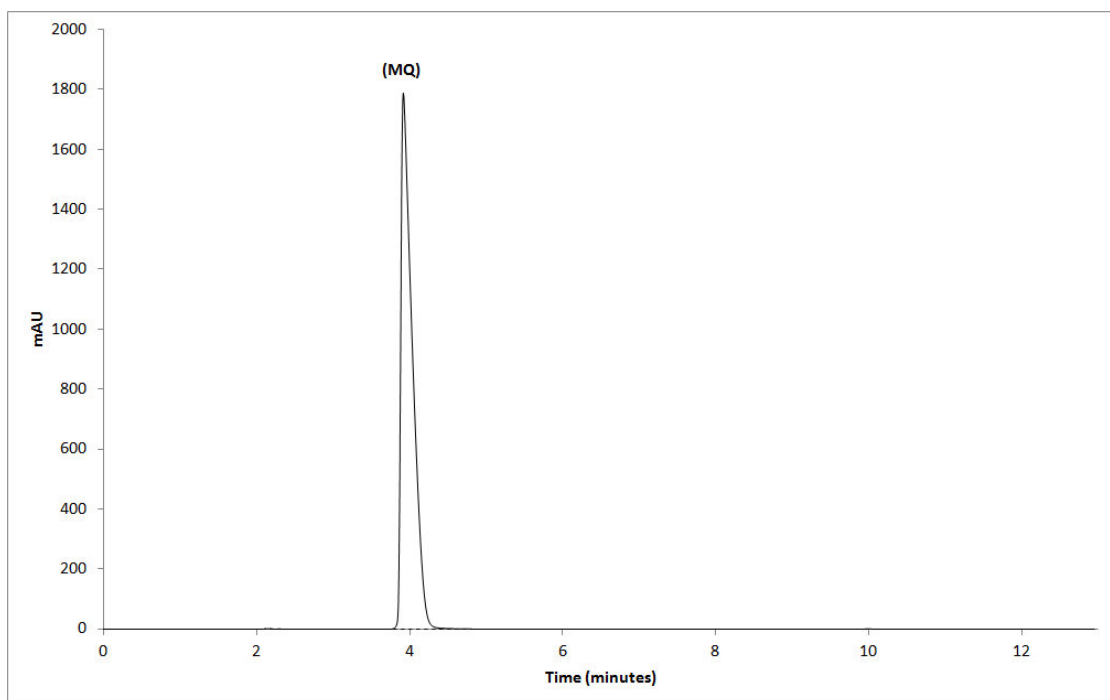
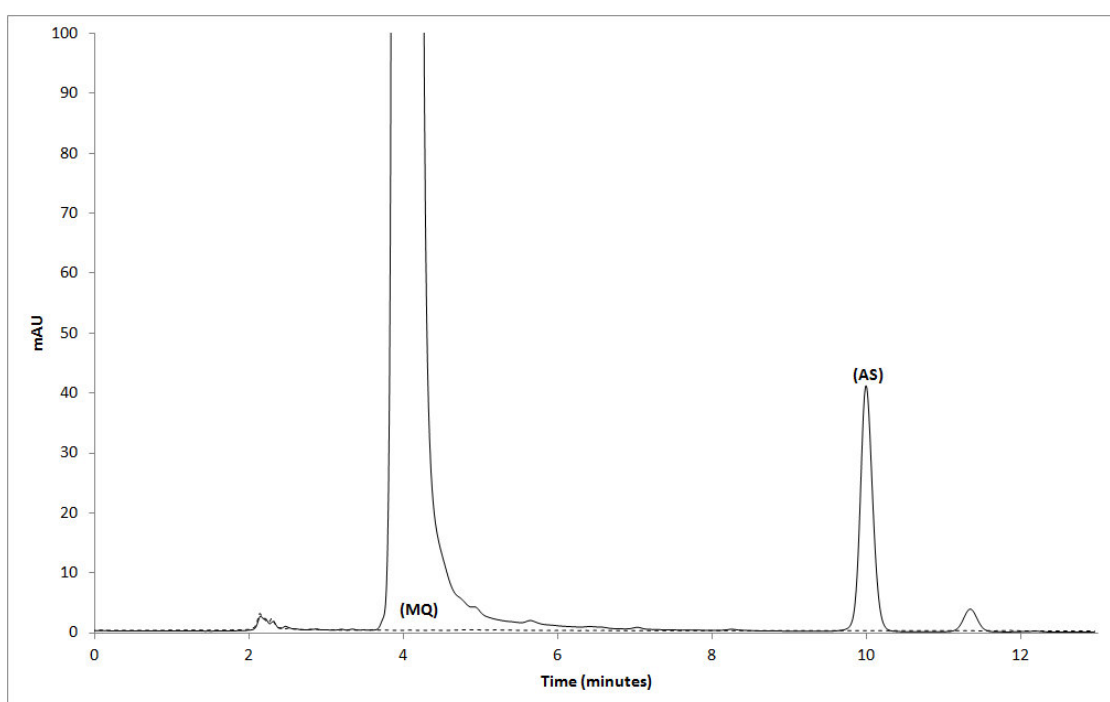


FIGURE 3 - Overlay of the chromatogram of the sample solution (full line, $\lambda = 210$ nm) and the chromatogram of the mixture of excipients (dotted line), optimized mobile phase, showing both mefloquine hydrochloride (MQ) and artesunate (AS) peaks.



Linearity

A linear correlation was found between the peak areas and the concentrations of AS and MQ in the assayed range. The regression analysis data are shown in Table II. The regression coefficient (r^2) obtained in this phase was higher than 0.99 for both compounds, which attests to the linearity of the method.

TABLE II - Overview of the linearity data for AS and MQ.

Regression parameter	Artesunate	Mefloquine hydrochloride
r^2	0.9997	0.9997
Slope \pm SE	913.9 \pm 4.716	16080 \pm 76.00
Intercept \pm SE	-6.328 \pm 2.547	36.71 \pm 89.39
RSD, %	0.86	0.51
Concentration range (mg/mL)	0.25 – 0.75	0.55 – 1.65
Number of points	5	5

Precision

Mean contents of AS and MQ in the intra-day precision analyses ($n = 6$) was 96.17% (RSD = 1.38%) and 100.07% (RSD = 1.41%) of their labeled amounts, respectively. For the inter-day precision ($n = 12$), the mean contents obtained were 96.39% (RSD = 1.19%) and 100.00% (RSD = 1.01%) for AS and MQ, respectively. The RSD values below 2.0% indicated the high-level precision of the method.

Accuracy

Accuracy was investigated by means of a standard addition experiment. Table III shows both the expected concentrations of AS and MQ and the recovery percentages. All values were within the specified limits, between 98.0 and 102.0% of the theoretical concentration.

TABLE III - Results of the recovery analysis of AS and MQ in tablets.

Concentration level	Artesunate			Mefloquine hydrochloride				
	Expected concentration (mg/mL)	Found concentration (mg/mL)	Recovery (%)	Average recovery (%)	Expected concentration (mg/mL)	Found concentration (mg/mL)	Recovery (%)	Average recovery (%)
75%	0.3733	0.3712	99.44	99.34;	0.8425	0.8434	100.10	99.89;
				0.15				0.18
	0.3725	0.3703	99.41		0.8468	0.8449	99.78	
100%	0.3812	0.3781	99.17		0.8573	0.8555	99.79	
	0.5175	0.5178	100.06	100.0	1.1039	1.1068	100.26	100.3
				9;				6;
125%				0.05				0.12
	0.4941	0.4948	100.15		1.1027	1.1062	100.31	
	0.5214	0.5217	100.06		1.0957	1.1011	100.49	
	0.6124	0.6148	100.39	100.5	1.4071	1.4077	100.04	100.2
				5;				7;
			0.13				0.21	
	0.7071	0.7113	100.61		1.4132	1.4181	100.35	
	0.6266	0.6206	100.64		1.4502	1.4564	100.43	

Robustness

Effects of the variation of analytical parameters in content, retention time, tailing factor, and theoretical plate number are shown in Table IV. In general, the variation of the flow rate and the column supplier were responsible for the greatest differences in the plate number for AS and MQ. Other factors remained practically unchanged.

TABLE IV - Effects of the analytical parameters in content, retention time (Rt), tailing factor (T), and theoretical plate number (N) of the chromatographic method for AS and MQ quantification.

Effect	Artesunate				Mefloquine hydrochloride			
	Content (%) [*]	Rt (min) [*]	T [*]	N [*]	Content (%) [*]	Rt (min) [*]	T [*]	N [*]
Acetonitrile concentration in the mobile phase	101.83-100.79 = 1.04	9.55-12.08 = -2.53	1.08-1.08 = 0.00	17055-17082 = -27	101.47-101.27 = 0.20	3.73-4.38 = -0.65	2.45-2.83 = -0.38	3797-3709 = 88
pH buffer	100.82-101.80 = -0.98	12.09-9.53 = 2.56	1.08-1.08 = 0.00	16946-17190 = -244	101.11-101.63 = -0.52	4.37-3.75 = 0.62	2.78-2.50 = 0.28	3776-3730 = 46
Column temperature	100.72-101.90 = -1.18	11.59-10.03 = 1.56	1.07-1.08 = -0.01	16662-17474 = -812	101.20-101.54 = -0.34	4.20-3.91 = 0.29	2.72-2.55 = 0.17	3711-3796 = -85
Mobile phase flow rate	101.85-100.77 = 1.08	9.80-11.82 = -2.02	1.08-1.08 = 0.00	17576-16560 = 1016	101.48-101.26 = 0.22	3.90-4.21 = -0.31	2.49-2.79 = -0.30	3979-3527 = 453
Column supplier	101.69-100.93 = 0.76	9.48-12.15 = -2.67	1.10-1.05 = 0.05	17813-16323 = 1490	101.41-101.33 = 0.08	3.77-4.34 = -0.57	2.55-2.73 = -0.18	3651-3856 = -205
Acetonitrile supplier	100.80-101.82 = -1.02	11.63-9.99 = 1.64	1.08-1.08 = 0.00	16892-17244 = -352	101.25-101.49 = -0.24	4.28-3.84 = 0.44	2.74-2.54 = 0.20	3740-3766 = -26
Chromatograph model	101.71-100.91 = 0.80	9.88-11.75 = -1.87	1.09-1.06 = 0.03	17254-16882 = 372	101.55-101.19 = 0.37	3.82-4.29 = -0.47	2.55-2.72 = -0.17	3745-3762 = -17

* Average of the values obtained at nominal conditions – average of the values obtained at altered conditions

Stability of solutions

No changes in the retention time could be observed for AS and MQ peaks after 8 hours. Likewise, no additional peaks were observed. A negligible reduction (about 1.2%) of the AS peak area was observed when the initial peak area (zero time) and the area of AS peak after 8 hours of preparation were compared. Despite this small reduction in the AS peak area, the recommendation was to inject the solutions as soon as they had been prepared. MQ peak areas remained practically unchanged after 8 hours of analysis.

Analysis of Fixed-Dose Combination Tablets

Samples of ASMQ fixed-dose combination tablets containing 25 mg of AS and 55 mg of MQ were analyzed using the validated method. The samples presented AS and MQ contents that proved to be very close to the labeled amount. The AS content in samples varied from 94.12% to 97.99%, while the MQ content varied from 97.80% to 102.25%.

CONCLUSION

This study is the first report which simultaneously determines the artesunate and mefloquine hydrochloride content in fixed-dose combination tablets. The method proved to be selective, linear, precise, accurate, and robust. In addition, the two drugs were separated by an adequate run time of 13 minutes. The developed method proved to be a simple and suitable technique to quantify these antimalarials and can therefore be employed for routine quality control analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by the Brazilian Pharmacopeia. The authors would like to thank Dr. Núbia Boechat at Farmanguinhos/FIOCRUZ for the donations of the sample.

REFERENCES

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Brazilian Pharmacopeia*, fifth ed., Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2010.

CÉSAR, I.C.; NOGUEIRA, F.H.A.; PIANETTI, G.A. Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.48, p.951-954, 2008.

GAUDIANO, M.C.; ANTONIELLA, E.; BERTOCCHI, P.; VALVO, L. Development and validation of a reversed-phase LC method for analysing potentially counterfeit antimalarial medicines. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.42, p.132-135, 2006.

GAUDIN, K.; LANGLOIS, M.; BARBAUD, A.; BOYER, C.; MILLET, P.; FAWAZ, F.; DUBOST, J. Stability of artesunate in pharmaceutical solvents. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.43, p.1019-1024, 2007.

HASTINGS, I. How artemisinin-containing combination therapies slow the spread of antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.*, v.27, p.67-72, 2011.

HODEL, E.M.; ZANOLARI, B.; MERCIER, T.; BIOLLAZ, J.; KEISER, 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. *J. Chromatogr. B*, v.877, p.867-886, 2009.

KREMSNER, P.G.; KRISHNA, S. Antimalarial combinations. *Lancet*, v.364, p.285-294, 2004.

LAI, C.S.; NAIR, N.K.; MANSOR, S.M.; OLLIARO, P.L.; NAVARATNAM, V. An analytical method with a single extraction procedure and two separate high performance liquid chromatographic systems for the determination of artesunate, dihydroartemisinin and mefloquine in human plasma for application in clinical pharmacological studies of the drug combination. *J. Chromatogr. B*, v.857, p.308-314, 2007.

MARTINO, R.; MALET-MARTINO, M.; GILARD, V.; BALAYSSAC, S. Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.398, p.77-92, 2010.

NOGUEIRA, F.H.A.; GOULART, L.P.L.; CÉSAR, I.C.; CAMPOS, L.M.M.; PIANETTI, G.A. Development and validation of an HPLC method for mefloquine hydrochloride determination in tablet dosage form. *J. AOAC Int.*, v.94, p.1089-1093, 2011.

RANHER, S.S.; GANDHI, S.V.; KADUKAR, S.S.; RANJANE, P.N. A validated HPLC method for determination of artesunate in bulk and tablet formulation. *J. Anal. Chem.*, v.65, p.507-510, 2010.

VAROTTI, F.P.; BOTELHO, A.C.C.; ANDRADE, A.A.; DE PAULA, R.C.; FAGUNDES, E.M.S.; VALVERDE, A.; MAYER, L.M.U.; MENDONÇA, J.S.; SOUZA, M.V.N.; BOECHAT, N.; KRETTLI, A.U. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, v.52, p.3868-3874, 2008.

WHITE, N.J.; OLLIARO, P.L. Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: rationale for combination therapy for malaria. *Parasitol. Today*, v.12, p.399-401, 1996.

WHITE, N.J. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resist. Updat.*, v.1, p.3-9, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for the treatment of malaria*. Second ed., World Health Organization, Geneva, 2011a, pp. ix.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The International Pharmacopoeia*, fourth ed., second supplement, WHO, Geneva, 2011b.

YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. *Statistical manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry*. Washington: AOAC, 1975. 88p.

APÊNDICE D - Projeto submetido à Plataforma Brasil para aplicação do método bioanalítico na monitorização terapêutica de pacientes em uso de artesunato e cloridrato de mefloquina em dose fixa combinada.

15/04/13

Plataforma Brasil



Visualizar Projeto de Pesquisa

Informações Preliminares											
<p>A pesquisa envolve seres humanos, na qualidade de sujeito de pesquisa, individual ou coletivamente de forma direta ou indireta, em sua totalidade ou partes dela, incluindo o manejo de informações ou materiais? Maiores informações ver</p> <p>Sim</p> <p>Informe o Modelo que deseja preencher:</p> <p>Simplificado</p> <p>Pesquisador Principal:</p> <p>CPF: 01107054672 Nome Social: GERSON ANTONIO PIANETTI Telefone: (31) 3337-2367 E-mail: pianetti@farmacia.ufmg.br</p> <p>Deseja delegar a autorização de preenchimento deste projeto a outras pessoas já cadastradas no sistema?</p> <p>Não</p>											
Equipe de Pesquisa											
CPF/Documento	Nome Social										
038.304.306-98	Fernando Nogueira										
<p>Instituição Proponente:</p> <p>17.217.985/0046-06 - PRO REITORIA DE PESQUISA ((UFMG))</p> <p>É um estudo internacional?</p> <p>Não</p>											
Área de Estudo											
<p>Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq) (Selecione até três)</p> <p>> Grande Área 1. Ciências Exatas e da Terra</p> <p>> Grande Área 4. Ciências da Saúde</p>											
<p>Propósito Principal do Estudo (OMS):</p> <p>Ciências Básicas</p> <p>Título Público da Pesquisa:</p> <p>Estudos de pré-formulação e desenvolvimento de métodos analíticos para determinação do artesanato de mefloquina</p> <p>Título Principal da Pesquisa:</p> <p>Estudos de pré-formulação e desenvolvimento de métodos analíticos para determinação do artesanato de mefloquina</p>											
Contato Público											
<p>Será o pesquisador principal?</p> <p>Sim</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CPF</th> <th>Nome Social</th> <th>Telefone</th> <th>E-mail</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>011.070.546-72</td> <td>GERSON ANTONIO PIANETTI</td> <td>3133372367</td> <td>pianetti@farmacia.ufmg.br</td> </tr> </tbody> </table>				CPF	Nome Social	Telefone	E-mail	011.070.546-72	GERSON ANTONIO PIANETTI	3133372367	pianetti@farmacia.ufmg.br
CPF	Nome Social	Telefone	E-mail								
011.070.546-72	GERSON ANTONIO PIANETTI	3133372367	pianetti@farmacia.ufmg.br								

15/04/13

Plataforma Brasil

Contato Científico:
Fernando Nogueira

Desenho de Estudo/ Apoio Financeiro

Desenho:

O estudo de monitorização terapêutica será realizado em seis voluntários sadios. O estudo será aberto. Será administrado o medicamento Farmanguinhos Artesunato + Mefloquina (artesanato 100 mg e cloridrato de mefloquina 220 mg) por via oral. Após a administração, será realizada coleta de sangue nos tempos de 2, 5 e 8 horas. Os voluntários serão devidamente informados sobre as características da pesquisa, recebendo e assinando um termo de consentimento livre e esclarecido. Todos os voluntários deverão satisfazer aos seguintes critérios: não fumante; idade entre 18 e 50 anos; ambos os sexos (nesse caso, 3 homens e 3 mulheres); ausência de hipersensibilidade ao medicamento do estudo; não ser usuário de medicamentos de uso contínuo; no caso de mulheres, não estar grávida ou amamentando; apresentar Índice de Massa Corporal (IMC) entre 18,5 e 25,0; ter concordado livremente e assinado o termo de livre consentimento. As amostras de sangue serão colhidas por farmacêuticos da equipe da Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. As coletas somente serão feitas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando linguagem clara e acessível. As amostras biológicas serão devidamente transportadas e armazenadas no Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico (CEDAFAR-BIO) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Após a realização dos testes previstos, as amostras de sangue excedentes ao estudo serão descartadas de acordo com as normas de biossegurança.

Financiamento

CNPJ	Nome	Tipo de Financiamento	E-mail	Telefone
		Financiamento Próprio		

Palavra-chave

Palavra-chave

malária
artesanato
cloridrato de mefloquina
cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial

Detalhamento do Estudo

Resumo:

A malária é a doença parasitária mais importante do mundo, posicionando-se entre os maiores desafios para os países mais pobres na área de saúde e desenvolvimento. A doença causa pelo menos 300 milhões e, possivelmente, algo como 500 milhões de casos agudos a cada ano, resultando em mais de 3000 mortes diárias, a maioria crianças na África Subsaariana. Em 2010, foram confirmados 330 mil casos de malária na Região Amazônica. Nos manuais de terapêutica para o tratamento da malária, encontra-se recomendada a terapia combinada da artemisinina ou seus derivados (ACT - artemisinin based combination therapy) com outros fármacos antimaláricos ou com antibióticos, desde que provada a sua eficácia e segurança em áreas endêmicas. A razão para a escolha de combinações de fármacos é que eles agem em sinergia ou apresentam diferentes modos de ação para prevenir a evolução da resistência aos medicamentos. Em 2006, foi introduzido somente no estado do Acre um medicamento contendo artesunato e mefloquina em dose fixa combinada, tendo apresentado resultados promissores e sendo, hoje em dia, também um tratamento de 1ª escolha para infecções por *P. falciparum*. Estudos de monitorização terapêutica são

importantes para determinar a posologia adequada, interpretar respostas inesperadas ao medicamento e melhorar a compreensão da ação e do comportamento do fármaco no organismo. Para fazer a monitorização terapêutica é necessário quantificar simultaneamente artesunato e cloridrato de mefloquina em plasma humano, para isso um método bioanalítico deve ser desenvolvido e validado. Dessa forma, é proposto o desenvolvimento e validação de um método de quantificação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina em plasma humano, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrometria de massas, e a realização da monitorização terapêutica dos fármacos em voluntários sadios.

Introdução:

A malária é a doença parasitária mais importante do mundo, posicionando-se entre os maiores desafios para os países mais pobres na área de saúde e desenvolvimento. Mais de um terço da população mundial reside em áreas endêmicas e cerca de um bilhão de pessoas são portadoras do parasita em alguma fase da vida (GUERIN et al., 2002). Relatos incluem ainda a possibilidade de reintrodução da doença em áreas não endêmicas (ROMI et al., 2012). A doença causa pelo menos 300 milhões e, possivelmente, algo como 500 milhões de casos agudos a cada ano, resultando em mais de 3000 mortes diárias, a maioria crianças na África Subsaariana. Entre os adultos, as mulheres grávidas constituem o principal grupo de risco (WHO, 2002). A malária continua sendo um grave problema de saúde pública na Região Amazônica, devido à sua alta incidência e aos efeitos debilitantes para as pessoas acometidas por essa doença, com um importante potencial de influenciar o próprio desenvolvimento daquela região (LACERDA et al., 2012). Em 2010, foram confirmados 330 mil casos de malária na Região Amazônica (BARBOSA, 2011). O diagnóstico da infecção malárica só é possível pela demonstração do parasita, ou de antígenos relacionados, no sangue periférico do paciente. No entanto, em virtude de seu padrão epidemiológico diverso, várias têm sido as abordagens diagnósticas da malária. A OMS, em suas orientações atuais para o controle da malária no mundo, preconiza tanto o diagnóstico clínico quanto o diagnóstico laboratorial como norteadores da terapêutica da doença (BRAGA & FONTES, 2005). O elemento mais importante no diagnóstico clínico da malária, tanto nas áreas endêmicas como nas não endêmicas, é sempre cogitar a possibilidade da doença. Como a distribuição da malária não é homogênea, inclusive nos países onde sua prevalência é elevada, tornam-se importantes os fatores geográficos e os antecedentes de viagens que possam dar indicações sobre a exposição à doença. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de malária induzida, em consequência de transfusões ou utilização de agulhas contaminadas. Ainda, deve-se distinguir a malária de outras doenças de quadro clínico semelhante presentes nos países malarígenos (OMS, 2000). O tratamento oportuno e eficaz da malária é provavelmente o elemento que tem a melhor relação custo/benefício nas estratégias de controle. A maior parte da terapia antimalárica no mundo é feita com medicamentos orais para malária causada por *P. falciparum*. O tratamento por via oral previne a progressão da doença, além de, se realizado a tempo e com eficácia, ser capaz de reduzir a sua morbidade e mortalidade. Entretanto, muitas pessoas que vivem em áreas endêmicas têm pouco ou nenhum acesso ao diagnóstico e tratamento, além disso, este último comumente é inadequado porque medicamentos de qualidade e eficazes não estão disponíveis para a população, ou, se estão, são ingeridos incorretamente (prescrição incorreta ou baixa adesão ao tratamento) ou são utilizados erroneamente (em pacientes que não possuem malária). Muitos países afetados pela malária incluem, em seus esquemas terapêuticos, fármacos que são parcialmente ou completamente ineficazes (GUERIN et al., 2002). Em relação aos seus objetivos, o tratamento da malária visa à interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do seu ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hipnozoítas) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias. Além disso, a abordagem terapêutica de pacientes residentes em áreas endêmicas pode visar também à interrupção da transmissão, pelo uso de fármacos que eliminam as formas sexuadas dos parasitas (BRAGA & FONTES, 2005). Um dos maiores desafios encontrados para o controle mundial da malária é o crescimento e intensificação da resistência do parasita aos fármacos antimaláricos em uso atualmente. O número limitado desses fármacos aumenta as dificuldades no desenvolvimento de esquemas terapêuticos eficazes e controle adequado da doença (WHO, 2000). A resistência múltipla aos antimaláricos tornou inúteis os esquemas terapêuticos baseados em apenas um fármaco, sendo necessários urgentemente novos tratamentos, como as combinações de antimaláricos (KREMSNER & KRISHNA, 2004). No presente momento, nos manuais de terapêutica para o tratamento da malária, encontra-se recomendada a terapia combinada da artemisinina ou seus derivados (ACT - artemisinin based combination therapy) com outros fármacos antimaláricos ou com antibióticos, desde que provada a sua eficácia e segurança em áreas endêmicas. A razão para a escolha de combinações de fármacos é que eles agem em sinergia ou apresentam diferentes modos de ação para prevenir a evolução da resistência aos medicamentos (VAROTTI et al., 2008). Assim, várias combinações de antimaláricos com derivados da artemisinina foram introduzidas na terapêutica, como artesunato e amodiaquina; artesunato, sulfadoxina e

pirimetamina; arteméter e lumefantrina e, por fim, artesunato e mefloquina (KREMSNER & KRISHNA, 2004). A formulação de arteméter e lumefantrina em dose fixa combinada foi introduzida no Brasil no ano de 2006, sendo utilizada como um dos tratamentos de 1ª escolha para infecções não complicadas por *Plasmodium falciparum* em toda a área endêmica (BRASIL, 2006). Neste mesmo ano foi introduzido somente no estado do Acre um medicamento contendo artesunato e mefloquina em dose fixa combinada, tendo apresentado resultados promissores e sendo, hoje em dia, também um tratamento de 1ª escolha para infecções por *P. falciparum* (SANTELLI et al., 2011; MINISTÉRIO, 2010). Estudos de monitorização terapêutica são importantes para conhecer a farmacocinética do artesunato e do cloridrato de mefloquina quando administrados simultaneamente. O objetivo é garantir que ambos os fármacos estejam acima da concentração plasmática mínima necessária para a ação farmacológica e que não ocorra reações adversas durante o tratamento. Desta forma, o presente projeto visa o desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos para proceder ao controle de qualidade de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos de dose fixa combinada e para avaliar as concentrações plasmáticas de artesunato e cloridrato de mefloquina após administração do comprimido de dose fixa combinada em voluntários sadios. As amostras de sangue serão colhidas por farmacêuticos da equipe da Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As coletas somente serão feitas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando linguagem clara e acessível. O desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação de artesunato e cloridrato de mefloquina, assim como a análise das amostras plasmáticas, serão realizados no Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico (CEDAFAR-BIO) da Faculdade de Farmácia da UFMG. A técnica utilizada para a quantificação dos fármacos em plasma humano é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas com ionização por electrospray.

Hipótese:

Avaliar se o método bioanalítico desenvolvido e validado é capaz de identificar e quantificar simultaneamente artesunato e cloridrato de mefloquina em plasma humano coletado após administração do comprimido em dose fixa combinada em voluntários sadios.

Objetivo Primário:

Desenvolver e validar método bioanalítico para a quantificação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina em plasma humano.

Metodologia Proposta:

A coleta das amostras de sangue será feita com material estéril e por profissionais habilitados. Durante o período da pesquisa, haverá o acompanhamento dos voluntários por profissionais da área da saúde para monitorar as condições de saúde e atender os voluntários no caso de alguma eventualidade, além de esclarecer qualquer dúvida.

Critério de Inclusão:

Os voluntários para participar do projeto "Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano" serão recrutados na comunidade acadêmica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. A divulgação do projeto será feita por meio de cartazes que serão fixados nos murais de aviso da faculdade. Após divulgação da seleção dos voluntários, os interessados em participar do estudo passarão por um processo de seleção no qual será aplicado um questionário e serão avaliados se atenderão os seguintes critérios: não fumantes; idade entre 18 e 50 anos; ambos os sexos (neste caso, serão 3 homens e 3 mulheres; ausência de hipersensibilidade ao medicamento do estudo; não ser usuário de medicamentos de uso contínuo; no caso de mulheres, não estar grávida ou amamentando; apresentar Índice de Massa Corporal (IMC) entre 18,5 e 25,0; ter concordado livremente e assinado o termo de livre consentimento.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos voluntários que atenderem os seguintes critérios: fumantes; idade menor que 18 e maior que 50 anos; apresentar antecedentes de hipersensibilidade aos medicamentos do estudo; usuários de medicamentos de uso contínuo; no caso de mulheres, mulheres grávidas ou amamentando; não apresentarem Índice de Massa Corporal (IMC) entre 18,5 a 25,0; ter grau de instrução menor que o ensino médio concluído; não ter concordado livremente e assinado o termo de livre consentimento.

Riscos:

A metodologia de coleta de amostras de sangue venoso (6,0 mL em heparina) inclui um pequeno risco de acidente de punção representado, principalmente, por extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena

15/04/13

Plataforma Brasil

gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional farmacêutico, com grande capacidade técnica e experiência, que estará atento para fazer a compressão imediata do local da punção, visando estancar o sangramento. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), garantindo o êxito da coleta. Outro risco associado ao procedimento de coleta de sangue, embora raro, é a ocorrência de lipotímia. Nesse caso, o profissional farmacêutico adotará as medidas pertinentes para as quais está habilitado. Os possíveis efeitos adversos do medicamento usado no estudo são considerados leves, bem toleráveis e reversíveis. O indivíduo pode apresentar tonteira, distúrbios do sono e vômitos como efeitos adversos. O medicamento é contraindicado para pessoas sensíveis ou alérgicas a qualquer componente da formulação, que tenham histórico de doença psiquiátrica grave (depressão, distúrbio afetivo bipolar, neurose de ansiedade grave), histórico de terapia recente com halofantrina e gestantes no primeiro trimestre de gravidez.

Benefícios:

O estudo trará benefícios aos pacientes com malária usuários de artesunato e cloridrato de mefloquina em comprimidos de dose fixa combinada pela possibilidade de elucidação dos processos de absorção e eliminação desses fármacos no organismo. O método bioanalítico desenvolvido e validado será útil para a realização da monitorização terapêutica. Além disso, poderá ser utilizado para futuros estudos de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência.

Metodologia de Análise de dados:

O sangue coletado será submetido a um processo de precipitação de proteínas e um volume determinado será injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas. Os resultados encontrados com as análises serão avaliados utilizando parâmetros estatísticos básicos para quantificação dos fármacos. Será utilizado o software MassLynx 4.0. As amostras de plasma serão estocadas em freezer - 80°C até a finalização do estudo e, em seguida, descartadas em lixo próprio para material biológico. O material coletado e os dados obtidos serão usados exclusivamente para a pesquisa proposta. Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade. Todos os resultados da pesquisa, favoráveis ou não, serão integralmente apresentados na tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do aluno Fernando Henrique Andrade Nogueira e em publicações científicas decorrentes do trabalho.

Desfecho Primário:


Avaliação do desempenho da técnica de extração, identificação e quantificação simultânea de artesunato e cloridrato de mefloquina em plasma humano e realização de monitorização terapêutica.

Tamanho da Amostra no Brasil:

6

Data do Primeiro Recrutamento:

Nao se aplica

Países de Recrutamento		
Pais de Origem	Pais	Nº de Sujeitos
	BRASIL	6

outras Informações
Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)? Não
Detalhamento: Não se aplica
Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa: : 6

15/04/13

Plataforma Brasil

Grupos em que serão divididos os sujeitos de pesquisa neste centro:

ID Grupo	Nº de Individuos	Intervenções a serem realizadas
Voluntários sadios	6	Coleta de sangue

O estudo é multicêntrico no Brasil?

Não

Propõe dispensa do TCLE?

Não

Justificativa:

Não se aplica

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Não

Justificativa:

Não se aplica

Cronograma de execução:

Identificação da Etapa	Início (dd/mm/aaaa)	Término (dd/mm/aaaa)
Desenvolvimento e validação do método bioanalítico	29/04/2013	22/05/2013
Seleção dos voluntários sadios	23/05/2013	31/05/2013
Administração e coleta de sangue	03/06/2013	07/06/2013
Quantificação de artesunato e cloridrato de mefloquina no plasma humano coletado	10/06/2013	14/06/2013

Orçamento Financeiro:**Detalhamento do Orçamento**

Identificação do Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Tubo heparinizado e agulha descartável	Outros	250,00
Metanol HPLC 4 litros	Outros	140,00
Coluna cromatográfica Ciano	Outros	1.300,00
Artesunato SQR	Outros	1.500,00
Cloridrato de mefloquina SQR	Outros	1.500,00

Total em Reais (R\$)4.690,00**Bibliografia:**

BARBOSA, J. Situação epidemiológica da malária na Amazônia. Apresentação. Brasília, 2011. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2011/Set/05/jarbas_malaria_050911.pdf. Acesso em Ago/2012. BRAGA, E. M., FONTES, C. J. F. Plasmodium-malária. In: NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 143-161. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Malária. Esquemas recomendados para o tratamento da malária não complicada no Brasil. Folder. Brasília: 2006 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, p.564-573, 2002. KREMSNER, P. G., KRISHNA, S. Antimalarial combinations. Lancet, London, n. 364, p. 285-294, 2004. LACERDA, M. V. G., MOURÃO, M. P. G., ALEXANDRE, M. A. A., SIQUEIRA, A. M., MAGALHÃES, B. M. L., MARTINEZ-ESPINOSA, F. E., FILHO, F. S. S., BRASIL, P., VENTURA, A. M. R. S., TADA, M. S., COUTO, V. S. C. D., SILVA, A. R., SILVA, R. S. U., ALECRIM, M. G. C. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. Malaria Journal, v. 11, p. 12, 2012. MINISTÉRIO da Saúde. Secretaria de Vigilância em


15/04/13

Plataforma Brasil





Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 36 p. OMS. Organização Mundial da Saúde. Tratamento da malária grave e complicada. Guia de condutas práticas. 2 ed. Genebra: OMS, 2000. p. 38-39. ROMI, R., BOCCOLINI, D., VALLORANI, R., SEVERINI, F., TOMA, L., COCCHI, M., TAMBURRO, A., MESSERI, G., CRISCI, A., ANGELI, L., COSTANTINI, R., RAFFAELLI, I., PONTUALE, G., THIÉRY, I., LANDIER, A., LE GOFF, G., FAUSTO, A. M., DI LUCA, M. Assessment of the risk of malaria re-introduction in the Maremma plain (Central Italy) using a multi-factorial approach. Malaria Journal, v. 11, p. 98, 2012. SANTELLI, A. C., RIBEIRO, I., DAHLER, A., BOULOS, M., MARCHESINI, P., LA CORTE, R., BARBOSA, M., LUCENA, F., MAGALHÃES, I., DE LEON, A. P., JUNGER, W., KIECHEL, J. R., LADISLAU, J. L. B. Effect of artesunate-mefloquine fixed dose combination in malaria transmission in Amazon basin communities. Tropical Medicine and International Health, v. 16, s. 1, p. 375-376, 2011. VAROTTI, F. P., BOTELHO, A. C. C., ANDRADE, A. A., PAULA, R. C., FAGUNDES, E. M. S., VALVERDE, A., MAYER, L. M. U., MENDONÇA, J. S. M., SOUZA, M. V. N., BOECHAT, N., KRETTLI, A. U. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Bethesda (EUA), v.52, n.11, p. 3868-3874, 2008. WHO - World Health Organization. The global malaria situation: current tools for prevention and control. 55th World Health Assembly. Global funds to fight AIDS, Tuberculosis & Malaria, 2002. Disponível em <<http://who.int/topics/malaria/en>>. Acesso em Ago/2012.

Upload de Documentos:

Anexar Folha de Rosto:

Tipo de Documento	Nome	Tamanho
Folha de Rosto	 Folha de rosto.pdf	620,72 KB

Anexar Outros Documentos:

Tipo de Documento	Nome	Tamanho
TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	 Termo consentimento livre esclarecido.docx	25,08 KB
Pareceres (para projeto anterior à Plataforma Brasil)	 Parecer consubstanciado.pdf	1,07 MB
Vínculo Instituições Participantes	 Termo de concordância.pdf	495,68 KB
Brochura do Pesquisador	 Termo de compromisso.pdf	507,73 KB

Finalizar

* Manter sigilo da integra do projeto de pesquisa?

Não

 Aceitar termos acima