

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

**ISABELA DA COSTA CÉSAR**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA QUANTIFICAÇÃO DE ARTEMETER E LUMEFANTRINA  
EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA  
E EM PLASMA HUMANO**

Belo Horizonte - MG

2009

ISABELA DA COSTA CÉSAR

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE ARTEMETER E LUMEFANTRINA EM  
COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA E EM PLASMA HUMANO**

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de  
Farmácia da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau  
de Doutor em Ciências Farmacêuticas.**

**Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.**

**Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti.**

Belo Horizonte - MG

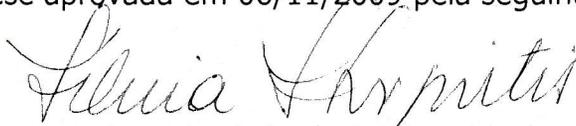
2009

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### "Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de Artemeter e Lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano "

**Isabela da Costa César**

Tese aprovada em 06/11/2009, pela seguinte Comissão Examinadora:



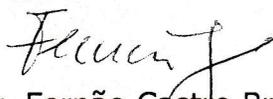
Profa. Dra. Sílvia Storpirtis

Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.



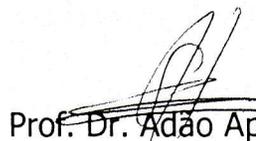
Profa. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS



Prof. Dr. Fernão Castro Braga

Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG



Prof. Dr. Adão Aparecido Sabino

Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG



Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti (Orientador)

Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG

Dedico este trabalho ao Daniel,  
que enche meu caminho de luz e  
minha vida de poesia.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti, por me fornecer todas as condições necessárias para o desenvolvimento desta tese, por me abrir várias portas e pelo exemplo de profissional farmacêutico competente e ético.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristina Duarte Vianna Soares, pelo apoio e por ter compartilhado comigo sua experiência docente durante o tempo em que fui professora substituta.

Ao Prof. Dr. Ricardo José Alves, pela importante ajuda na elucidação das estruturas e rotas de fragmentação por espectrometria de massas.

Aos professores Adão Aparecido Sabino, Fernão Castro Braga e Lucas Antônio Miranda Ferreira, pelas sugestões no exame de qualificação, que contribuíram de forma especial para a qualidade final da tese.

Ao Dr. Leonardo de Souza Teixeira, à Julliana Rodrigues Moura e toda equipe do Instituto de Ciências Farmacêuticas pela valiosa parceria na realização da etapa clínica do estudo, imprescindível para o sucesso do trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ligia Maria Moreira de Campos, por ter carinhosamente contribuído para minha formação como farmacêutica, pesquisadora e professora.

Ao Colegiado de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelos esforços constantes visando o crescimento do nosso Programa.

À Comissão da Farmacopéia Brasileira e Agência Nacional de Vigilância Sanitária, pelo empenho em construir a quinta edição da Farmacopéia Brasileira com qualidade e competência e por permitir minha atuação profissional durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Zé, pela grande colaboração na realização de todas as etapas do método bioanalítico, pela disponibilidade e amizade duradoura.

Ao Fernando, por compartilhar comigo as atividades diárias durante todo este tempo, pela amizade e por animar o laboratório.

Aos amigos do LCQ, Ana Gabriela, André Lima, André Márcio, Diego, Flávia, Giovanni, Geovani, Gustavo, Juliana, Léo, Luciano, Michele, Paula, Ricardo, Taízia e Tiago, pelo agradável convívio e amizade ao longo deste tempo.

À Edna, Lúcia e Márcia pela atenção dispensada e organização do laboratório.

À Paula Chellini, pela colaboração nas análises estatísticas do estudo farmacocinético.

Ao Daniel, por me indicar os melhores caminhos, enfrentar as dificuldades ao meu lado e iluminar minha vida com carinho e amor.

Aos meus pais, Helenice e Francisco, que sempre me apoiaram e forneceram todas as condições que precisei para chegar onde estou e ser a pessoa que sou.

À Nana e Alexandre, pelo incentivo, carinho e amizade compartilhados em todos os momentos.

À minha família de Araújo, Maria José, Amador, Bruno, Aline, Hugo e Renan, pelo carinho e apoio.

A todos meus familiares e amigos que estiveram ao meu lado durante este tempo, pelo incentivo constante e pela alegre convivência.

A Deus, por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, oportunidades, dificuldades e alegrias.

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais retorna ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

## RESUMO

Atualmente, a malária é a infecção parasitária de maior incidência mundial. A terapia de combinação com artemisinina (ACT) tem sido proposta como um tratamento promissor para malária, sendo artemeter-lumefantrina (20+120 mg) a principal associação recomendada em áreas endêmicas. Apesar da ampla utilização desta associação, a literatura científica ainda é escassa em relação a métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em produtos farmacêuticos e matrizes biológicas. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina isoladamente em matérias-primas farmacêuticas e simultaneamente em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano. O método analítico descrito na Farmacopéia Internacional 4ª edição por CLAE-UV foi adaptado e validado para quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica. Para determinação de lumefantrina, três métodos analíticos foram desenvolvidos e comparados estatisticamente: CLAE, UV e titulação em meio não aquoso. A análise cromatográfica foi realizada em coluna  $C_{18}$ , com fase móvel composta por metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (80:20). A robustez do método por CLAE foi avaliada por meio de Teste de Youden, que permitiu analisar a influência de sete parâmetros analíticos no resultado final. Para o método espectrofotométrico, empregou-se detecção em 335 nm. Ácido perclórico 0,1 M em ácido acético glacial foi utilizado como titulante no método volumétrico. Os três métodos se mostraram adequados para quantificação do fármaco em matéria-prima, enquanto para análise dos comprimidos, CLAE e UV forneceram resultados mais confiáveis. A quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada foi realizada por meio de um método de adição de padrão de artemeter por CLAE, com coluna Ciano, fase móvel composta por acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,05% (60:40) e detecção UV em 210 nm. O método desenvolvido cumpriu com todos os parâmetros de validação exigidos e se mostrou adequado para análises rotineiras. Desenvolveu-se, ainda, método bioanalítico por CLAE com detecção por espectrometria de massas e ionização por eletrospray no modo positivo para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma humano. Para extração dos fármacos do plasma, empregou-se precipitação de proteínas e artesunato como padrão interno. A análise cromatográfica foi realizada em coluna Ciano e as transições empregadas para artemeter, lumefantrina e artesunato foram  $m/z$  316  $\rightarrow$   $m/z$  267,  $m/z$  530  $\rightarrow$   $m/z$  348 e  $m/z$  402  $\rightarrow$   $m/z$  267, respectivamente. O método demonstrou ser seletivo, preciso e exato, além de fornecer taxas de recuperação superiores a 80% para todos os fármacos. A linearidade do método para artemeter foi comprovada na faixa de 10 a 1000 ng/ml, enquanto para lumefantrina uma curva quadrática foi obtida na faixa de 10 a 18000 ng/ml. O estudo clínico com voluntários permitiu a obtenção das curvas de absorção plasmática e dos parâmetros farmacocinéticos. A concentração plasmática máxima de artemeter, 57,4 ng/ml, foi alcançada após 1,9 h da administração do medicamento, enquanto para lumefantrina, a concentração máxima de 1979,9 ng/ml foi alcançada em 5,8 h. Realizou-se, ainda, estudo das estruturas dos fragmentos e das rotas de fragmentação de artemeter e lumefantrina. O desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e simples é de extrema importância para avaliar a qualidade dos medicamentos antimaláricos distribuídos atualmente, enquanto o método bioanalítico desenvolvido constitui uma ferramenta útil para estudos de biodisponibilidade e bioequivalência.

*Palavras-chave:* artemeter, lumefantrina, antimaláricos, CLAE, espectrometria de massas, produtos farmacêuticos, plasma humano.

## ABSTRACT

Nowadays, malaria is the world's most incident parasitic infection. The artemisinin based combination therapy (ACT) has been advocated as a promising treatment for malaria and artemether-lumefantrine (20+120 mg) is the main recommended association in endemic areas. In spite of the wide use of this association, the scientific literature is still scarce regarding analytical methods for the quantitation of artemether and lumefantrine in pharmaceutical products and biological matrices. The aim of the present work was developing and validating analytical methods for the quantitation of artemether and lumefantrine isolated in pharmaceutical raw materials and simultaneously in fixed dose combination tablets and human plasma. The analytical method described in the International Pharmacopeia 4<sup>th</sup> edition by HPLC-UV was adapted and validated for the quantitation of artemether in pharmaceutical raw material. Three analytical methods were developed and statistically compared for lumefantrine determination: HPLC, UV and non aqueous titration. The chromatographic analysis was performed in a C<sub>18</sub> column and mobile phase composed of methanol and 0.05% trifluoroacetic acid (80:20). The robustness of the HPLC method was evaluated by means of Youden's test, which allowed analysing the influence of seven analytical parameters in the final result. In the spectrophotometric method, the detection was performed at 335 nm. The titulant employed in the volumetric method was 0.1 M perchloric acid in glacial acetic acid. All methods showed to be adequate for the quantitation of the drug in raw material, while for the tablet assay, HPLC and UV provided the most reliable results. The simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets was carried out by means of artemether standard addition method, by HPLC with cyano column, mobile phase composed of acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid (60:40) and UV detection at 210 nm. The developed method complied with all required validation parameters e showed to be adequate for routine analysis. A bioanalytical method by HPLC with detection by mass spectrometry and eletrospray ionization in the positive mode was developed for the quantitation of artemether and lumefantrine in human plasma. For the extraction of the drugs from plasma, protein precipitation and artesunate as internal standard were employed. The chromatographic analysis was performed using a cyano column and the employed transitions for the quantitation of artemether, lumefantrine and artesunate were  $m/z$  316 →  $m/z$  267,  $m/z$  530 →  $m/z$  348 e  $m/z$  402 →  $m/z$  267, respectively. The method showed to be selective, precise, accurate, besides providing recovery rates higher than 80% for all drugs. Linearity of the method for artemether was proved in the range from 10 to 1000 ng/ml, while for lumefantrine, a quadratic curve was obtained in the range from 10 to 18000 ng/ml. The clinical study with volunteers allowed obtaining plasmatic absorption curves, as well as the pharmacokinetic parameters. The maximum plasmatic concentration of artemether, 57.4 ng/ml, was reached 1.9 h after the drug administration, whereas for lumefantrina, a maximum concentration of 1979.9 ng/ml was reached after 5.8 h. The study of the fragment structures and fragmentation routes of artemether and lumefantrine was also performed. The development of simple and rapid analytical methods is extremely important to evaluate the quality of the antimalarials distributed nowadays and to contribute to assuring the treatment efficacy, while the developed bioanalytical method represents a useful tool for bioavailability and bioequivalence studies.

*Key words:* artemether, lumefantrine, antimalarials, HPLC, mass spectrometry, pharmaceutical products, human plasma.

## LISTA DE FIGURAS

<b>1</b>	<b>Estrutura química dos principais antimaláricos disponíveis atualmente.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Estruturas químicas de artemeter (ATM) e lumefantrina (LMF).....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Espectro na região do ultravioleta de artemeter a 1 mg/ml em etanol.....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>Espectro na região do ultravioleta de lumefantrina a 20 µg/ml em diclorometano e metanol (1:50). </b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>Espectro na região do infravermelho de artemeter, obtido com pastilha de KBr.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Espectro na região do infravermelho de lumefantrina, obtido com pastilha de KBr .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Cromatograma obtido para solução amostra de artemeter, a 4 mg/ml, utilizando coluna Zorbax C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm), a 30 °C e fase móvel composta por acetonitrila e água (70:30), com fluxo de 1 ml/min e detecção a 216 nm .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Cromatograma obtido para solução amostra de lumefantrina, a 24 µg/ml, utilizando coluna Symmetry C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm), a 30 °C e fase móvel composta por metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (80:20), fluxo de 1 ml/min e detecção a 335 nm.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Cromatogramas obtidos com soluções de lumefantrina a 0,02 µg/ml (LD) e 0,05 µg/ml (LQ). Tr do pico de lumefantrina = 4,9 min .....</b>	<b>60</b>
<b>10</b>	<b>Teores de lumefantrina determinados por CLAE, UV e titulação em meio não aquoso, em amostras de matéria-prima e comprimidos .....</b>	<b>66</b>
<b>11</b>	<b>Cromatograma obtido por CLAE para (A) solução contendo 400 µg/ml de artemeter e 300 µg/ml de lumefantrina e (B) mistura dos excipientes dos comprimidos, em coluna Zorbax SB-Ciano e fase móvel composta por acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,05% (60:40). Identificação dos picos: (1) clorofórmio, (2) artemeter e (3) lumefantrina.....</b>	<b>70</b>
<b>12</b>	<b>Estruturas químicas dos fármacos avaliados como padrões internos, artesunato (ATS) e halofantrina (HAL), e respectivas massas molares .....</b>	<b>84</b>
<b>13</b>	<b>Espectros ESI(+)-MS de artemeter, demonstrando (A) espectro do íon precursor, m/z 316,30 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal m/z 267,01 .....</b>	<b>102</b>

<b>14 Espectros ESI(+)-MS de lumefantrina, demonstrando (A) espectro do íon precursor, <math>m/z</math> 530,45 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal <math>m/z</math> 348,41</b> .....	103
<b>15 Espectros ESI(+)-MS de artesunato, demonstrando (A) espectro do íon precursor, <math>m/z</math> 402,43 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal <math>m/z</math> 267,44</b> .....	104
<b>16 Espectros ESI(+)-MS de halofantrina, demonstrando (A) espectro do íon precursor, <math>m/z</math> 500,42 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal <math>m/z</math> 142,36</b> .....	105
<b>17 Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS, para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma, utilizando-se coluna Zorbax SB-Ciano e fase móvel composta por metanol e tampão acetato de amônio 10 mM (90:10). Concentração das soluções: lumefantrina 7500 ng/ml, halofantrina 1000 ng/ml, artesunato 500 ng/ml e artemeter 400 ng/ml</b> .....	107
<b>18 Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma, utilizando-se coluna Zorbax SB-Ciano e eluição em gradiente com fase móvel composta por tampão acetato de amônio 10 mM e metanol. Concentração das soluções: lumefantrina 7500 ng/ml, artesunato 1000 ng/ml e artemeter 400 ng/ml</b> .....	114
<b>19 Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasmas normal, lipêmico e hemolisado, para avaliação da seletividade do método</b> .....	122
<b>20 Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS com a injeção de uma amostra plasmática contendo diidroartemisinina a 1000 ng/ml, para avaliação da seletividade do método</b> .....	123
<b>21 Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma contendo artemeter (10 ng/ml), lumefantrina (10 ng/ml) e artesunato (1000 ng/ml), isoladamente</b> .....	124
<b>22 Gráfico de resíduos e curva analítica de artemeter obtidos por regressão linear no primeiro dia de análise, na faixa de 10 a 1000 ng/ml</b> .....	126
<b>23 Gráfico de resíduos e curva analítica de lumefantrina obtidos por regressão linear, na faixa de 10 a 18000 ng/ml</b> .....	128
<b>24 Gráfico de resíduos e curva analítica de lumefantrina obtidos por regressão quadrática no primeiro dia de análise, na faixa de 10 a 18000 ng/ml</b> .....	132
<b>25 Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasmas do voluntário 1, após 1, 3 e 6 horas de administração oral de 80 mg de artemeter e 480 mg de lumefantrina</b> .....	148

26 Curva de concentração plasmática média versus tempo de lumefantrina (LMF) obtida após administração de quatro comprimidos de Coartem <sup>®</sup> (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em voluntários sadios.....	152
27 Curva de concentração plasmática média versus tempo de artemeter (ATM) obtida após administração de quatro comprimidos de Coartem <sup>®</sup> (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em voluntários sadios.....	153
28 Estruturas do íon <i>m/z</i> 299 e dos adutos de sódio ( <i>m/z</i> 321) e amônia ( <i>m/z</i> 316) de artemeter .....	160
29 Proposta para obtenção do fragmento de artemeter <i>m/z</i> 267 a partir dos íons <i>m/z</i> 299 e <i>m/z</i> 316	160
30 Proposta para obtenção do fragmento de artemeter <i>m/z</i> 284, a partir de <i>m/z</i> 316.....	161
31 Proposta A para obtenção do fragmento de artemeter <i>m/z</i> 231, diretamente a partir do íon <i>m/z</i> 267 .....	162
32 Proposta B para obtenção do fragmento de artemeter <i>m/z</i> 231, a partir do íon <i>m/z</i> 267, via <i>m/z</i> 249 .....	162
33 Proposta A para obtenção do fragmento de artemeter <i>m/z</i> 163, a partir do íon <i>m/z</i> 267.....	163
34 Proposta B para obtenção do fragmento de artemeter <i>m/z</i> 163, a partir do íon <i>m/z</i> 231.....	163
35 Estruturas propostas para o fragmento <i>m/z</i> 163, (A) no presente estudo, (B) por XING <i>et al.</i> (2006) e (C) por SHI <i>et al.</i> (2006) .....	164
36 Proposta A para obtenção do fragmento de lumefantrina <i>m/z</i> 347, a partir do íon <i>m/z</i> 530 .....	167
37 Proposta B para obtenção do fragmento de lumefantrina <i>m/z</i> 347, a partir do íon <i>m/z</i> 530 .....	168
38 Proposta C para obtenção do fragmento de lumefantrina <i>m/z</i> 347, a partir do íon <i>m/z</i> 530 .....	169
39 Proposta A para obtenção do fragmento de lumefantrina <i>m/z</i> 348, a partir do íon <i>m/z</i> 384 .....	170
40 Proposta B para obtenção do fragmento de lumefantrina <i>m/z</i> 348, a partir do íon <i>m/z</i> 384 .....	170
41 Proposta A para obtenção do fragmento de lumefantrina <i>m/z</i> 385, a partir do íon <i>m/z</i> 530 .....	171

- 42 Proposta B para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  385, a partir do íon  $m/z$  530 .....172**
- 43 Proposta C para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  385, a partir do íon  $m/z$  530 .....173**

## LISTA DE TABELAS

<b>1 Esquema terapêutico recomendado pela OMS e Ministério da Saúde do Brasil para tratamento de malária causada por <i>P. falciparum</i> com a associação de artemeter e lumefantrina .....</b>	<b>15</b>
<b>2 Métodos de extração e condições cromatográficas para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma, isoladamente .....</b>	<b>27</b>
<b>3 Soluções diluídas para construção de curva analítica e avaliação da linearidade do método por CLAE para quantificação de artemeter matéria-prima .....</b>	<b>34</b>
<b>4 Soluções diluídas para construção de curva analítica e avaliação da linearidade dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico para quantificação de lumefantrina.....</b>	<b>37</b>
<b>5 Relação dos excipientes e suas respectivas proporções para preparo de formulação e avaliação da exatidão dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico .....</b>	<b>38</b>
<b>6 Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para quantificação de lumefantrina.....</b>	<b>40</b>
<b>7 Matriz de combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden.....</b>	<b>40</b>
<b>8 Soluções diluídas de artemeter e lumefantrina para construção das curvas analíticas e avaliação da linearidade do método analítico por CLAE.....</b>	<b>43</b>
<b>9 Diluições para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE para quantificação de artemeter pelo método de adição de padrão .....</b>	<b>44</b>
<b>10 Massas pesadas e concentrações das soluções para avaliação da exatidão do método por CLAE para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....</b>	<b>45</b>
<b>11 Parâmetros analíticos e variações empregadas para avaliação da robustez do método analítico por CLAE para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.....</b>	<b>46</b>
<b>12 Atribuições das principais bandas obtidas no espectro de infravermelho de artemeter.....</b>	<b>51</b>
<b>13 Atribuições das principais bandas obtidas no espectro de infravermelho de lumefantrina .....</b>	<b>52</b>

<b>14 Resultados da análise de regressão linear obtidos para o método por CLAE para quantificação de artemeter matéria-prima .....</b>	<b>54</b>
<b>15 Concentrações das soluções de lumefantrina e respectivas respostas para obtenção das curvas analíticas dos métodos cromatográficos e espectrofotométricos .....</b>	<b>57</b>
<b>16 Resultados da análise de regressão linear obtidos para os métodos cromatográfico e espectrofotométrico para quantificação de lumefantrina .....</b>	<b>57</b>
<b>17 Valores de DPR obtidos na avaliação da precisão intra-corrída e inter-corrídas para os três métodos avaliados, em amostras de lumefantrina matéria-prima e comprimidos .....</b>	<b>58</b>
<b>18 Porcentagens de recuperação para avaliação da exatidão dos métodos cromatográfico e epectrofotométrico .....</b>	<b>59</b>
<b>19 Limites de detecção e quantificação de lumefantrina determinados pela equação da reta e pela avaliação da resposta de soluções diluídas, por CLAE e UV .....</b>	<b>61</b>
<b>20 Combinação dos parâmetros analíticos segundo o teste de Youden para avaliação da robustez do método cromatográfico .....</b>	<b>62</b>
<b>21 Resultados obtidos nos oito ensaios realizados para avaliação da robustez, para soluções amostra e padrão de lumefantrina .....</b>	<b>63</b>
<b>22 Efeito dos parâmetros analíticos no teor, tempo de retenção, fator de cauda e número de pratos teóricos do método cromatográfico para quantificação de lumefantrina .....</b>	<b>63</b>
<b>23 Teores de lumefantrina determinados por CLAE, UV e titulação em meio não aquoso, em amostras de matéria-prima e comprimidos .....</b>	<b>65</b>
<b>24 Parâmetros cromatográficos para artemeter e lumefantrina em diferentes composições de fase móvel, usando coluna Zorbax SB-Ciano .....</b>	<b>69</b>
<b>25 Concentrações das soluções de artemeter e lumefantrina e respectivas áreas para obtenção das curvas analíticas do método por CLAE .....</b>	<b>71</b>

<b>26 Resultados da análise de regressão linear obtidos para a quantificação de artemeter e lumefantrina por CLAE.....</b>	<b>72</b>
<b>27 Valores de teor e DPR obtidos para artemeter e lumefantrina na avaliação da precisão intra-corrída e inter-corrídas do método por CLAE .....</b>	<b>72</b>
<b>28 Quantidades de padrão adicionadas, recuperadas e porcentagens de recuperação de cada fármaco para avaliação da exatidão do método por CLAE.....</b>	<b>73</b>
<b>29 Resultados das análises obtidas em condições nominais e com variações nos parâmetros analíticos para avaliação da robustez do método por CLAE para quantificação de artemeter e lumefantrina .....</b>	<b>74</b>
<b>30 Limites de detecção e quantificação de artemeter e lumefantrina determinados pela equação da reta e pela razão sinal/ruído .....</b>	<b>75</b>
<b>31 Teores de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada, determinados por CLAE (<math>n = 6</math>) .....</b>	<b>76</b>
<b>32 Diluições para avaliação da linearidade do método bioanalítico por LC-MS/MS para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma humano.....</b>	<b>87</b>
<b>33 Concentrações plasmáticas de artemeter e lumefantrina para construção das curvas analíticas e avaliação da linearidade .....</b>	<b>88</b>
<b>34 Taxas de recuperação de artemeter, lumefantrina, artesunato e halofantrina obtidas pelo procedimento de extração líquido-líquido .....</b>	<b>109</b>
<b>35 Condição da eluição em gradiente inicialmente avaliada para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma por LC-MS/MS .....</b>	<b>111</b>
<b>36 Condição da eluição em gradiente adotada para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma por LC-MS/MS.....</b>	<b>114</b>
<b>37 Dados obtidos para construção da curva analítica de artemeter, no primeiro dia de análise, pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....</b>	<b>125</b>

<b>38</b> Equações das retas e respectivos coeficientes de correlação obtidos para artemeter, na avaliação da linearidade do método bioanalítico .....	126
<b>39</b> Dados obtidos para construção da curva analítica de lumefantrina, no primeiro dia de análise, pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.....	131
<b>40</b> Equações das retas e respectivos coeficientes de correlação obtidos para lumefantrina, na avaliação da linearidade do método bioanalítico.....	131
<b>41</b> Resultados da precisão e exatidão intra-corrída obtidos pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....	133
<b>42</b> Resultados da precisão e exatidão inter-corrídas obtidos pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....	134
<b>43</b> Resultados da recuperação do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....	135
<b>44</b> Resultados do teste de efeito de matriz para o método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....	136
<b>45</b> Resultados da precisão e exatidão para o limite inferior de quantificação obtidos pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....	137
<b>46</b> Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de curta duração (6 h) do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....	139
<b>47</b> Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de longa duração do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....	140
<b>48</b> Resultados obtidos na avaliação da estabilidade pós-processamento (10 h) do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....	141
<b>49</b> Resultados obtidos na avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.....	142
<b>50</b> Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de solução padrão do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....	143

<b>51 Resultados obtidos na avaliação da estabilidade do padrão interno em plasma no método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina .....</b>	<b>144</b>
<b>52 Resultados das análises físico-químicas dos comprimidos de Coartem<sup>®</sup> utilizados no estudo de farmacocinética .....</b>	<b>145</b>
<b>53 Dados sobre sexo, idade e índice de massa corporal (IMC) dos voluntários participantes do estudo de farmacocinética de artemeter e lumefantrina.....</b>	<b>146</b>
<b>54 Concentrações plasmáticas individuais de lumefantrina (LMF) obtidas após administração de quatro comprimidos de Coartem<sup>®</sup> (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em seis voluntários sadios .....</b>	<b>149</b>
<b>55 Concentrações plasmáticas individuais de artemeter (ATM) obtidas após administração de quatro comprimidos de Coartem<sup>®</sup> (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em seis voluntários sadios .....</b>	<b>150</b>
<b>56 Análises das concentrações plasmáticas de lumefantrina (LMF) ao longo do tempo, após administração de quatro comprimidos de Coartem<sup>®</sup> (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em cinco voluntários sadios .....</b>	<b>151</b>
<b>57 Análises das concentrações plasmáticas de artemeter (ATM) ao longo do tempo, após administração de quatro comprimidos de Coartem<sup>®</sup> (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em cinco voluntários sadios .....</b>	<b>152</b>
<b>58 Parâmetros farmacocinéticos de artemeter e lumefantrina obtidos após administração de quatro comprimidos de Coartem<sup>®</sup> (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em voluntários sadios ..</b>	<b>153</b>
<b>59 Parâmetros farmacocinéticos de artemeter administrados por via oral em voluntários sadios e pacientes com malária citados em diferentes referências da literatura.....</b>	<b>155</b>
<b>60 Parâmetros farmacocinéticos de lumefantrina administrados por via oral em voluntários sadios e pacientes com malária citados em diferentes referências da literatura.....</b>	<b>155</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ACT	<i>Atemisinin based combination therapy</i>
Am	Amostra
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
API	<i>Atmospheric pressure ionization</i>
APPI	<i>Atmospheric pressure photo ionization</i>
ASC <sub>0-t</sub>	Área sob a curva do tempo zero ao último ponto de coleta
ASC <sub>0-∞</sub>	Área sob a curva do tempo zero até extrapolação ao infinito
ATM	Artemeter
ATS	Artesunato
b	Inclinação da curva analítica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
C <sub>máx</sub>	Concentração plasmática máxima
CV	Coefficiente de variação
Da	Dalton (s)
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPa	Desvio padrão do intercepto
DPR	Desvio padrão relativo
ECD	Estabilidade de curta duração
ECCD	Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento
ELD	Estabilidade de longa duração
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPP	Estabilidade pós-processamento

ESI	<i>Eletrospray ionization</i>
ESP	Estabilidade de solução padrão
eV	Elétron Volt (s)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-ICR	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
HAL	Halofantrina
ICF	Instituto de Ciências Farmacêuticas
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IMC	Índice de massa corporal
IT	<i>Ion trap</i>
<i>k</i>	Fator de retenção
$K_e$	Constante de eliminação
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography- mass spectrometry</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography- tandem mass spectrometry</i>
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid chromatography- eletrospray ionization – tandem mass spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LM-HM	<i>Low mass/high mass</i>
LMF	Lumefantrina
LQ	Limite de quantificação
M	$\text{Mol.l}^{-1}$
MS	Massas
mM	Mili mol
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
m/z	Massa / carga
N	Número de pratos teóricos
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pa	Padrão
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

p/v	Peso por volume
QBS	<i>Quantitative buffy-coat</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	Resolução
r	Coefficiente de correlação
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RF	Radio frequência
SQR	Substância química de referência
S/R	Razão sinal/ruído
T	Fator de cauda
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia vida
T <sub>máx</sub>	Tempo para atingir concentração plasmática máxima
TOF	<i>Time of flight</i>
tr	Tempo de retenção
t <sub>0</sub>	Tempo morto
UV	Ultravioleta
V	Volt (s)
v/v	Volume por volume

---

**SUMÁRIO**

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>01</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>05</b>
<b>2 Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>05</b>
2.1 Ciclo biológico da malária .....	05
2.2 Quadro clínico e diagnóstico.....	05
2.3 Agentes antimaláricos.....	07
2.4 Tratamento.....	10
2.5 Profilaxia .....	11
2.6 Resistência a drogas antimaláricas .....	13
2.7 Associação de artemeter e lumefantrina.....	14
2.8 Métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em matrizes biológicas.....	17
2.8.1 Estudos de biodisponibilidade e farmacocinética .....	17
2.8.2 Extração e preparo de amostras .....	18
2.8.3 Métodos de análise e detecção .....	18
2.8.4 Validação de métodos bioanalíticos.....	21
2.9 Métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina.....	22
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
<b>CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ARTEMETER E LUMEFANTRINA EM MATÉRIAS-PRIMAS E COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA .....</b>	<b>30</b>
<b>1 Materiais e métodos .....</b>	<b>31</b>
1.1 Materiais .....	31
1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras .....	31
1.1.2 Reagentes e vidrarias .....	31
1.1.3 Equipamentos e materiais .....	31
1.2 Métodos .....	32
1.2.1 Caracterização das matérias-primas de artemeter e lumefantrina .....	32
1.2.2 Quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica .....	33
1.2.2.1 Condições cromatográficas.....	33
1.2.2.2 Preparo das soluções padrão e amostra de artemeter .....	33
1.2.2.3 Validação parcial do método cromatográfico .....	34

1.2.2.3.1 Linearidade.....	34
1.2.2.3.2 Precisão .....	34
1.2.2.3.3 Seletividade .....	35
1.2.2.4 Doseamento de artemeter matéria-prima por CLAE .....	35
1.2.3 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de lumefantrina em matéria-prima e comprimidos.....	35
1.2.3.1 Condições analíticas .....	35
1.2.3.2 Preparo das soluções padrão e amostra de lumefantrina.....	36
1.2.3.3 Validação dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico.....	36
13.2.3.3.1 Linearidade.....	36
1.2.3.3.2 Precisão .....	37
1.2.3.3.3 Exatidão .....	37
1.2.3.3.4 Seletividade.....	38
1.2.3.3.5 Limites de detecção e quantificação .....	38
1.2.3.3.6 Robustez .....	39
1.2.3.4 Quantificação de lumefantrina em matéria-prima e comprimidos .....	41
1.2.4 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE com detecção UV para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada .....	42
1.2.4.1 Condições analíticas .....	42
1.2.4.2 Preparo das soluções padrão e amostra de artemeter e lumefantrina .....	42
1.2.4.3 Validação.....	43
1.2.4.3.1 Linearidade.....	43
1.2.4.3.2 Precisão .....	44
1.2.4.3.3 Exatidão .....	45
1.2.4.3.4 Seletividade.....	46
1.2.4.3.5 Robustez .....	46
1.2.4.3.6 Limites de detecção e quantificação .....	47
1.2.4.4 Quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada .....	47
<b>2 Resultados e discussão .....</b>	<b>49</b>
2.1 Caracterização das matérias-primas de artemeter e lumefantrina .....	49
2.2 Quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica.....	52
2.2.2 Validação parcial do método cromatográfico .....	53
2.2.2.1 Linearidade.....	53
2.2.2.2 Precisão .....	54
2.2.2.3 Seletividade.....	54
2.2.3 Doseamento de artemeter matéria-prima por CLAE.....	55

2.3 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de lumefantrina em matéria-prima e comprimidos .....	55
2.3.1 Validação dos métodos cromatográfico e espectrofotométricos.....	56
2.3.1.1 Linearidade.....	56
2.3.1.2 Precisão .....	58
2.3.1.3 Exatidão .....	58
2.3.1.4 Seletividade.....	59
2.3.1.5 Limites de detecção e quantificação .....	59
2.3.1.6 Robustez .....	61
2.3.2 Quantificação de lumefantrina em matéria-prima e comprimidos.....	65
2.4 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE com detecção UV para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada .....	67
2.4.1 Desenvolvimento do método cromatográfico.....	69
2.4.2 Validação .....	71
2.4.2.1 Linearidade.....	71
2.4.2.2 Precisão .....	72
2.4.2.3 Exatidão .....	73
2.4.2.4 Seletividade.....	73
2.4.2.5 Robustez .....	74
2.4.2.6 Limites de detecção e quantificação .....	75
2.4.3 Quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada....	76
<b>3 Conclusões.....</b>	<b>78</b>
<b>CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ARTEMETER E LUMEFANTRINA EM PLASMA HUMANO.....</b>	<b>79</b>
<b>1 Materiais e métodos .....</b>	<b>80</b>
1.1 Materiais .....	80
1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras .....	80
1.1.2 Reagentes e vidrarias .....	80
1.1.3 Equipamentos e materiais .....	80
1.2 Métodos .....	81
1.2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em plasma humano por LC-MS/MS.....	81
1.2.1.1 Detecção por espectrometria de massas.....	81
1.2.1.2 Análise cromatográfica.....	82

1.2.1.3 Extração dos fármacos do plasma .....	83
1.2.1.4 Validação do método bioanalítico .....	85
1.2.1.4.1 Seletividade .....	85
1.2.1.4.2 Linearidade.....	86
1.2.1.4.3 Precisão e exatidão .....	89
1.2.1.4.4 Recuperação .....	90
1.2.1.4.5 Efeito de matriz.....	90
1.2.1.4.6 Limites inferior de quantificação (LIQ).....	91
1.2.1.4.7 Estabilidade .....	91
1.2.1.4.7.1 Estabilidade de curta duração (ECD).....	92
1.2.1.4.7.2 Estabilidade de longa duração (ELD).....	92
1.2.1.4.7.3 Estabilidade pós-processamento (EPP).....	92
1.2.1.4.7.4 Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento (ECCD).....	93
1.2.1.4.7.5 Estabilidade de soluções padrão (ESP).....	93
1.2.1.5 Avaliação da farmacocinética de artemeter e lumefantrina administrados em comprimidos de dose fixa combinada .....	94
1.2.1.5.1 Casuística.....	94
1.2.1.5.2 Plano de coleta de amostras e análise de dados.....	96
1.2.2 Estudo de fragmentação de artemeter e lumefantrina por espectrometria de massas ...	96
<b>2 Resultados e discussão .....</b>	<b>98</b>
2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em plasma humano por LC-MS/MS.....	98
2.1.1 Detecção por espectrometria de massas.....	98
2.1.2 Extração dos fármacos do plasma e análise cromatográfica.....	106
2.1.3 Validação do método bioanalítico .....	120
2.1.3.1 Seletividade .....	120
2.1.3.2 Linearidade .....	125
2.1.3.3 Precisão e exatidão .....	133
2.1.3.4 Recuperação .....	134
2.1.3.5 Efeito de matriz.....	135
2.1.3.6 Limites inferior de quantificação (LIQ).....	137
2.1.3.7 Estabilidade .....	138
2.1.3.7.1 Estabilidade de curta duração (ECD).....	139
2.1.3.7.2 Estabilidade de longa duração (ELD).....	139
2.1.3.7.3 Estabilidade pós-processamento (EPP).....	141
2.1.3.7.4 Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento (ECCD). 142	

2.1.3.7.5 Estabilidade de soluções padrão (ESP).....	143
2.1.4 Avaliação da farmacocinética de artemeter e lumefantrina administrados em comprimidos de dose fixa combinada .....	145
2.1.4.1 Análise físico-química dos comprimidos utilizados no estudo .....	145
2.1.4.2 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos de artemeter e lumefantrina ....	146
2.2 Estudo de fragmentação de artemeter e lumefantrina por espectrometria de massas ....	159
<b>3 Conclusões.....</b>	<b>174</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>175</b>
<b>APÊNDICE A – Publicações e manuscritos decorrentes do trabalho .....</b>	<b>189</b>
<b>APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido para a etapa clínica do estudo de biodisponibilidade .....</b>	<b>242</b>
<b>ANEXO A - Ofício de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da UFMG .....</b>	<b>246</b>

# **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar de muito antiga, a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Atualmente, cerca de 109 países no mundo apresentam malária, sendo que praticamente metade destes está localizada na África, ao sul do Saara. Embora esse número seja consideravelmente menor do que o encontrado na década de 1950 (140 países), mais de 3,3 milhões de pessoas no mundo ainda estão sob o risco de contrair malária (WORLD, 2008).

A incidência de malária no mundo é estimada entre 189 e 327 milhões de casos por ano. Cerca de 86% desses casos ocorrem na África e a maioria é causada por *Plasmodium falciparum*. O número de mortes por malária varia entre 610000 e 1212000 por ano, dos quais cerca de 810000 ocorrem em crianças africanas menores de 5 anos. Essas mortes infantis, resultantes principalmente de malária cerebral e anemia, constituem aproximadamente 25% da mortalidade infantil na África (WORLD, 2008).

Na América Latina, o maior número de casos é verificado na Amazônia brasileira, com registro de cerca de 500 mil casos por ano. O desenvolvimento intensificado da Amazônia nas décadas de 70 e 80 acelerou o processo migratório, atraindo moradores de outras localidades do país. Nessa região, as precárias condições sócio-econômicas da população migrante determinaram a rápida expansão da malária (BRAGA & FONTES, 2002).

No Brasil, a incidência de malária em 2006 foi de 540.047 casos, sendo que os estados do Amazonas, Rondônia, Pará e Acre foram responsáveis por 87,9% dos mesmos. Na Amazônia legal, as infecções causadas pela espécie *P. vivax* prevalecem. Em 2006, foram registrados cerca de 396.000 casos de malária por essa espécie, correspondendo a 73,4% das notificações (BRASIL, 2006b).

Durante o século passado, a malária foi reconhecida como um problema de saúde grave pelas autoridades sanitárias e grandes avanços foram realizados no sentido de compreender a biologia da doença e do parasita, visando o desenvolvimento de métodos de controle. Desta forma, na década de 1950, a combinação de inseticidas potentes e fármacos a baixo custo trouxeram, por um breve momento, a possibilidade de erradicação da doença. Entretanto, a malária continua sendo um dos maiores problemas de saúde mundial no século 21, uma vez que os planos de erradicação da doença falharam por diversos motivos, como instabilidade política, dificuldades econômicas regionais, desenvolvimento de resistência do parasita aos fármacos e inseticidas e investimento insuficiente na descoberta de novos fármacos (WINSTANLEY, 2001).

Além de ser uma doença grave, a malária também envolve problemas sócio-econômicos a curto e longo prazo. Os custos médicos associados à doença são grandes, incluindo consultas médicas, diagnóstico, tratamento com medicamentos e medidas de prevenção. Em adição a essas despesas, os custos relacionados à malária em países pobres envolvem também o sofrimento dos pacientes, retardo físico e cognitivo no desenvolvimento de crianças e conseqüentemente baixo desempenho na escola, anemia e aumento da vulnerabilidade a outras doenças. Além disso, a malária incapacita os trabalhadores, aumentando as taxas de ausência ao emprego, e desencoraja o turismo e investimentos financeiros na região, reduzindo as oportunidades para o desenvolvimento econômico (SACHS & MALANEY, 2002; GUERIN *et al.*, 2002).

Um dos maiores desafios encontrados para o controle mundial da malária é o crescimento e intensificação da resistência do parasita aos antimaláricos em utilização clínica. O número limitado destes fármacos aumenta as dificuldades para o desenvolvimento de esquemas terapêuticos eficazes e controle adequado da doença (WORLD, 2008). Com o aumento de resistência tanto em relação aos fármacos antimaláricos como a inseticidas, o desenvolvimento de uma vacina para malária tem criado grande expectativa. Entretanto, pesquisas sobre vacinas nas últimas três décadas têm se caracterizado por repetidas falhas, devido à complexidade do parasita, falta de modelos animais apropriados e falta de conhecimento sobre os mecanismos imunes envolvidos na proteção (GUERIN *et al.*, 2002).

Atualmente, a resistência à cloroquina é altamente difundida em áreas endêmicas e já foram registrados casos de resistência de *P. falciparum* a todas as classes de fármacos, exceto aos derivados de artemisinina (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002). Por isso, a terapia de combinação com artemisinina (ACT – *artemisinin based combination therapy*) tem sido proposta como uma alternativa promissora para esse tipo de tratamento, apresentando alta eficácia clínica e segurança (MARTENSSON *et al.*, 2005).

Nem todas as falhas observadas no tratamento da malária se devem ao desenvolvimento de resistência. Fatores críticos que devem ser avaliados quando há falha terapêutica incluem a verificação da qualidade e do prazo de validade do medicamento, se a dose administrada pelo paciente foi correta e se o fármaco foi devidamente absorvido no trato gastrintestinal (SHANKS, 2006).

Além disso, o problema relacionado a medicamentos antimaláricos falsificados ou de má qualidade é bem conhecido em várias partes do mundo, incluindo África e sudeste da Ásia. A utilização desses medicamentos pode contribuir para o desenvolvimento de resistência do plasmódio em áreas endêmicas de malária, devido à exposição a doses

subterapêuticas do fármaco (GREEN *et al.*, 2001; ATEMNKENG *et al.*, 2007a). Desta forma, o desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para identificação e quantificação de antimaláricos são de grande importância para avaliar e garantir a qualidade dos medicamentos comercializados e distribuídos atualmente. Tal medida pode contribuir para assegurar a eficácia do tratamento e diminuir o desenvolvimento de resistência a antimaláricos.

Com a intensificação do uso da associação de artemeter-lumefantrina como um tratamento promissor para malária causada por *P. falciparum* resistente, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos bioanalíticos para quantificação simultânea desses fármacos em plasma, importantes para realização de estudos sobre biodisponibilidade e farmacocinética. Há, ainda, possibilidade de interesse na produção de medicamentos genéricos futuramente, de forma que tais métodos bioanalíticos podem ser úteis também para os estudos de bioequivalência.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ciclo biológico da malária

A malária humana pode ser causada por quatro espécies de protozoários intracelulares do gênero *Plasmodium*, sendo eles *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. A infecção malárica inicia-se quando esporozoítos infectantes são inoculados no homem por mosquitos do gênero *Anopheles*. Essas formas parasitárias saem rapidamente da circulação sanguínea e se alojam nos hepatócitos, onde se transformam, multiplicam e originam esquizontes tissulares. Essa fase assintomática é denominada pré-eritrocítica e dura cerca de 5 a 15 dias. Em seguida, os esquizontes se rompem, cada qual liberando milhares de merozoítos que caem na circulação, invadem os eritrócitos e iniciam, assim, o ciclo eritrocítico (BRAGA & FONTES, 2002; HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

Nos eritrócitos, a maioria dos parasitas se reproduz assexuadamente, originando merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos, que continuarão seu desenvolvimento no mosquito vetor. Os eritrócitos contendo parasitas se rompem, cada qual liberando 6 a 24 merozoítos, sendo esse processo o responsável pelas crises febris (BRAGA & FONTES, 2002; HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito *Anopheles* ingere as formas sanguíneas do parasita, mas somente os gametócitos são capazes de se desenvolver no inseto. No intestino do mosquito, o processo de gametogênese é estimulado, formando-se zigotos. Essas formas do parasita se desenvolvem na parede do intestino do inseto e dão origem a esporozoítos infectantes, que se alojam nas glândulas salivares do mosquito. Esse inseto pode, então, infectar outro hospedeiro humano ao exercer a hematofagia (BRAGA & FONTES, 2002; HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

### 2.2 Quadro clínico e diagnóstico

Uma fase sintomática inicial, caracterizada por mal-estar, cefaléia, cansaço e mialgia, geralmente precede a clássica febre da malária. O ataque paroxístico agudo

(acesso malárico), coincidente com a ruptura das hemácias ao final da esquizogonia, é acompanhado de calafrios e sudorese. Essa fase dura cerca de 15 minutos a uma hora, sendo seguida por uma fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41 °C ou mais. Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente, relacionado ao tempo de ruptura de hemácias, que é de 48 horas para o *P. falciparum* e *P. vivax* (BRAGA & FONTES, 2002).

NUNES & FERREIRA (2007) analisaram o quadro clínico de 326 pacientes diagnosticados com malária não-complicada na região amazônica. Treze sintomas foram identificados nos pacientes, sendo eles febre, calafrio, sudorese, cefaléia, mialgia, artralgia, dor abdominal, náusea, vômito, tonteira, tosse, dispnéia e diarreia. Os sintomas mais freqüentes foram cefaléia (59,8% dos casos), febre (57,1%) e mialgia (48,4%). 29,4% dos casos de malária diagnosticados foram assintomáticos. A prevalência e a intensidade da febre e dos demais sintomas clínicos variaram de forma significativa em relação à parasitemia, idade dos pacientes, exposição cumulativa à malária, infecção recente à doença e espécie do parasita.

O quadro de malária complicada inclui sintomas como anemia, hepatoesplenomegalia, comprometimento cerebral, falência renal e choque. Estas complicações podem comprometer gravemente o estado de saúde do paciente e levar à morte (KNUDSON *et al.*, 2007).

As manifestações clínicas da malária em áreas de alta transmissão são mais freqüentes em crianças e jovens, enquanto as infecções assintomáticas são mais comuns em indivíduos de maior idade. Isso indica que a imunidade é adquirida gradualmente e está relacionada com a idade em que ocorreu a primeira exposição à doença (KNUDSON *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza tanto o diagnóstico clínico quanto o laboratorial como norteadores da terapêutica da malária. Os sintomas da malária são inespecíficos, não sendo possível a distinção clínica entre malária e outras infecções agudas do homem. Com isso, o diagnóstico de certeza da infecção malárica só é possível pela demonstração do parasita ou de antígenos específicos no sangue periférico do paciente. As técnicas mais utilizadas para o diagnóstico laboratorial são gota espessa e esfregaço sanguíneo, que se baseiam na visualização do parasita por meio de microscopia óptica, após coloração com corantes específicos (azul de metileno e Giemsa) (BRAGA & FONTES, 2002).

Vários métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial têm sido desenvolvidos nos últimos anos, como o QBC (*quantitative buffy-coat*),

imunofluorescência, testes de ELISA para detecção do antígeno de *P. falciparum* e uso de métodos moleculares por PCR (*polymerase chain reaction*). Entretanto, nenhum desses testes é usado rotineiramente devido à complexidade e custo elevado (GUERIN *et al.*, 2002).

### 2.3 Agentes antimaláricos

Os antimaláricos podem ser classificados pelo estágio do parasita no qual agem, pelas indicações clínicas de seu uso ou classe química (HARDMAN & LIMBIRD, 2003).

De acordo com o estágio do ciclo de vida do parasita no qual agem, os antimaláricos podem ser classificados em esquizotocidas sanguíneos, esquizotocidas teciduais, gametocidas e esporontocidas (SWEETMAN, 2005).

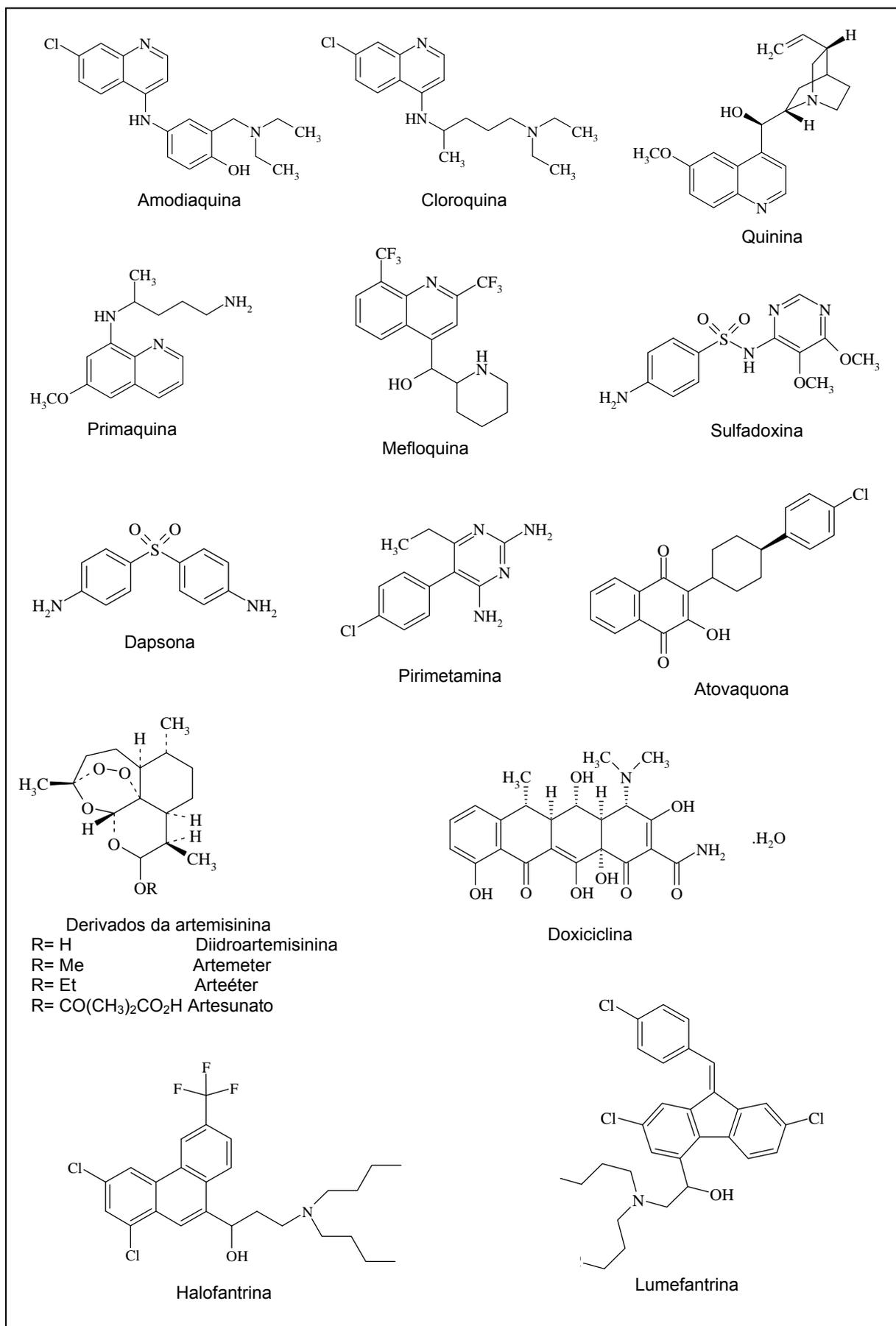
Os esquizotocidas sanguíneos agem nas fases eritrocíticas dos parasitas, que são diretamente responsáveis pelos sintomas clínicos da doença. Eles podem promover a cura clínica ou a supressão da infecção por isolados de plasmódios suscetíveis. Entretanto, como não exercem efeito nas formas exoeritrocíticas, os esquizotocidas sanguíneos não levam à cura radical em relação às recaídas devido a infecção por *P. vivax* ou *ovale* (SWEETMAN, 2005).

Os esquizotocidas teciduais atuam nas fases exoeritrocíticas do parasita. São usados para profilaxia, prevenindo a invasão de células sanguíneas, e para evitar recaídas, levando à cura radical de infecções por *P. vivax* ou *ovale* (SWEETMAN, 2005).

Os gametocidas destroem as formas sexuadas do parasita, interrompendo a transmissão da infecção ao mosquito vetor. Os esporontocidas não apresentam ação direta nos gametócitos no hospedeiro humano, mas previnem a esporogonia no mosquito (SWEETMAN, 2005).

Os principais antimaláricos disponíveis atualmente e suas estruturas químicas estão representados na Figura 1.

A cloroquina, principal fármaco utilizado no tratamento de *P. vivax*, é um potente agente esquizotocida sanguíneo, eficaz contra formas eritrocitárias do parasita, mas que não exerce nenhum efeito sobre os esporozoítas ou gametócitos.



**Figura 1 – Estrutura química dos principais antimaláricos disponíveis atualmente.**

A cloroquina atua, principalmente, no processamento do heme, ao impedir a digestão da hemoglobina pelo parasita. Na atualidade, *P. falciparum* tornou-se resistente à cloroquina na maior parte do mundo (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

A amodiaquina possui ação muito semelhante à da cloroquina e já foi retirada do mercado, visto que causava agranulocitose. Entretanto, voltou a ser utilizada na atualidade devido à alta incidência de resistência à cloroquina (RANG *et al.*, 2004).

A quinina é um alcalóide derivado da casca de cinchona e trata-se de um agente esquizonticida sanguíneo, eficaz contra formas eritrocitárias. Assim como a cloroquina, seu mecanismo de ação está associado à inibição da heme polimerase do parasita. A mefloquina também é esquizonticida sanguíneo, que exibe atividade contra *P. falciparum* e *P. vivax*, mas é inativa contra as formas hepáticas do parasita, sendo freqüentemente associada à pirimetamina. Outro potente esquizonticida sanguíneo é a halofantrina, ativa contra isolados de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, pirimetamina e quinina. É eficaz também contra a forma eritrocitária do *P. vivax*. A lumefantrina, estruturalmente relacionada à halofantrina, é eficaz contra *P. falciparum*, particularmente quando combinada com mefloquina ou derivados de artemisinina (RANG *et al.*, 2004).

Os agentes antifolato são classificados em compostos de tipo 1 e tipo 2. Os antifolatos de tipo 1 incluem as sulfonamidas (sulfadoxina) e sulfonas (dapsona), que inibem a síntese do folato ao competirem com o ácido *p*-aminobenzóico. Os antifolatos do tipo 2 são fármacos como a pirimetamina e a proguanil, que impedem a utilização do folato para a síntese de DNA. Esses compostos exercem ação contra formas eritrocitárias do parasita e são utilizados, geralmente, em associações com outros antimaláricos (RANG *et al.*, 2004).

A primaquina é o único antimalárico disponível atualmente ativo contra os hipnozoítas hepáticos. Esse fármaco não afeta os esporozoítas e exerce pouca ou nenhuma ação sobre o estágio eritrocitário do parasita. Entretanto, exerce ação gametocida, constituindo o agente antimalárico mais eficaz para prevenção da transmissão da doença (RANG *et al.*, 2004).

Alguns antibacterianos, como a doxiciclina e a tetraciclina são utilizados no tratamento do ataque agudo da malária, bem como na quimioprofilaxia. São utilizados, geralmente, em associação com outros agentes antimaláricos (RANG *et al.*, 2004).

Os compostos a base de artemisinina são derivados da erva *qing hao* (*Artemisia annua* L.), utilizada tradicionalmente pelos chineses contra malária. A artemisinina é um esquizonticida sanguíneo de ação rápida, eficaz no tratamento de ataque agudo da malária, incluindo malária resistente a cloroquina e malária cerebral. Os análogos sintéticos artesunato, artemeter e arteéter exibem maior atividade e são melhor absorvidos. Esses compostos concentram-se nos eritrócitos parasitados e apresentam ação gametocida (RANG *et al.*, 2004).

A atovaquona é um agente antimalárico que atua inicialmente inibindo a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial do parasita. A atovaquona e o antifolato proguanil são habitualmente utilizados em combinação, uma vez que atuam produzindo um efeito antimalárico sinérgico (RANG *et al.*, 2004).

Algumas substâncias naturais com atividade antimalárica, principalmente alcalóides, estão sendo isoladas de plantas. A descoberta e o isolamento de substâncias provenientes de produtos naturais tem sido proposta como uma abordagem promissora, uma vez que tais substâncias podem ser utilizadas como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

## 2.4 Tratamento

O tratamento quimioterápico adequado da malária é a medida mais efetiva para o controle da doença. O tratamento da malária visa a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção, e a interrupção da transmissão, pelo uso de fármacos que eliminam as formas sexuadas dos parasitas (BRAGA & FONTES, 2002).

O esquema terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde para tratamento de malária por *P. vivax* ou *P. malarie* consiste na administração, por três dias, de cloroquina, ativa contra formas sanguíneas e gametócitos, associada à primaquina por sete dias (BRASIL, 2006b). Para conseguir a cura radical da malária por *P. vivax* e *P. malarie*, a associação de primaquina, um esquizonticida tecidual, é essencial para erradicação dos hipnozoítas, formas latentes do parasita alojadas no fígado (WINSTANLEY, 2001).

Após surgimento da resistência do *P. falciparum* à cloroquina, constantes mudanças têm sido observadas no perfil de resposta deste plasmódio aos

antimaláricos convencionais. No Brasil, a partir de 1987, recomendava-se a associação de quinina e doxiciclina como esquema terapêutico para tratamento de *P. falciparum* (BRAGA & FONTES, 2002). Em dezembro de 2006, o Ministério da Saúde passou a adotar, como tratamento de primeira escolha para esse tipo de malária, associação de artemeter e lumefantrina, administrada em seis doses, por três dias. O esquema de segunda escolha consiste em quinina por três dias, doxiciclina por cinco dias e primaquina no sexto dia (BRASIL, 2006b).

Para o tratamento de malária mista (*P. falciparum* + *P. vivax*), o esquema terapêutico recomendado atualmente consiste na administração de artemeter e lumefantrina por três dias, associada à primaquina por dez dias (BRASIL, 2006b).

A adesão dos pacientes ao esquema terapêutico é um ponto crítico do tratamento, uma vez a baixa adesão leva a um grande número de recrudescências e aumenta a possibilidade de desenvolvimento de resistência (BRAGA & FONTES, 2002). A associação dos fármacos em uma única formulação, como artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada, facilita o tratamento e apresenta considerável vantagem em relação à maior adesão ao tratamento por parte dos pacientes (BAKSHI *et al.*, 2000).

## 2.5 Profilaxia

A profilaxia da malária pode ser realizada utilizando-se medidas de proteção individual, medidas de proteção coletiva ou quimioprofilaxia. A principal medida de proteção individual é a profilaxia de contato, que consiste em evitar o contato do mosquito com a pele do homem por meio do uso de repelentes, telas nas portas e janelas e mosquiteiros para dormir. Entretanto, essas medidas só se aplicam em situações especiais, como no caso de pessoas que eventualmente visitam as áreas endêmicas. O grande contingente de indivíduos que vivem nas áreas de transmissão não consegue, por razões óbvias, adotar constantemente essas medidas (BRAGA & FONTES, 2002).

Atualmente, algumas substâncias ativas são aprovadas para aplicação na pele na forma de repelentes. A N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) é a substância mais amplamente utilizado com eficácia e segurança comprovadas nas últimas décadas. O uso de novos agentes, como picaridina, e produtos naturais como óleo

de citronela ou eucalipto vem aumentando devido à sua baixa toxicidade e eficácia adequada (KATZ *et al.*, 2008).

A principal medida de proteção coletiva nas áreas endêmicas consiste na borrifação das paredes dos domicílios com inseticidas de ação residual (BATES & HERRINGTON, 2007). Além disso, medidas de combate às larvas e de saneamento básico exercem importante função no controle da doença (BRAGA & FONTES, 2002).

Como ainda não há disponível um fármaco profilático causal para a malária, a ação esquizontocida sanguínea de alguns antimaláricos tem sido usada como forma de prevenir suas manifestações clínicas. O fármaco mais largamente utilizado como profilático no Brasil é a mefloquina, cuja administração deve ser iniciada uma semana antes do deslocamento para o local de risco e interrompida após quatro semanas de regresso (BRAGA & FONTES, 2002).

O desenvolvimento e a implementação de uma vacina contra malária constituiriam uma das maiores inovações na saúde pública mundial atualmente (VEKEMANS & BALLOU, 2008). Em 1983, o gene da proteína circunsporozoíta (CSP), principal antígeno da superfície dos esporozoítas, foi clonado e a possibilidade de produção de uma vacina utilizando CSP pareceu iminente. Entretanto, atualmente, mais de 25 anos depois, ainda não há uma vacina que garanta imunidade protetora contra malária, apesar do considerável volume de informações sobre o genoma e proteoma dos parasitas (SHARMA & PATHAK, 2008).

Apesar da imunidade clínica à malária ser bem documentada em alguns adultos residentes em áreas endêmicas, as respostas imunes que ocorrem nestes indivíduos não são bem esclarecidas, limitando o desenvolvimento de um controle imunológico da doença (SHARMA & PATHAK, 2008).

Recentemente, vários antígenos e combinações, candidatos a vacina em potencial, entraram na fase clínica da pesquisa (VEKEMANS & BALLOU, 2008). Entretanto, o plasmódio é um parasita altamente complexo, com um ciclo de vida com estágios variados, durante o qual apresenta múltiplos antígenos com variabilidade significativa (GUINOVART & ALONSO, 2007). Além disso, a falta de modelos animais apropriados, as dificuldades para avaliação da eficácia da vacina em áreas endêmicas e a falta de conhecimento sobre os mecanismos imunes envolvidos na proteção podem ser apontadas como as principais razões para falhas

no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra malária (GUERIN *et al.*, 2002; SHARMA & PATHAK, 2008).

## 2.6 Resistência a fármacos antimaláricos

Atualmente, a resistência do *P. falciparum* à cloroquina é comum em praticamente todos os países onde a malária é endêmica, principalmente no oeste da África, aumentando as dificuldades em fornecer tratamentos adequados. Conseqüentemente, no início da década de 90, alguns países substituíram a cloroquina pela associação de sulfadoxina com pirimetamina como tratamento de primeira escolha. A resistência a essa associação, entretanto, se estabeleceu rapidamente e estudos recentes sugeriram que ocorreram alterações na susceptibilidade do parasita a sulfadoxina/pirimetamina, induzindo resistência clínica. A resistência à mefloquina é difundida em áreas como Tailândia e alguns países da África. A sensibilidade do parasita à quinina está declinando em vários países do sul da Ásia e na região Amazônica, onde esse fármaco é usado em associação com doxiciclina ou tetraciclina. Dessa forma, o uso de artemisinina e seus derivados tem aumentado como tratamento de primeira escolha em algumas destas áreas (WORLD, 2000).

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento e expansão da resistência à malária. Os genes mutantes do parasita que conferem resistência a antimaláricos ocorrem naturalmente, independente do efeito do fármaco, uma vez que os antimaláricos, normalmente, não são mutagênicos. Mutações pontuais ou em múltiplos pontos no genoma do plasmódio podem conferir resistência mediante o tratamento com antimaláricos (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

Características do fármaco são fatores importantes para o desenvolvimento de resistência. Fármacos com tempo de meia-vida longo, como mefloquina, permanecem em concentrações subterapêuticas no plasma, eliminando os parasitas mais suscetíveis e permitindo que aqueles mais resistentes se recuperem e se reproduzam (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

A resistência tem maior probabilidade de ocorrer quando a imunidade do paciente é baixa, o número de parasitas no indivíduo é elevado e o uso de medicamentos é intenso. A propensão para o desenvolvimento de resistência depende também das propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas do

fármaco. Aqueles com longo tempo de meia-vida e para os quais a resistência ocorre por mutação pontual selecionam parasitas resistentes rapidamente (GUERIN *et al.*, 2002).

A medida que vários antimaláricos, como cloroquina e sulfadoxina mais pirimetamina, vêm sendo substituídos por terapias de combinação com artemisinina mais eficazes, estratégias para monitorar o desenvolvimento de malária resistente devem ser atualizadas e otimizadas. A determinação do crescimento do parasita *in vitro* na presença de concentrações crescentes de antimaláricos é um dos métodos mais utilizados para avaliação da resistência dos parasitas. Tais testes determinam a susceptibilidade intrínseca do parasita aos fármacos, sem a influência dos fatores do hospedeiro, como imunidade ou farmacocinética (LAUFER *et al.*, 2007).

## 2.7 Associação de artemeter e lumefantrina

Devido à difundida resistência do *P. falciparum* a antimaláricos convencionais, vários países estão enfrentando dificuldades em relação ao tratamento da malária. A terapia de combinação com artemisinina (ACT – *artemisinin based combination therapy*) tem sido proposta como uma alternativa promissora para esse tipo de tratamento. O princípio da ACT se baseia no uso de dois fármacos com diferentes mecanismos 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. Estes dois fármacos associados são capazes de promover efetiva cura clínica e parasitológica e reduzir o índice de transmissão da doença, além de proteger um ao outro do desenvolvimento de resistência pelo *P. falciparum*. As três associações de ACT mais difundidas são artemeter com lumefantrina, artesunato com amodiaquina e artesunato com sulfadoxina e pirimetamina. (MARTENSSON *et al.*, 2005).

Atualmente, a ACT é considerada a melhor terapia para o tratamento de malária *falciparum*, e mudanças nas políticas da maioria dos países estão sendo feitas, de forma a adotar a ACT como terapia de primeira escolha para malária. As evidências de eficácia e segurança aumentaram significativamente nos últimos anos, de forma que essas associações se tornaram o grupo de antimaláricos mais estudados e com maior enfoque (NOSTEN & WHITE, 2007).

Artemeter-lumefantrina é uma associação de dose fixa combinada (20 mg de artemeter e 120 mg de lumefantrina), que foi inicialmente desenvolvida na China e, atualmente, é produzida principalmente pela indústria farmacêutica Novartis (Coartem<sup>®</sup>). A vantagem da associação está relacionada à rápida redução da parasitemia pelo artemeter, promovendo alívio dos sintomas, enquanto a lumefantrina elimina os parasitas residuais. Como os parasitas não são expostos ao artemeter isoladamente, devido a sua rápida eliminação, o desenvolvimento de resistência é minimizado. Mesmo que os parasitas fiquem expostos a lumefantrina isoladamente, a probabilidade do aparecimento de resistência aos dois fármacos simultaneamente é baixa (OMARI *et al.*, 2004).

Desde 2001, a Organização Mundial de Saúde recomenda que países onde o plasmódio é resistente aos tratamentos convencionais, como cloroquina, amodiaquina e sulfadoxina mais pirimetamina, adotem a ACT como tratamento de primeira escolha. Quatro ACT são atualmente recomendados pela OMS: artemeter com lumefantrina, artesunato com mefloquina, artesunato com amodiaquina e artesunato com sulfadoxina/pirimetamina (WORLD, 2003).

Quarenta países, vinte deles na África, adotaram oficialmente esses medicamentos para tratamento da malária desde 2001 e dezoito os adotaram em 2004. Dentre esses, quatorze países utilizam artemeter com lumefantrina como tratamento de primeira escolha para malária (WORLD, 2003). No Brasil, esta associação também foi adotada pelo Ministério da Saúde, a partir de dezembro de 2006.

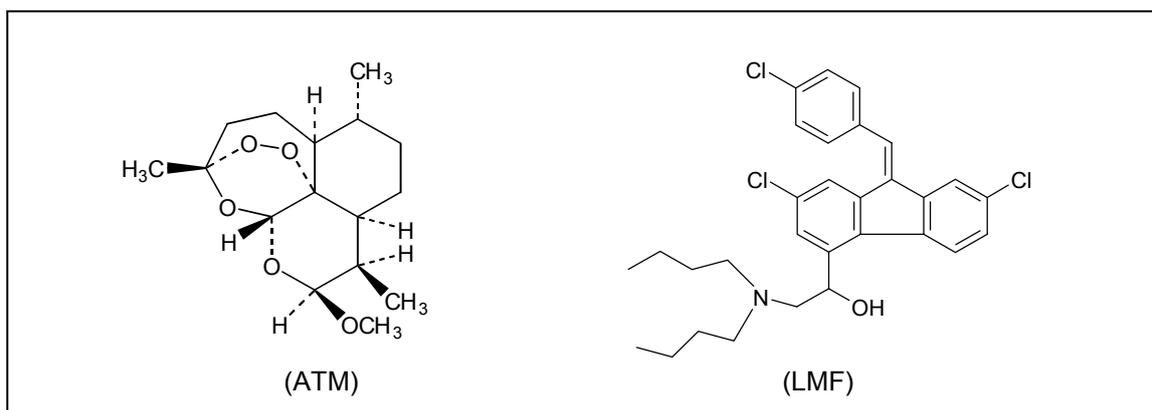
Segundo recomendações da OMS, um esquema terapêutico de seis doses de artemeter-lumefantrina deve ser utilizado. O esquema para adultos consiste na administração oral de quatro comprimidos da associação (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) a cada 8 horas no primeiro dia e a cada 12 horas no segundo e terceiro dias, totalizando seis doses. O esquema terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil também consiste em seis doses do medicamento, entretanto, as administrações são feitas a cada 12 horas, durante três dias (BRASIL, 2006b). O número de comprimidos por dose para crianças deve ser ajustado, conforme indicado na Tabela 1 (WORLD, 2003; BRASIL, 2006b).

As estruturas químicas de artemeter e lumefantrina estão representadas na Figura 2 (THE MERCK, 2001). Artemeter, também denominado diidroartemisinina metil éter, é o análogo sintético de artemisinina mais utilizado atualmente. Lumefantrina, inicialmente denominado benflumetol, é um aril álcool racêmico. Os

isômeros dextrógero e levógero são igualmente potentes, não havendo diferença nas atividades antimaláricas entre os enantiômeros isolados ou em mistura racêmica (WERNSDORFER *et al.*, 1998).

**Tabela 1 – Esquema terapêutico recomendado pela OMS e Ministério da Saúde do Brasil para tratamento de malária causada por *P. falciparum* com a associação de artemeter (ATM) e lumefantrina (LMF).**

Peso do paciente (kg)	Nº de comprimidos	Artemeter + lumefantrina por dose
<5	não recomendado	-
5-14	1	20 mg ATM + 120 mg LMF
15-24	2	40 mg ATM + 240 mg LMF
25-34	3	60 mg ATM + 360 mg LMF
>34	4	80 mg ATM + 480 mg LMF



**Figura 2 – Estruturas químicas de artemeter (ATM) e lumefantrina (LMF).**

VAN VUGT *et al.* (2000) avaliaram a eficácia e segurança de um esquema terapêutico de seis doses de artemeter e lumefantrina, comparado com um tratamento a base de artesunato associado a mefloquina. O estudo foi realizado com adultos e crianças que contraíram malária por *P. falciparum* na Tailândia. O tratamento com artemeter e lumefantrina foi melhor tolerado e tão eficiente quanto artesunato e mefloquina.

MARTENSSON *et al.* (2005) realizaram um estudo clínico comparando a eficácia de artesunato e amodiaquina com artemeter e lumefantrina em 408 crianças com malária por *P. falciparum* na Tanzânia. Ambos os tratamentos foram altamente eficazes, mas a associação de artemeter e lumefantrina promoveu maior prevenção contra reinfeção.

A tolerabilidade e segurança do tratamento com a associação de artemeter e lumefantrina foram investigadas por BAKSHI *et al.* (2000) em 1869 pacientes, incluindo adultos e crianças. A maioria dos efeitos adversos decorrentes da terapia envolveu sintomas gastrintestinais (dor abdominal, náusea, vômito) e relacionados ao sistema nervoso central (cefaléia), muitos dos quais coincidem com a sintomatologia ou evolução da malária. A associação artemeter e lumefantrina apresentou perfil adequado de tolerabilidade e segurança, favorável ao tratamento de malária por *P. falciparum*.

SUTHERLAND *et al.* (2005) avaliaram a eficácia do tratamento com a associação artemeter e lumefantrina, em relação à redução da transmissão da malária, comparada com o tratamento a base de cloroquina e sulfadoxina/pirimetamina. Após estudo clínico em 497 crianças, observou-se que o tratamento com artemeter e lumefantrina foi altamente eficiente na prevenção da transmissão de *P. falciparum* pós-tratamento, devido à ação específica contra gametócitos imaturos, e apresentou a capacidade de minimizar a transmissão de parasitas resistentes.

## **2.8 Métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em matrizes biológicas**

### *2.8.1 Estudos de biodisponibilidade e farmacocinética*

Os estudos de biodisponibilidade são úteis para determinação da eficácia e segurança de produtos farmacêuticos, assim como para avaliar o efeito de alterações nas propriedades físico-químicas do fármaco e o efeito da formulação na sua farmacocinética (SHARGEL *et al.*, 2005). Além disso, dados sobre a farmacocinética podem ser considerados ferramentas extremamente úteis para o estudo do destino do fármaco no organismo em diversas situações, tais como a co-administração de medicamentos, a presença de condições patológicas associadas, a interação fármaco-alimento, entre outras (CONSIGLIERI & STORPIRTIS, 2000).

Para determinar a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de fármacos em humanos, métodos bioanalíticos são necessários para quantificação destes fármacos e seus metabólitos em matrizes biológicas como plasma, urina e tecidos. Os estudos bioanalíticos têm duas fases. A primeira consiste no

desenvolvimento e validação do método analítico, e a segunda, na análise das amostras em estudo (HOPFGARTNER & BOURGOGNE, 2003).

A execução de ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos requer planejamento criterioso, de modo a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Devem ser considerados aspectos fundamentais, tais como a conformidade dos produtos em estudo em relação aos parâmetros físicos e físico-químicos previamente estabelecidos, os procedimentos de seleção de voluntários sadios e de coleta de amostras de líquidos biológicos, a metodologia analítica empregada na quantificação do fármaco, o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos e a adequada análise estatística dos dados (STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995).

### 2.8.2 *Extração e preparo de amostras*

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes biológicas, como soro, plasma e urina, em geral, requer um tratamento prévio da amostra. As razões para isso são inúmeras, destacando-se a complexidade das matrizes biológicas, a presença de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a baixa concentração das substâncias a serem analisadas (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Enquanto a análise cromatográfica consiste, predominantemente, em um processo automático, o pré-tratamento da amostra é realizado manualmente na maioria dos casos. Com isso, o tratamento prévio pode necessitar de maior tempo para desenvolvimento do método e análises rotineiras, comparando-se à separação cromatográfica e análise dos dados (SNYDER *et al.*, 1997).

As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou concentração de compostos presentes em fluídos biológicos são: precipitação de proteínas, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluído supercrítico e extração em membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas, sendo as três primeiras mais utilizadas em análises rotineiras (QUEIROZ *et al.*, 2001; SNYDER *et al.*, 1997).

### 2.8.3 *Métodos de análise e detecção*

Na análise cromatográfica, o tipo e os parâmetros do detector afetam diretamente a resposta relativa dos componentes da amostra e as interferências em potencial, de três formas correlacionadas: sensibilidade, seletividade e ruído de linha

de base. Para quantificação de fármacos em matrizes biológicas, torna-se necessária a utilização de um detector que apresente alta sensibilidade, capaz de quantificar concentrações reduzidas do fármaco, e alta seletividade, capaz de detectar apenas a substância de interesse na presença de outros componentes da matriz. A seleção do detector mais adequado à análise é feita de acordo com as características do fármaco a ser quantificado, concentração do analito na amostra, presença de interferentes, além de custo e disponibilidade dos detectores (SNYDER *et al.*, 1997).

Nos últimos dez anos, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas vem sendo largamente aplicada a análises tanto quantitativas quanto qualitativas de fármacos em meio biológico, e vem substituindo de forma ampla os outros tipos de detecção, como ultravioleta, eletroquímica e fluorescência, na área bioanalítica (XIA *et al.*, 2003; HOPFGARTNER & BOURGOGNE, 2003). As principais razões para este crescimento exponencial da espectrometria de massas são a elevada sensibilidade e seletividade da técnica, além da rapidez de análise (ZHOU *et al.*, 2005). Além disso, um espectrômetro de massas pode facilitar o desenvolvimento de métodos por CLAE e evitar problemas comuns, por meio da identificação de picos individuais nos cromatogramas e distinção entre compostos de interesse e interferentes em pequenas quantidades (SNYDER *et al.*, 1997).

O princípio da espectrometria de massas se baseia na produção de íons dos analitos em estudo, que são em seguida separados ou filtrados de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ). Os espectrômetros de massa podem ser divididos em uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector (ZHOU *et al.*, 2005).

As fontes de ionização a pressão atmosférica (API – *atmospheric pressure ionization*) mais comumente utilizadas são eletrospray (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI – *atmospheric pressure chemical ionization*), sendo que cada uma das técnicas tem aplicações distintas em relação a polaridade e massa molar dos analitos. Eletrospray é mais adequado a analitos polares ou iônicos, com ampla faixa de massa molar, enquanto ionização química a pressão atmosférica é mais aplicada a analitos com menor polaridade e massa molar pequena a média. No processo de ionização por eletrospray, os analitos são ionizados em solução e em seguida os íons são transferidos para fase gasosa por meio de aplicação de spray e voltagem específica, seguida da evaporação do solvente. Em ionização química a pressão atmosférica, os analitos são inicialmente transferidos para a fase gasosa e

em seguida ionizados por meio um processo no qual o solvente carregado transfere sua carga aos analitos. A ionização pode ser realizada no modo positivo, em que a molécula do analito recebe uma carga positiva (por exemplo,  $[M+H]^+$ ), ou negativo, quando o analito se torna carregado negativamente ( $[M-H]^-$ ) (ROSENBERG, 2003).

Como na ionização por APCI a evaporação do solvente ocorre por meio da aplicação de temperaturas elevadas, acima de 500 °C, a fragmentação do íon precursor ocorre em maior proporção, de forma que nem sempre é possível visualizá-lo no espectro de massas da substância. A ionização por ESI, por outro lado, é mais branda, apresenta maior probabilidade de preservar o íon precursor (menor fragmentação), o que é interessante para identificação da substância. As principais desvantagens da utilização de ESI comparado a APCI consistem na menor robustez em relação a interferências da matriz e alterações nas condições da fase móvel, além do fato que ESI originalmente utiliza fluxos muito baixos para introdução das amostras, sendo necessária a divisão (*split*) do fluxo que sai do cromatógrafo. Ainda assim, ESI é a fonte de ionização mais comumente utilizada para análise de fármacos (ROSENBERG, 2003).

Os efeitos de matriz (supressão ou indução iônica) durante o processo de ionização são um fenômeno comumente observado em ionização a pressão atmosférica (API), resultando em diminuição ou, mais raramente, em aumento do sinal. As alterações da intensidade do sinal são causadas pela co-eluição de substâncias endógenas como sais, aminas, ácidos graxos ou triglicérides, que interferem na ionização dos analitos. Estes efeitos são fortemente substância-dependentes, e são mais pronunciados quando se utiliza ESI comparando-se a APCI (HOPFGARTNER & BOURGOGNE, 2003). Para evitar o efeito de matriz, é necessária uma etapa inicial de extração e limpeza da amostra, por meio de técnicas como extração em fase sólida, extração líquido-líquido ou precipitação de proteínas. A segunda etapa envolve a utilização da cromatografia líquida, que separa o analito de interesse de outras substâncias indesejáveis (ZHOU *et al.*, 2005).

Mais recentemente, foto ionização a pressão atmosférica (APPI – *atmospheric pressure photo ionization*) tem sido utilizada como uma técnica de ionização alternativa, na qual os analitos são ionizados por meio de radiação proveniente de uma lâmpada ultravioleta. Entretanto, é uma técnica limitada, restrita a substâncias fotoionizáveis (ZHOU *et al.*, 2005).

Além da fonte de ionização, outro fator importante que afeta a performance dos equipamentos LC-MS são os analisadores de massa utilizados. A maior parte

dos métodos bioanalíticos quantitativos utilizam espectrômetro de massas do tipo tandem (MS/MS), que emprega dois filtros de massa e uma célula de colisão. Neste analisador, denominado triplo quadrupolo, o íon pai ou precursor é filtrado no primeiro quadrupolo (ou filtro de massas), sendo em seguida fragmentado na célula de colisão (segundo quadrupolo). O íon filho ou fragmento formado é então selecionado e filtrado no terceiro quadrupolo (ZHOU *et al.*, 2005). Desta forma, o triplo quadrupolo pode trabalhar no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), no qual as massas do íon precursor e do fragmento correspondentes ao analito são selecionadas no primeiro e terceiro quadrupolos, respectivamente. O par de massas do íon precursor e do fragmento é tipicamente conhecido como transição. A principal vantagem da utilização de um analisador triplo quadrupolo no modo MRM é o aumento considerável na sensibilidade e seletividade da técnica, necessárias a uma aplicação quantitativa (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

Outros tipos de analisadores utilizados são *ion trap* (IT) e *time-of-flight* (TOF). Esses analisadores são comumente empregados para elucidação estrutural e identificação de substâncias (XIA *et al.*, 2003). O analisador *ion trap* permite a realização de fragmentações sucessivas dos íons analisados ( $MS^n$ ), sendo que sua principal vantagem é a alta sensibilidade no modo de varredura (*scan*), permitindo a identificação de substâncias por meio da interpretação dos sucessivos espectros obtidos. *Time-of-flight* é um analisador que apresenta elevada exatidão e resolução na determinação das massas, além de alta sensibilidade e velocidade de aquisição, sendo adequado para diferenciação de substâncias isobáricas, que apresentam a mesma massa nominal, mas diferentes massas exatas (LACORTE & FERNANDEZ-ALBA, 2006). Atualmente, o analisador que apresenta maior resolução de massa, além de elevada exatidão, é o FT-ICR (*Fourier transform ion cyclotron resonance*), constituindo uma ferramenta importante na elucidação estrutural e desenvolvimento de novos fármacos (ZHANG *et al.*, 2005).

#### 2.8.4 Validação de métodos bioanalíticos

A validação de métodos bioanalíticos é o processo utilizado para garantir que os parâmetros analíticos estão adequados para o uso pretendido, garantindo a confiabilidade dos resultados. A quantificação de analitos em matrizes biológicas é suscetível a um grande número de variáveis, de forma que o processo de validação

de métodos cromatográficos aplicados em bioanálise é mais minucioso (CAUSON, 1997).

No processo de validação, todas as variáveis do método devem ser consideradas, incluindo procedimento de amostragem, preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e análise dos dados. No caso de métodos bioanalíticos, o procedimento de validação inclui, em um primeiro momento, a validação do método analítico, e em seguida, a validação da estabilidade dos analitos na matriz biológica. Todos os parâmetros devem ser avaliados antes da utilização do método para a análise rotineira (BRESSOLLE *et al.*, 1996).

Para métodos que visam a determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, devem ser avaliados os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, recuperação e estabilidade do fármaco em líquidos biológicos. A análise de todas as amostras de um analito em matriz biológica deve ser concluída dentro de um período de tempo para o qual a estabilidade tenha sido determinada (BRASIL, 2003).

## **2.9 Métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina**

Até o início do presente trabalho, não foram encontrados artigos publicados ou monografias oficiais que apresentassem métodos para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em produtos farmacêuticos, como comprimidos de dose fixa combinada. Na literatura científica, não há estudos para quantificação de lumefantrina em produtos farmacêuticos e apenas poucos artigos estão disponíveis para quantificação de artemeter em matéria-prima ou produto acabado.

A Farmacopéia Internacional 4<sup>a</sup> edição (THE INTERNATIONAL, 2006) apresenta monografias de artemeter matéria-prima, comprimidos e solução injetável. Os métodos de doseamento para estes produtos são cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta (216 nm), e um método alternativo, em que artemeter é submetido à hidrólise ácida, seguida da leitura em espectrofotômetro, em 254 nm. O método cromatográfico descrito é relativamente simples, entretanto, devido à baixa absorvidade de artemeter na região do

ultravioleta, a concentração de trabalho é consideravelmente alta (10 mg/ml), o que implica em elevado gasto de substância química de referência e amostras para realização do doseamento. O método alternativo por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta após hidrólise ácida, apesar de ser mais barato, é demorado, laborioso e nem sempre reprodutível.

GREEN *et al.* (2001) realizaram a identificação de artemeter, artesunato e diidroartemisinina em comprimidos utilizando reações colorimétricas. O método descrito é simples, podendo ser aplicado em laboratórios com poucos recursos financeiros, porém, é limitado a análises qualitativas ou semi-quantitativas dos fármacos. DEBNATH *et al.* (2006) quantificaram artemeter em formulações farmacêuticas por meio de polarografia de pulso diferencial, devido à capacidade de artemeter de sofrer reação de redução. O método foi devidamente validado e aplicado com sucesso à quantificação de artemeter em comprimidos e cápsulas. Entretanto, a técnica utilizada é pouco comum e poucos laboratórios dispõem de polarógrafos para realização destas análises.

Em dois trabalhos recentes, a quantificação de artemeter em produtos farmacêuticos foi realizada por CLAE com detecção UV, a 215 nm. ATEMNKENG *et al.* (2007a) realizaram a determinação de antimaláricos derivados da artemisinina em medicamentos utilizados no Quênia e Congo. Dos 24 medicamentos analisados, apenas 15 (62,5%) cumpriram com as especificações de teor preconizadas pela Farmacopéia Européia (95 a 105% do valor rotulado), além de terem sido verificados problemas relativos à falsificação e qualidade inadequada dos medicamentos. ATEMNKENG *et al.* (2007b) quantificaram artemeter, metilparabeno e propilparabeno em pó para suspensão oral pediátrica. Devido à grande diferença nas concentrações de trabalho dos três analitos, artemeter não foi quantificado simultaneamente com os parabenos.

Alguns métodos bioanalíticos para quantificação de artemeter ou lumefantrina isoladamente, no plasma, são descritos na literatura. Os métodos de extração e as condições cromatográficas destes métodos, obtidos em diferentes referências da literatura, estão demonstrados na Tabela 2.

Todos os métodos de extração disponíveis para análise de artemeter se baseiam em extração líquido-líquido. Os solventes extratores mais utilizados foram, geralmente, misturas de dois ou três solventes orgânicos, contendo isooctano, 1-clorobutano, diclorometano, metil-*t*-butil éter, cloreto de *n*-butila ou acetato de etila. Alguns autores (NAVARATNAM *et al.*, 1995; SANDRENAN *et al.*, 1997; SOUPPART

*et al.*, 2002) utilizaram solução saturada de cloreto de sódio para evitar a formação de emulsão durante a extração. Em todos os estudos, após agitação com o solvente extrator, a amostra foi centrifugada para separação das fases, a fase orgânica foi evaporada e o resíduo suspenso em solventes adequados para injeção no cromatógrafo. Para a lumefantrina, foram citadas extrações líquido-líquido e em fase sólida no preparo da amostra. Os solventes extratores para extração líquido-líquido utilizados foram mistura de ácido acético glacial e acetato de etila (1:100) (ZENG *et al.*, 1996), hexano e dietil éter (70:30) (MANSOR *et al.*, 1996) e ácido acético glacial e hexano (WAHAJUDDIN *et al.*, 2009). LINDEGARDH *et al.* (2005) avaliaram várias condições para extração em fase sólida de lumefantrina e otimizaram um método para extração e quantificação deste fármaco. ANNERBERG *et al.* (2005), do mesmo grupo de pesquisa de LINDEGARDH, utilizaram o método de extração em fase sólida otimizado para determinação de lumefantrina em plasma.

É interessante observar que houve uma nítida evolução dos métodos de detecção utilizados para quantificação de artemeter em plasma ao longo dos anos. Nos artigos mais antigos (THOMAS & WARD, 1992; MUHIA *et al.*, 1994), artemeter foi submetido a um processo de hidrólise ácida, formando um produto que apresenta absorção adequada na região do ultravioleta, permitindo a detecção a 254 nm. Este processo, no entanto, é relativamente trabalhoso, com muitas variáveis e pouco reprodutível, como testado em laboratório.

Todos os trabalhos consultados publicados entre 1995 e 1998 (NAVARATNAM *et al.*, 1995; KARBWANG *et al.*, 1997a; SANDRENAN *et al.*, 1997; VAN AGTMAEL *et al.*, 1998) para quantificação de artemeter em plasma empregaram detecção eletroquímica, utilizando a capacidade de artemeter de sofrer redução devido à presença de anel peróxido em sua estrutura. Como a maioria das reações de oxi-redução são pH específicas, todos os autores mencionados utilizaram fase móvel com pH 5,0.

Nos artigos mais recentes, o método de escolha para detecção de artemeter foi espectrometria de massas. Como a molécula de artemeter não possui funções ácidas ou básicas e apresenta baixa polaridade, SOUPPART *et al.* (2002) e SHI *et al.* (2006) utilizaram ionização química a pressão atmosférica (APCI) como fonte de ionização. XING *et al.* (2006) utilizaram fase móvel contendo tampão acetato de amônio 10 mM, levando à formação de um aduto entre artemeter e amônia e permitindo a quantificação do íon precursor de artemeter  $[M+NH_4]^+$  com a fonte de ionização por eletrospray (ESI). Todos os autores realizaram a detecção de

artemeter no modo positivo, no qual a molécula do fármaco recebe um próton (ou  $\text{NH}_4^+$ ), ficando carregada positivamente.

Pode-se observar, ainda, uma tendência em relação ao tipo de coluna das análises, de acordo com a detecção empregada. Os mesmos autores que utilizaram detecção na região do ultravioleta e por espectrometria de massas empregaram colunas  $\text{C}_{18}$ , enquanto nos trabalhos com detecção eletroquímica, a coluna de escolha foi ciano. Para utilização do detector eletroquímico, há uma clara limitação em relação à proporção de solvente orgânico na fase móvel, que deve ser constituída majoritariamente de eletrólitos, ou seja, elevada proporção de solvente aquoso acidificado ou tampões. Este fator aumenta de forma significativa o tempo de retenção e alargamento dos picos dos analitos. Tendo em vista que coluna ciano é menos retentiva para artemeter comparando-se com  $\text{C}_{18}$ , uma provável explicação para a tendência observada seria que a utilização de coluna ciano compensaria, em parte, o aumento no tempo de retenção dos analitos provocada pela alta proporção de solvente aquoso na fase móvel.

Nos trabalhos consultados para lumefantrina, colunas  $\text{C}_{18}$  e ciano foram utilizadas com sucesso pelos autores. Para quantificação em plasma, a maioria dos autores utilizou detecção na região do ultravioleta como método de escolha. O comprimento de onda selecionado (335 nm) é bastante seletivo em relação a possíveis interferentes. Além disso, lumefantrina apresenta alta absorvidade molar nesta região, permitindo, assim, uma detecção seletiva e sensível na região do ultravioleta. No trabalho de WAHAJUDDIN *et al.* (2009), os autores utilizaram espectrometria de massas como método de detecção, com fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo. É interessante observar que este trabalho é recente e a coluna empregada apresenta comprimento (3 cm) e tamanho de partículas (3,5  $\mu\text{m}$ ) reduzidos. Este fato demonstra a clara tendência na área de cromatografia para análise de medicamentos em trabalhar-se com colunas pequenas e com menor tamanho de partículas, de forma a manter ou aumentar a eficiência e a resolução cromatográfica, consumindo menos solventes e com tempo de corrida menor.

HODEL *et al.* (2009) desenvolveram um método por LC-MS/MS para detecção simultânea de quatorze antimaláricos em plasma humano, entre eles artemeter e lumefantrina. Para extração, os autores utilizaram um procedimento de precipitação de proteínas, seguido de evaporação do sobrenadante e reconstituição

do resíduo em fase móvel. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo.

Com exceção de ZENG *et al.* (1996), todos os autores utilizaram acetonitrila como solvente orgânico da fase móvel. Eluição isocrática foi empregada em todos os estudos, com o fluxo da fase móvel de 0,5 a 2,0 ml/min e tempo total de eluição variando entre 5 e 20 minutos.

**Tabela 2 – Métodos de extração e condições cromatográficas para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma, isoladamente.**

Referência	Fármaco	Método de extração	Fase móvel	Coluna	Fluxo (ml/min)	Tempo de eluição (min)	Deteção
THOMAS & WARD (1992)	Artemeter	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:água (50:50)	C <sub>18</sub> , 100 x 4,6 mm, 5 µm	0,7	20	Ultravioleta (254 nm), após hidrólise ácida
MUHIA <i>et al.</i> (1994)	Artemeter	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:água (60:40)	C <sub>18</sub> , 250 x 4,6 mm, 5 µm	2,0	6	Ultravioleta (254 nm), após hidrólise ácida
NAVARATNAM <i>et al.</i> (1995)	Artemeter	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:ácido acético 0,05 mol/L (15:85), pH 5,0	Ciano, 250 x 4 mm, 5 µm, a 30°C	1,5	20	Eletroquímica
KARBWANG <i>et al.</i> (1997a)	Artemeter	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:ácido acético 0,1 mol/L (20:80), pH 5,0	Ciano, 150 x 3,9 mm, 10 µm	1,2	15	Eletroquímica
SANDRENAN <i>et al.</i> (1997)	Artemeter	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 (15:85)	Ciano, 150 x 3,9 mm, 4 µm, 35 °C	1,0	15	Eletroquímica
VAN AGTMAEL <i>et al.</i> (1998)	Artemeter	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:tampão acetato 100 mM, pH 5,0 (40:60)	Ciano, 300 x 4,6 mm, 10 µm, 30 °C	1,0	20	Eletroquímica
SOUPPART <i>et al.</i> (2002)	Artemeter	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:ácido acético 0,1% (66:34)	C <sub>18</sub> , 150 x 4,6 mm, 5 µm, temp. amb.	1,0	14	Espectrometria de massas – APCI+
SHI <i>et al.</i> (2006)	Artemeter	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (80:20)	C <sub>18</sub> , 150 x 4,6 mm, 5 µm, 25 °C	1,0	6	Espectrometria de massas – APCI+

Tabela 2 (Continuação)

Referência	Fármaco	Método de extração	Fase móvel	Coluna	Fluxo (ml/min)	Tempo de eluição (min)	Deteção
XING <i>et al.</i> (2006)	Artemeter	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:tampão acetato de amônio 10 mM (85:15)	C <sub>18</sub> , 150 x 4,6 mm, 5 µm, 20 °C	0,8	6	Espectrometria de massas – ESI+
MANSOR <i>et al.</i> (1996)	Lumefantrina	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:acetato de amônio 0,1 M (90:10), pH 4,9	C <sub>18</sub> , 250 x 4,6 mm, 10 µm, temp. amb.	1,5	20	Ultravioleta (335 nm)
ZENG <i>et al.</i> (1996)	Lumefantrina	Extração líquido-líquido	Metanol:água:ác acético :dietilamina (93:6:1:0,03)	C <sub>18</sub> , 150 x 4,6 mm, 5 µm	1,0	15	Ultravioleta (335 nm)
LINDEGARDH <i>et al.</i> (2005)	Lumefantrina	Extração em fase sólida	Acetonitrila:tampão fosfato 0,1M, pH 2,0 (55:45)	Ciano, 250 x 4,6 mm, 25 °C	1,2	20	Ultravioleta (335 nm)
ANNERBERG <i>et al.</i> (2005)	Lumefantrina	Extração em fase sólida	Acetonitrila:tampão fosfato 0,1M, pH 2,0 (55:45)	Ciano, 250 x 4,6 mm, 25 °C	1,2	12	Ultravioleta (335 nm)
WAHAJUDDIN <i>et al.</i> (2009)	Lumefantrina	Extração líquido-líquido	Acetonitrila:metanol:tampão acetato de amônio 0,01 M, pH 5,5 (45:45:10)	C <sub>18</sub> , 30 x 2,1 mm, 3,5 µm	0,5	5	Espectrometria de massas – ESI+

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Contribuir com a avaliação da qualidade e da farmacocinética de medicamentos antimaláricos, por meio do desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em produtos farmacêuticos e plasma humano.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar a quantificação de artemeter e lumefantrina em matérias-primas farmacêuticas.
- Desenvolver e validar método analítico por CLAE com detecção ultravioleta para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada.
- Desenvolver e validar método bioanalítico por CLAE, com detecção por espectrometria de massas, para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em plasma humano.
- Determinar os parâmetros farmacocinéticos de artemeter e lumefantrina administrados concomitantemente em comprimidos de dose fixa combinada, em voluntários sadios.
- Realizar estudo das estruturas dos fragmentos e das rotas de fragmentação de artemeter e lumefantrina, obtidos por espectrometria de massas.

## **CAPÍTULO 2**

**Desenvolvimento e validação de métodos analíticos  
para quantificação de artemeter e lumefantrina em  
matérias-primas e comprimidos de dose fixa combinada**

## 1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Materiais

#### 1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras

- Artemeter SQR (Daфра Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 10203215, validade 04/2009.
- Lumefantrina SQR (Daфра Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 05083101, validade 08/2008.
- Artemeter matéria-prima (Daфра Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 0601010-4087, validade 08/2009.
- Lumefantrina matéria-prima (Daфра Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 06032403, validade 08/2008.
- Coartem<sup>®</sup> comprimidos - 20 mg artemeter + 120 mg lumefantrina (Novartis – Basel, Suíça), lotes 04137, F0107, F0168 e F0311, validades 11/2006, 10/2007, 12/2007 e 06/2008, respectivamente.
- Co-artesiane<sup>®</sup> comprimidos - 20 mg artemeter + 120 mg lumefantrina (Daфра Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 5002, validade 05/2007.

#### 1.1.2 Reagentes e vidraria

- Solventes e reagentes grau cromatográfico: acetonitrila, metanol, ácido trifluoroacético, diclorometano.
- Solventes e reagente grau analítico: ácido acético glacial, ácido perclórico, anidrido acético, clorofórmio.
- Água destilada e água deionizada em sistema Millipore.
- Pipetas, buretas e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres, erlenmeyers, pesa-filtros e kit de filtração.

#### 1.1.3 Equipamentos e materiais

- Aparelho de ultra-som BRANSONIC 220.
- Balança analítica SARTORIUS BP210D com precisão de 0,01 mg.

- Coluna cromatográfica Symmetry C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 µm) - WATERS.
- Coluna cromatográfica Ace C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 µm) - ACT.
- Coluna cromatográfica Zorbax C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 µm) - AGILENT.
- Coluna cromatográfica Zorbax SB-Ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm) - AGILENT.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência AGILENT 1200, com forno, injeção automática e detector de arranjo de diodos (DAD).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência HP 1100, com forno, injeção automática e detector de arranjo de diodos (DAD).
- Espectrofotômetro de absorção no infravermelho SHIMADZU Prestige 21.
- Estufa FANEM 306/1.
- Filtros de membrana de celulose regenerada de 0,45 µm.
- Potenciômetro METROHM HERISAU E510.
- Sistema de purificação de água Milli-Q-Plus MILIPORE.
- Titulador automático METTLER TOLEDO DL53.

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Caracterização das matérias-primas de artemeter e lumefantrina

As solubilidades das matérias-primas de artemeter e lumefantrina foram avaliadas em solventes comumente utilizados em análises laboratoriais e ensaios de dissolução, sendo eles água, etanol, metanol, acetonitrila, diclorometano, hexano, metil-*t*-butil éter, clorofórmio, acetato de etila, solução de hidróxido de sódio 0,1 M (pH 13,0), solução de ácido clorídrico 0,1 M (pH 1,0) e solução de lauril sulfato de sódio 0,5% (p/v).

Transferiu-se determinada quantidade de cada matéria-prima para erlenmeyer e foram adicionadas alíquotas sucessivas do solvente, exatamente medidas, até completa solubilização. Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente e foram utilizados os termos descritivos da Farmacopéia Brasileira 4ª edição para expressar a faixa de solubilidade em cada solvente.

Os espectros na região do ultravioleta, na faixa de 200 a 400 nm, e na região do infravermelho, na faixa de 4500 a 450 cm<sup>-1</sup>, foram obtidos para os padrões de ambos os fármacos. Para a análise no ultravioleta, preparou-se solução de artemeter a 1 mg/ml em etanol, e de lumefantrina a 20 µg/ml em diclorometano e metanol (1:50). Pastilhas de brometo de potássio foram preparadas para obtenção dos espectros na região do

infravermelho. Em cada espectro, foram determinados os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção.

### 1.2.2 Quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica

Uma adaptação do método descrito na Farmacopéia Internacional 4<sup>a</sup> edição (2006) para quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica foi realizada. O método original preconiza a utilização de coluna C<sub>18</sub>, de 250 mm de comprimento, e fase móvel composta por acetonitrila e água (62:38). Com o objetivo de reduzir o tempo de análise, o tamanho da coluna foi reduzido de 250 para 150 mm e a proporção de acetonitrila na fase móvel foi aumentada de 62 para 70%. A concentração de trabalho das soluções de artemeter foi reduzida de 10 para 4 mg/ml.

Foi realizada avaliação dos parâmetros linearidade, precisão intra-corrída, precisão inter-corrídas e seletividade do método analítico por CLAE para quantificação de artemeter em matéria-prima.

#### 1.2.2.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Agilent 1200 provido de detector ultravioleta (DAD) a 216 nm e coluna Zorbax C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 µm), mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi mistura de acetonitrila e água (70:30), fluxo de 1 ml/min. O volume de injeção foi 20 µl e os espectros na região do ultravioleta foram armazenados na faixa de 200 a 400 nm, por meio do detector DAD, para identificação dos picos cromatográficos.

#### 1.2.2.2 Preparo das soluções padrão e amostra de artemeter

*Solução padrão de artemeter:* aproximadamente 20 mg de artemeter SQR foram exatamente pesados, transferidos para balão volumétrico de 5 ml e solubilizados em fase móvel. O volume foi completado com o mesmo solvente, de modo a obter solução a 4 mg/ml.

*Solução amostra de artemeter:* aproximadamente 100 mg de artemeter matéria-prima, previamente dessecada a 60 °C em estufa a vácuo por 3 horas, foram exatamente

pesados, transferidos para balão volumétrico de 25 ml e solubilizados em fase móvel. O volume foi completado com o mesmo solvente, de modo a obter solução a 4 mg/ml.

### 1.2.2.3 Validação parcial do método cromatográfico

#### 1.2.2.3.1 Linearidade

Foram preparadas, em triplicata, soluções estoque de artemeter matéria-prima a 8 mg/ml, em acetonitrila. A partir de cada solução estoque, foram feitas diluições para cinco diferentes concentrações, conforme Tabela 3.

**Tabela 3 – Soluções diluídas para construção de curva analítica e avaliação da linearidade do método por CLAE para quantificação de artemeter matéria-prima.**

Intervalo linear (%)	Volume da solução estoque (ml)	Fase móvel q.s.p (ml)	Concentração final (mg/ml)
50	2,5	10	2,0
75	3,75	10	3,0
100	5	10	4,0
125	6,25	10	5,0
150	7,5	10	6,0

O intervalo linear avaliado foi de 50 a 150%, que corresponde à faixa de concentração de 2,0 a 6,0 mg/ml de artemeter. A curva analítica foi plotada para concentração de artemeter versus a área do pico, e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear.

#### 1.2.2.3.2 Precisão

A precisão intra-corrída foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho (4 mg/ml). As soluções de artemeter para a análise foram preparadas conforme descrito em 1.2.2.2. Para avaliação da precisão inter-corrídas, o mesmo procedimento foi adotado, realizando-se análises em dois dias consecutivos. Em cada análise, o teor de artemeter e o desvio padrão relativo (DPR) foram determinados.

### **1.2.2.3.3 Seletividade**

A seletividade do método cromatográfico foi determinada pela avaliação da pureza espectral dos picos de artemeter obtidos em cromatogramas de soluções padrão e amostra, com auxílio do detector DAD. Este teste é realizado por meio da sobreposição dos espectros na região do ultravioleta obtidos em diferentes pontos do pico cromatográfico, e verifica se outras substâncias estão co-eluído no mesmo tempo de retenção do pico de interesse.

### **1.2.2.4 Doseamento de artemeter matéria-prima por CLAE**

Uma amostra de artemeter matéria-prima (lote 0601010-4087, validade 08/2009) foi analisada empregando-se o método analítico por CLAE adaptado da Farmacopéia Internacional 4ª edição (2006). As soluções de artemeter para as análises foram preparadas conforme descrito em 1.2.2.2. O teor de artemeter e o DPR foram determinados na matéria-prima analisada.

## **1.2.3 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de lumefantrina em matéria-prima e comprimidos**

### **1.2.3.1 Condições analíticas**

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Agilent 1200 provido de detector ultravioleta (DAD) a 335 nm e coluna Symmetry C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 µm), mantida a 30 °C. A fase móvel utilizada foi mistura de metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20), fluxo de 1 ml/min. O volume de injeção foi 20 µl e os espectros no ultravioleta foram armazenados na faixa de 200 a 400 nm, por meio do detector DAD, para identificação dos picos cromatográficos.

Para as análises espectrofotométricas, o comprimento de onda selecionado para detecção foi 335 nm e o solvente utilizado foi metanol.

A titulação em meio não aquoso foi realizada em titulador automático provido de eletrodo de vidro combinado. Como titulante, empregou-se solução volumétrica de ácido perclórico 0,1 M, preparada em ácido acético glacial e anidrido acético e padronizada com biftalato de potássio. O ponto final da titulação foi determinado potenciometricamente.

### 1.2.3.2 Preparo das soluções padrão e amostra de lumefantrina

*Solução padrão de lumefantrina:* aproximadamente 15 mg de lumefantrina SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 50 ml. Adicionou-se 1 ml de diclorometano para completa solubilização e o volume foi ajustado com metanol. Transferiram-se 4 ml da solução obtida para balão volumétrico de 50 ml. O volume foi ajustado com fase móvel, para as análises cromatográficas, e com metanol, para as análises espectrofotométricas, de modo a obter solução a 24 µg/ml.

*Solução amostra de lumefantrina:* aproximadamente 30 mg de lumefantrina matéria-prima, previamente dessecada a 105 °C por 2 horas, ou uma quantidade do pó dos comprimidos triturados equivalente a 30 mg de lumefantrina, foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 ml. Adicionaram-se 2 ml de diclorometano para completa solubilização e o volume foi ajustado com metanol. Transferiram-se 4 ml da solução obtida para balão volumétrico de 50 ml. O volume foi ajustado com fase móvel, para as análises cromatográficas, e com metanol, para as análises espectrofotométricas.

### 1.2.3.3 Validação dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico

Os métodos por CLAE e UV, após otimização, foram validados segundo os procedimentos recomendados pela Resolução RDC 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e o Guia de Validação de Procedimentos Analíticos ICH (1996).

#### 1.2.3.3.1 Linearidade

Foram preparadas, em triplicata, soluções padrão estoque de lumefantrina a 300 µg/ml, em metanol. A partir de cada solução estoque, foram feitas diluições para cinco diferentes concentrações, conforme Tabela 4.

Para as análises cromatográficas, empregou-se fase móvel como solvente nas diluições e, para as análises espectrofotométricas, metanol foi utilizado. A concentração de trabalho (100%) otimizada para ambos os métodos foi 24 µg/ml e o intervalo estabelecido para avaliação da linearidade foi 50 a 150%, que corresponde à faixa de concentração de 12 a 36 µg/ml.

**Tabela 4 – Soluções diluídas para construção de curva analítica e avaliação da linearidade dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico para quantificação de lumefantrina.**

Intervalo linear (%)	Volume da solução estoque (ml)	Fase móvel ou metanol q.s.p (ml)	Concentração final (µg/ml)
50	2	50	12
75	3	50	18
100	4	50	24
125	5	50	30
150	6	50	36

Curvas analíticas foram plotadas para concentração de lumefantrina versus a área do pico ou absorvância, e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear.

#### 1.2.3.3.2 Precisão

A precisão intra-corrída foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho (24 µg/ml). As soluções de lumefantrina para a análise foram preparadas conforme descrito em 1.2.3.2. Para avaliação da precisão inter-corrídas, o mesmo procedimento foi adotado, realizando-se análises em dois dias consecutivos. A precisão dos métodos foi avaliada para amostras de lumefantrina em matérias-primas e em comprimidos. Além dos métodos por CLAE e UV, a precisão do método por titulação em meio não aquoso também foi avaliada. Para cada método, o teor de lumefantrina e o desvio padrão relativo (DPR) foram determinados.

#### 1.2.3.3.3 Exatidão

A exatidão dos métodos desenvolvidos foi avaliada pelo método do placebo contaminado, no qual quantidades conhecidas de lumefantrina SQR foram adicionadas a uma mistura dos excipientes do comprimido. Essa mistura foi preparada de acordo com os excipientes citados na bula do medicamento (Coartem<sup>®</sup>) e as proporções de cada um foram estimadas segundo referências da literatura (KIBBE, 2000). A relação dos excipientes empregados com suas respectivas proporções está demonstrada na Tabela 5.

**Tabela 5 – Relação dos excipientes e suas respectivas proporções para preparo de formulação e avaliação da exatidão dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico.**

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

Foram preparadas, em triplicata, soluções padrão estoque de lumefantrina a 300 µg/ml, em metanol. Cada solução estoque foi diluída para três diferentes concentrações (18, 24 e 30 µg/ml), em balão volumétrico de 50 ml, contendo 50 mg da formulação dos excipientes. As soluções foram submetidas a banho de ultra-som por três minutos, o volume foi ajustado e as soluções filtradas. Para as análises cromatográficas, empregou-se fase móvel como solvente e, para as análises espectrofotométricas, metanol foi utilizado. A porcentagem de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) foram determinados para cada método.

#### 1.2.3.3.4 Seletividade

A seletividade do método cromatográfico foi determinada pela avaliação da pureza espectral dos picos de lumefantrina obtidos em cromatogramas de soluções padrão e amostra, com auxílio do detector DAD. Além disso, foram injetadas soluções contendo apenas mistura de excipientes dos comprimidos, preparada pelo mesmo procedimento, com o objetivo de avaliar possíveis picos interferentes no cromatograma, com o mesmo tempo de retenção do pico de interesse. Para as análises espectrofotométricas, foi obtido o espectro de uma solução contendo apenas a formulação dos excipientes do comprimido em metanol, na faixa de 200 a 400 nm, para avaliar a presença de bandas de absorção interferentes em 335 nm.

#### 1.2.3.3.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram inicialmente estimados a partir da equação que leva em consideração parâmetros da curva analítica:

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

b

$$LQ = \frac{3 \times DP_a}{b}$$

b

onde:

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

Dpa = desvio padrão do intercepto da curva de regressão

b = inclinação da curva analítica

A partir dos valores encontrados, foram preparadas soluções diluídas de lumefantrina, em concentrações decrescentes, na faixa de 0,40 a 0,01 µg/ml. Para o método cromatográfico, a avaliação dos limites de detecção e quantificação foi realizada por meio da determinação da razão entre a altura do sinal e a altura do ruído da linha de base. Os limites de detecção e quantificação foram definidos como as concentrações para as quais se obteve relação sinal/ruído de 3 e 10, respectivamente.

Para a determinação dos limites do método espectrofotométrico, foi realizada a avaliação dos valores de absorvância e dos espectros no ultravioleta de soluções de lumefantrina diluídas. Além disso, o desvio padrão relativo de leituras de absorvância das soluções diluídas foram calculados.

#### 1.2.3.3.6 Robustez

Para determinar a robustez de métodos analíticos, pode-se recorrer ao teste de Youden. Trata-se de um teste que permite não apenas avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada um dos parâmetros analíticos nos resultados finais. A idéia principal do teste não é avaliar a alteração de um parâmetro individualmente, mas introduzir várias alterações nas condições analíticas ao mesmo tempo, de maneira que o efeito de cada alteração individual possa ser avaliado no final (YOUTDEN & STEINER, 1975; INMETRO, 2003).

No teste de Youden, sete parâmetros analíticos são selecionados para avaliação e oito ensaios são realizados para determinar a influência dos mesmos no resultado final. Os ensaios são realizados com as condições analíticas em seu valor nominal (representado por letras maiúsculas) e com uma pequena variação (letras minúsculas). Os sete parâmetros analíticos estabelecidos para avaliação da robustez do método

cromatográfico para quantificação de lumefantrina, assim como as variações introduzidas nestes parâmetros, estão representados na Tabela 6.

**Tabela 6 – Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para quantificação de lumefantrina.**

	Parâmetro	Nominal	Variação
A/a	Proporção de metanol na fase móvel	80% - A	77% - a
B/b	pH aparente da fase móvel	2,8 - B	3,1 - b
C/c	Temperatura da coluna	30 °C - C	35 °C - c
D/d	Fluxo da fase móvel	1,0 - D	1,2 - d
E/e	Marca da coluna	Symmetry - E	Ace - e
F/f	Marca do metanol	Tedia - F	J.T. Baker - f
G/g	Modelo do cromatógrafo	Agilent 1200 - G	HP 1100 - g

Os sete parâmetros e suas respectivas variações foram combinados em oito ensaios ou corridas cromatográficas, realizados em ordem aleatória. Dos oito ensaios realizados, quatro deles foram realizados com cada parâmetro em seu valor nominal e quatro deles com o parâmetro com variação. A Tabela 7 demonstra a série de combinações fatoriais dos parâmetros para execução do teste de Youden. Os resultados das análises são representados por letras de s a z.

**Tabela 7 – Matriz de combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo teste de Youden.**

Parâmetro analítico	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Proporção de metanol	A	A	A	A	a	a	a	a
pH aparente	B	B	b	b	B	B	b	b
Temperatura da coluna	C	c	C	c	C	c	C	c
Fluxo da fase móvel	D	D	d	d	d	d	D	D
Marca da coluna	E	e	E	e	e	E	e	E
Marca do metanol	F	f	f	F	F	f	f	F
Modelo do cromatógrafo	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

Em cada combinação, foram realizadas três injeções da solução amostra da matéria-prima e três da solução padrão de lumefantrina, na concentração de trabalho (24

µg/ml). Após troca da coluna cromatográfica ou alteração dos solventes da fase móvel, foram aguardados 30 minutos para estabilização do sistema.

Para determinar a influência da variação de cada parâmetro no resultado final, deve-se comparar a média dos quatro valores correspondentes às letras maiúsculas com a média dos quatro valores correspondentes às letras minúsculas. Por exemplo, para avaliar o efeito da temperatura da coluna no resultado final da análise, pode-se utilizar a equação:

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

Assim, a influência dos sete parâmetros analíticos em relação à área, tempo de retenção (tr), fator de cauda (T), número de pratos teóricos (N) e teor de lumefantrina foram avaliados. Por meio do teste de Youden, pode-se estabelecer com clareza quais parâmetros apresentam maior influência nos resultados finais da análise e fazer um controle mais rigoroso das eventuais variações destes parâmetros que podem ocorrer durante uma análise de rotina.

#### 1.2.3.4 Quantificação de lumefantrina em matéria-prima e comprimidos

Amostras de lumefantrina matéria-prima (lote 05083101, validade 08/2008) e de comprimidos Coartem<sup>®</sup> (lote F0107, validade 10/2007) foram analisadas empregando-se os métodos por CLAE e UV validados e titulação em meio não-aquoso. Para as análises, os comprimidos foram pesados, o peso médio foi determinado e, em seguida, eles foram finamente triturados. As soluções de lumefantrina para as análises cromatográficas e espectrofotométricas foram preparadas conforme descrito em 1.2.3.2.

Para a titulação em meio não aquoso, aproximadamente 200 mg de lumefantrina matéria-prima, previamente dessecada a 105 °C por 2 horas, ou quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 200 mg de lumefantrina, foram exatamente pesados e transferidos para o frasco de titulação. Adicionaram-se 10 ml de anidrido acético e 40 ml de ácido acético e submeteu-se à agitação mecânica do próprio titulador até completa solubilização, antes do início da titulação. O ponto final foi determinado potenciometricamente.

Os teores de lumefantrina nas amostras analisadas foram determinados pelos três métodos. Os resultados obtidos foram estatisticamente comparados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de confiança de 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 1.2.4 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE com detecção UV para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada

### 1.2.4.1 Condições analíticas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Agilent 1200, provido de detector ultravioleta (DAD) a 210 nm. Os espectros foram armazenados na faixa de 200 a 400 nm, por meio do detector DAD, para auxiliar na identificação dos picos cromatográficos. Duas colunas cromatográficas foram avaliadas, uma Symmetry C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 µm) e uma Zorbax SB-Ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm), ambas mantidas a 30 °C. O volume de injeção foi 20 µl. Utilizou-se fase móvel composta por acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v), com fluxo de 1 ml/min. A separação de artemeter e lumefantrina foi avaliada em diferentes proporções dos solventes da fase móvel, e em cada condição, o fator de retenção (*k*) dos picos de artemeter e lumefantrina e a resolução (*R*) entre eles foram avaliados. Para calcular o fator de retenção, o tempo morto (*t<sub>0</sub>*) foi determinado injetando-se no cromatógrafo solução de NaNO<sub>3</sub> 0,01% (p/v) em fase móvel.

### 1.2.4.2 Preparo das soluções padrão e amostra de artemeter e lumefantrina

*Solução padrão de artemeter e lumefantrina:* aproximadamente 40 mg de artemeter SQR e 30 mg de lumefantrina SQR foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 ml. Adicionaram-se 2 ml de clorofórmio para completa solubilização, seguidos da adição de 80 ml de acetonitrila. O volume foi ajustado com ácido trifluoroacético 0,05% (v/v), de modo a obter solução a 400 µg/ml de artemeter e 300 µg/ml de lumefantrina.

*Solução padrão estoque de artemeter:* aproximadamente 175 mg de artemeter matéria-prima, previamente padronizada com padrão primário e dessecada a 60 °C em estufa a vácuo por 3 horas, foram exatamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 ml. Adicionaram-se 2 ml de clorofórmio para completa solubilização e o volume foi ajustado com acetonitrila, de modo a obter solução a 1750 µg/ml.

*Solução padrão diluída de artemeter:* transferiram-se 10 ml da *solução padrão estoque de artemeter* para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter solução a 350 µg/ml.

*Solução amostra:* pesou-se, exatamente, quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 1,25 pesos médios (25 mg de artemeter e 150 mg de lumefantrina) e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml. Adicionaram-se 5 ml de clorofórmio e submeteu-se a banho de ultra-som por 3 minutos. O volume foi ajustado com acetonitrila, a solução foi homogeneizada e filtrada. Transferiram-se 10 ml do filtrado para balão volumétrico de 50 ml e adicionaram-se 10 ml da *solução padrão estoque de artemeter*. O volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter solução a 400 µg/ml de artemeter (50 µg/ml provenientes do medicamento e 350 µg/ml provenientes da solução padrão adicionada) e 300 µg/ml de lumefantrina.

#### 1.2.4.3 Validação

Após avaliação dos parâmetros cromatográficos, o método otimizado foi obtido utilizando-se coluna Zorbax SB-Ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm) e fase móvel composta por acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,05% (60:40), pH 2,35. O método, então, foi validado segundo os procedimentos recomendados pela Resolução RDC n° 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e o Guia de Validação de Procedimentos Analíticos ICH (1996).

##### 1.2.4.3.1 Linearidade

Foram preparadas, em triplicata, soluções padrão estoque contendo 1000 µg/ml de artemeter e 750 µg/ml de lumefantrina. A partir de cada solução estoque, foram feitas diluições para cinco diferentes concentrações, conforme Tabela 8.

**Tabela 8 – Soluções diluídas de artemeter e lumefantrina para construção das curvas analíticas e avaliação da linearidade do método analítico por CLAE.**

Intervalo linear (%)	Volume da sol. estoque (ml)	Concentração de artemeter (µg/ml)	Concentração de lumefantrina (µg/ml)	Fase móvel q.s.p (ml)
50	5,0	200	150	25
75	7,5	300	225	25
100	10,0	400	300	25
125	12,5	500	375	25
150	15,0	600	450	25

As concentrações de trabalho (100%) otimizadas para as análises foram 400 µg/ml de artemeter e 300 µg/ml de lumefantrina e o intervalo estabelecido para avaliação da linearidade foi 50 a 150%.

Além disso, avaliou-se a linearidade para artemeter segundo o procedimento de adição de padrão adotado para a análise dos comprimidos. Foram preparadas soluções com os comprimidos contendo 250 µg/ml de artemeter, em triplicata. Alíquotas destas soluções foram diluídas em fase móvel e 10 ml da solução padrão estoque de artemeter contendo 1750 µg/ml foi adicionado. O volume foi ajustado para 50 ml. As diluições realizadas estão demonstradas na Tabela 9.

**Tabela 9 – Diluições para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE para quantificação de artemeter pelo método de adição de padrão.**

%	Sol. amostra estoque		Sol. padrão estoque		Conc final (µg/ml)	Fase móvel q.s.p (ml)
	Volume (ml)	Conc (µg/ml)	Volume (ml)	Conc (µg/ml)		
50	5	25	10	350	375	50
75	7,5	37,5	10	350	387,5	50
100	10	50	10	350	400	50
125	12,5	62,5	10	350	412,5	50
150	15	75	10	350	425	50

Este procedimento foi realizado por se aproximar mais daquele empregado nas análises para determinação de teor de artemeter nos comprimidos, uma vez que, nestes casos, sempre será realizada adição de 350 µg/ml de artemeter padrão e conseqüentemente, nunca será injetada uma solução com concentração menor do que esta. Assim, a faixa linear avaliada foi de 50 a 150% em relação aos 50 µg/ml de artemeter provenientes do medicamento, que no total corresponde a 375 a 425 µg/ml de artemeter.

Nos dois procedimentos adotados, curvas analíticas foram plotadas para concentração versus a área do pico para cada fármaco, e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear.

#### 1.2.4.3.2 Precisão

A precisão intra-corrída foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho (400 µg/ml de artemeter e 300 µg/ml de lumefantrina). As soluções amostra para a análise foram preparadas conforme procedimento descrito no

item 1.2.4.2. O lote 04137 de Coartem<sup>®</sup> foi empregado nas análises. Para avaliação da precisão inter-corridas, o mesmo procedimento foi adotado, realizando-se análises em dois dias consecutivos. Os teores de artemeter e lumefantrina e o desvio padrão relativo (DPR) dos valores foram determinados.

### 1.2.4.3.3 Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada pelo método do placebo contaminado, no qual quantidades conhecidas de artemeter SQR e lumefantrina SQR foram adicionadas a uma mistura dos excipientes do comprimido. A composição deste placebo está descrita no item 1.2.3.3.3.

O procedimento mais usual para realização do método do placebo contaminado é o preparo de soluções estoque concentradas dos fármacos, seguida da transferência de volumes determinados destas soluções para balões volumétricos contendo a mistura de excipientes, de forma a obter soluções de trabalho com excipientes, em três concentrações diferentes. Entretanto, no presente método analítico, o ponto crítico do preparo da amostra é a solubilização da lumefantrina no clorofórmio. Assim, o preparo de uma solução concentrada com diluições subseqüentes não seria adequado para avaliar o processo de solubilização na concentração determinada para a análise do medicamento. Desta forma, foi realizada uma pesagem de fármaco para o preparo de cada solução, em triplicata. As massas pesadas de placebo, artemeter e lumefantrina, assim como os três níveis de concentração avaliados na exatidão, estão descritos na Tabela 10.

**Tabela 10 – Massas pesadas e concentrações das soluções para avaliação da exatidão do método por CLAE para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

% correspondente	Massa do placebo (mg)	Massa de artemeter (mg)	Massa de lumefantrina (mg)	Concentração teórica (µg/ml)
75	65	75	56,25	300 ATM + 225 LMF
100	65	100	75	400 ATM + 300 LMF
125	65	125	93,75	500 ATM + 375 LMF

ATM = artemeter, LMF = lumefantrina

A massa de placebo pesada (65 mg) foi determinada de acordo com a proporção de excipientes originalmente presente nos comprimidos. As massas estabelecidas na Tabela 10 foram exatamente pesadas e transferidas para balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se 2,5 ml de clorofórmio e submeteu-se a banho de ultra-som por 3 minutos.

O volume foi ajustado com acetonitrila, a solução foi homogeneizada e filtrada. Em seguida, 10 ml do filtrado foram transferidos para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi ajustado com fase móvel, de modo a obter as concentrações teóricas demonstradas na Tabela 10. Cada solução foi preparada em triplicata.

As porcentagens de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) foram determinados em cada nível.

#### 1.2.4.3.4 Seletividade

A seletividade do método por CLAE foi determinada pela avaliação da pureza espectral dos picos de artemeter e lumefantrina obtidos em cromatogramas de soluções padrão e amostra, com auxílio do detector DAD. Além disso, foram injetadas soluções contendo apenas mistura de excipientes dos comprimidos, preparada pelo mesmo procedimento, com o objetivo de avaliar possíveis picos interferentes no cromatograma, com o mesmo tempo de retenção dos picos de interesse.

#### 1.2.4.3.5 Robustez

Seis soluções amostras foram preparadas de acordo com o procedimento descrito em 1.2.4.2 e analisadas nas condições nominais e variando-se os parâmetros analíticos: proporção de acetonitrila na fase móvel, pH aparente, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna. As variações estabelecidas para cada parâmetro estão demonstradas na Tabela 11.

**Tabela 11 – Parâmetros analíticos e variações empregadas para avaliação da robustez do método analítico por CLAE para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Parâmetro	Variação	Valor inferior	Valor nominal	Valor superior
Proporção de acetonitrila na FM (%)	± 2,0	58	60	62
pH aparente da FM	± 0,2	2,15	2,35	2,55
Fluxo da FM (ml/min)	± 0,2	0,8	1,0	1,2
Temperatura da coluna (°C)	± 5	25	30	35

FM = fase móvel

Em cada condição, os teores de artemeter e lumefantrina foram determinados e os parâmetros cromatográficos tempo de retenção (tr), fator de cauda (T) e resolução (R)

entre os picos de artemeter e lumefantrina foram avaliados. Os teores dos fármacos obtidos nas condições nominais e nas condições variadas foram estatisticamente comparados por meio de análise de variância (ANOVA).

#### 1.2.4.3.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação de artemeter e lumefantrina foram inicialmente estimados a partir da equação que leva em consideração parâmetros da curva analítica, apresentada no item 1.2.3.3.5.

A partir dos valores encontrados, foram preparadas oito soluções diluídas contendo artemeter e lumefantrina, na mesma proporção da concentração de trabalho. As concentrações das soluções variaram de 0,13 µg/ml de artemeter e 0,10 µg/ml de lumefantrina a 15,00 µg/ml de artemeter e 11,25 µg/ml de lumefantrina. Para determinação dos limites, a razão entre a altura do sinal e a altura do ruído da linha de base foi avaliada, considerando-se  $S/R = 3$  para o limite de detecção e  $S/R = 10$  para o limite de quantificação. Além disso, o desvio padrão relativo das áreas dos picos obtidos com replicatas de injeções de soluções diluídas também foi avaliado para determinação do limite de quantificação.

#### 1.2.4.4 Quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada

Três lotes de Coartem<sup>®</sup> e um lote de Co-artesiane<sup>®</sup> foram analisados, em sextuplicata, pelo método por CLAE desenvolvido e validado. Artemeter SQR foi adicionado às amostras, com o objetivo de aumentar a área do pico e melhorar a detecção do fármaco. Devido à baixa solubilidade de lumefantrina, foi necessária a adição de pequena quantidade de clorofórmio para garantir completa solubilização do fármaco.

Para as análises, os comprimidos foram pesados, o peso médio foi determinado e, em seguida, eles foram finamente triturados. Pesou-se, exatamente, quantidade do pó dos comprimidos equivalente a 1,25 pesos médios (25 mg de artemeter e 150 mg de lumefantrina) e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml. Adicionaram-se 5 ml de clorofórmio e submeteu-se a banho de ultra-som por 3 minutos. O volume foi ajustado com acetonitrila, a solução foi homogeneizada e filtrada. Transferiram-se 10 ml do filtrado para balão volumétrico de 50 ml e adicionaram-se 10 ml da *solução padrão estoque de artemeter* (preparo descrito em 1.2.4.2). O volume foi ajustado com fase móvel. Uma

*solução padrão diluída de artemeter* também foi preparada, diluindo-se 10 ml da *solução padrão estoque de artemeter* para balão volumétrico de 50 ml, com fase móvel.

De acordo com o procedimento descrito, se não fosse realizada a adição de padrão de artemeter, a solução amostra apresentaria concentração de 50 µg/ml de artemeter e 300 µg/ml de lumefantrina, mesma proporção dos fármacos nos comprimidos de dose fixa combinada. A adição de 10 ml da *solução padrão estoque de artemeter* corresponde à adição de 350 µg/ml de artemeter na solução amostra, de forma que as concentrações finais dos fármacos são 400 µg/ml de artemeter e 300 µg/ml de lumefantrina.

Para calcular o teor de artemeter nos comprimidos, a área do pico obtida com a *solução padrão diluída de artemeter* (350 µg/ml) foi subtraída da área do pico obtida nas soluções amostra (400 µg/ml). A diferença corresponde à quantidade de artemeter originalmente presente nos comprimidos (aproximadamente 50 µg/ml).

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Caracterização das matérias-primas de artemeter e lumefantrina

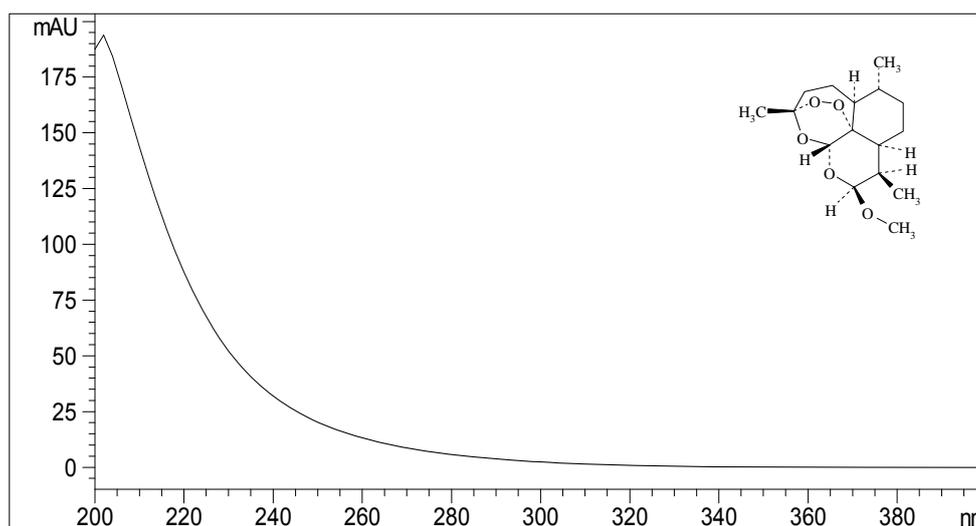
A avaliação da solubilidade da matéria-prima é um dado auxiliar para o desenvolvimento de métodos de análise tanto para matéria-prima quanto para o produto acabado. É de extrema importância conhecer a solubilidade dos fármacos em análise, principalmente para otimização das etapas de preparo de amostra. Este fator se torna ainda mais crítico quando os fármacos apresentam baixa solubilidade em água, como é o caso de artemeter e lumefantrina. Além disso, para o desenvolvimento de método de extração líquido-líquido para quantificação dos fármacos em meio biológico, a solubilidade dos fármacos em diferentes solventes orgânicos deve ser determinada visando a obtenção de altas taxas de recuperação.

De acordo com os resultados obtidos, e utilizando-se os termos descritivos da Farmacopéia Brasileira 4<sup>a</sup> edição (FARMACOPÉIA, 1998), artemeter é praticamente insolúvel em água, solução de hidróxido de sódio 0,1 M, solução de ácido clorídrico 0,1 M e solução de lauril sulfato de sódio 0,5% (p/v); muito solúvel em diclorometano e clorofórmio; facilmente solúvel em etanol, hexano, acetato de etila e metil-*t*-butil éter e solúvel em metanol e acetonitrila.

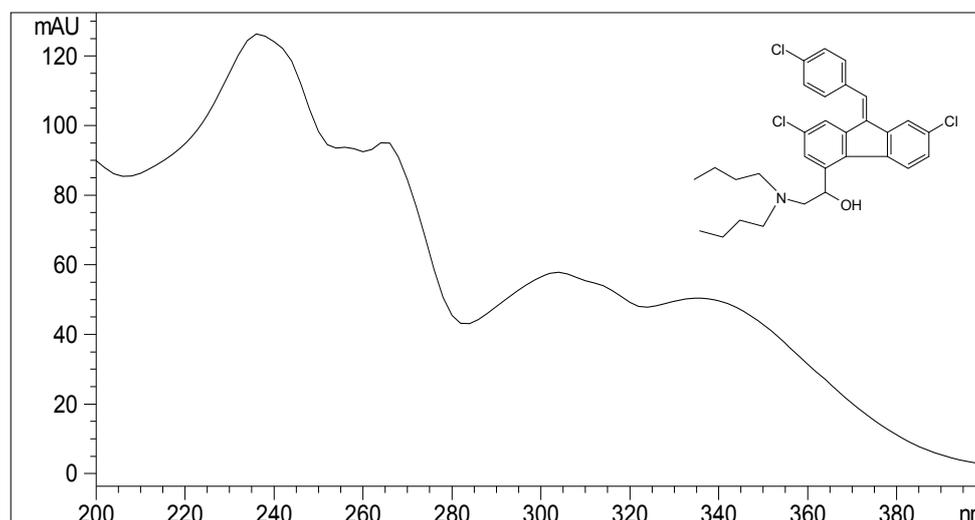
Lumefantrina é praticamente insolúvel em água, solução de hidróxido de sódio 0,1 M, solução de ácido clorídrico 0,1 M e solução de lauril sulfato de sódio 0,5% (p/v); facilmente solúvel em diclorometano e clorofórmio, ligeiramente solúvel em metil-*t*-butil éter e acetato de etila, pouco solúvel em hexano e muito pouco solúvel em etanol, metanol e acetonitrila. Foi verificado que a adição de pequena quantidade de ácido acético (cerca de 1%) nos solventes orgânicos aumenta de forma considerável a solubilidade de lumefantrina nos mesmos.

Ambos os fármacos apresentaram baixa solubilidade em água e solventes aquosos, inclusive na presença de tensoativo, o que pode representar uma dificuldade para o desenvolvimento de ensaios de dissolução para os comprimidos. O pH da solução aquosa aparentemente não teve influência na solubilidade dos fármacos, apesar de lumefantrina ter se solubilizado de forma adequada em ácido acético glacial para o doseamento por titulação em meio não aquoso.

Os espectros na região do ultravioleta de artemeter e lumefantrina, na faixa de 200 a 400 nm, foram obtidos em espectrofotômetro de absorção no ultravioleta-visível e estão demonstrados nas Figuras 3 e 4.



**Figura 3** – Espectro na região do ultravioleta de artemeter a 1 mg/ml em etanol.



**Figura 4** – Espectro na região do ultravioleta de lumefantrina a 20 µg/ml em diclorometano e metanol (1:50).

Devido à ausência de ligações duplas e cromóforos estendidos em sua estrutura, artemeter apresentou apenas um máximo de absorção em seu espectro (203 nm). A absorvidade deste fármaco na região do ultravioleta é consideravelmente baixa, de forma que foram necessárias concentrações elevadas de artemeter para a detecção. No espectro de lumefantrina, foram identificados quatro máximos de absorção: 235, 265, 305 e 335 nm. Apesar da maior absorvidade de lumefantrina em 235 nm, o comprimento de onda de 335 nm apresenta maior seletividade em relação a possíveis interferências de solventes e da matriz, sendo mais adequado para análises quantitativas.

Os espectros dos fármacos na região do infravermelho, obtidos com pastilhas de brometo de potássio, estão demonstrados nas Figuras 5 e 6. Foram feitas as atribuições

das principais bandas obtidas nos espectros, de acordo com a estrutura de cada fármaco (Tabelas 12 e 13).

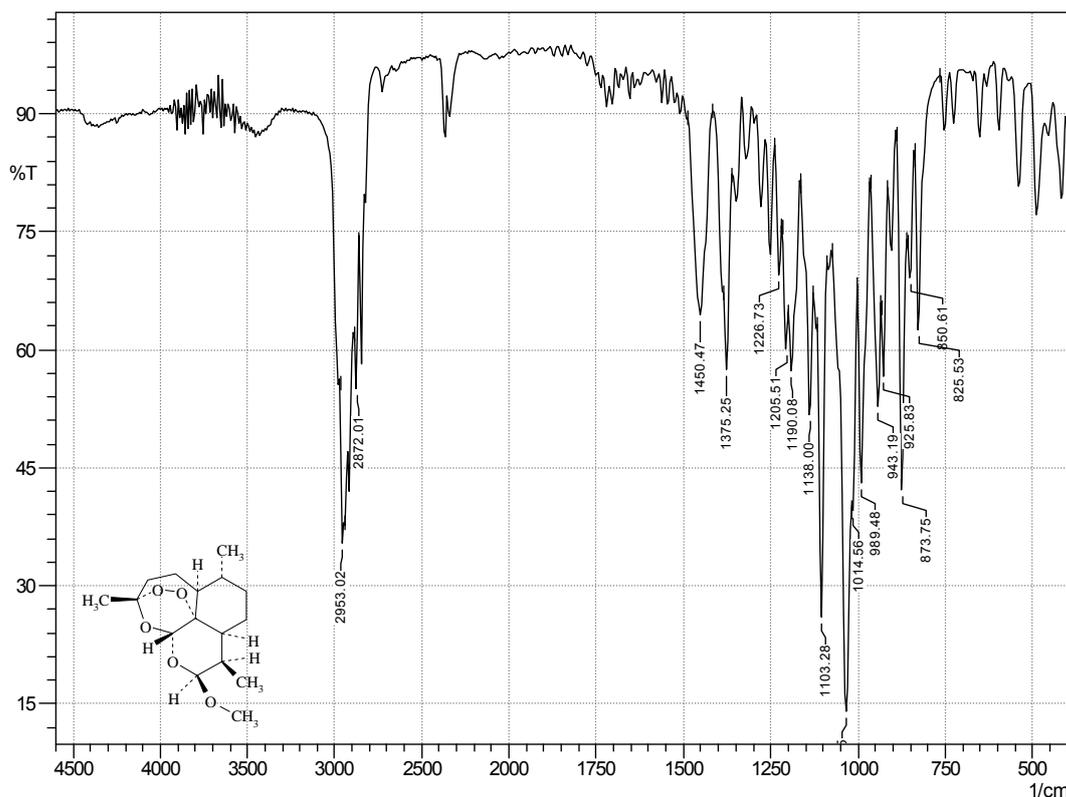


Figura 5 – Espectro na região do infravermelho de artemeter, obtido com pastilha de KBr.

Tabela 12 – Atribuições das principais bandas obtidas no espectro de infravermelho de artemeter.

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
2953, 2872	deformação axial C-H de alceno
1450, 1375	deformação angular C-H de alceno
1103, 1033	deformação axial C-O de éter

Os testes espectrofotométricos contribuem de forma significativa para identificação de substâncias, sendo comumente utilizados em compêndios farmacêuticos com esta finalidade. O espectro de absorção na região do infravermelho de uma substância, comparado com aquele obtido concomitantemente com o padrão de referência correspondente, fornece evidência bastante conclusiva sobre a identidade da substância analisada. O espectro de absorção na região do ultravioleta, por outro lado, não apresenta alto grau de especificidade. A conformidade com as especificações de ambos os testes (infravermelho e ultravioleta), como preconizado em grande número de monografias farmacopeicas, praticamente não deixa dúvidas sobre a identidade da substância em análise (THE UNITED, 2008).

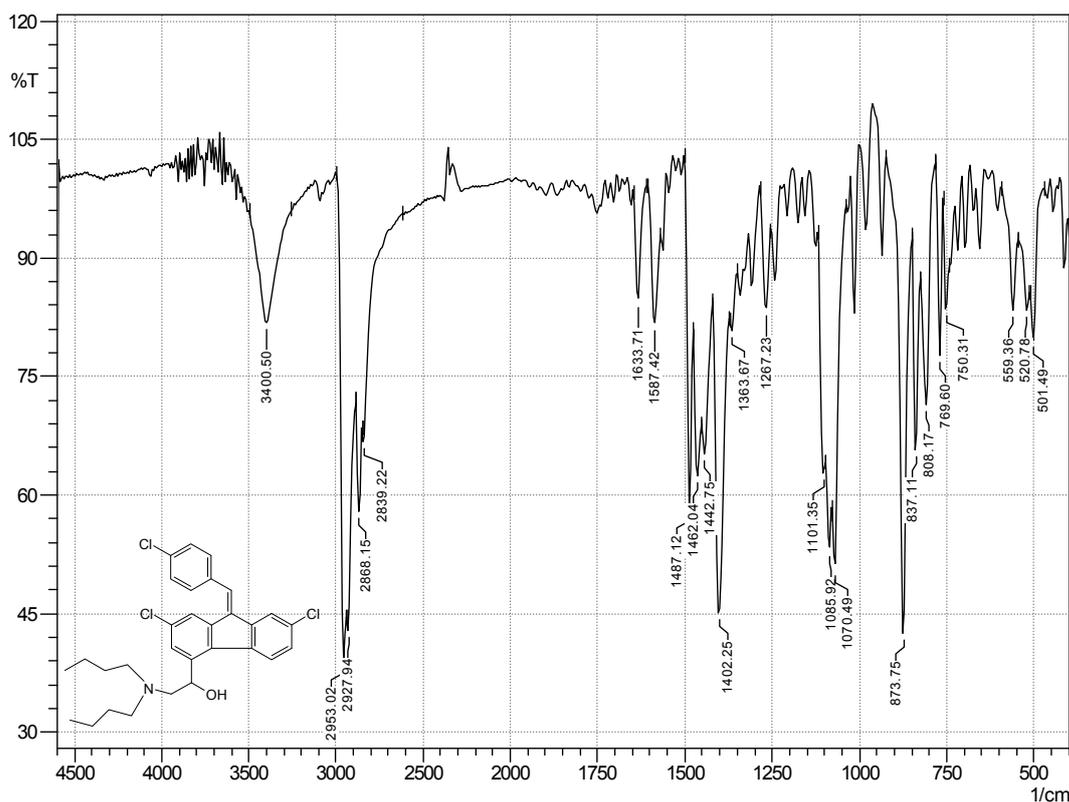


Figura 6 – Espectro na região do infravermelho de lumefantrina, obtido com pastilha de KBr.

Tabela 13 – Atribuições das principais bandas obtidas no espectro de infravermelho de lumefantrina.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3400	deformação axial O-H de álcool
2953, 2927, 2868	deformação axial C-H
1633	deformação axial C=C de alqueno
1587	deformação axial C=C de aromático
1487, 1462	deformação angular C-H de alceno
1085	deformação axial C-O de álcool
1070	deformação axial C-N
873, 837	deformação angular C-H de aromático
769, 750	deformação axial C-Cl

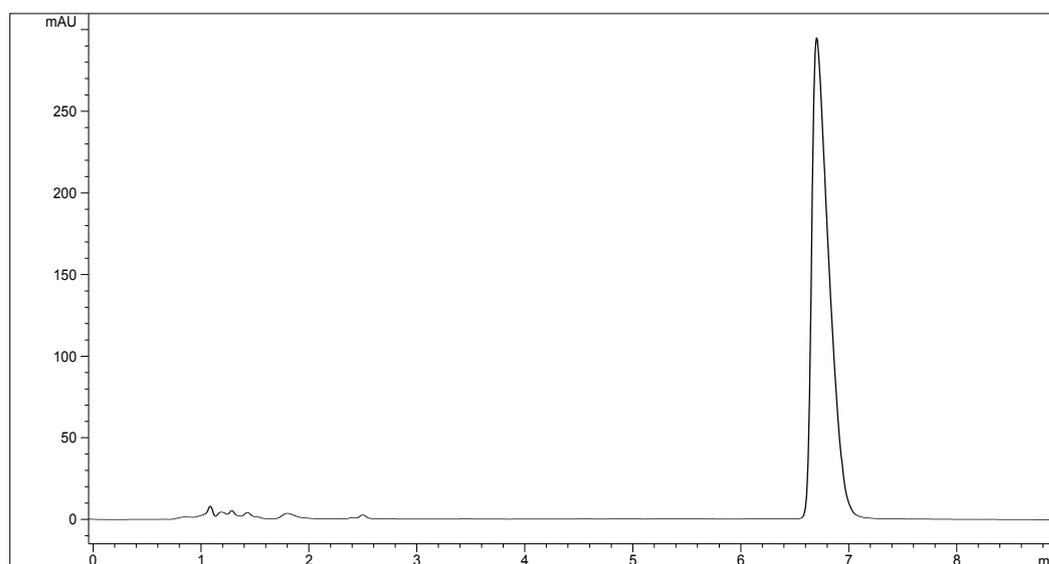
## 2.2 Quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica

Para quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica, foi feita uma adaptação do método descrito na Farmacopéia Internacional 4<sup>a</sup> edição (THE

INTERNATIONAL, 2006), seguida da avaliação da linearidade, precisão intra-corrida e inter-corridas e seletividade do método.

Tendo em vista a baixa absorvidade molar de artemeter, a concentração de trabalho utilizada para as análises deve ser consideravelmente elevada. Segundo o procedimento da Farmacopéia Internacional 4ª edição, deve-se preparar soluções amostra e padrão contendo 10 mg/ml de artemeter.

No método empregado, a concentração de trabalho utilizada foi de 4 mg/ml de artemeter. Nesta concentração, o pico de artemeter já apresenta intensidade adequada para integração e quantificação, além de reduzir o consumo de padrão de referência de artemeter para o preparo da solução padrão. O cromatograma obtido para uma solução amostra a 4 mg/ml, apresentando pico de artemeter em 6,70 minutos, está demonstrado na Figura 7.



**Figura 7 – Cromatograma obtido para solução amostra de artemeter, a 4 mg/ml, utilizando coluna Zorbax C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm), a 30 °C e fase móvel composta por acetonitrila e água (70:30), com fluxo de 1 ml/min e detecção a 216 nm.**

## 2.2.2 Validação parcial do método cromatográfico

### 2.2.2.1 Linearidade

A curva analítica obtida para o método por CLAE indicou correlação linear adequada entre as concentrações de artemeter e as áreas dos picos, na faixa de 2,0 a 6,0 mg/ml. A área média obtida para a concentração de trabalho (4 mg/ml) foi 3249. Os dados da análise de regressão linear estão demonstrados na Tabela 14.

**Tabela 14 - Resultados da análise de regressão linear obtidos para o método por CLAE para quantificação de artemeter matéria-prima.**

Parâmetros da regressão	Resultados
Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9999
Inclinação $\pm$ desvio padrão	32237 $\pm$ 26
Intercepto $\pm$ desvio padrão	6,89 $\pm$ 2,780
Desvio padrão relativo (%)	0,06
Faixa de concentração (mg/ml)	2,0 – 6,0
Número de pontos	5

O coeficiente de determinação obtido ( $r^2 = 0,9999$ ) indicou que, dentro da faixa de concentração avaliada, as concentrações de artemeter foram diretamente proporcionais às áreas dos picos. O valor de DPR inferior a 2,0% demonstrou a precisão da curva analítica. O gráfico de resíduos versus as concentrações de artemeter demonstrou distribuição aleatória, não apresentando qualquer tendência. Portanto, o método apresentou linearidade adequada.

#### 2.2.2.2 Precisão

A precisão intra-corrída e inter-corrídas do método por CLAE foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho (4 mg/ml). Os valores de DPR obtidos nas análises da precisão intra-corrída ( $n=6$ ) e inter-corrídas ( $n=12$ ) foram 0,49% e 0,48%, respectivamente. Assim, a precisão do método foi demonstrada pela obtenção de valores de DPR abaixo de 2,0%.

#### 2.2.2.3 Seletividade

A determinação da pureza espectral dos picos cromatográficos de artemeter foi realizada com auxílio do detector de arranjo de diodos. As purezas dos picos referentes ao artemeter padrão e matéria-prima foram, respectivamente, 99,95% e 99,99%. Os elevados valores de pureza de pico obtidos indicam que outros compostos não co-eluíram com o pico de interesse.

### 2.2.3 Doseamento de artemeter matéria-prima por CLAE

O método por CLAE foi aplicado para quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica. Para determinação do teor, foram utilizadas as mesmas amostras empregadas na avaliação da precisão. O teor médio ( $n=12$ ) obtido para a amostra de matéria-prima analisada foi 99,26%, estando dentro da especificação da Farmacopéia Internacional 4ª edição (97,0 a 102,0%).

## 2.3 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de lumefantrina em matéria-prima e comprimidos

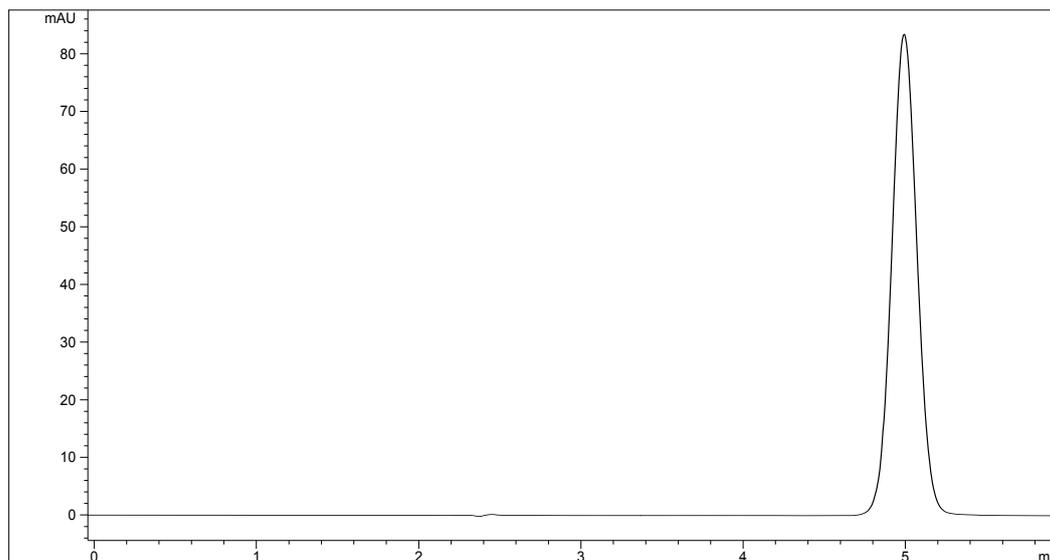
Durante o desenvolvimento do método cromatográfico, metanol promoveu resultados mais adequados em relação à seletividade de lumefantrina, quando comparado à acetonitrila, fornecendo picos mais simétricos. Tendo em vista que lumefantrina é uma base orgânica, sua interação com os grupos silanóis residuais da fase estacionária deve ser evitada ou minimizada, visando a obtenção de picos com simetria adequada. Assim, foi realizada a acidificação da fase móvel com ácido trifluoroacético, para garantir que as moléculas de lumefantrina se encontrassem completamente na sua forma ionizada, e empregou-se coluna C<sub>18</sub> com aproximadamente 19% de cobertura de carbono (Symmetry C<sub>18</sub> – Waters). Desta forma, foram obtidos picos de lumefantrina com fator de cauda próximo a 1 (1,04), em um tempo de corrida razoável (6 min), conforme demonstrado na Figura 8.

A utilização de uma coluna com elevada porcentagem de cobertura de carbono reduz a interação entre analitos com caráter básico e grupos silanóis residuais da fase estacionária, de forma a contribuir para obtenção de picos simétricos. Como observado na avaliação da robustez do método desenvolvido (item 2.3.1.6), a substituição da coluna Symmetry pela Ace (15,5% de cobertura de carbono) apresentou um efeito negativo na simetria do pico, com aumento do fator de cauda para 2,34.

Após avaliação do espectro de lumefantrina na região do ultravioleta (200 a 400 nm), 335 nm foi selecionado para detecção e realização das análises, devido à maior seletividade deste comprimento de onda em relação a possíveis interferências provenientes de solventes e da matriz das amostras.

A titulação em meio não aquoso de lumefantrina demonstrou um ponto de inflexão bem definido na curva de titulação, indicando de forma precisa o ponto final. A determinação potenciométrica do ponto final da titulação é menos subjetiva e mais

precisa, comparando-se à utilização de indicadores visuais, de forma que este método de detecção foi escolhido para as análises.



**Figura 8** – Cromatograma obtido para solução amostra de lumefantrina, a 24 µg/ml, utilizando coluna Symmetry C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm), a 30 °C e fase móvel composta por metanol e ácido trifluoroacético 0,05% (80:20), com fluxo de 1 ml/min e detecção a 335 nm.

### 2.3.1 Validação dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico

#### 2.3.1.1 Linearidade

As curvas analíticas obtidas para os métodos cromatográfico e espectrofotométrico indicaram correlação linear adequada entre as concentrações de lumefantrina e as respostas dos métodos, na faixa de concentração avaliada. As concentrações de lumefantrina e suas respectivas respostas para cada método estão demonstradas na Tabela 15.

Os dados da análise de regressão linear estão demonstrados na Tabela 16. Os valores de DPR obtidos para ambos os métodos, inferiores a 2,0%, demonstraram a precisão das curvas analíticas.

Os valores do coeficiente de determinação ( $r^2 = 0,9999$  para ambos os métodos) indicam que, dentro da faixa de concentração avaliada, as concentrações de lumefantrina foram diretamente proporcionais às respostas dos métodos. Os gráficos de resíduos versus as concentrações de lumefantrina demonstraram distribuição aleatória, não

apresentando qualquer tendência. Portanto, ambos os métodos apresentaram linearidade adequada.

**Tabela 15 – Concentrações das soluções de lumefantrina e respectivas respostas para obtenção das curvas analíticas dos métodos cromatográficos e espectrofotométricos.**

Solução	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Resposta do método	
		Área do pico	Absorvância
1	12,08	416,42	0,353
	12,19	416,99	0,354
	12,23	418,40	0,354
2	18,11	618,05	0,527
	18,28	622,31	0,531
	18,34	622,60	0,530
3	24,15	822,91	0,704
	24,38	836,71	0,710
	24,46	838,25	0,712
4	30,19	1021,80	0,880
	30,47	1039,20	0,887
	30,57	1042,60	0,889
5	36,23	1235,80	1,053
	36,56	1250,00	1,069
	36,68	1252,80	1,062

**Tabela 16 - Resultados da análise de regressão linear obtidos para os métodos cromatográfico e espectrofotométrico para quantificação de lumefantrina.**

Parâmetros da regressão	HPLC	UV
Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9999	0,9999
Inclinação $\pm$ desvio padrão	34,06 $\pm$ 0,10	0,0291 $\pm$ 0,0001
Intercepto $\pm$ desvio padrão	1,70 $\pm$ 2,60	-0,0008 $\pm$ 0,0019
Desvio padrão relativo (%)	0,40	0,35
Faixa de concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	12 - 36	12 - 36
Número de pontos	5	5

### 2.3.1.2 Precisão

Avaliou-se a precisão intra-corrída e inter-corrídas dos três métodos (CLAE, UV e titulação em meio não aquoso) por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho (24 µg/ml), para amostras de lumefantrina em matéria-prima e em comprimidos. Os valores de DPR obtidos para cada método estão representados na Tabela 17.

**Tabela 17 – Valores de DPR obtidos na avaliação da precisão intra-corrída e inter-corrídas para os três métodos avaliados, em amostras de lumefantrina matéria-prima e comprimidos.**

Amostra	Método	Valores de DPR (%)	
		Precisão intra-corrída (n = 6)	Precisão inter-corrídas (n = 12)
Matéria-prima	CLAE	0,32	0,60
	UV	0,34	0,82
	Titulação	0,20	0,27
Comprimido	CLAE	0,45	0,67
	UV	0,65	0,73
	Titulação	0,29	0,63

Os valores de DPR obtidos em todos os métodos para as duas amostras foram inferiores a 2,0%, indicando que os três métodos avaliados apresentaram precisão intra-corrída e inter-corrídas satisfatórias. Titulação em meio não aquoso foi o método que propiciou resultados mais precisos para as amostras analisadas, comparando-se com os métodos instrumentais.

### 2.3.1.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método do placebo contaminado, em três níveis de concentração, cada um em triplicata. As porcentagens de recuperação de cada método estão demonstradas na Tabela 18.

Os valores de porcentagem de recuperação entre 98% e 102% e desvio padrão relativo abaixo de 2,0% indicam que ambos os métodos apresentaram exatidão adequada para quantificação de lumefantrina em comprimidos.

**Tabela 18 – Porcentagens de recuperação para avaliação da exatidão dos métodos cromatográfico e espectrofotométrico.**

Concentração teórica (µg/ml)	Recuperação (%)	
	CLAE	UV
18	99,15	98,42
	98,96	98,04
	99,04	98,99
24	99,58	99,01
	99,25	99,25
	100,11	98,58
30	99,14	98,65
	99,98	98,88
	99,55	99,48
Média (%)	99,42	98,81
DPR (%)	0,42	0,44

#### 2.3.1.4 Seletividade

Com auxílio do detector de arranjo de diodos, foi possível calcular as purezas dos picos referentes à lumefantrina nos cromatogramas obtidos com soluções padrão e amostra. As purezas dos picos referentes à lumefantrina padrão, matéria-prima e comprimidos foram, respectivamente, 99,89%, 99,86% e 99,98%. Os elevados valores de pureza de pico obtidos indicam que outros compostos não co-eluíram com o pico de interesse. No cromatograma da solução contendo apenas a mistura dos excipientes do comprimido, não foram visualizados picos interferentes no mesmo tempo de retenção de lumefantrina, de forma que o método pode ser considerado seletivo para o fármaco.

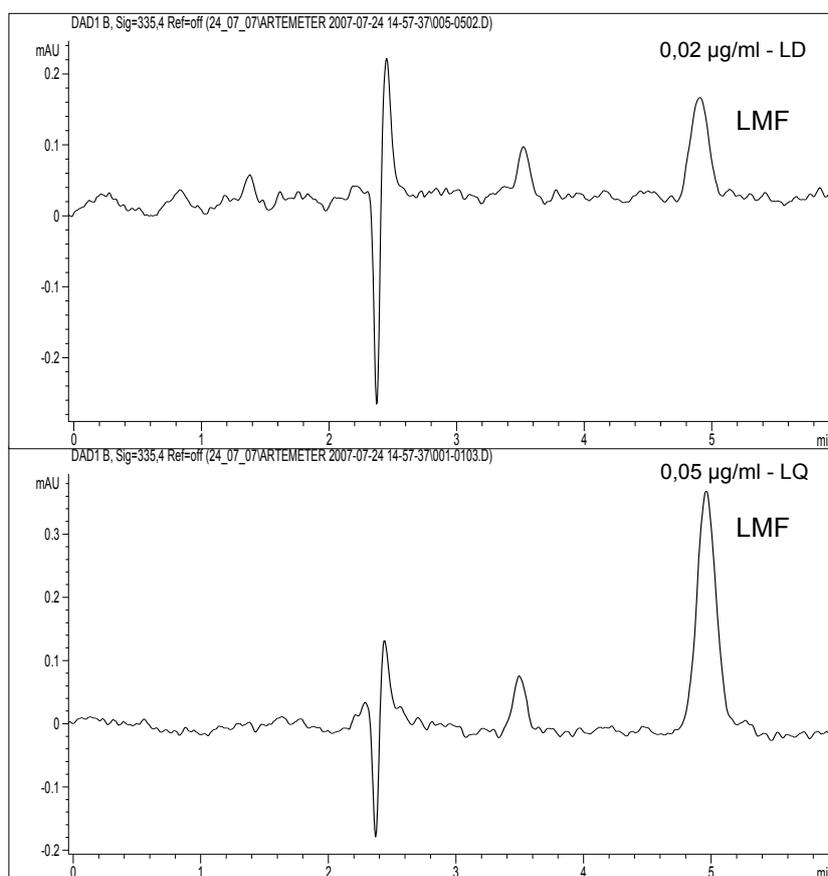
Na avaliação da seletividade do método espectrofotométrico, não foram identificadas bandas de absorção em 335 nm, em espectro obtido com a mistura de excipientes dos comprimidos em metanol. Assim, o método por UV se mostrou seletivo em relação aos excipientes para quantificação de lumefantrina em comprimidos.

#### 2.3.1.5 Limites de detecção e quantificação

A determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de lumefantrina por CLAE e UV foi realizada, inicialmente, a partir da equação que leva em consideração

parâmetros da curva analítica. Para realização dos cálculos, foram utilizados o desvio padrão do intercepto e a inclinação das curvas analíticas obtidas na linearidade (Tabela 16).

Em seguida, foram avaliadas as respostas de soluções de lumefantrina na faixa de concentração de 0,01 a 0,40  $\mu\text{g/ml}$ . Para o método cromatográfico, a razão sinal/ruído foi utilizada para determinação dos limites, considerando-se os valores de 3 e 10 para LD e LQ, respectivamente. Os cromatogramas obtidos para as soluções de lumefantrina a 0,02 e 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , consideradas LD e LQ, de acordo com a razão sinal/ruído, estão demonstrados na Figura 9. O pico de lumefantrina foi eluído em 4,9 minutos.



**Figura 9 – Cromatogramas obtidos com soluções de lumefantrina a 0,02  $\mu\text{g/ml}$  (LD) e 0,05  $\mu\text{g/ml}$  (LQ). Tempo de retenção do pico de lumefantrina = 4,9 min.**

Na avaliação do método espectrofotométrico, foi possível visualizar a banda de absorção a 335 nm no espectro expandido de uma solução de lumefantrina a 0,10  $\mu\text{g/ml}$  e o valor de absorvância correspondente foi 0,004. Assim, esta concentração foi considerada o limite de detecção do método. O limite de quantificação estabelecido foi 0,30  $\mu\text{g/ml}$ , pois nesta concentração foram obtidos valores de leitura de absorvância igual a 0,010, com precisão adequada (DPR < 2,0%).

Os valores dos limites de detecção e quantificação obtidos pela equação da reta e pela avaliação das respostas de soluções diluídas estão demonstrados na Tabela 19, para os métodos cromatográfico e espectrofotométrico.

**Tabela 19 – Limites de detecção e quantificação de lumefantrina determinados pela equação da reta e pela avaliação da resposta de soluções diluídas, por CLAE e UV.**

Método	Limite de detecção ( $\mu\text{g/ml}$ )		Limite de quantificação ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Curva analítica	Avaliação da resposta	Curva analítica	Avaliação da resposta
CLAE	0,23	0,02	0,76	0,05
UV	0,20	0,10	0,66	0,30

Comparando-se os valores da Tabela 19, observa-se que os limites de detecção e quantificação calculados pelos parâmetros da curva analítica são significativamente maiores do que aqueles determinados pela avaliação das respostas obtidas com soluções diluídas. A equação para o cálculo de LD e LQ é útil para estimar os valores de concentração mais prováveis, porém, a leitura ou injeção de soluções diluídas no equipamento permite avaliar de forma mais confiável e precisa as menores concentrações do analito que podem ser detectadas e quantificadas.

CLAE demonstrou ser um método consideravelmente mais sensível, permitindo a quantificação de lumefantrina em concentrações cerca de cinco vezes menores do que espectrofotometria no UV. É interessante observar que a concentração de trabalho de ambos os métodos é a mesma ( $24 \mu\text{g/ml}$  de lumefantrina). Entretanto, o método por CLAE é capaz de detectar e quantificar concentrações consideravelmente menores de lumefantrina, quando comparado a espectrofotometria no UV.

### 2.3.1.6 Robustez

A robustez do método cromatográfico para quantificação de lumefantrina foi avaliada por meio de teste de Youden. A influência de sete parâmetros analíticos em relação à área, tempo de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e teor de lumefantrina foi avaliada em oito experimentos. A Tabela 20 demonstra as oito combinações avaliadas, conforme a matriz proposta pelo teste de Youden (Tabela 7). Os ensaios foram realizados simultaneamente nos dois equipamentos, Agilent 1200 e HP1100. A coluna Symmetry foi inicialmente testada no cromatógrafo Agilent 1200, enquanto as análises eram realizadas com a coluna Ace no HP1100. Em seguida, as

colunas cromatográficas foram trocadas nos equipamentos para prosseguimento dos ensaios.

**Tabela 20 – Combinação dos parâmetros analíticos segundo o teste de Youden para avaliação da robustez do método cromatográfico.**

	<b>Combinações avaliadas</b>	
Agilent 1200	<b>1</b> Proporção da fase móvel: 80:20 pH da fase móvel: 2,8 Temperatura da coluna: 30 °C Fluxo da fase móvel: 1,0 ml/min Marca da coluna: Symmetry Marca do metanol: Tedia	<b>6</b> Proporção da fase móvel: 77:23 pH da fase móvel: 2,8 Temperatura da coluna: 35 °C Fluxo da fase móvel: 1,2 ml/min Marca da coluna: Symmetry Marca do metanol: J.T. Baker
	<b>4</b> Proporção da fase móvel: 80:20 pH da fase móvel: 3,1 Temperatura da coluna: 35 °C Fluxo da fase móvel: 1,2 ml/min Marca da coluna: Ace Marca do metanol: Tedia	<b>7</b> Proporção da fase móvel: 77:23 pH da fase móvel: 3,1 Temperatura da coluna: 30 °C Fluxo da fase móvel: 1,0 ml/min Marca da coluna: Ace Marca do metanol: J.T. Baker
HP1100	<b>2</b> Proporção da fase móvel: 80:20 pH da fase móvel: 2,8 Temperatura da coluna: 35 °C Fluxo da fase móvel: 1,0 ml/min Marca da coluna: Ace Marca do metanol: J.T. Baker	<b>5</b> Proporção da fase móvel: 77:23 pH da fase móvel: 2,8 Temperatura da coluna: 30 °C Fluxo da fase móvel: 1,2 ml/min Marca da coluna: Ace Marca do metanol: Tedia
	<b>3</b> Proporção da fase móvel: 80:20 pH da fase móvel: 3,1 Temperatura da coluna: 30 °C Fluxo da fase móvel: 1,2 ml/min Marca da coluna: Symmetry Marca do metanol: J.T. Baker	<b>8</b> Proporção da fase móvel: 77:23 pH da fase móvel: 3,1 Temperatura da coluna: 35 °C Fluxo da fase móvel: 1,0 ml/min Marca da coluna: Symmetry Marca do metanol: Tedia

Os resultados obtidos nos oito ensaios, para a solução amostra (Am) e solução padrão (Pa) de lumefantrina estão demonstrados na Tabela 21. Os valores apresentados na tabela representam a média de três injeções de cada solução.

**Tabela 21 – Resultados obtidos nos oito ensaios realizados para avaliação da robustez, para soluções amostra e padrão de lumefantrina.**

Condição	Área		Tempo de retenção		Fator de cauda		N		Teor (%)
	Am	Pa	Am	Pa	Am	Pa	Am	Pa	
1	858	839	4,91	4,40	1,06	0,94	4730	4433	99,63
2	876	855	6,71	6,67	1,95	1,92	5254	5276	99,80
3	727	709	3,89	3,89	1,04	1,04	3924	3927	99,85
4	719	703	5,63	5,61	2,57	2,56	3433	3418	99,63
5	726	711	10,26	10,25	1,92	1,90	5350	5456	99,48
6	710	694	5,66	5,60	1,09	1,09	4509	4403	99,64
7	857	838	12,27	11,75	2,54	3,00	5056	3598	99,60
8	870	852	4,55	4,40	1,05	1,02	5020	4467	99,51

Para avaliar o efeito de cada parâmetro, a média dos quatro valores correspondentes às variações foi subtraída da média dos quatro valores obtidos nas condições nominais, conforme equação demonstrada no item 1.2.3.3.6. Os resultados das equações aplicadas aos sete parâmetros avaliados estão representados na Tabela 22.

**Tabela 22 – Efeito dos parâmetros analíticos no teor, tempo de retenção, fator de cauda e número de pratos teóricos do método cromatográfico para quantificação de lumefantrina.**

Efeito	Teor (%)*	tr (min)*	Fator de cauda*	N*
Proporção de metanol na fase móvel (A = 80%; a = 77%)	99,73 – 99,56 = <b>0,17</b>	5,14 – 8,00 = <b>-2,86</b>	1,62 – 1,75 = <b>-0,14</b>	4263 – 4481 = <b>-218</b>
pH aparente da fase móvel (B = 2,8; b = 3,1)	99,64 – 99,65 = <b>-0,01</b>	6,73 – 6,41 = <b>0,32</b>	1,46 – 1,90 = <b>-0,44</b>	4892 – 3853 = <b>1039</b>
Temperatura da coluna (C = 30°C; c = 35°C)	99,64 – 99,65 = <b>-0,01</b>	7,57 – 5,57 = <b>2,00</b>	1,72 – 1,65 = <b>0,07</b>	4353 – 4391 = <b>-38</b>
Fluxo da fase móvel (D = 1,0 ml/min; d = 1,2 ml/min)	99,64 – 99,65 = <b>-0,01</b>	6,81 – 6,34 = <b>0,47</b>	1,72 – 1,65 = <b>0,07</b>	4443 – 4301 = <b>142</b>
Marca da coluna (E = Symmetry, e = Ace)	99,66 – 99,63 = <b>0,03</b>	4,57 – 8,57 = <b>-4,00</b>	1,02 – 2,34 = <b>-1,32</b>	4308 – 4437 = <b>-129</b>
Marca do metanol (F = Tedia; f = J.T.Baker)	99,56 – 99,72 = <b>-0,16</b>	6,17 – 6,98 = <b>-0,81</b>	1,61 – 1,76 = <b>-0,16</b>	4443 – 4301 = <b>142</b>
Modelo do cromatógrafo (G = Agilent 1200; g = HP1100)	99,63 – 99,66 = <b>-0,03</b>	6,84 – 6,30 = <b>0,54</b>	1,90 – 1,47 = <b>0,43</b>	3963 – 4782 = <b>-819</b>

\* Média dos valores obtidos em condições nominais – média dos valores obtidos nas condições variadas.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 22, observa-se que o método cromatográfico se mostrou altamente robusto em relação ao teor de lumefantrina, quando variações em sete parâmetros analíticos foram induzidas no método. A maior variação no teor de lumefantrina foi 0,17%, quando a proporção de metanol na fase móvel foi alterada, valor consideravelmente baixo e não significativo em análises rotineiras.

O tempo de retenção do pico de lumefantrina sofreu influência mais pronunciada de três parâmetros analíticos. A redução da proporção de metanol diminuiu a força eluente da fase móvel e levou ao aumento do tempo de retenção do pico de lumefantrina. A alteração da marca da coluna promoveu o mesmo efeito. Apesar de ambas as colunas apresentarem a mesma fase estacionária (sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilano) e o mesmo comprimento (250 mm), alterações na marca ou mesmo no lote das colunas podem levar à pronunciada alteração da seletividade da fase estacionária em relação ao analito. Além disso, a alteração da marca da coluna promoveu também considerável aumento do fator de cauda, decorrente da menor porcentagem de cobertura de carbono da coluna Ace (15,5%), comparada com a coluna Symmetry (19%) e do alargamento de banda que se observa com o aumento do tempo de retenção.

O aumento da temperatura da coluna de 30 °C para 35 °C causou uma redução de 2 minutos no tempo de retenção do pico de lumefantrina. Neste caso, cuidado especial deve ser tomado, pois a combinação de temperaturas elevadas com valores de pH próximos aos limites de trabalho da coluna, como 2,8, pode reduzir seu tempo de vida útil devido à hidrólise da sílica na fase estacionária (SNYDER *et al.*, 1997).

O pH aparente da fase móvel apresentou efeito considerável no aumento do fator de cauda do pico de lumefantrina. A utilização da fase móvel com pH aparente de 2,8 garante a total ionização da lumefantrina, que é uma base fraca. O aumento do pH pode prejudicar a ionização do fármaco e, com isso, ele passa a se apresentar parcialmente não ionizado, levando à formação de cauda no pico. A alteração no modelo do cromatógrafo foi outro parâmetro que demonstrou influência sobre o fator de cauda. Este fato pode ser decorrente da presença de volume morto nas junções entre os módulos presentes nos equipamentos.

O número de pratos teóricos é um parâmetro que leva em consideração tanto o tempo de retenção quanto o alargamento das bandas do analito. Quanto maior o tempo de retenção e menor o alargamento das bandas, maior será a eficiência da coluna. Assim, foi possível observar uma correlação direta entre o número de pratos teóricos e tempo de retenção e fator de cauda nos resultados da Tabela 22. O pH aparente da fase móvel, por

exemplo, que levou ao aumento do fator de cauda de lumefantrina, causou também redução significativa do número de pratos teóricos, indicando diminuição da eficiência da coluna. A alteração do modelo do cromatógrafo apresentou o efeito contrário, redução do fator de cauda e conseqüente aumento do número de pratos teóricos. A variação da marca da coluna não promoveu alteração significativa no número de pratos teóricos, provavelmente porque o aumento do fator de cauda foi compensado pelo aumento significativo do tempo de retenção.

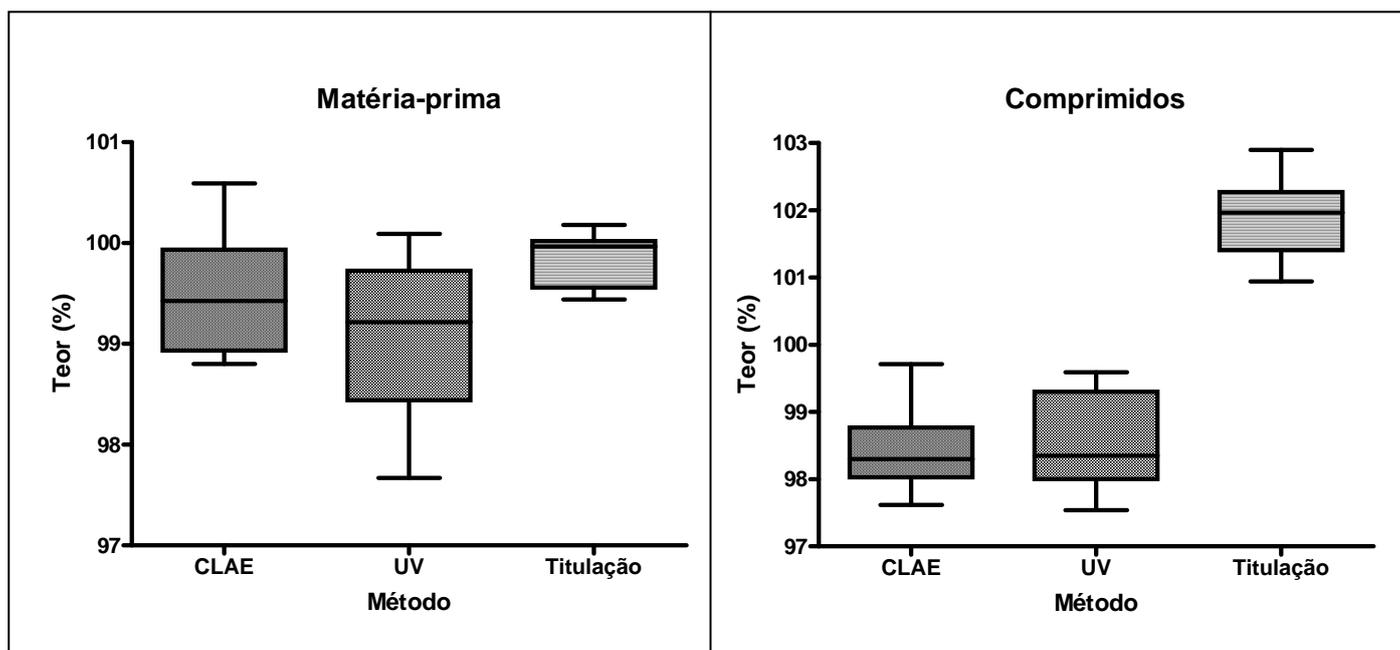
Alguns parâmetros como fluxo da fase móvel e marca do metanol apresentaram pouca influência nos fatores avaliados para o método cromatográfico.

### 2.3.2 Quantificação de lumefantrina em matéria-prima e comprimidos

Os métodos por CLAE, UV e titulação em meio não aquoso foram aplicados para quantificação de lumefantrina em matéria-prima e comprimidos. Os teores obtidos por cada método, para cada amostra, estão demonstrados na Tabela 23. A Figura 10 apresenta, de forma esquemática, os resultados obtidos.

**Tabela 23 – Teores de lumefantrina determinados por CLAE, UV e titulação em meio não aquoso, em amostras de matéria-prima e comprimidos.**

Replicatas	Matéria-prima			Comprimidos		
	CLAE	UV	Titulação	CLAE	UV	Titulação
1	100,59	99,82	100,02	97,61	97,66	101,38
2	98,85	99,68	100,18	97,75	97,69	101,56
3	99,71	99,77	100,02	97,12	97,37	101,96
4	99,97	100,09	100,06	99,21	98,82	102,39
5	99,99	99,48	99,99	98,97	98,87	102,40
6	99,90	99,10	99,59	97,44	98,01	101,58
7	99,14	99,16	100,01	98,08	97,16	101,55
8	99,82	99,27	99,94	97,12	97,04	100,60
9	98,80	98,29	99,58	97,73	97,63	101,12
10	99,08	97,67	99,53	98,46	98,78	100,44
11	98,80	97,71	99,51	97,93	99,09	101,18
12	99,01	98,59	99,44	97,85	98,24	100,69
Média (%)	99,47	99,05	99,82	97,94	98,03	101,41
DPR (%)	0,60	0,82	0,27	0,67	0,73	0,63



**Figura 10 - Teores de lumefantrina determinados por CLAE, UV e titulação em meio não aquoso, em amostras de matéria-prima e comprimidos.**

Para comparação das médias obtidas pelos três métodos, inicialmente foi aplicada análise de variância (ANOVA), com nível de confiança de 0,05. O  $F$  crítico utilizado, considerando-se 33 graus de liberdade, foi 3,285 para a amostra de matéria-prima e de comprimidos. Na comparação dos teores da matéria-prima, o  $F$  obtido foi igual a 4,903 e, para os comprimidos, 103,604. Como  $F$  calculado foi superior ao  $F$  crítico em ambas as amostras, houve diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas por CLAE, UV e titulação para análise de lumefantrina na matéria-prima e nos comprimidos.

Em seguida, foi aplicado teste de Tukey, também com nível de confiança de 0,05, com objetivo de identificar as médias diferentes dentro de cada grupo. Para a análise da matéria-prima, o teste de Tukey indicou que as médias obtidas por CLAE e UV, assim como aquelas obtidas por CLAE e titulação, foram estatisticamente equivalentes ( $p > 0,05$ ). Entretanto, houve uma diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas por UV e titulação ( $p < 0,05$ ), de forma que os dois métodos não são equivalentes. Na análise dos comprimidos, o teste de Tukey indicou que houve equivalência estatística entre as médias obtidas por CLAE e UV ( $p > 0,05$ ), e que os resultados obtidos por titulação foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos pelos outros dois métodos ( $p < 0,05$ ).

Teores consideravelmente mais elevados foram encontrados quando titulação em meio não aquoso foi utilizada para análise dos comprimidos. A presença de excipientes

com características básicas, que podem reagir com o ácido perclórico, como o estearato de magnésio, pode interferir no processo de titulação, levando à obtenção de teores maiores do que os reais. Assim, titulação em meio não aquoso não pode ser considerada um método adequado para quantificação de lumefantrina em comprimidos, uma vez que não apresentou seletividade adequada em relação aos excipientes da formulação.

Em relação à análise da matéria-prima, os três métodos avaliados se mostraram adequados para quantificação de lumefantrina. Apesar da análise estatística ter revelado diferença significativa entre os resultados obtidos por UV e titulação, a diferença de teor entre os métodos foi inferior a 1% e todos apresentaram precisão satisfatória. Interferências em potencial não foram identificadas em nenhum método avaliado para matéria-prima, apesar de espectrofotometria no UV e titulação em meio não aquoso poderem quantificar produtos de degradação e impurezas de síntese que apresentam estrutura química semelhante à lumefantrina.

Dentre os métodos avaliados, CLAE apresentou maior sensibilidade e seletividade, podendo provavelmente ser aplicada para quantificação de lumefantrina em meios biológicos e para análise de traços. Outros fatores importantes que devem ser levados em consideração são o custo e o tempo de análise. Os métodos espectrofotométrico e volumétrico são consideravelmente mais rápidos e mais econômicos, comparando-se à cromatografia. Além disso, não é necessário treinamento prolongado dos operadores para execução dos mesmos. Tendo em vista a necessidade da avaliação da qualidade de medicamentos antimaláricos utilizados atualmente e que nem sempre os laboratórios presentes nas áreas endêmicas de malária dispõem de recursos financeiros com facilidade, o desenvolvimento e a disponibilização de métodos rápidos, simples e viáveis são imprescindíveis para auxiliar a garantir a qualidade e a eficácia do tratamento com antimaláricos.

#### **2.4 Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE com detecção UV para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada**

Artemeter apresenta absorção na região do ultravioleta apenas nos comprimentos de onda iniciais do espectro (Figura 3), devido à ausência de ligações duplas e cromóforos estendidos em sua estrutura. Além disso, a absorvidade de artemeter é consideravelmente baixa nessa região, de forma que métodos com detecção no

ultravioleta apresentam baixa sensibilidade para quantificação do fármaco. Por outro lado, lumefantrina apresenta absorvidade bastante elevada na região do ultravioleta, o que dificultou de forma considerável a determinação de uma tomada de amostra adequada dos comprimidos, em que artemeter apresentasse pico com intensidade razoável, sem ocorrer saturação da coluna e do detector pela lumefantrina. Assim, foi desenvolvido um método por CLAE, com detecção na região do ultravioleta (210 nm), por meio da adição de padrão de artemeter nas amostras.

O método de adição de padrão é frequentemente utilizado em análises de traços, em que quantidades determinadas de padrão são adicionadas à amostra, que já contém uma concentração desconhecida do analito. Um aspecto importante neste método é que a resposta do analito antes da adição do padrão deve ser elevada o suficiente para fornecer uma razão sinal/ruído adequada ( $> 10$ ), caso contrário o resultado apresenta baixa precisão (SNYDER *et al.*, 1997).

Inicialmente, tentou-se a quantificação simultânea dos fármacos sem adição de padrão de artemeter. Entretanto, para a obtenção de picos de artemeter com intensidade adequada e áreas com precisão satisfatória, a concentração da solução injetada no cromatógrafo deve ser, no mínimo, 200 a 300  $\mu\text{g/ml}$ . Considerando-se que a dosagem de lumefantrina nos comprimidos é seis vezes superior a de artemeter (20 mg de artemeter + 120 mg de lumefantrina), a análise de uma solução contendo 200  $\mu\text{g/ml}$  de artemeter implica na injeção de solução de lumefantrina a 1200  $\mu\text{g/ml}$ . No método cromatográfico desenvolvido para quantificação de lumefantrina em matéria-prima, a concentração de trabalho utilizada foi 24  $\mu\text{g/ml}$ , de forma que a injeção de uma solução 50 vezes mais concentrada levou à obtenção de picos deformados, devido à saturação da coluna e/ou do detector. Uma alternativa avaliada foi a detecção de artemeter em 210 nm e a detecção de lumefantrina em comprimentos de onda nos quais este fármaco apresenta menor absorvidade, como 380 nm. Entretanto, apesar da área do pico apresentar menor valor, sua simetria permaneceu inadequada, não sendo viável para análises quantitativas.

Por meio do método de adição de padrão, foi possível trabalhar com soluções contendo 300  $\mu\text{g/ml}$  de lumefantrina e 400  $\mu\text{g/ml}$  de artemeter (50  $\mu\text{g/ml}$  provenientes do comprimido e 350  $\mu\text{g/ml}$  provenientes do padrão adicionado). Nesta concentração, o pico de lumefantrina é bastante intenso, mas apresenta simetria adequada (fator de cauda = 1,81). Nos experimentos realizados, foi feita padronização de uma matéria-prima de artemeter para utilização como padrão de trabalho. Este procedimento reduz o custo da análise, tornando viável sua execução mesmo em laboratórios com poucos recursos financeiros.

### 2.4.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

Para otimização do método cromatográfico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina, foram avaliadas duas fases estacionárias (C<sub>18</sub> e ciano) e diferentes proporções dos solventes da fase móvel.

Os parâmetros cromatográficos foram inicialmente avaliados usando uma coluna Symmetry C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 µm) e fase móvel composta por acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20). Nessas condições, os fatores de retenção obtidos para artemeter e lumefantrina foram 5,05 e 0,61, respectivamente. Apesar de uma resolução adequada entre os picos ter sido obtida, essa condição implica em um longo tempo de corrida, uma vez que o pico de artemeter foi eluído apenas após 9 minutos. Além disso, o pico de artemeter sofre alargamento de banda considerável e o pico de lumefantrina é eluído muito próximo ao tempo morto.

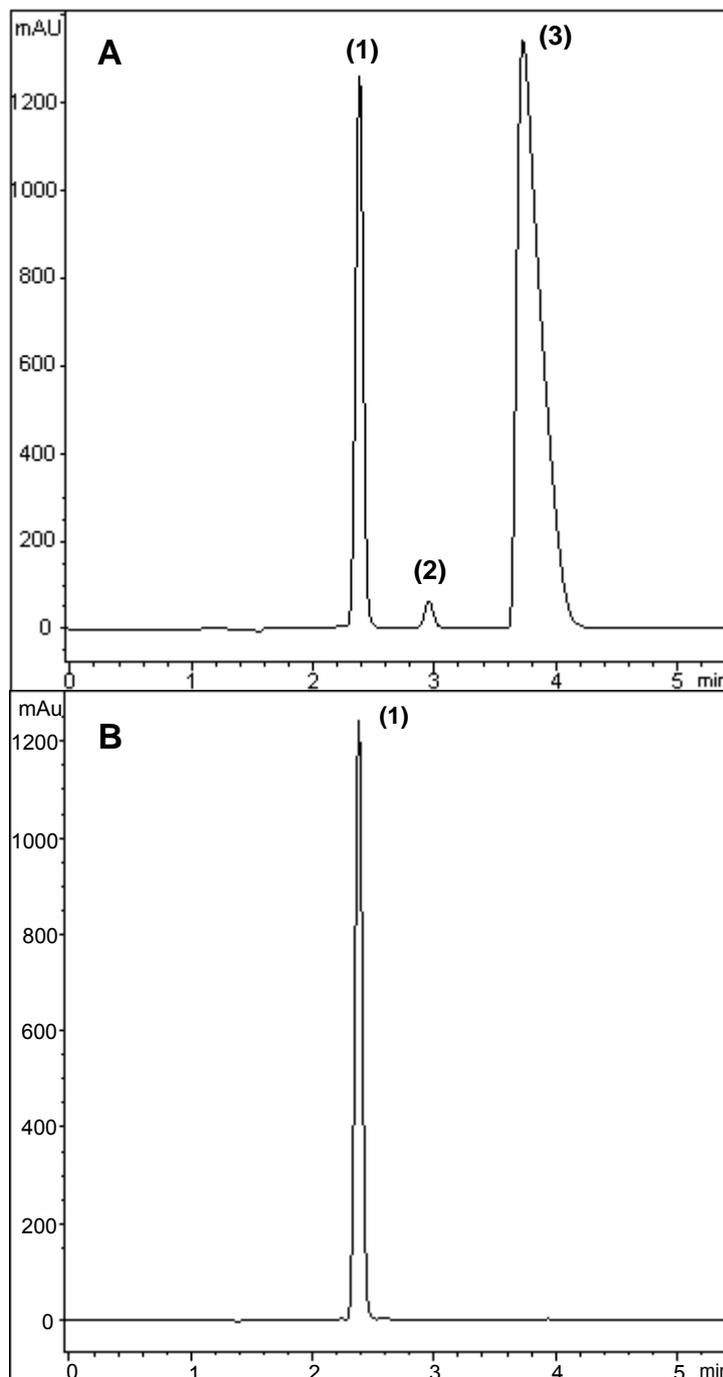
Assim, a coluna Symmetry C<sub>18</sub> foi substituída pela Zorbax SB-Ciano, que apresentou melhores resultados para análise dos fármacos. Empregando-se a coluna ciano, diferentes proporções dos solventes da fase móvel foram avaliadas, com o objetivo de obter fatores de retenção satisfatórios e resolução adequada entre os picos de artemeter e lumefantrina. Os resultados obtidos desta avaliação estão demonstrados na Tabela 24.

**Tabela 24 – Parâmetros cromatográficos para artemeter e lumefantrina em diferentes composições de fase móvel, usando coluna Zorbax SB-Ciano.**

Composição da fase móvel ACN: ác. trifluoroacético 0,05%	Fator de retenção de artemeter ( <i>k</i> )	Fator de retenção de lumefantrina ( <i>k</i> )	Resolução (R)
80 : 20	0,32	0,28	0,00
75 : 25	0,38	0,36	0,00
70 : 30	0,48	0,56	0,00
65 : 35	0,63	0,91	0,54
60 : 40	0,86	1,53	2,38
55 : 45	1,14	2,19	3,23

A fase móvel composta por acetonitrila e ácido trifluoroacético, na proporção 60:40, promoveu adequada separação dos picos de artemeter e lumefantrina (R = 2,38), em um tempo de corrida curto (5 minutos), conforme demonstrado no cromatograma da Figura 11A. Apesar do fator de retenção do pico de artemeter ser inferior a 1, foi obtida separação adequada do pico de clorofórmio (utilizado no preparo das amostras) e o

tempo de retenção de artemeter (2,91 min) foi praticamente o dobro do tempo morto (1,56 min). Com a utilização de fase móvel composta por acetonitrila e ácido trifluoroacético (55:45), os fatores de retenção dos fármacos foram maiores, entretanto, o fator de cauda de lumefantrina aumentou para 2,0, já indicando assimetria considerável do pico. Assim, a proporção 60:40 de acetonitrila e ácido trifluoroacético na fase móvel foi adotada para as análises subseqüentes.



**Figura 11** – Cromatograma obtido por CLAE para (A) solução contendo 400 µg/ml de artemeter e 300 µg/ml de lumefantrina e (B) mistura dos excipientes dos comprimidos, em coluna Zorbax SB-Ciano e fase móvel composta por acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,05% (60:40). Identificação dos picos: (1) clorofórmio, (2) artemeter e (3) lumefantrina.

## 2.4.2 Validação

### 2.4.2.1 Linearidade

As curvas analíticas obtidas indicaram correlação linear adequada entre as concentrações dos fármacos e as áreas dos picos, nas faixas de 200 a 600 µg/ml de artemeter e 150 a 450 µg/ml de lumefantrina. A Tabela 25 apresenta as concentrações de artemeter e lumefantrina e suas respectivas áreas para construção da curva analítica.

**Tabela 25 – Concentrações das soluções de artemeter e lumefantrina e respectivas áreas para obtenção das curvas analíticas do método por CLAE.**

Solução	Artemeter		Lumefantrina	
	Conc. (µg/ml)	Área	Conc. (µg/ml)	Área
1	198,90	167,93	150,48	8696,35
	201,52	169,26	149,44	8596,00
	200,27	169,82	150,66	8647,00
2	298,35	251,06	225,72	13017,50
	302,28	252,97	224,17	12922,50
	300,40	254,01	225,99	13295,50
3	397,80	333,74	300,96	17303,00
	403,04	336,26	298,89	17151,50
	400,54	342,93	301,31	17359,50
4	497,25	410,38	376,20	21557,50
	503,80	419,64	373,61	21334,50
	500,67	419,82	376,64	21671,50
5	596,70	495,22	451,43	25819,50
	604,56	502,37	448,33	25696,50
	600,81	500,24	451,97	25736,50

Além disso, a linearidade para artemeter também foi avaliada segundo o procedimento de adição de padrão adotado para a análise dos comprimidos. Da mesma forma, foi encontrada correlação linear adequada entre as concentrações de artemeter e as áreas dos picos, na faixa de 375 a 425 µg/ml.

Os dados das análises de regressão linear estão demonstrados na Tabela 26.

**Tabela 26 - Resultados da análise de regressão linear obtidos para a quantificação de artemeter e lumefantrina por CLAE.**

Parâmetros da regressão	Artemeter	Lumefantrina	Artemeter – método de adição de padrão
Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9995	0,9998	0,9984
Inclinação $\pm$ desvio padrão	0,82 $\pm$ 0,01	56,80 $\pm$ 0,24	1,08 $\pm$ 0,01
Intercepto $\pm$ desvio padrão	5,24 $\pm$ 2,13	192,65 $\pm$ 76,25	-100,61 $\pm$ 4,74
Desvio padrão relativo (%)	0,82	0,57	0,25
Faixa de concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	200 - 600	150 - 450	375 - 425
Número de pontos	5	5	5

Os valores do coeficiente de determinação ( $r^2 > 0,99$  em todas as curvas) indicam que, dentro das faixas de concentração avaliadas, as concentrações de artemeter e lumefantrina foram diretamente proporcionais às áreas dos picos. Os gráficos de resíduos versus as concentrações de artemeter ou lumefantrina demonstraram distribuição aleatória, não apresentando qualquer tendência. Portanto, o método apresentou linearidade adequada para ambos os fármacos.

#### 2.4.2.2 Precisão

Avaliou-se a precisão intra-corrida e inter-corridas do método por CLAE por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho (400  $\mu\text{g/ml}$  de artemeter e 300  $\mu\text{g/ml}$  de lumefantrina), em soluções amostra contendo artemeter e lumefantrina. Os valores de teor e DPR obtidos para cada fármaco estão representados na Tabela 27.

**Tabela 27 – Valores de teor e DPR obtidos para artemeter e lumefantrina na avaliação da precisão intra-corrida e inter-corridas do método por CLAE.**

Fármaco	Parâmetro	Precisão intra-corrida ( $n = 6$ )	Precisão inter-corridas ( $n = 12$ )
Artemeter	Teor médio (%)	101,69	101,93
	DPR (%)	1,08	1,18
Lumefantrina	Teor médio (%)	99,02	99,43
	DPR (%)	0,64	0,74

Os valores de DPR obtidos para ambos os fármacos foram inferiores a 2,0%, indicando que o método por CLAE apresentou precisão intra-corrida e inter-corridas satisfatórias.

### 2.4.2.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método do placebo contaminado, em três níveis de concentração, cada um em triplicata. As quantidades de padrão adicionadas e recuperadas, assim como as porcentagens de recuperação para cada fármaco estão demonstradas na Tabela 28.

**Tabela 28** – Quantidades de padrão adicionadas, recuperadas e porcentagens de recuperação de cada fármaco para avaliação da exatidão do método por CLAE.

Nível	ARTEMETER			LUMEFANTRINA		
	Padrão adicionado (mg)	Padrão recuperado (mg)	Recuperação (%)	Padrão adicionado (mg)	Padrão recuperado (mg)	Recuperação (%)
1	74,87	74,88	100,01	56,14	56,89	101,33
	74,93	75,89	101,28	56,11	56,97	101,52
	74,81	75,38	100,76	56,46	57,58	101,98
2	100,40	102,08	101,68	74,74	75,94	101,60
	99,62	100,99	101,38	74,94	75,96	101,36
	99,93	101,20	101,27	74,75	76,05	101,74
3	125,09	126,42	101,06	94,27	95,44	101,24
	124,61	125,42	100,65	94,02	95,50	101,58
	124,61	126,58	101,57	93,94	95,72	101,89
		Média (%)	101,07		Média (%)	101,58
		DPR (%)	0,52		DPR (%)	0,25

Os valores de porcentagem de recuperação entre 98% e 102% e desvio padrão relativo abaixo de 2,0% indicam que o método por CLAE apresentou exatidão adequada para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos.

### 2.4.2.4 Seletividade

As purezas espectrais dos picos de artemeter e lumefantrina no cromatograma obtido com a solução padrão, por meio do detector de arranjo de diodos, foram 99,88% e 99,98%, respectivamente. Na solução amostra, os valores de pureza foram 99,28% e 99,89%, para artemeter e lumefantrina, respectivamente. De acordo com os valores

obtidos, substâncias interferentes não eluíram no mesmo tempo de retenção dos picos de artemeter e lumefantrina e, assim, o método se mostrou seletivo para quantificação de ambos os fármacos em comprimidos.

No cromatograma da solução contendo apenas a mistura dos excipientes do comprimido (Figura 11B), foi obtido apenas um pico referente ao clorofórmio, no início do cromatograma. Não foram visualizados picos interferentes no mesmo tempo de retenção de artemeter e lumefantrina.

#### 2.4.2.5 Robustez

Os resultados das análises de seis soluções amostra contendo artemeter e lumefantrina, nas condições nominais e variando-se a proporção de acetonitrila na fase móvel, pH aparente, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna, estão demonstrados na Tabela 29.

**Tabela 29** - Resultados das análises obtidas em condições nominais e com variações nos parâmetros analíticos para avaliação da robustez do método por CLAE para quantificação de artemeter e lumefantrina.

Parâmetro	Valor	ARTEMETER			LUMEFANTRINA			Resolução
		Teor (%)	tr (min)	Fator T	Teor (%)	tr (min)	Fator T	
Proporção de ACN (%)	58	102,09	3,13	1,12	99,17	4,29	2,00	3,95
	60	101,69	2,95	1,06	99,02	3,73	1,86	3,14
	62	101,47	2,77	1,11	99,08	3,22	1,73	2,19
pH aparente	2,15	101,60	2,95	0,94	100,30	3,70	1,87	3,08
	2,35	102,17	2,95	1,06	99,85	3,73	1,86	3,14
	2,55	101,31	2,95	1,02	100,58	3,75	1,87	3,20
Fluxo (ml/min)	0,8	101,20	3,68	1,03	99,53	4,62	1,96	3,01
	1,0	101,69	2,95	1,06	99,02	3,73	1,86	3,14
	1,2	101,82	2,45	0,96	99,44	3,06	1,77	3,00
Temp. da coluna (° C)	25	101,92	3,09	1,10	99,06	3,78	1,95	3,15
	30	101,49	2,95	1,06	99,01	3,73	1,89	3,12
	35	102,26	2,93	1,12	98,64	3,24	1,90	2,99

Para cada parâmetro, os valores de teor obtidos para os fármacos foram estatisticamente comparados por meio de análise de variância (ANOVA). Em todas as

análises, os valores de  $F$  calculados foram inferiores aos valores de  $F$  crítico, com nível de confiança de 95% ( $\alpha = 0,05$ ), indicando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os teores de artemeter e lumefantrina quando se induziu pequena variação na proporção de acetonitrila na fase móvel, no pH aparente da fase móvel, no fluxo e na temperatura da coluna. Desta forma, o método por CLAE pode ser considerado robusto para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos.

De acordo com os resultados, observa-se que a diminuição da proporção de acetonitrila na fase móvel promoveu aumento no tempo de retenção dos fármacos e conseqüentemente, aumento na resolução entre os picos. Entretanto, essa alteração apresentou efeito negativo sobre o fator de cauda de lumefantrina, que aumentou para 2,00. A alteração do fluxo da fase móvel promoveu alterações no tempo de retenção dos dois fármacos e no fator de cauda de lumefantrina, mas não foi observado efeito em relação à resolução entre os picos no cromatograma. O tempo de retenção dos fármacos variou ligeiramente com a alteração da temperatura da coluna, enquanto o pH aparente da fase móvel não demonstrou efeito significativo em nenhum dos parâmetros analíticos avaliados.

#### 2.4.2.6 Limites de detecção e quantificação

Foram preparadas oito soluções diluídas contendo artemeter e lumefantrina, nas mesmas proporções da concentração de trabalho. Os limites de detecção e quantificação foram determinados por meio da equação que leva em consideração parâmetros da curva analítica e pela razão sinal/ruído obtida em cromatogramas de soluções diluídas. Além disso, para definir o limite de quantificação, avaliou-se o desvio padrão relativo das áreas obtidas em replicatas de injeções das soluções diluídas, considerando-se satisfatórios valores inferiores a 2,0%. Os valores obtidos estão representados na Tabela 30.

**Tabela 30 – Limites de detecção e quantificação de artemeter e lumefantrina determinados pela curva analítica e pela razão sinal/ruído.**

Fármaco	Limite de detecção ( $\mu\text{g/ml}$ )		Limite de quantificação ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Curva analítica	Razão sinal/ruído	Curva analítica	Razão sinal/ruído
Artemeter	8,54	5,00	25,88	15,00
Lumefantrina	4,43	0,10	13,42	0,50

Os limites de detecção e quantificação encontrados pela razão sinal/ruído foram consideravelmente menores do que aqueles calculados pela equação e se aproximam mais dos valores reais, uma vez que foram obtidos pela avaliação da resposta de soluções diluídas dos fármacos.

Os limites de detecção e quantificação de artemeter foram significativamente maiores do que aqueles obtidos para lumefantrina, devido à sua baixa absorvidade na região do ultravioleta. Entretanto, como o objetivo do método é a quantificação simultânea dos dois fármacos, deve-se manter a proporção da concentração de trabalho para definição dos limites de detecção e quantificação e posteriores análises. Assim, considerando-se que artemeter é o fármaco limitante em relação à sensibilidade do método, os limites de detecção foram 5,00 µg/ml de artemeter e 3,75 µg/ml de lumefantrina, e os limites de quantificação, 15 µg/ml de artemeter e 11,25 µg/ml de lumefantrina.

### 2.4.3 Quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada

Amostras de comprimidos de dose fixa combinada (Coartem<sup>®</sup> e Co-artesiane<sup>®</sup>) contendo 20 mg de artemeter e 120 mg de lumefantrina foram analisados, em sextuplicata, pelo método por CLAE desenvolvido e validado. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 31.

**Tabela 31 – Teores de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada, determinados por CLAE (n = 6).**

Amostra	Lote	Teor (%) ± desvio padrão	
		Artemeter	Lumefantrina
Coartem <sup>®</sup>	04137	101,69 ± 1,09	99,02 ± 0,63
	F0168	103,35 ± 1,25	97,92 ± 0,24
	F0311	98,61 ± 0,59	98,89 ± 0,53
Co-artesiane <sup>®</sup>	5002	101,71 ± 1,00	100,48 ± 0,23

Todos os lotes analisados apresentaram teores de artemeter e lumefantrina próximos à quantidade declarada e dentro da faixa de 95% a 105% do valor rotulado. O teor de artemeter nos comprimidos variou de 98,61% a 103,35%, enquanto para

lumefantrina obteve-se variação de 97,92% a 100,48%. Desta forma, todos os comprimidos apresentaram qualidade adequada em relação aos teores de artemeter e lumefantrina.

A quantificação simultânea dos fármacos em associação, como em comprimidos de dose fixa combinada, apresenta vantagens como menor tempo de análise, menor gasto de solventes e de amostras. Entretanto, quando esses fármacos apresentam características estruturais e comportamentos químicos distintos, a otimização dos processos de separação e detecção se torna um desafio.

O desenvolvimento de métodos analíticos simples e confiáveis é essencial para identificação e determinação quantitativa dos fármacos, uma vez que o problema de medicamentos antimaláricos falsificados ou de qualidade inadequada é bem estabelecido em vários países, principalmente na África e sudeste da Ásia (GREEN *et al.*, 2001; ATEMNKENG *et al.*, 2007). A utilização de medicamentos com baixos teores pode contribuir para o desenvolvimento de resistência do plasmódio, devido à exposição a doses sub-terapêuticas do fármaco. Além disso, apesar da associação de artemeter e lumefantrina apresentar perfil adequado de segurança e tolerabilidade em humanos (BAKSHI *et al.*, 2000), doses elevadas levaram à neurotoxicidade (NONTPRASERT *et al.*, 2002) e hepatotoxicidade (ADARAMOYE *et al.*, 2008) em animais, de forma que medicamentos com teores muito elevados dos fármacos podem não apresentar segurança terapêutica adequada.

Assim, é de extrema importância avaliar e controlar a qualidade dos medicamentos antimaláricos comercializados e distribuídos atualmente, por meio de métodos rápidos e simples, que podem ser executados em qualquer laboratório, incluindo aqueles que não dispõem de facilidades de recursos. Estas medidas podem ajudar a garantir a eficácia do tratamento e evitar o desenvolvimento de resistência aos antimaláricos, sendo importantes ferramentas para o controle efetivo da malária em áreas endêmicas.

### 3 CONCLUSÕES

- O método por CLAE com detecção UV descrito na Farmacopéia Internacional 4ª edição, após adaptações visando reduzir o tempo de análise e a concentração de trabalho, se mostrou seletivo, preciso e linear na faixa de 2,0 a 6,0 mg/ml, podendo ser aplicado para quantificação de artemeter em matéria-prima.

- CLAE, espectrofotometria na região do ultravioleta e volumetria em meio não-aquoso forneceram resultados entre 99,05% e 99,82% para quantificação de lumefantrina em matéria-prima. Como são métodos simples e relativamente rápidos, podem ser aplicados com sucesso a análises rotineiras em controle de qualidade.

- Para a quantificação de lumefantrina em comprimidos, resultados mais confiáveis foram obtidos por CLAE (97,94%) e espectrofotometria no UV (98,03%), uma vez que foram detectadas interferências no método por titulação em meio não aquoso (101,41%).

- O teste de Youden se mostrou uma ferramenta confiável e prática para validação da robustez do método cromatográfico para quantificação de lumefantrina em matéria-prima, tornando possível a avaliação da influência de várias condições analíticas nos parâmetros cromatográficos do método.

- O método por CLAE com detecção UV (210 nm) desenvolvido se mostrou simples e adequado para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada. O método demonstrou ser seletivo, linear na faixa de 150 a 450 µg/ml para artemeter e 200 a 600 µg/ml para lumefantrina, preciso (DPR < 2,0%), exato (taxas de recuperação próximas a 100%) e robusto, podendo ser empregado para quantificação dos fármacos e análise da qualidade dos comprimidos.

## **CAPÍTULO 3**

**Desenvolvimento e validação de método bioanalítico  
para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina  
em plasma humano**

## 1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Materiais

#### 1.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR) e amostras

- Artemeter SQR (Dafra Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 10203215, validade 04/2009.
- Lumefantrina SQR (Dafra Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 05083101, validade 08/2008.
- Diidroartemisinina SQR (Dafra Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 060710-2091, validade 07/2009.
- Artemeter matéria-prima (Dafra Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 0601010-4087, validade 08/2009.
- Lumefantrina matéria-prima (Dafra Pharma – Turnhout, Bélgica), lote 06032403, validade 08/2008.
- Coartem<sup>®</sup> comprimidos - 20 mg artemeter + 120 mg lumefantrina (Novartis – Basel, Suíça), lote F0725, validade 07/2009.

#### 1.1.2 Reagentes e vidraria

- Solventes e reagentes grau cromatográfico: acetonitrila, metanol, ácido acético, ácido fórmico.
- Solventes e reagentes grau analítico: acetato de amônio, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, hexano, metil-*t*-butil éter.
- Água destilada e água deionizada em sistema Millipore.
- Pipetas e balões volumétricos calibrados.
- Tubos de vidro de 10 cm.
- Minitubos Eppendorf.
- Béqueres, pesa-filtros e kit de filtração.

#### 1.1.3 Equipamentos e materiais

- Aparelho de ultra-som BRANSONIC 220.

- Aparelho para infusão direta KD Scientific.
- Balança analítica SARTORIUS BP210D com precisão de 0,01 mg.
- Centrífuga JOUAN MR 23 I.
- Coluna cromatográfica Zorbax SB-Ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm) - AGILENT.
- Concentrador de amostras TECNAL TE-0194.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência WATERS, composto por bomba binária 1525 µ, auto injetor 2777, forno de colunas DCM/CHM, acoplado a espectrômetro de massas WATERS Quattro LC.
- Estufa FANEM 306/1.
- Handy step Brand.
- Micropipetas P1000 e P200 Gilson.
- Potenciômetro METROHM HERISAU E510.
- Pré-coluna Zorbax SB-Ciano (12,5 x 4,6 mm, 5 µm) – AGILENT.
- Sistema de purificação de água Milli-Q-Plus MILIPORE.
- Vórtex JK MS1.

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em plasma humano por LC-MS/MS

#### 1.2.1.1 Detecção por espectrometria de massas

A primeira etapa do desenvolvimento do método por LC-MS/MS para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em plasma humano consistiu na avaliação e otimização da detecção dos fármacos no espectrômetro de massas.

Inicialmente, tentou-se ionizar e detectar artemeter e lumefantrina, isoladamente, por eletrospray no modo positivo (ESI(+)), de forma que os analitos recebessem uma carga positiva. Foram realizadas infusões diretas no espectrômetro de soluções de artemeter e lumefantrina isoladamente, cada uma a 500 ng/ml, em mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (60:40), com fluxo de 1200 µl/h. Em ESI(+), os principais parâmetros otimizados para obtenção de íons precursores  $[M+H]^+$  de alta intensidade nos espectros de massa (*MS Scan*) foram voltagem do capilar, voltagem do cone, temperaturas da fonte e de desolvatação e resolução LM-HM (*Low mass/high*

mass). Visando a obtenção de fragmentos de alta intensidade nos espectros de fragmentação (*Daughter Scan*), a voltagem de colisão foi otimizada.

Devido a dificuldades encontradas para ionização de artemeter por ESI(+), ionização química a pressão atmosférica (APCI – *Atmospheric pressure chemical ionization*) no modo positivo também foi avaliada. Foram realizadas infusões diretas de soluções de artemeter e lumefantrina isoladamente, cada uma a 10 µg/ml, em mistura de acetonitrila e água (50:50), com fluxo de 3000 µl/h. Em APCI(+), os principais parâmetros otimizados para obtenção de íons precursores  $[M+H]^+$  de alta intensidade nos espectros de massas (*MS Scan*) foram voltagem da agulha corona, voltagem do cone e temperaturas da fonte e da probe. Visando a obtenção de fragmentos de alta intensidade nos espectros de fragmentação (*Daughter Scan*), a voltagem de colisão foi otimizada.

Outra alternativa avaliada para intensificação da ionização e detecção de artemeter foi a utilização de ESI(+) com quantificação do aduto  $[M+NH_4]^+$  como íon precursor, formado quando utilizou-se fase móvel composta por mistura de metanol e tampão acetato de amônio 10 mM.

Os padrões internos avaliados para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma foram artesunato (ATS) e halofantrina (HAL). Da mesma forma, a ionização e detecção destes fármacos foram otimizadas no espectrômetro de massas, de modo a obter íons precursores e fragmentos de alta intensidade nos espectros.

### 1.2.1.2 Análise cromatográfica

Inicialmente, foram utilizadas as condições cromatográficas anteriormente otimizadas para a separação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada. Alguns parâmetros foram alterados, visando otimizar a intensidade do sinal dos fármacos no espectrômetro de massas, o tempo de análise e a separação de interferentes da matriz.

A coluna cromatográfica utilizada foi Zorbax SB-Ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm), com pré-coluna contendo a mesma fase estacionária (12,5 x 4,6 mm, 5 µm), mantidas a 30 ° C. O fluxo da fase móvel foi 1 ml/min.

Como solvente orgânico da fase móvel, acetonitrila e metanol foram avaliados quanto à intensidade do sinal e seletividade em relação aos fármacos. O solvente aquoso inicialmente avaliado foi ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) e, em seguida, tampão acetato de amônio 10 mM contendo 0,2% (v/v) de ácido acético (pH 4,0). A proporção do solvente

orgânico na fase móvel também foi otimizada, visando a obtenção de tempos de corrida curtos.

Avaliaram-se, ainda, os modos isocrático e em gradiente para eluição da fase móvel, visando obter completa separação dos analitos de interferentes provenientes do plasma que poderiam exercer efeito de matriz.

Como o fluxo de análise utilizado na cromatografia líquida é consideravelmente superior ao fluxo de entrada no qual o espectrômetro de massas pode operar, foi utilizada uma conexão T entre a saída do cromatógrafo e a entrada do detector. Assim, foi feita uma divisão do fluxo (*split*), de forma que 80% do solvente proveniente do cromatógrafo era descartado e apenas 20% era introduzido no espectrômetro de massas.

### 1.2.1.3 Extração dos fármacos do plasma

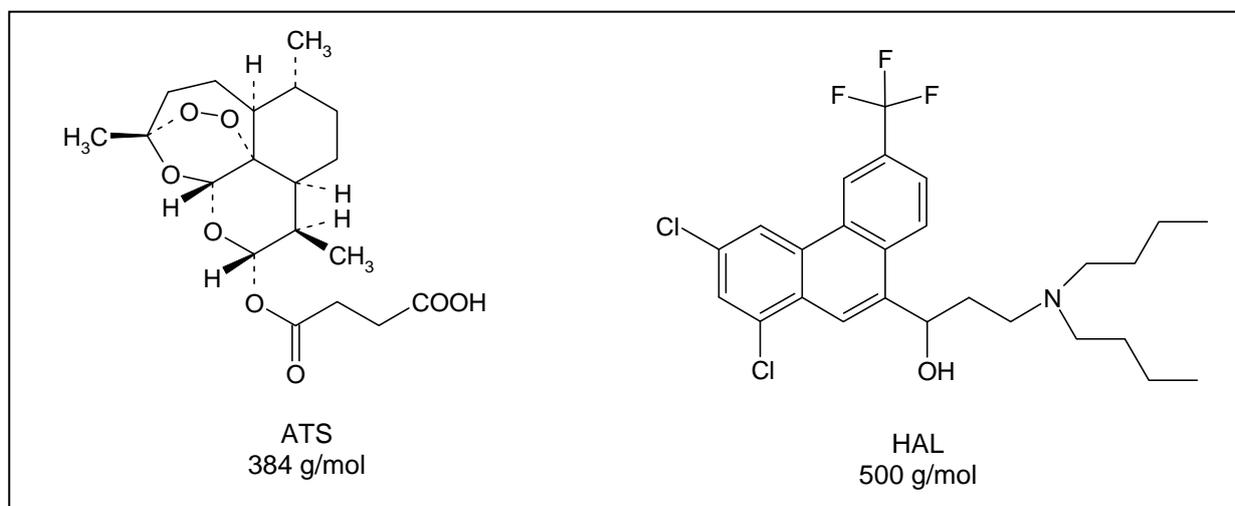
Para extração de artemeter e lumefantrina do plasma, foram avaliados os métodos de precipitação de proteínas e extração líquido-líquido. Estes métodos foram priorizados em detrimento à extração em fase sólida devido ao custo consideravelmente mais elevado deste último.

Para otimização das etapas de extração, foi feita a adição de padrões de artemeter e lumefantrina em plasma humano branco, obtido de voluntários que não estavam fazendo uso de qualquer medicação. As faixas de concentração plasmática avaliadas foram inicialmente definidas tendo como base dados sobre a farmacocinética dos fármacos presentes em estudos da literatura (NAVARATNAN *et al.*, 1995; MANSOR *et al.*, 1996; WHITE *et al.*, 1999). Além de lumefantrina atingir concentrações plasmáticas significativamente altas, a dose do fármaco nos comprimidos é elevada, de forma que a faixa avaliada foi de 10 a 18000 ng/ml. Para artemeter, a faixa de concentração plasmática foi 10 a 1000 ng/ml.

Para avaliação da extração, foi preparada solução padrão de lumefantrina a 2500 µg/ml em mistura de metanol e ácido acético (100:2) e solução padrão de artemeter a 1250 µg/ml em metanol. Estas soluções foram diluídas sequencialmente em mistura de metanol e água (1:1), de forma a obter uma solução padrão única contendo 250 µg/ml lumefantrina e 10 µg/ml de artemeter. Uma alíquota de 0,2 ml desta solução foi adicionada em 4,8 ml de plasma branco, de forma a obter 10000 ng/ml de lumefantrina e 400 ng/ml de artemeter como concentrações plasmáticas finais.

Os fármacos avaliados como possíveis padrões internos no processo de extração foram artesunato e halofantrina, cujas estruturas estão representadas na Figura 12.

Para avaliação do procedimento de extração líquido-líquido, várias misturas de solventes orgânicos extratores foram testadas, visando aumentar a eficiência de extração dos fármacos do plasma.



**Figura 12 – Estruturas químicas dos fármacos avaliados como padrões internos, artesunato (ATS) e halofantrina (HAL), e respectivas massas molares.**

Em tubos de vidro de 10 cm, 50  $\mu$ l da solução padrão interno (contendo 2500 ng/ml de artesunato ou 5000 ng/ml de halofantrina) foram adicionados a 250  $\mu$ l de plasma contendo os fármacos. Assim, as concentrações plasmáticas avaliadas foram 400 ng/ml de artemeter, 10000 ng/ml de lumefantrina, 500 ng/ml de artesunato e 1000 ng/ml de halofantrina. Nesta etapa, foi avaliada a adição de 200  $\mu$ l de metanol ou acetonitrila, visando a precipitação de proteínas do plasma e aumento da eficiência de extração. Em seguida, adicionaram-se 2 ml do solvente extrator testado e agitou-se em vórtex por 40 segundos. Os tubos foram centrifugados a 3500 rpm, por 4 minutos, para separação das fases. Uma alíquota de 1,6 ml da camada orgânica foi transferida para outro tubo de vidro e evaporada no concentrador de amostras, sob fluxo de nitrogênio e banho maria a 40 °C, durante 6 minutos. O resíduo obtido foi reconstituído em 100  $\mu$ l de fase móvel, com agitação em vórtex por 20 segundos. Uma alíquota de 20  $\mu$ l foi injetada no cromatógrafo.

Os solventes orgânicos extratores avaliados foram mistura de hexano e metil-*t*-butil éter (20:80), clorofórmio e metil-*t*-butil éter (20:80), clorofórmio, metil-*t*-butil éter e ácido acético glacial (20:80:1) e acetato de etila e ácido acético glacial (100:1). A porcentagem de recuperação dos fármacos foi determinada para cada mistura de solventes, com o objetivo de verificar a eficiência de extração.

Foram avaliados também procedimentos por precipitação de proteínas para extração dos fármacos do plasma. No primeiro procedimento avaliado, 50  $\mu$ l da solução

padrão interno (contendo 2500 ng/ml de artesunato ou 5000 ng/ml de halofantrina) foram adicionados a 250 µl de plasma contendo os fármacos em minitubos eppendorf e agitou-se em vórtex por 5 segundos. Em seguida, adicionaram-se 50 µl de ácido perclórico 5% (v/v) em metanol e agitou-se em vórtex por 10 segundos. Após repouso de 10 minutos, foram adicionados 50 µl de acetato de sódio 0,1 M em metanol e agitou-se em vórtex por mais 10 segundos. Os minitubos foram centrifugados a 14000 rpm, por 6 minutos, a 5 °C e injetaram-se 20 µl do sobrenadante.

Um segundo procedimento de precipitação de proteínas, mais simples e rápido, também foi avaliado. Em minitubos eppendorf contendo 250 µl de plasma com os fármacos, adicionaram-se 50 µl da solução padrão interno e submeteu-se ao vórtex por 30 segundos. Em seguida, 450 µl de ácido acético glacial 0,5% (v/v) em metanol foram adicionados e agitou-se em vórtex por 40 segundos. Os minitubos foram centrifugados a 10000 rpm, por 5 minutos, a 4 °C e injetaram-se 50 µl do sobrenadante.

Em todos os procedimentos avaliados, foi realizada a extração simultânea de uma amostra de plasma branco, que não havia recebido os fármacos nem os padrões internos, visando a avaliação de possíveis interferentes provenientes do meio plasmático. Além disso, analisou-se também uma amostra de plasma branco sem os fármacos, no qual foi adicionada apenas a solução dos padrões internos.

#### **1.2.1.4 Validação do método bioanalítico**

O método bioanalítico desenvolvido foi validado segundo os procedimentos preconizados pela Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos recomendado pelo U.S. Food and Drug Administration (Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2001).

##### **1.2.1.4.1 Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada pela análise de seis amostras de plasma branco, para verificação de existência de interferentes provenientes do meio plasmático. Dentre as seis amostras analisadas, uma era composta por plasma lipêmico, uma por plasma hemolisado e quatro por plasmas normais, todas obtidas de diferentes voluntários sadios que não estavam fazendo uso de qualquer medicação.

Além disso, foram avaliadas também possíveis interferências provenientes de fármacos comumente utilizados. Estes fármacos foram adicionados a plasmas brancos e procedeu-se a extração e análise das amostras. Os fármacos e suas respectivas concentrações plasmáticas analisadas foram: cafeína (1 µg/ml), paracetamol (20 µg/ml), dipirona (5 µg/ml) e dexclorfeniramina (76 ng/ml). A diidroartemisinina, principal metabólito plasmático de artemeter, também foi avaliada, na concentração de 1000 ng/ml. As concentrações empregadas foram estimadas com base em estudos farmacocinéticos prévios que determinaram a concentração plasmática máxima destes fármacos em voluntários sadios.

Os cromatogramas destas amostras foram comparados com aqueles obtidos isoladamente para o padrão interno na concentração de trabalho (artesunato a 1000 ng/ml) e de artemeter e lumefantrina na concentração do limite inferior de quantificação (10 ng/ml). A presença de interferentes no mesmo tempo de retenção de algum dos fármacos analisados pode ser aceita, desde que a resposta de picos interferentes seja inferior a 20% da resposta do fármaco no limite inferior de quantificação. No caso do padrão interno, a resposta de picos interferentes deve ser inferior a 5% da resposta na concentração utilizada.

Qualquer amostra branco que apresentar interferência significativa no tempo de retenção do fármaco ou do padrão interno deve ser rejeitada. Caso isso ocorra, novas amostras de outros seis voluntários devem ser testadas. Se amostras deste novo grupo apresentarem interferências significativas no tempo de retenção do fármaco ou do padrão interno, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

#### **1.2.1.4.2 Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada por meio de curvas analíticas de sete pontos plotadas para resposta (área do fármaco/área do padrão interno) versus a concentração do fármaco. Foram preparadas soluções estoque de artemeter e lumefantrina, que foram diluídas para soluções de trabalho contendo ambos os fármacos, e que, em seguida, foram adicionadas a plasma branco. As faixas de concentrações plasmáticas avaliadas foram de 10 a 1000 ng/ml para artemeter e de 10 a 18000 ng/ml de lumefantrina.

O preparo das soluções estoque de artemeter e lumefantrina está descrito a seguir.

*Solução estoque de artemeter 1* (250 µg/ml): pesaram-se, exatamente, cerca de 12,5 mg de artemeter SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml. Adicionaram-

se 8 ml de metanol, submeteu-se a banho de ultra-som por 2 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiram-se 2 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com metanol.

*Solução estoque de artemeter 2* (12,5 µg/ml): transferiu-se 0,5 ml da *solução estoque de artemeter 1* para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com metanol.

*Solução estoque de lumefantrina 1* (2500 µg/ml): pesaram-se, exatamente, cerca de 25 mg de lumefantrina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml. Adicionaram-se 8 ml de mistura de ácido acético glacial e metanol (1:100), submeteu-se a banho de ultra-som por 2 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente.

*Solução estoque de lumefantrina 2:* (12,5 µg/ml): transferiu-se 0,25 ml da *solução estoque de lumefantrina 1* para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com metanol.

*Solução estoque de lumefantrina 3* (50 µg/ml): transferiu-se 0,5 ml da *solução estoque de lumefantrina 1* para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com metanol.

Em seguida, as soluções estoque de artemeter e lumefantrina foram diluídas em mistura de metanol e água (1:1), para balões volumétricos únicos, conforme demonstrado na Tabela 32.

**Tabela 32 – Diluições para avaliação da linearidade do método bioanalítico por LC-MS/MS para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma humano.**

Ponto da curva	Lumefantrina		Artemeter		Metanol:água (1:1) q.s.p. (ml)
	Sol. estoque	Volume (ml)	Sol. estoque	Volume (ml)	
1	2	0,5	2	0,5	25
2	3	1,0	2	1,0	10
3	1	0,5	1	0,25	25
4	1	0,6	1	0,25	10
5	1	0,5	1	0,25	5
6	1	0,7	1	0,375	5
7	1	0,9	1	0,5	5
CQB	2	0,6	2	0,6	10
CQM	1	0,75	1	0,4	10
CQA	1	0,75	1	0,4	5

Desta forma, para preparar a solução correspondente ao primeiro ponto da curva, transferiu-se 0,5 ml da *solução estoque de lumefantrina 2* e 0,5 ml da *solução estoque de artemeter 2* para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com mistura de metanol e água (1:1).

Para o preparo das amostras plasmáticas, 0,2 ml das soluções descritas na Tabela 32 foram adicionadas em 4,8 ml de plasma branco, seguido da agitação em vórtex por 40 segundos, para incorporar os fármacos ao plasma. As concentrações plasmáticas obtidas e empregadas para construção da curva analítica estão demonstradas na Tabela 33.

**Tabela 33 – Concentrações plasmáticas de artemeter e lumefantrina para construção das curvas analíticas e avaliação da linearidade.**

Solução	Artemeter (ng/ml)	Lumefantrina (ng/ml)
1	10	10
2	50	200
3	100	2000
4	250	6000
5	500	10000
6	750	14000
7	1000	18000
CQB	30	30
CQM	400	7500
CQA	800	15000

As amostras de plasma adicionadas com artemeter e lumefantrina nas concentrações descritas na Tabela 33 foram submetidas ao processo de extração e analisadas conforme o procedimento otimizado. Além disso, incluiu-se também a análise de uma amostra branco (plasma isento de padrão dos fármacos e padrão interno) e de uma amostra zero (plasma isento de padrão dos fármacos e com o padrão interno).

Além das soluções correspondentes aos sete pontos da curva analítica, foram preparadas também soluções de controle de qualidade, em três diferentes concentrações: baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA). As amostras de controle de qualidade são analisadas juntamente com as amostras da corrida analítica para verificar a conformidade do sistema e das condições empregadas. A concentração do CQB deve ser menor ou igual a três vezes o limite inferior de quantificação, o CQM deve ser aproximadamente a média entre o CQB e o CQA, e o CQA deve estar compreendido entre 75% e 90% da maior concentração da curva de calibração.

Para avaliação da linearidade do método, curvas analíticas com sete concentrações, cada uma em duplicata, foram plotadas em três dias consecutivos. Os critérios de aceitação utilizados foram: coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98; desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ e desvio menor ou igual 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva. No mínimo cinco de sete concentrações da curva analítica devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva.

#### **1.2.1.4.3 Precisão e exatidão**

A precisão de um método analítico avalia a proximidade de medidas individuais do analito quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas provenientes de um volume homogêneo da matriz biológica. A exatidão avalia a proximidade do resultado médio fornecido pelo método em relação ao valor verdadeiro (concentração) do analito.

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por meio da análise em sextuplicata de amostras de plasma contendo artemeter e lumefantrina em três diferentes concentrações: CQB (30 ng/ml de artemeter e 30 ng/ml de lumefantrina), CQM (400 ng/ml de artemeter e 7500 ng/ml de lumefantrina) e CQA (800 ng/ml de artemeter e 15000 ng/ml de lumefantrina). As amostras de plasma contendo os fármacos nessas concentrações foram extraídas e analisadas conforme o procedimento otimizado. As análises foram realizadas em três dias consecutivos, de forma que foram avaliadas precisão e exatidão intra-corrída e inter-corrídas.

A precisão do método é expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), sendo que não se admitem valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20%.

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, multiplicada por 100. A exatidão de métodos bioanalíticos deve estar compreendida entre 85% e 115%, exceto para o LIQ, para o qual se admitem valores dentro da faixa de 80% a 120%.

#### 1.2.1.4.4 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do procedimento de extração de um método analítico, ou seja, a quantidade do fármaco que é efetivamente extraída no processo, em relação à quantidade originalmente presente na matriz biológica.

A recuperação do método foi avaliada por meio da análise em sextuplicata de amostras de plasma contendo artemeter e lumefantrina em três diferentes concentrações: CQB (30 ng/ml de artemeter e 30 ng/ml de lumefantrina), CQM (400 ng/ml de artemeter e 7500 ng/ml de lumefantrina) e CQA (800 ng/ml de artemeter e 15000 ng/ml de lumefantrina). A recuperação do padrão interno (artesunato) também foi avaliada na concentração de trabalho utilizada (1000 ng/ml).

Para determinar a porcentagem de recuperação do método, foi feita a comparação dos resultados obtidos com amostras de plasma contendo os fármacos submetidas ao processo de extração e amostras dos fármacos em fase móvel, nas mesmas concentrações.

Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

#### 1.2.1.4.5 Efeito de matriz

Em métodos bioanalíticos, a avaliação do efeito de matriz é imprescindível para verificar se componentes endógenos da matriz biológica são capazes de promover supressão ou indução da ionização dos fármacos no espectrômetro de massas, alterando sua resposta no detector. Apesar do teste de efeito de matriz não ser preconizado nos guias de validação de métodos bioanalíticos disponíveis, como a Resolução RDC nº899 da ANVISA e o *Bioanalytical Method Validation* do FDA, este parâmetro é avaliado na maioria dos artigos científicos publicados atualmente, sendo importante para verificar possíveis alterações na ionização do fármaco quando espectrometria de massas é utilizada como método de detecção.

Para avaliação do efeito de matriz, foi feita a comparação das áreas dos picos dos analitos em amostras diluídas em fase móvel e em amostras diluídas no sobrenadante de plasma branco obtido após o processo de extração. A referência adotada foi MATUSZEWSKI *et al.* (2003).

No procedimento de precipitação de proteínas otimizado para a extração, a 250 µl de plasma contendo os fármacos, eram adicionados 50 µl de solução do padrão interno e 450 µl de ácido acético glacial 0,5% (v/v) em metanol, de forma que o volume final era 750 µl. Considerando o volume inicial de 250 µl, os fármacos eram diluídos três vezes no processo de extração.

Para avaliação do efeito de matriz, amostras de plasma branco (sem fármacos e sem padrão interno) foram submetidas ao processo de extração de acordo o procedimento descrito anteriormente. Em seguida, a 200 µl do sobrenadante obtido, foram adicionados 100 µl de solução dos fármacos em fase móvel. Para comparação, a 200 µl de fase móvel, foram adicionados 100 µl da mesma solução dos fármacos em fase móvel. Assim, se o sobrenadante do plasma contivesse alguma substância endógena capaz de alterar a ionização dos fármacos, as áreas dos picos dos fármacos nesta amostra seriam diferentes daquelas obtidas com a solução diluída apenas em fase móvel.

Esta avaliação foi feita empregando-se amostras de plasma branco obtidas de seis diferentes voluntários, em duas concentrações dos fármacos: CQB (30 ng/ml de artemeter e 30 ng/ml de lumefantrina) e CQA (800 ng/ml de artemeter e 15000 ng/ml de lumefantrina). Considera-se que não há efeito de matriz quando a diferença entre a área do pico do analito na solução diluída no sobrenadante do plasma e aquela obtida em fase móvel é inferior a 15%.

#### **1.2.1.4.6 Limite inferior de quantificação (LIQ)**

O limite inferior de quantificação pode ser estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Para isso, amostras plasmáticas com concentrações próximas ao LIQ foram analisadas em sextuplicata e determinou-se a precisão e exatidão das mesmas. A resposta do fármaco no LIQ deve ser reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80% a 120%.

Além disso, a resposta do LIQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco.

#### **1.2.1.4.7 Estabilidade**

A avaliação da estabilidade das amostras utilizadas durante as diferentes etapas do estudo visa determinar se os analitos mantêm-se quimicamente inalterados em uma

matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo. Todos os tipos de estabilidade foram avaliados empregando-se concentrações baixa e alta dos fármacos (CQB e CQA), cada uma em sextuplicata. As amostras foram consideradas estáveis quando não se verificou desvio superior a 15% em relação ao valor obtido em amostras recém-preparadas. Além disso, em todas as análises, o desvio padrão relativo deve ser inferior a 15% e exatidão deve estar compreendida dentro da faixa de 85% a 115%.

#### **1.2.1.4.7.1 Estabilidade de curta duração (ECD)**

Para avaliação da estabilidade de curta duração, as amostras plasmáticas devem permanecer a temperatura ambiente de 4 a 24 horas, baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas a temperatura ambiente antes da extração e análise.

Amostras de plasma contendo os fármacos foram descongeladas e mantidas a temperatura ambiente por 6 horas. Após este tempo, outras amostras plasmáticas foram descongeladas e todas foram submetidas ao processo de extração e análise. As concentrações de artemeter e lumefantrina das amostras de estabilidade de curta duração foram comparadas àquelas das amostras recém-preparadas.

#### **1.2.1.4.7.2 Estabilidade de longa duração (ELD)**

O tempo de armazenamento das amostras plasmáticas em freezer para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, de acordo com o cronograma proposto no protocolo do estudo clínico.

Para avaliação da estabilidade de longa duração, amostras plasmáticas armazenadas em freezer a -70 °C foram descongeladas e analisadas após 1, 2 e 3 meses de preparo. As concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras recém-preparadas.

#### **1.2.1.4.7.3 Estabilidade pós-processamento (EPP)**

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de injeção, deve-se avaliar a estabilidade dos fármacos nas amostras processadas (incluindo o padrão interno), na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de tempo superior à duração das corridas analíticas do conjunto de amostras.

Para avaliação da estabilidade pós-processamento, amostras plasmáticas foram submetidas ao processo de extração e mantidas na bandeja do injetor automático por 10 horas antes da injeção. A temperatura da bandeja do injetor automático era programada para 4 °C, de forma que as amostras foram mantidas sob refrigeração. As concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras injetadas imediatamente após a extração.

#### **1.2.1.4.7.4 Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento (ECCD)**

A estabilidade dos analitos deve ser avaliada após três ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras plasmáticas recém-preparadas foram congeladas a -70 °C e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento até atingir a temperatura ambiente. Após completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -70 °C por 24 horas e assim sucessivamente, até completar três ciclos. Ao final do terceiro ciclo, as amostras foram analisadas e as concentrações dos fármacos foram comparadas com aquelas obtidas em amostras recém-preparadas.

#### **1.2.1.4.7.5 Estabilidade de soluções padrão (ESP)**

A estabilidade das soluções padrão dos fármacos e do padrão interno deve ser avaliada em temperatura ambiente por no mínimo 6 horas após seu preparo. No caso de tais soluções serem armazenadas sob refrigeração ou congelamento, a estabilidade deve ser avaliada contemplando a temperatura e o período de armazenamento das mesmas.

Para avaliação da estabilidade de soluções padrão, foram preparadas soluções estoque dos fármacos em metanol:água (1:1) e essas soluções foram levadas à geladeira por 6 horas. Após este tempo, as soluções foram retiradas da geladeira e, depois de atingida a temperatura ambiente, foi feita a adição dos fármacos no plasma com estas soluções. As amostras plasmáticas foram submetidas ao processo de extração e as concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras nas quais as soluções padrão não foram submetidas ao período de armazenamento em geladeira por 6 horas.

Para avaliação da estabilidade do padrão interno (artesunato) em plasma, adicionaram-se 50 µl da solução de padrão interno a 250 µl do plasma contendo os fármacos. Esta amostra foi mantida em temperatura ambiente por 6 horas, seguida da extração e análise. As concentrações plasmáticas de artemeter e lumefantrina obtidas

foram comparadas com aquelas de amostras plasmáticas recém-preparadas, para verificar se artesunato apresenta estabilidade adequada em plasma.

#### **1.2.1.5 Avaliação da farmacocinética de artemeter e lumefantrina administrados em comprimidos de dose fixa combinada**

A etapa clínica do estudo de farmacocinética e biodisponibilidade de artemeter e lumefantrina administrados concomitantemente em comprimidos de dose fixa combinada foi realizada na Unidade Clínica do Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF), em Aparecida de Goiânia – GO. O centro clínico desta instituição conta com infra-estrutura completa para realização de estudos clínicos, com leitos, equipamentos para situações emergenciais e pessoal habilitado (médicos, enfermeiros, farmacêuticos). O estudo clínico foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), conforme declaração apresentada no Anexo A.

O medicamento utilizado no estudo foi Coartem<sup>®</sup> (artemeter 20 mg + lumefantrina 120 mg), produzido pela indústria farmacêutica Novartis e doado pelo Ministério da Saúde. Antes da realização da etapa clínica, os comprimidos foram submetidos às seguintes análises físico-químicas: identificação, dureza, friabilidade, determinação de peso, teste de desintegração, uniformidade de conteúdo e doseamento. As análises foram realizadas com o objetivo de garantir a conformidade com as especificações farmacopeicas e a qualidade do medicamento que foi administrado nos voluntários do estudo.

##### **1.2.1.5.1 Casuística**

O estudo foi realizado em seis voluntários sadios, três do sexo masculino e três do sexo feminino. Todos satisfizeram os seguintes critérios recomendados pela Resolução nº 1170 da ANVISA (BRASIL, 2006a):

- não fumantes;
- apresentação de bom estado de saúde, com ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas e metabólicas;
- idade entre 21 e 50 anos;
- índice de massa corpórea (IMC) dentro da faixa de 18,5 a 25,0, podendo variar até 15% quanto ao limite superior (18,5 a 28,5);

- sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- sem utilização de medicamentos de uso contínuo.

A inclusão dos indivíduos foi baseada também nos resultados de exames clínicos e laboratoriais, como exames hematológicos (hemograma e leucograma), bioquímicos (uréia, creatinina, bilirrubinas, proteínas totais, albumina, glicemia, fosfatase alcalina, TGO, TGP, colesterol, triglicérides, ácido úrico), sorológicos (hepatite B, hepatite C, HIV), exames de urina e fezes. Conforme preconizado pela Resolução nº 1170 da ANVISA (BRASIL, 2006a), todos os exames laboratoriais, com exceção de hepatite B, hepatite C, HIV e exame de fezes, foram repetidos após a última coleta sanguínea.

Os voluntários foram devidamente informados sobre as características da pesquisa, recebendo e assinando um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B). Todos tiveram acesso aos resultados dos exames clínicos e laboratoriais e receberam R\$ 450,00 como forma de ressarcimento de despesas referentes à participação no estudo.

Os voluntários compareceram à Unidade Clínica do ICF na noite anterior ao estudo, receberam um lanche e permaneceram internados e em jejum até o dia seguinte. Pela manhã, eles receberam uma dose para adultos do medicamento Coartem<sup>®</sup> (80 mg de artemeter e 480 mg de lumefantrina), que corresponde a quatro comprimidos, cada um contendo 20 mg de artemeter e 120 mg de lumefantrina. A administração dos comprimidos foi feita com 200 ml de leite integral, que contém o equivalente a 6,0 g de gorduras totais, uma vez que estudos demonstraram que a absorção de lumefantrina pode aumentar em até 16 vezes quando administrada com alimentos ricos em gordura (MCGREADY *et al.*, 2006).

O jejum foi mantido até quatro horas após a administração do medicamento, quando os voluntários receberam almoço e posteriormente, mais duas refeições padronizadas. A pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura corporal dos voluntários foram monitoradas de hora em hora após a administração do medicamento e os voluntários foram acompanhados pela equipe de enfermagem durante o tempo em que permaneceram internados.

Os voluntários permaneceram na Unidade Clínica durante as primeiras 12 horas após a administração do medicamento, sendo liberados em seguida. Eles retornaram à clínica para as coletas posteriores e foram conscientizados sobre a necessidade de não tomarem nenhum medicamento durante o período do estudo.

### 1.2.1.5.2 Plano de coletas de amostras e análise de dados

Segundo a Resolução nº 1170 da ANVISA (BRASIL, 2006a), o cronograma de coleta das amostras deve garantir a adequada caracterização do perfil plasmático do fármaco (concentração versus tempo), contemplando um tempo igual ou superior a 3 a 5 vezes a meia-vida de eliminação do mesmo. Artemeter é rapidamente eliminado após a administração, entretanto a meia-vida de lumefantrina varia de três a seis dias (WHITE *et al.*, 1999), de forma que o período do estudo delineado foi onze dias.

Foram coletadas amostras de 10 ml de sangue em tubos heparinizados, nos seguintes tempos: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 24; 36; 48; 72; 120; 168; 216 e 264 horas após a administração do medicamento. No total, foram realizadas 22 coletas, que equivalem a 220 ml de sangue, em 11 dias.

As amostras de sangue foram centrifugadas para separação do plasma, congeladas a -80 °C e enviadas ao Laboratório de Bioequivalência do Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico (CEDAFAR-BIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina nas amostras plasmáticas foi realizada por meio do método bioanalítico previamente desenvolvido e validado. Após as análises, foram obtidas as curvas de tempo versus concentração plasmática de ambos os fármacos e os parâmetros farmacocinéticos de artemeter e lumefantrina avaliados foram concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), tempo para atingir a concentração plasmática máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ ), área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta ( $ASC_{0-t}$ ), área sob a curva do tempo zero até extrapolação ao infinito ( $ASC_{0-\infty}$ ), constante de eliminação ( $K_e$ ) e meia-vida ( $t_{1/2}$ ).

### 1.2.2 Estudo de fragmentação de artemeter e lumefantrina por espectrometria de massas

A análise dos fragmentos e das rotas de fragmentação de artemeter e lumefantrina obtidos por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e analisador triplo quadrupolo foi realizada.

Triplo quadrupolo é um sistema de analisadores aplicado geralmente para determinações quantitativas, devido à sua elevada sensibilidade e seletividade. Apesar

deste sistema analisador não ser ideal para elucidações estruturais devido à limitada exatidão na determinação de massas ( $\pm 1$  Da), foram propostas estruturas e rotas para os fragmentos visualizados nos espectros de artemeter e lumefantrina.

As estruturas propostas para artemeter foram comparadas com aquelas previamente descritas na literatura (SABARINATH *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2006; XING *et al.*, 2006) que propuseram estruturas e rotas para os fragmentos obtidos a partir de artemeter ou outros derivados de artemisinina, por espectrometria de massas. Para lumefantrina, apenas WAHAJUDDIN *et al.* (2009) propuseram estruturas para o íon precursor e fragmento de lumefantrina.

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em plasma humano por LC-MS/MS

#### 2.1.1 Detecção por espectrometria de massas

A ionização e detecção de lumefantrina por ESI(+) foi avaliada por meio de infusão direta de solução a 500 ng/ml. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados, e a voltagem do cone foi gradativamente aumentada, de modo a obter íon precursor de alta intensidade. Assim, utilizou-se voltagem do capilar de 3,5 kV, voltagem do cone de 40 eV, extrator de 2 V, lentes RF 0,5, resolução LM/HM de 10/7,5, temperatura da fonte 100 °C e temperatura de desolvatação 300 °C. Nestas condições, foi obtido íon precursor  $[M+H]^+$  com relação massa/carga ( $m/z$ ) igual a 530,45, que corresponde à massa molar da lumefantrina (528,95 g/mol) somada à massa molar do hidrogênio.

Em seguida, foram aplicadas voltagens crescentes na câmara de colisão, com o objetivo de fragmentar o íon precursor de lumefantrina. No espectro de fragmentação obtido com uma energia de colisão de 40 eV (*Daughter Scan*), o fragmento de maior intensidade foi  $m/z$  348,41. Assim, adotou-se a transição de  $m/z$  530,45 para  $m/z$  348,41 para a detecção de lumefantrina por espectrometria de massas em ESI(+).

Para ionização e detecção de artemeter por ESI(+), inicialmente foram utilizadas as seguintes condições no espectrômetro de massas: voltagem do capilar de 3,5 V, voltagem do cone de 10 eV, extrator de 3 V, lentes RF 0,5, resolução LM/HM de 10/7,5, temperatura da fonte 100 °C e temperatura de desolvatação 250 °C. Nestas condições, o íon precursor  $[M+H]^+$  de artemeter, correspondente a  $m/z$  299, apresentou intensidade consideravelmente baixa. Devido à labilidade de artemeter, provavelmente sua molécula sofreu degradação no processo de ionização, devido às temperaturas elevadas e voltagem aplicada, apesar da ionização por eletrospray ser menos drástica e apresentar maior possibilidade de preservação do íon precursor, comparando-se com APCI (ROSENBERG, 2003).

No espectro do íon precursor (*MS Scan*) de artemeter, o íon que apresentou maior intensidade foi  $m/z$  267, que corresponde a um fragmento de  $m/z$  299, mesmo antes de se induzir a fragmentação da molécula. Utilizando-se  $m/z$  267 como íon precursor, foi aplicada energia de colisão de 10 eV e o principal fragmento obtido foi  $m/z$  231. Poderia-

se considerar, então, a transição de  $m/z$  267 para  $m/z$  231 para quantificação de artemeter. Entretanto, o principal metabólito de artemeter encontrado no plasma após administração oral é diidroartemisinina, cuja molécula pode apresentar a mesma transição  $m/z$  267 para  $m/z$  231 no processo de detecção (SOUPPART *et al.*, 2002), de forma que o método perderia sua seletividade para quantificação de artemeter.

A próxima tentativa foi substituir o modo de ionização de ESI(+) para APCI(+). Segundo SOUPPART *et al.* (2002) e SHI *et al.* (2006), a utilização de ESI não foi capaz de fornecer um pico característico e com intensidade adequada para quantificação de artemeter em plasma humano. Por outro lado, APCI gerou picos de intensidade suficiente para uma determinação quantitativa, exata e seletiva de artemeter em plasma. Desta forma, utilizando-se APCI(+) como fonte de ionização, os parâmetros otimizados para detecção de artemeter foram: voltagem da agulha corona de 2,5 V, voltagem do cone de 30 eV, extrator de 5 V, lentes RF 0,5, resolução LM/HM de 10/10, temperatura da fonte 150 °C e temperatura da probe 400 °C. No espectro do íon precursor (*MS Scan*) obtido nestas condições, foi visualizado ruído elevado e pico  $m/z$  299 de baixa intensidade. Além disso, a infusão direta de uma solução de lumefantrina a 10 µg/ml não forneceu sinais adequados para quantificação por APCI(+).

Após o modo APCI(+) ter se mostrado inadequado para ionização de ambos os fármacos, tentou-se novamente a ionização por eletrospray, agora avaliando a formação de aduto entre artemeter e amônia para utilização como íon precursor. XING *et al.* (2006) descreveram a quantificação de artemisinina em plasma de ratos por LC-MS/MS com ionização por eletrospray, empregando artemeter como padrão interno. Utilizando fase móvel contendo tampão acetato de amônio 10 mM, os autores consideraram o aduto de amônia  $[M+NH_4]^+$  como íon precursor para artemeter, que corresponde ao pico  $m/z$  316 (298 g/mol de artemeter e 18 g/mol da amônia). SABARINATH *et al.* (2003) adotaram um procedimento semelhante para quantificação de arteeter (outro derivado sintético de artemisinina) e diidroartemisinina em plasma. Neste caso, o íon precursor de arteeter empregado também foi o aduto de amônia  $[M+NH_4]^+$ , correspondente a  $m/z$  330.

Assim, a fase móvel utilizada foi substituída por metanol e tampão acetato de amônio 10 mM ajustado para pH 4,0 com ácido acético (90:10). A infusão direta da solução de artemeter a 500 ng/ml foi realizada da mesma forma e utilizando-se os mesmos parâmetros do espectrômetro de massas anteriormente descritos. Inicialmente, o pico  $m/z$  316 de artemeter, correspondente ao íon precursor desejado,  $[M+NH_4]^+$ , não apresentou intensidade adequada. Como temperaturas elevadas na fonte desfavorecem a formação de adutos no processo de ionização, foi realizada redução da temperatura da

fonte de 100 °C para 80 °C e da temperatura de dessolvatação de 250 °C para 150 °C, e aumento da energia do cone de 10 eV para 15 eV. Estes fatores levaram a um aumento significativo da intensidade do pico  $m/z$  316,30 (Figura 13A). A subsequente fragmentação deste íon, aplicando-se uma energia de colisão de 10 eV, levou à obtenção do fragmento  $m/z$  267,01 de alta intensidade (Figura 13B). Assim, após avaliação de todas as formas de ionização testadas, a transição selecionada para quantificação de artemeter foi  $m/z$  316,30 para  $m/z$  267,01.

Para a quantificação simultânea de dois ou mais fármacos no espectrômetro de massas, todos os parâmetros do detector devem ser os mesmos, com exceção das energias do cone e de colisão, que podem ser otimizadas individualmente para cada fármaco.

A etapa seguinte foi a verificação da adequação dos parâmetros otimizados para detecção do artemeter, em relação à intensidade dos picos de lumefantrina. A redução das temperaturas da fonte e de dessolvatação promoveu uma leve diminuição na intensidade do íon precursor de lumefantrina ( $m/z$  530,45). Dessa forma, a energia do cone foi aumentada de 40 para 45 eV para compensar esta redução e melhorar a intensidade do sinal obtido com a transição  $m/z$  530,45 para  $m/z$  348,41 para a detecção de lumefantrina (Figura 14).

Substâncias cloradas apresentam padrão isotópico característico no espectro de massas, tendo em vista que o cloro apresenta os isótopos  $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$ , com abundância de cerca de 75% e 25%, respectivamente. No espectro de massas de moléculas com três átomos de cloro obtêm-se, além do pico do íon molecular, os picos M+2, M+4 e M+6, que correspondem às diferentes contribuições dos isótopos na molécula do analito. As intensidades dos picos destes isótopos em relação ao íon molecular são 97,8% (M+2), 31,9% (M+4) e 3,5% (M+6) (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

Um padrão isotópico condizente com o descrito foi encontrado no espectro de massas de lumefantrina (Figura 14A). Entretanto, como a molécula de lumefantrina se encontra protonada nos espectros, foi possível visualizar os íons M+1, M+3, M+5 e M+7, que correspondem aos picos  $m/z$  528,44, 530,45, 532,46 e 534,41. Como o método desenvolvido visa a determinação quantitativa dos analitos em meio biológico, o pico de maior intensidade ( $m/z$  530,45) foi selecionado como íon precursor, de forma a aumentar a sensibilidade do método. Assim, foi possível fragmentar este íon e obter sinais de alta intensidade para quantificação de lumefantrina em plasma.

Por fim, foram feitas infusões diretas de soluções dos padrões internos avaliados, artesunato e halofantrina, isoladamente. As condições previamente otimizadas para

artemeter e lumefantrina se mostraram adequadas também à ionização e detecção dos dois padrões internos.

Para o artesunato, empregou-se energia do cone de 15 eV e energia de colisão de 10 eV. O íon precursor selecionado, da mesma forma que artemeter, foi o aduto de amônia  $[M+NH_4]^+$ , correspondente a  $m/z$  402,43 (384 g/mol de artesunato e 18 g/mol da amônia). No processo de fragmentação, o íon de maior intensidade obtido foi  $m/z$  267,44, o mesmo fragmento selecionado para artemeter. Assim, para quantificação de artesunato, a transição selecionada foi  $m/z$  402,43 para  $m/z$  267,44 (Figura 15).

Para halofantrina, as energias de cone e colisão otimizadas foram 45 e 23 eV, respectivamente. O íon precursor selecionado foi  $m/z$  500,42, correspondente a  $[M+H]^+$ , e o fragmento de maior intensidade foi  $m/z$  142,36 (Figura 16). Esta transição foi monitorada para quantificação de halofantrina.

Os outros parâmetros do espectrômetro de massas utilizados foram: voltagem do capilar de 3,5 V, extrator de 2 V, lentes RF 0,5, resolução LM/HM de 10/7,5, temperatura da fonte 80 °C e temperatura de desolvatação 150 °C.

Os espectros dos íons precursores de artemeter, lumefantrina, artesunato e halofantrina, assim como os espectros de fragmentação demonstrando os fragmentos de cada fármaco estão representados nas Figuras 13 a 16.

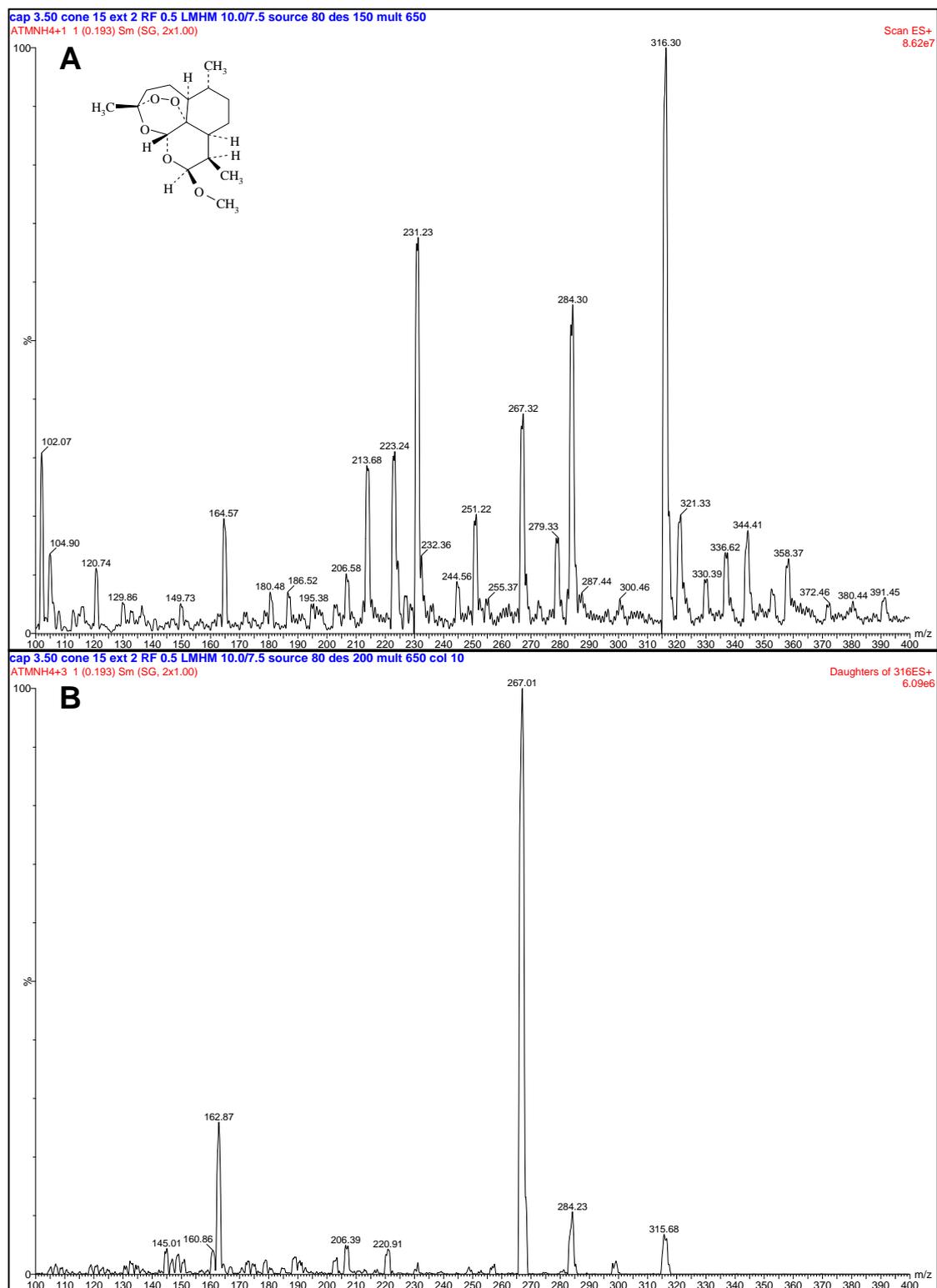


Figura 13 - Espectros ESI(+)-MS de artemeter, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  316,30 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  267,01.

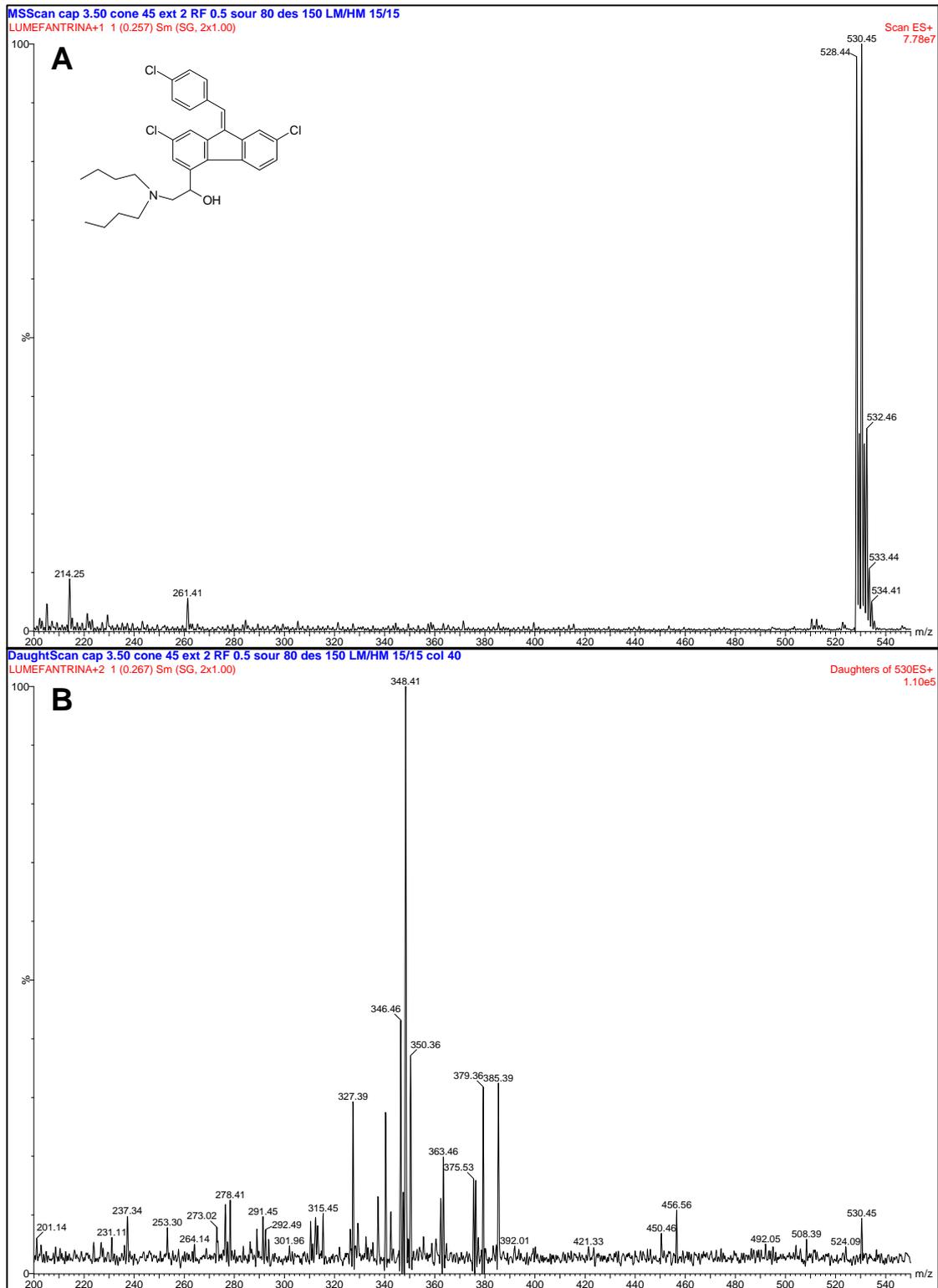


Figura 14 - Espectros ESI(+)-MS de lumefantrina, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  530,45 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  348,41.

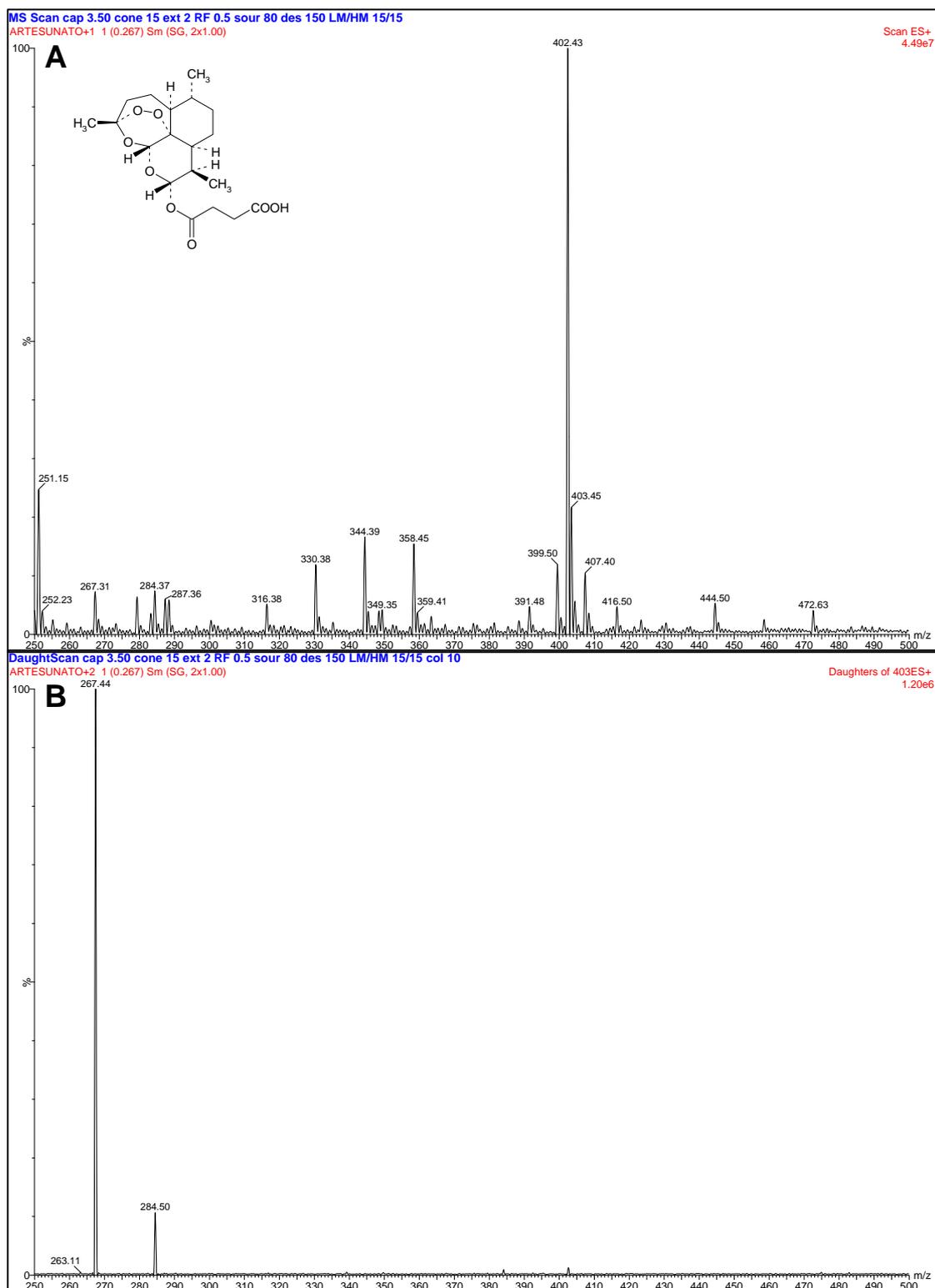


Figura 15 - Espectros ESI(+)-MS de artesunato, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  402,43 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  267,44.

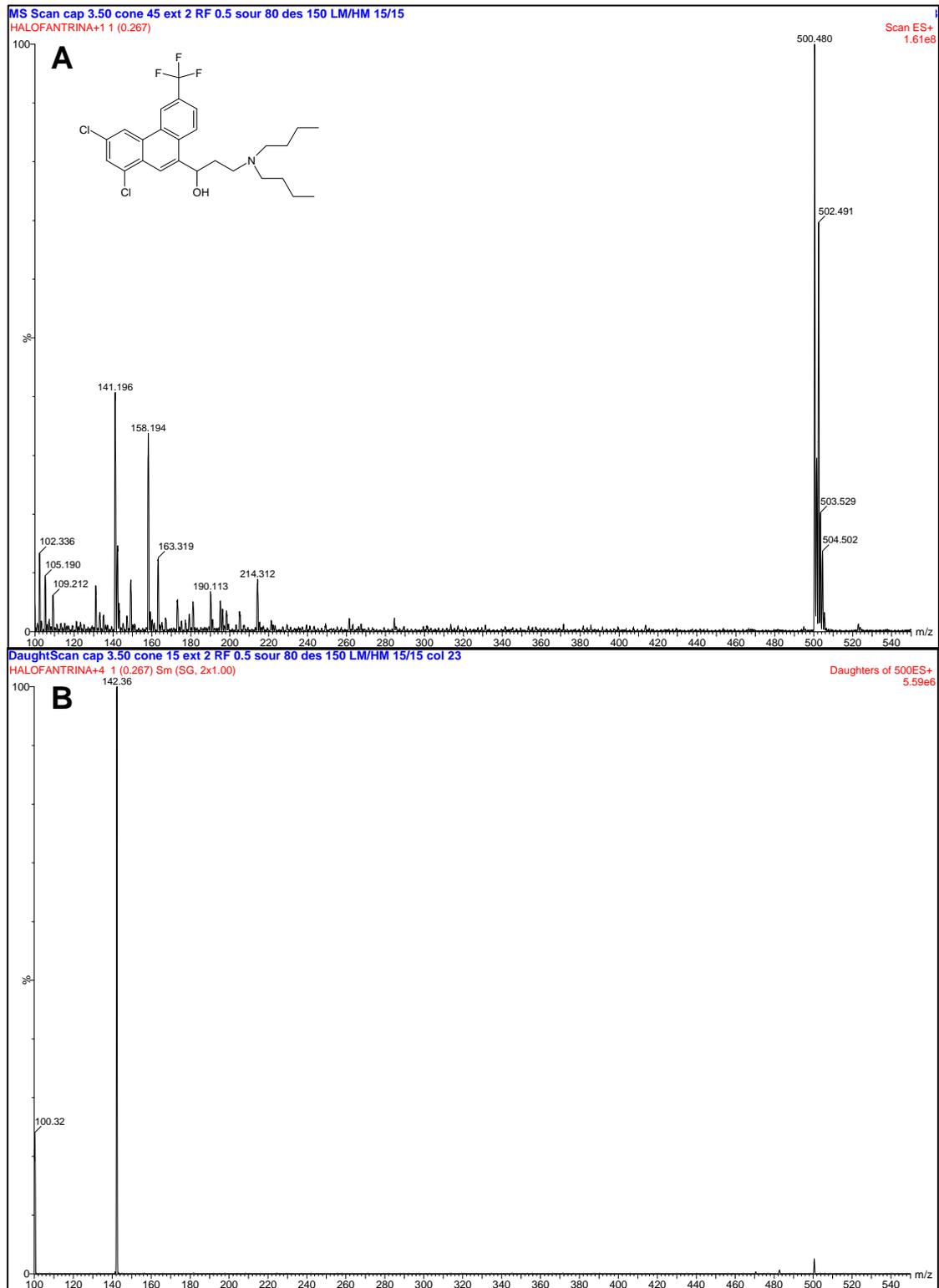


Figura 16 - Espectros ESI(+)-MS de halofantrina, demonstrando (A) espectro do íon precursor,  $m/z$  500,42 e (B) espectro de fragmentação, com fragmento principal  $m/z$  142,36.

### 2.1.2 Extração dos fármacos do plasma e análise cromatográfica

As análises cromatográficas de artemeter, lumefantrina, artesunato e halofantrina foram realizadas em coluna Zorbax SB-Ciano (150 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), com pré-coluna contendo a mesma fase estacionária (12,5 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), a 30 °C. O fluxo da fase móvel foi 1 ml/min. A composição e proporção dos solventes na fase móvel foram otimizadas de modo a obter sinais de alta intensidade no espectrômetro de massas e tempo de corrida curto.

Acetonitrila foi substituída por metanol, tendo em vista que este solvente orgânico promoveu a obtenção de sinais mais intensos dos fármacos em análise.

Para a ionização de artemeter e artesunato no modo ESI(+), foi necessária a formação do aduto destes fármacos com amônia, de modo a quantificar o íon precursor correspondente a  $[M+NH_4]^+$ . Para formação do aduto, foi necessário utilizar fase móvel contendo tampão acetato de amônio 10 mM, ajustado para pH 4,0 com 0,2% (v/v) de ácido acético.

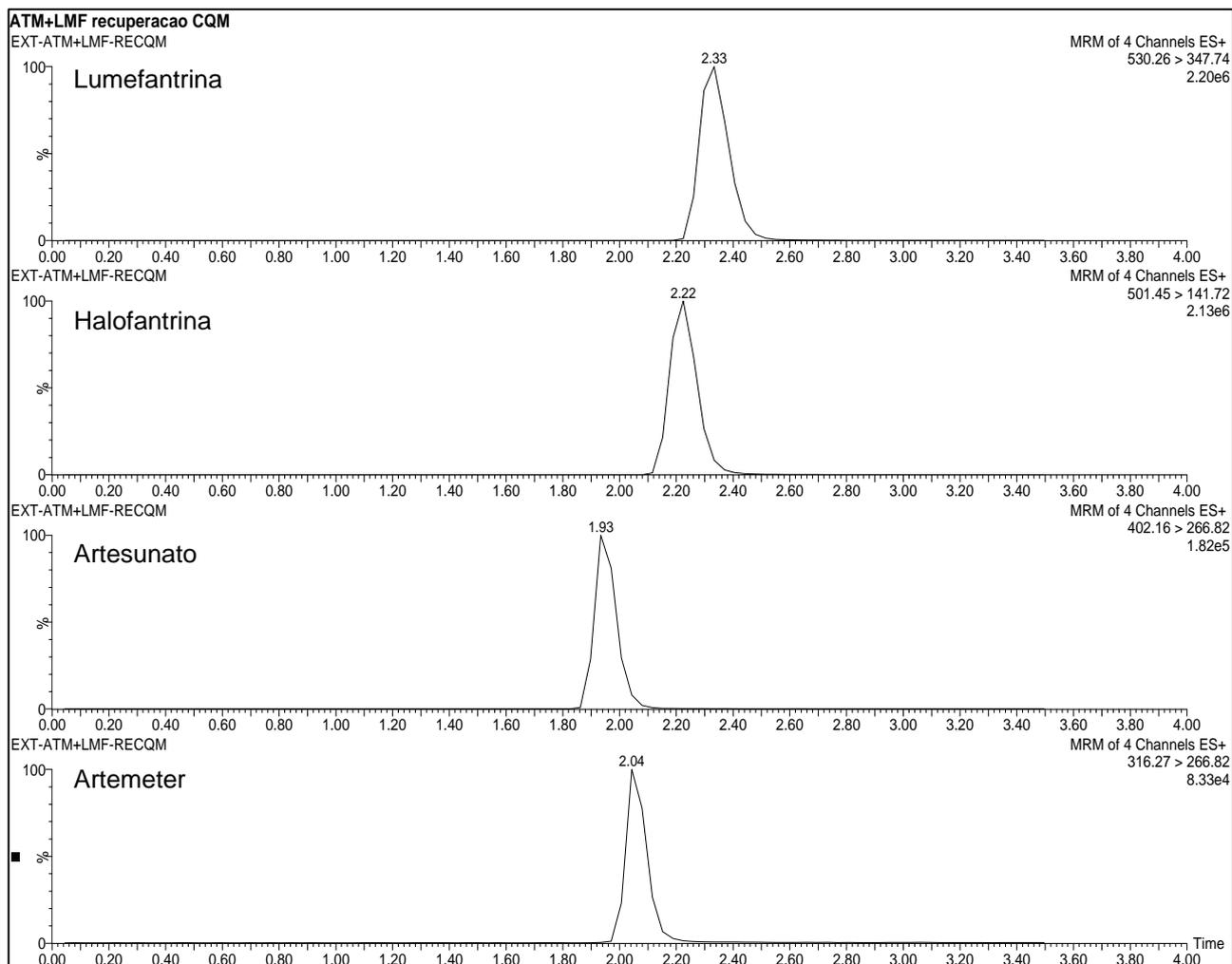
No processo de ionização por eletrospray, utilizou-se o modo positivo, no qual as moléculas dos fármacos recebem um próton (ou  $NH_4^+$ ) e ficam carregadas positivamente. Para favorecer a ionização dos fármacos no modo positivo, um procedimento usual é adicionar 0,1% (v/v) de ácido fórmico no solvente aquoso da fase móvel. Assim, ao tampão acetato de amônio 10 mM, foram adicionados 0,2% (v/v) de ácido acético e 0,1% (v/v) de ácido fórmico, obtendo-se um pH final igual a 3,0. A presença dos dois ácidos no tampão da fase móvel foi imprescindível para garantir picos simétricos e com intensidade elevada nos cromatogramas.

Desta forma, para detecção dos fármacos por espectrometria de massas, a fase móvel utilizada foi mistura de metanol e tampão acetato de amônio 10 mM com 0,2% de ácido acético e 0,1% de ácido fórmico. Inicialmente, foi empregada eluição isocrática, com 90% de metanol e 10% de tampão acetato de amônio. A elevada proporção de metanol na fase móvel é desejável para obtenção de sinais de alta intensidade e tempo de corrida curto.

Como na espectrometria de massas cada fármaco é detectado por meio de uma transição distinta, não é necessário obter resolução de linha base entre os picos no cromatograma, o que também contribui para obtenção de tempos de corrida curtos. Entretanto, é imprescindível avaliar a interferência de constituintes do plasma que co-eluem com os fármacos de interesse, que podem suprimir ou induzir a ionização dos

mesmos. Neste caso, as condições cromatográficas devem ser alteradas, visando a separação adequada entre picos de interesse e os interferentes em potencial.

Na análise cromatográfica realizada com eluição isocrática (metanol:tampão acetato de amônio – 90:10), os tempos de retenção de artesunato, artemeter, halofantrina e lumefantrina foram 1,97, 2,08, 2,22 e 2,33 minutos, respectivamente, conforme pode ser visualizado na Figura 17.



**Figura 17 – Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS, para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma, utilizando-se coluna Zorbax SB-Ciano e fase móvel composta por metanol e tampão acetato de amônio 10 mM (90:10). Concentração das soluções: lumefantrina 7500 ng/ml, halofantrina 1000 ng/ml, artesunato 500 ng/ml e artemeter 400 ng/ml.**

Após o estabelecimento desta condição cromatográfica inicial capaz de determinar os fármacos, vários procedimentos de extração foram avaliados, assim como a adequabilidade da utilização de artesunato e/ou halofantrina como padrões internos.

Inicialmente, foi testado um método por precipitação de proteínas, no qual 50 µl da solução padrão interno e 50 µl de ácido perclórico 5% (v/v) em metanol foram adicionados

a 250 µl de plasma contendo os fármacos, seguido de agitação em vórtex e adição de 50 µl de acetato de sódio 0,1 M em metanol. Com a injeção de 20 µl do sobrenadante, verificou-se que a extração de lumefantrina e halofantrina do plasma foi baixa e variável entre amostras de diferentes concentrações. Além disso, artemeter e artesunato também não alcançaram altas taxas de recuperação com este procedimento.

Em seguida, passou-se a extração líquido-líquido, conforme descrito no item 1.2.1.3 deste capítulo, no qual foram avaliados vários solventes orgânicos extratores. Durante o procedimento de extração empregado, a amostra foi concentrada, de forma que a concentração dos fármacos na solução injetada no cromatógrafo foi duas vezes superior à concentração no plasma. Este procedimento foi adotado com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção dos fármacos para determinação quantitativa. Assim, a tomada de amostra inicial foi de 250 µl de plasma e adicionaram-se 2 ml do solvente orgânico extrator. Após a separação das fases, foram retirados 1,6 ml da camada orgânica, que corresponde a 80% do volume inicialmente adicionado. Após a evaporação, a reconstituição do resíduo em 200 µl de fase móvel (80% de 250 µl) garantiria uma concentração final igual à concentração plasmática. No procedimento adotado, o resíduo foi reconstituído em 100 µl de fase móvel, de forma que a concentração final dos fármacos foi o dobro da concentração plasmática.

Foram avaliados, como solventes orgânicos extratores, mistura de hexano e metil-*t*-butil éter (20:80) e clorofórmio e metil-*t*-butil éter (20:80). Em ambos solventes, artemeter apresentou porcentagem de recuperação próxima a 100%, enquanto lumefantrina foi muito pouco extraída (recuperação inferior a 50%). Segundo ZENG *et al.* (1996), a presença de ácido acético no sistema de solventes extratores é a chave para uma alta eficiência de extração de lumefantrina.

Apesar de lumefantrina ser uma base orgânica e provavelmente se encontrar na forma ionizada em meio ácido, apresentando consequentemente maior afinidade pela fase aquosa, o autor sugere que ocorre a formação de um par iônico entre lumefantrina e ácido acético. Este par iônico não se dissocia, comporta-se como molécula neutra, e, desta forma, a adição de ácido acético aumenta de forma significativa a solubilidade de lumefantrina em solventes orgânicos. Utilizando acetato de etila como solvente extrator, ZENG *et al.* (1996) obtiveram uma porcentagem de recuperação de 26% para lumefantrina, enquanto a extração com acetato de etila e ácido acético (100:1) promoveu recuperação de 92,91% do fármaco.

Assim, outros dois sistemas de solventes extratores foram avaliados: clorofórmio, metil-*t*-butil éter e ácido acético glacial (20:80:1) e acetato de etila e ácido acético glacial

(100:1). Acetato de etila apresenta certa miscibilidade com água, de forma que não foi possível obter adequada separação de fases quando este solvente foi empregado. O solvente extrator constituído por mistura de clorofórmio, metil-*t*-butil éter e ácido acético glacial (20:80:1) apresentou elevada eficiência de extração tanto para os fármacos em estudo quanto para os padrões internos.

Outro fator importante para o aumento da eficiência de extração de lumefantrina foi a adição de 0,2 ml de acetonitrila ou metanol no plasma, antes da extração líquido-líquido. Este procedimento levou à precipitação de proteínas do plasma, e foi uma forma de limpar previamente a amostra antes da extração.

Deste modo, o seguinte procedimento para extração dos fármacos do plasma foi inicialmente adotado: a 250 µl de plasma contendo os fármacos, adicionaram-se 50 µl da solução padrão interno e 200 µl de acetonitrila, seguido de pulsos no vórtex. Adicionaram-se 2 ml de mistura de clorofórmio, metil-*t*-butil éter e ácido acético glacial (20:80:1) e agitou-se em vórtex por 40 segundos. Os tubos foram centrifugados, uma alíquota de 1,6 ml da camada orgânica foi transferida para outro tubo de vidro e evaporada. O resíduo obtido foi reconstituído em 100 µl de fase móvel e 20 µl foram injetados no cromatógrafo.

Com o objetivo de determinar a taxa de recuperação de artemeter, lumefantrina e padrões internos pelo procedimento otimizado, as áreas dos picos obtidos nas amostras extraídas foram comparadas com as áreas dos picos de amostras em fase móvel, nas mesmas concentrações. Três concentrações foram avaliadas: CQB (30 ng/ml de artemeter e 30 ng/ml de lumefantrina), CQM (400 ng/ml de artemeter e 7500 ng/ml de lumefantrina) e CQA (800 ng/ml de artemeter e 15000 ng/ml de lumefantrina). As concentrações dos padrões internos foram fixas: 500 ng/ml de artesunato e 1000 ng/ml de halofantrina. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 34.

**Tabela 34 – Taxas de recuperação de artemeter, lumefantrina, artesunato e halofantrina obtidas pelo procedimento de extração líquido-líquido.**

Fármaco	Taxas de recuperação (%)		
	CQB	CQM	CQA
Artemeter	150,1	151,3	154,2
Lumefantrina	168,0	84,8	74,9
Artesunato	131,9	125,0	132,4
Halofantrina	205,4	209,3	203,6

De acordo com a Tabela 34, observa-se que foram obtidas taxas de recuperação consideravelmente elevadas para todos os fármacos. Para artemeter, a recuperação foi

independente da concentração plasmática, enquanto para lumefantrina verificou-se que a taxa de recuperação diminuiu com o aumento da concentração do fármaco no plasma.

Primeiramente, pensou-se que as altas taxas de recuperação ocorreram devido à evaporação do solvente orgânico durante o processo de extração, levando à concentração das amostras. Desta forma, todo o procedimento foi repetido, controlando-se e evitando-se a evaporação do solvente em todas as etapas, principalmente na reconstituição do resíduo em 100 µl de fase móvel. Entretanto, taxas de recuperação semelhantes foram obtidas. Outros procedimentos foram adotados, como aumentar o número de lavagens da seringa e do loop do injetor automático entre as injeções para eliminar o efeito memória (*carry over*) do equipamento; retirar toda a camada orgânica após a centrifugação (2 ml ao invés de 1,6 ml) e reconstituir o resíduo em 125 µl ao invés de 100 µl; dobrar os volumes de plasma tomado, de solução de padrão interno e do solvente orgânico extrator; substituir metil-*t*-butil éter por hexano na mistura de solventes extratores e utilizar outro analista. Contudo, nenhum dos procedimentos avaliados se mostrou eficiente para reduzir as elevadas taxas de recuperação obtidas para os quatro fármacos.

Diante do exposto, foi feito um teste para avaliar o efeito de matriz do plasma no procedimento de extração líquido-líquido empregado, conforme descrito previamente no item 1.2.1.4.5. Este teste tem como objetivo verificar se compostos endógenos do plasma são co-eluídos com os fármacos de interesse, promovendo supressão ou indução de ionização quando espectrometria de massas é empregada como método de detecção. Para isso, foi feita a comparação das áreas dos picos dos fármacos diluídos em fase móvel com aquelas da solução obtida após extração de plasma branco e reconstituição do resíduo, nas mesmas concentrações. Assim, foi realizado o procedimento de extração líquido-líquido em uma amostra de plasma branco, que não recebeu os fármacos nem os padrões internos. Após a extração e evaporação da camada orgânica, o resíduo obtido foi reconstituído em uma solução que continha artemeter, lumefantrina, artesunato e halofantrina em fase móvel, na concentração média (CQM). As áreas foram comparadas com aquelas obtidas na mesma solução utilizada para reconstituição, mas injetada diretamente no cromatógrafo. Verificou-se que as áreas dos fármacos na solução utilizada para reconstituição do resíduo do plasma foi consideravelmente superior às áreas da mesma solução injetada diretamente no cromatógrafo, de forma que foi comprovado o efeito de indução de ionização dos quatro fármacos pelos constituintes do plasma.

SMERAGLIA *et al.* (2002) descrevem algumas medidas que podem ser consideradas para minimizar ou eliminar o efeito de matriz, como modificação das

condições de ionização no espectrômetro de massas, alterações no procedimento de extração, de forma a tornar a amostra mais limpa, e modificações nas condições cromatográficas, principalmente por meio da substituição de eluição isocrática por eluição em gradiente para melhor separação entre os picos de interesse e compostos interferentes.

Desta forma, a eluição isocrática (tampão acetato de amônio 10 mM:metanol – 10:90) foi substituída por eluição em gradiente, de acordo com a Tabela 35, sendo o eluente A constituído de tampão acetato de amônio 10 mM e o eluente B metanol.

**Tabela 35 – Condição da eluição em gradiente inicialmente avaliada para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma por LC-MS/MS.**

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0.00	50	50
4.00	5	95
6.00	5	95
6.01	50	50
7.50	50	50

Com esta condição, o tempo de corrida foi 7,5 minutos e os tempos de retenção de artesunato, artemeter, halofantrina e lumefantrina foram 4,09, 4,40, 5,51 e 5,92 minutos, respectivamente. Na transição de artemeter, foi possível identificar claramente dois picos interferentes, um antes e outro depois do pico do fármaco, que não apareciam no cromatograma da condição isocrática previamente utilizada. No modo isocrático, todos os picos eram eluídos rapidamente da coluna, com baixo tempo de retenção e, provavelmente, compostos endógenos do plasma saíam da coluna e entravam no detector simultaneamente com os fármacos, alterando a ionização dos mesmos.

Um novo teste de recuperação foi realizado na concentração média (CQM) a as novas taxas de recuperação obtidas para artemeter, lumefantrina, artesunato e halofantrina foram 85,4%, 87,1%, 94,0% e 206,3%, respectivamente. Desta forma, a condição em gradiente foi capaz de separar os compostos interferentes causadores da indução da ionização para todos os fármacos, com exceção de halofantrina.

A tentativa seguinte para eliminar o efeito de matriz de halofantrina foi alterar seus parâmetros de ionização no espectrômetro de massas. Várias modificações foram avaliadas, como alterações das energias do cone e de colisão e substituição do fragmento utilizado na transição de 142,36 para 100,32. Entretanto, em todas as condições testadas, o teste de efeito de matriz demonstrou que área do pico de halofantrina na solução usada

para reconstituição do resíduo do plasma era aproximadamente o dobro da área obtida com a mesma solução em fase móvel, resultado em taxas de recuperação próximas a 200%.

Segundo SNYDER *et al.* (1997), o padrão interno não precisa, necessariamente, ser estruturalmente relacionado ao analito, o requisito mais importante é que ele apresente o mesmo comportamento químico do analito no processo de extração e preparo da amostra. Apesar de artesunato ser um ácido orgânico e lumefantrina ser uma base, ambos se comportam de forma semelhante no processo de extração em meio ácido, uma vez que artesunato permanece em sua forma não ionizada e lumefantrina provavelmente forma par iônico com o ácido acético, comportando-se como molécula neutra. Desta forma, foi feita uma análise retrospectiva com os dados armazenados, considerando artesunato como padrão interno de lumefantrina. Em todas as curvas analíticas já plotadas e análises realizadas, os desvios e resultados das análises não foram alterados quando halofantrina foi substituída por artesunato como padrão interno para lumefantrina. De acordo com métodos disponíveis na literatura científica, a utilização de mais de um padrão interno para quantificação de fármacos em associação não é um procedimento usual, mesmo quando os analitos não são estruturalmente relacionados. Assim, passou-se a adotar artesunato como padrão interno único para artemeter e lumefantrina e sua concentração de trabalho foi aumentada de 500 ng/ml para 1000 ng/ml, de forma que a área de seu pico fornecesse um valor intermediário para os dois analitos.

Quanto maior o número de transições detectadas no espectrômetro de massas, menor é a sensibilidade do detector para cada uma delas, de forma que esta medida apresentou a vantagem de aumentar a intensidade dos sinais dos analitos, uma vez que a transição de halofantrina foi eliminada do método.

A etapa seguinte foi a realização de uma pré-validação para verificar a adequabilidade do procedimento de extração e das condições cromatográficas otimizadas. O teste de efeito de matriz foi novamente realizado, agora em duas concentrações de cada analito (CQA e CQB) e em amostras de plasma branco provenientes de seis voluntários diferentes. Considerou-se ausência de efeito de matriz quando a diferença entre a área do pico do analito na solução utilizada para reconstituição do resíduo do plasma e aquela obtida em fase móvel foi inferior a 15%. Verificou-se que artemeter e artesunato não sofreram efeito de matriz em nenhuma das seis amostras de plasma, independente da concentração. Para lumefantrina, na concentração alta (15000 ng/ml) não foi verificada diferença significativa entre as áreas na solução utilizada para

reconstituição e aquela em fase móvel. Entretanto, na concentração baixa (30 ng/ml), a área do pico da solução de reconstituição foi aproximadamente três vezes superior à área do pico da solução em fase móvel, demonstrando claramente indução de ionização de lumefantrina em baixas concentrações. Como as áreas dos picos de lumefantrina na concentração alta são bastante elevadas, o efeito de matriz não é detectado, mas em concentrações baixas este efeito é significativo, comprometendo a quantificação de lumefantrina e inviabilizando a aplicação do método desenvolvido para quantificação do fármaco em meio plasmático.

Novamente os procedimentos para eliminação do efeito de matriz por indução de ionização foram retomados, agora voltados à lumefantrina. Inicialmente, foi avaliada a troca da coluna cromatográfica, substituindo a fase estacionária ciano por C<sub>18</sub> ou fenila. Entretanto, além destas fases estacionárias não terem reduzido o efeito matriz de forma satisfatória, a simetria do pico de lumefantrina ficou comprometida na coluna C<sub>18</sub> e a coluna fenila forneceu tempos de retenção excessivamente longos para os analitos.

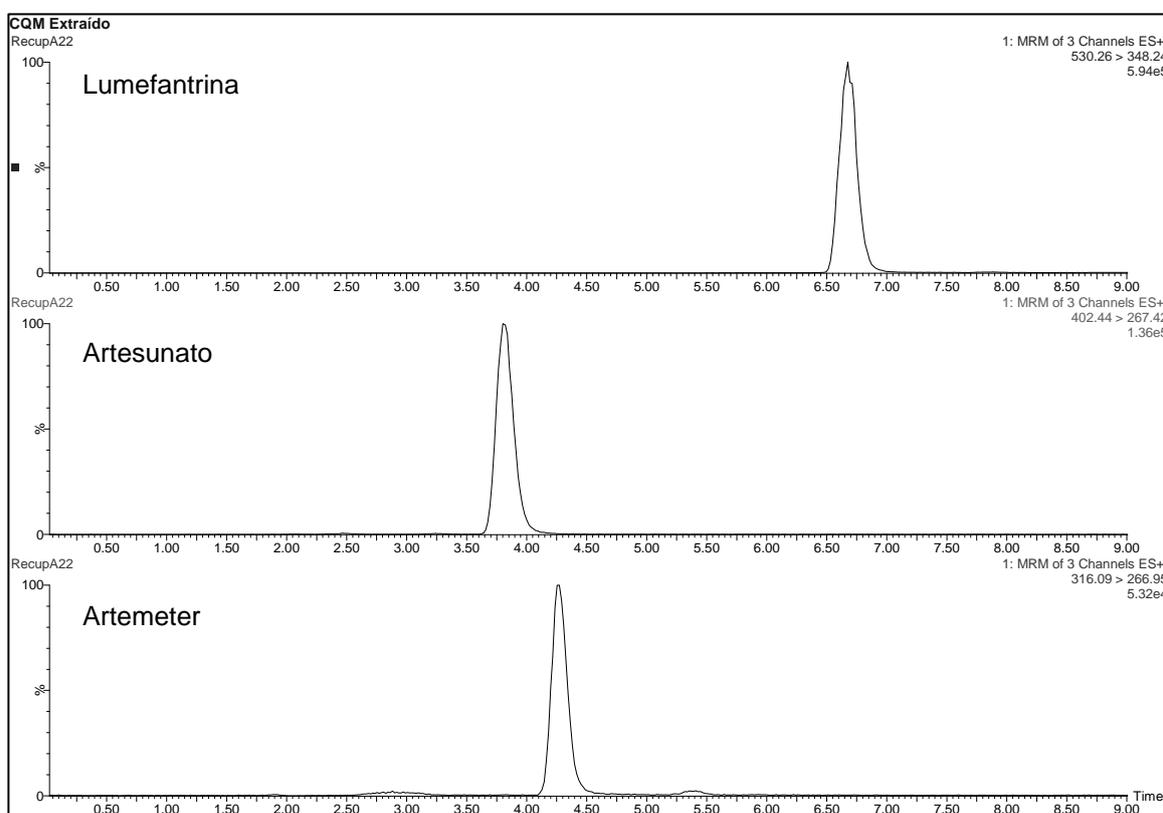
No processo de extração líquido-líquido empregado, após a reconstituição do resíduo com fase móvel, era obtida uma solução amarelada e levemente turva, demonstrando que o procedimento empregado fornecia uma amostra final consideravelmente “suja”. Em testes realizados com plasmas brancos, verificou-se que a presença de ácido acético no solvente orgânico extrator utilizado era responsável pela obtenção de amostras finais turvas e amareladas. Entretanto, como discutido anteriormente, ZENG *et al.* (1996) demonstraram que a presença de ácido acético no sistema de solventes extratores é a chave para uma alta eficiência de extração de lumefantrina, fato comprovado também experimentalmente no presente trabalho. Desta forma, a retirada de ácido acético do solvente extrator não seria adequada.

Assim, duas medidas foram adotadas para tentar eliminar a indução de ionização de lumefantrina: novas alterações no gradiente da fase móvel e no procedimento de extração. As condições do gradiente foram modificadas de forma a aumentar o tempo de corrida e possivelmente separar melhor o pico de lumefantrina dos interferentes provenientes do plasma. A avaliação desta separação é consideravelmente complexa, uma vez que os interferentes do plasma normalmente não são visualizados nos cromatogramas, mas sabe-se que eles entram simultaneamente com os fármacos no detector, alterando sua ionização. A nova condição da eluição em gradiente adotada está demonstrada na Tabela 36, sendo o eluente A constituído de tampão acetato de amônio 10 mM e o eluente B metanol.

**Tabela 36 - Condição da eluição em gradiente adotada para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma por LC-MS/MS.**

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0.00	40	60
7.00	0	100
7.01	40	60
9.00	40	60

Com esta condição, o tempo de corrida aumentou para 9,00 minutos e os tempos de retenção de artesunato, artemeter e lumefantrina foram 3,81, 4,24 e 6,69 minutos, respectivamente. Um cromatograma obtido nesta condição, na concentração média (CQM), está demonstrado na Figura 18.



**Figura 18 – Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS para quantificação de artemeter e lumefantrina em plasma, utilizando-se coluna Zorbax SB-Ciano e eluição em gradiente com fase móvel composta por tampão acetato de amônio 10 mM e metanol. Concentração das soluções: lumefantrina 7500 ng/ml, artesunato 1000 ng/ml e artemeter 400 ng/ml.**

Além disso, como tentativa para limpar a amostra no processo de extração de forma mais eficiente, foi inserido um procedimento inicial de precipitação de proteínas, seguido de centrifugação, antes da extração líquido-líquido. Em minitubos eppendorf,

adicionaram-se 250 µl de plasma contendo os fármacos, 50 µl de solução de padrão interno e 550 µl de metanol ou acetonitrila, seguido de agitação em vórtex por 20 segundos e centrifugação a 5000 rpm, por 5 minutos, a 4 °C. Uma alíquota de 640 µl do sobrenadante foi transferida para um tubo de vidro e adicionaram-se 2 ml do solvente orgânico extrator (clorofórmio:metil-*t*-butil éter:ácido acético glacial - 20:80:1). Os tubos foram agitados em vórtex por 40 segundos e centrifugados a 3500 rpm, por 4 minutos, a 4 °C. Uma alíquota de 1,8 ml da camada orgânica foi transferida para outro tubo de vidro e evaporada no concentrador de amostras, sob fluxo de nitrogênio, a 40 °C, por 8 minutos. O resíduo obtido foi reconstituído em 90 µl de fase móvel e 20 µl foram injetados no cromatógrafo.

Da forma semelhante ao procedimento anterior, os fármacos foram concentrados duas vezes nesse processo de extração. Utilizando-se esse procedimento, principalmente quando metanol foi utilizado na etapa inicial de precipitação de proteínas, a amostra final obtida após reconstituição ficou consideravelmente mais limpa, apenas levemente amarelada e sem turvação.

Realizou-se novo teste de efeito de matriz empregando a condição em gradiente e o procedimento de extração otimizados. Para artesunato, artemeter em concentração alta e baixa e lumefantrina em concentração alta, nenhum efeito de matriz foi verificado. Para a concentração baixa de lumefantrina, a área obtida na solução utilizada para reconstituição do resíduo do plasma foi 20% superior à área da solução em fase móvel. Segundo as referências empregadas para a realização deste teste (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003 e TAYLOR, 2005), a variação máxima permitida é 15%, de forma que ainda foi possível identificar uma leve indução de ionização para lumefantrina em concentrações baixas. Após avaliação da recuperação dos fármacos pelo novo procedimento de extração, verificou-se que as quantidades recuperadas de artemeter e lumefantrina, assim como de artesunato, foram reduzidas de forma significativa, o que consequentemente levou à diminuição das áreas dos picos e aumento do limite inferior de quantificação do método (>10 ng/ml para ambos os fármacos).

Além disso, o procedimento desenvolvido com precipitação de proteínas seguido de extração líquido-líquido se mostrou consideravelmente trabalhoso e demorado, uma vez que envolve duas etapas de centrifugação, uma de 5 e outra de 4 minutos, uma etapa de evaporação de solvente de 8 minutos, além do tempo gasto na manipulação das amostras. Para extração de cada amostra, seriam utilizados um minitubo eppendorf e dois tubos de vidro. Na primeira centrifugação, as amostras estariam em minitubos eppendorf, enquanto na segunda, estariam em tubos de vidro, de forma que o carrossel da centrífuga

deveria ser trocado a cada sequência de extração. Como várias etapas de pipetagem eram necessárias, o procedimento era suscetível a variações devido a erros humanos e evaporação de solvente, e mesmo sendo realizado por analistas treinados, verificou-se que a precisão obtida por este procedimento não foi elevada.

Poderia-se ignorar a leve indução de ionização de lumefantrina em concentrações baixas e empregar o método desenvolvido, mesmo com taxas de recuperação menores, limite inferior de quantificação maior e procedimento de extração laborioso. Entretanto, diante do exposto, novas tentativas foram realizadas, visando simplificar e otimizar a eficiência do método.

Foi observado que na etapa inicial de precipitação de proteínas, após adição de 550 µl de metanol e centrifugação, o sobrenadante obtido era consideravelmente límpido. Pensou-se então, em injetar diretamente este sobrenadante. Devido à alta afinidade de lumefantrina por ácido acético, adicionou-se 0,5% (v/v) desse ácido ao metanol e avaliou-se o seguinte procedimento de extração por precipitação de proteínas: em minitubos eppendorf contendo 250 µl de plasma com os fármacos, adicionaram-se 50 µl da solução padrão interno (artesunato 5000 ng/ml em metanol) e submeteu-se ao vórtex por 30 segundos. Em seguida, 450 µl de ácido acético glacial 0,5% (v/v) em metanol foram adicionados e agitou-se em vórtex por 40 segundos. Os minitubos foram centrifugados a 10000 rpm, por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para vials. Como neste procedimento a amostra, ao invés de concentrada, foi diluída três vezes (volume inicial de 250 µl e volume final de 750 µl), o volume de injeção foi aumentado para 50 µl.

Os testes de efeito de matriz e de recuperação foram realizados adotando-se o novo procedimento de precipitação de proteínas, com o método de eluição em gradiente descrito na Tabela 36. Não foi verificada indução ou supressão de ionização para nenhum dos fármacos, independente da concentração, nem para o padrão interno, indicando que os compostos endógenos do plasma que causavam efeito de matriz provavelmente eram extraídos pela mistura de solventes orgânicos extratores no procedimento de extração líquido-líquido. No procedimento de precipitação por proteínas, foram obtidas taxas de recuperação superiores a 80% para todos os fármacos e experimentos pré-validação indicaram linearidade e precisão adequadas, de forma que o procedimento descrito foi adotado para a extração dos fármacos do plasma com sucesso.

Apesar do tempo de corrida na análise cromatográfica ser relativamente longo (9 minutos), o procedimento de extração se mostrou rápido e robusto, resultando em uma análise simples e confiável. A etapa que consome maior tempo no método desenvolvido é justamente a análise cromatográfica, que é automatizada. Assim, o trabalho do analista

envolve basicamente o processo de extração que, como mencionado anteriormente, é bastante rápido e simples. Conseqüentemente, o procedimento desenvolvido minimiza possíveis erros ou variações provenientes da manipulação das amostras, levando à obtenção de resultados precisos e exatos.

Segundo TAYLOR (2005), os efeitos de matriz são o “calcanhar de Aquiles” de métodos bioanalíticos por LC-ESI-MS/MS. Estes efeitos são decorrentes de alterações na eficiência de ionização pela presença de substâncias que co-eluem com os analitos, provenientes da matriz biológica. O mecanismo exato do efeito de matriz ainda não é claro, entretanto, provavelmente se origina da competição entre o analito e componentes da matriz não detectados que co-eluem com o analito. Dependendo do ambiente no qual os processos de ionização e evaporação dos íons ocorrem, esta competição pode efetivamente diminuir (supressão de ionização) ou aumentar (indução de ionização) a eficiência da formação dos íons desejados do analito, presentes na fonte de ionização. Assim, a eficiência da formação de íons do analito é diretamente dependente da matriz que entra simultaneamente na fonte de ionização (MATUSZEWSKY *et al.*, 2003).

Para alguns compostos específicos, foi demonstrado que ionização química a pressão atmosférica (APCI) é menos suscetível a efeitos de matriz do que eletrospray, provavelmente porque o excesso de íons reagentes para produzir analitos carregados torna o processo de ionização por APCI menos suscetível aos efeitos de matriz. Assim, estes efeitos poderiam ser eliminados pela troca da fonte de ionização (HOPFGARTNER & BOURGOGNE, 2003). No presente trabalho, a fonte de ionização APCI já havia sido previamente avaliada e verificou-se que a mesma não foi adequada para ionização e detecção dos fármacos em estudos. Outro procedimento alternativo para eliminar efeitos de matriz seria alterar a polaridade do modo de ionização (positivo para negativo ou vice versa) (LEVERENCE *et al.*, 2007). Entretanto, como mencionado pelos próprios autores, esse procedimento é viável apenas quando o analito pode ser efetivamente ionizado em ambos os modos (positivo e negativo) e os compostos interferentes se ionizam em apenas um modo.

Os efeitos de matriz também são altamente dependentes do analito e da matriz biológica. A natureza química de uma substância influencia consideravelmente a extensão na qual o efeito de matriz ocorre. Substâncias mais polares apresentam maior probabilidade de sofrer supressão de ionização do que substâncias menos polares (TAYLOR, 2005).

Os interferentes do plasma que causam efeito de matriz normalmente não são detectados no cromatograma, mas causam impacto negativo na exatidão e sensibilidade

do método. Para minimizar ou eliminar os efeitos de matriz, modificações na metodologia de extração da amostra e melhoras na separação cromatográfica devem ser realizadas. Estes dois procedimentos estão interligados e constituem a base para o desenvolvimento bem sucedido de um método quantitativo robusto por LC-MS/MS (TAYLOR, 2005).

Segundo ZHOU *et al.* (2005), uma etapa inicial de extração e limpeza da amostra é necessária para remover compostos indesejáveis provenientes da matriz. Uma segunda etapa de limpeza, que envolve a análise cromatográfica, separa o analito de interesse de interferentes remanescentes do método de extração. Estas duas etapas adequadamente otimizadas em conjunto são capazes de eliminar os compostos da matriz biológica que poderiam competir com o analito pela ionização e garantir a performance satisfatória do método bioanalítico. No presente trabalho, modificações conjuntas nas condições cromatográficas e nos procedimentos de extração foram realizadas visando a eliminação do efeito de matriz. Como mencionado por TAYLOR (2005) e verificado experimentalmente, estes dois procedimentos são intimamente relacionados e devem ser considerados conjuntamente para obtenção de um método bioanalítico sem efeito de matriz, razão pela qual a extração dos fármacos do plasma e a análise cromatográfica foram descritas em um mesmo tópico no presente trabalho.

Precipitação de proteínas é considerado o procedimento de preparo de amostras mais “sujo”, promovendo, assim, efeito de matriz com maior frequência, quando comparado à extração em fase sólida ou extração líquido-líquido (LEVERENCE *et al.*, 2007). No presente trabalho, entretanto, uma situação contrária foi verificada, uma vez que as amostras obtidas pelo procedimento de extração líquido-líquido foram consideravelmente mais turvas e amareladas do que aquelas obtidas por precipitação de proteínas. Como discutido anteriormente, a presença de ácido acético no solvente orgânico extrator favorecia a extração de compostos do meio plasmático que provavelmente induziam a ionização dos analitos, entretanto o meio ácido era necessário para obtenção de altas taxas de recuperação de lumefantrina. Já o procedimento por precipitação de proteínas, além de mais simples, rápido e robusto, levou à obtenção de amostras mais limpas, cujos interferentes plasmáticos remanescentes foram posteriormente separados na etapa cromatográfica com sucesso. Tal fato condiz com o que foi descrito por TAYLOR (2005), em que a seleção de qual método de extração utilizar não é limitada apenas à avaliação de qual fornece a amostra mais limpa, mas deve ser também interligada à separação cromatográfica durante a otimização do método.

A maioria dos efeitos de matriz ocorre próximo ao tempo zero na corrida cromatográfica. Assim, intuitivamente, se os analitos forem retidos em certa extensão na

coluna, os efeitos de matriz podem ser minimizados (TAYLOR, 2005). No presente trabalho, verificou-se que a substituição da eluição isocrática por gradiente minimizou os efeitos de matriz, provavelmente devido ao aumento no tempo de retenção dos fármacos e melhor separação dos interferentes plasmáticos. Entretanto, após estabelecido o gradiente, verificou-se uma situação contrária àquela descrita por TAYLOR (2005), uma vez que os fármacos que foram mais suscetíveis ao efeito de matriz foram halofantrina e lumefantrina, que apresentavam maior tempo de retenção do que artemeter e artesunato. Tal fato demonstra que os interferentes plasmáticos apresentavam certa afinidade pela coluna ciano empregada, sendo eluídos em tempos de retenção próximos à halofantrina e lumefantrina. A troca da fase estacionária da coluna por  $C_{18}$  ou fenila, entretanto, não forneceu resultados satisfatórios em relação à seletividade dos fármacos e separação dos interferentes da matriz.

Tanto a supressão quanto a indução de ionização têm um efeito negativo na precisão do método, uma vez que os compostos responsáveis pelo efeito matriz são provenientes do plasma e, considerando-se a extensa variabilidade interindividual, amostras plasmáticas de diferentes voluntários podem promover efeitos de matriz em diferentes extensões (MATUSZEWSKY *et al.*, 2003). Além disso, a supressão de ionização apresenta efeito prejudicial no limite inferior de quantificação do método, uma vez que diminui sua sensibilidade de forma considerável. Por outro lado, a indução de ionização pode ser utilizada para melhorar os limites de detecção do método, principalmente em análises de substâncias pouco ionizáveis (TAYLOR, 2005). YAMAGUCHI *et al.* (1999 e 2001), em dois trabalhos, realizaram a infusão pós coluna de 2-(2-metoxietoxi)etanol, com o objetivo de aumentar a intensidade dos sinais dos metabólitos de esonarimode em urina e de ibuprofeno em plasma. Devido à baixa sensibilidade dos métodos por LC-ESI-MS/MS para detecção destes metabólitos, os autores empregaram com sucesso a infusão de um modificador capaz de induzir a ionização dos analitos, que permitiu a identificação e elucidação estrutural dos metabólitos de interesse. Entretanto, é importante ressaltar que, neste caso, a substância responsável pela indução de ionização não era proveniente do plasma, mas adicionada de forma conhecida e controlada ao sistema de detecção.

Apesar da supressão iônica devido a efeitos de matriz ter sido descrita com mais frequência na literatura, alguns trabalhos recentes relatam indução de ionização por componentes da matriz, embora o mecanismo pelo qual este processo ocorre permanecer obscuro (ZHOU *et al.*, 2005). KING *et al.* (2000) estudaram os mecanismos que promovem supressão iônica em eletrospray e demonstraram que o efeito de matriz é

resultado da competição entre componentes plasmáticos não voláteis e íons do analito para alcançar a superfície da gota e ser transferido para a fase gasosa no processo de ionização. Entretanto, os autores concluíram que o mecanismo exato da alteração da transferência do analito para a fase gasosa por estes compostos não voláteis não é claro. LEVERENCE *et al.* (2007) avaliaram os efeitos de matriz em eletrospray e atribuíram o fenômeno de indução de ionização observado no método ao modelo de ionização do eletrospray, ou seja, evaporação e ejeção dos íons da gota. Segundo esses autores, compostos interferentes podem induzir um excesso de analitos na superfície da gota e o acúmulo de cargas associadas facilitariam a evaporação dos íons ou a explosão da gota devido à repulsão eletrostática. Entretanto, os autores afirmam que o mecanismo de ionização por eletrospray é consideravelmente complexo e outros parâmetros, como as propriedades físico-químicas dos analitos, também podem ter um impacto significativo na extensão na qual a indução de ionização ocorre.

### **2.1.3 Validação do método bioanalítico**

A validação de métodos bioanalíticos é o processo utilizado para garantir que a performance dos parâmetros analíticos está adequada para o uso pretendido e que o método demonstra confiabilidade necessária para quantificar um ou mais analitos em uma matriz biológica específica (BRESSOLE *et al.*, 1996; CAUSON, 1997). Após desenvolvimento e otimização do método por LC-ESI-MS/MS para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina em plasma, procedeu-se o processo de validação, segundo procedimentos preconizados pela Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos recomendado pelo U.S. Food and Drug Administration (Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2001).

#### **2.1.3.1 Seletividade**

A seletividade do método bioanalítico foi avaliada por meio da análise de amostras de plasma branco obtidas de seis diferentes voluntários, sendo um plasma lipêmico, um plasma hemolisado e quatro plasmas normais. Empregou-se o procedimento de análise desenvolvido e otimizado e, em nenhuma das seis amostras, foram verificados picos

interferentes no mesmo tempo de retenção de artemeter, lumefantrina ou artesunato, como demonstrado na Figura 19.

Pode-se observar, nos cromatogramas obtidos na transição de artemeter, a presença de dois picos, o primeiro em torno de 2,9 minutos, e o segundo em 5,5 minutos. Como o tempo de retenção de artemeter é 4,2 minutos, a presença destes picos não interfere na quantificação do fármaco. É interessante notar que o primeiro pico, em 2,9 minutos, não aparece no cromatograma do plasma hemolisado. Nas transições de artesunato e lumefantrina, observa-se apenas ruídos da linha de base nos cromatogramas, demonstrando ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos fármacos e comprovando a seletividade do método bioanalítico para quantificação destes analitos em plasma.

A avaliação de interferências provenientes de alguns fármacos não é um requisito exigido pelos guias de validação, entretanto, é importante para melhor controle da etapa clínica a ser realizada com voluntários. Assim, se o processo de validação demonstrar que o método é seletivo em relação à presença de dipirona no plasma, por exemplo, este fármaco pode ser eventualmente utilizado para controlar efeitos adversos do medicamento administrado e os voluntários que fizerem uso de dipirona não precisam ser excluídos do estudo.

Assim, a seletividade do método também foi avaliada em relação à presença de cafeína, paracetamol, dipirona e dexclorfeniramina, nas suas respectivas concentrações plasmáticas máximas. Os cromatogramas obtidos com amostras de plasma contendo estes fármacos apresentaram o mesmo perfil do plasma branco normal demonstrado na Figura 19, de forma que o método bioanalítico demonstrou-se seletivo também em relação a presença destes fármacos.

A seletividade do método em relação à diidroartemisinina, o principal metabólito plasmático de artemeter, foi avaliada, na concentração plasmática máxima (1000 ng/ml). No cromatograma obtido na transição de artemeter, foi possível visualizar um pequeno pico com tempo de retenção de 3,8 minutos, correspondente à diidroartemisinina (Figura 20). Entretanto, a intensidade do pico foi baixa considerando-se a concentração de diidroartemisinina, além do seu tempo de retenção permitir adequada separação cromatográfica do pico de artemeter, que é eluído em 4,2 minutos. Assim, a seletividade do método em relação à presença de diidroartemisinina nas amostras plasmáticas também foi comprovada.

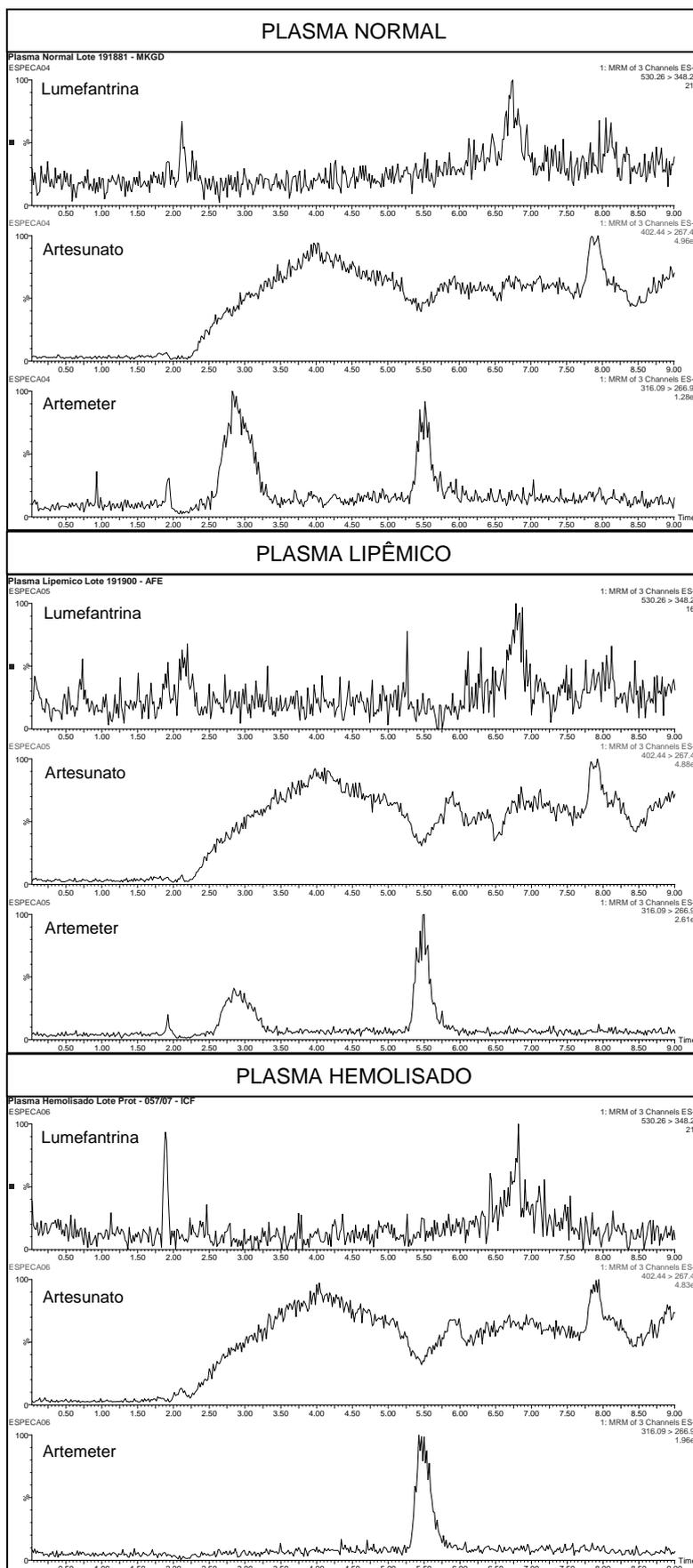
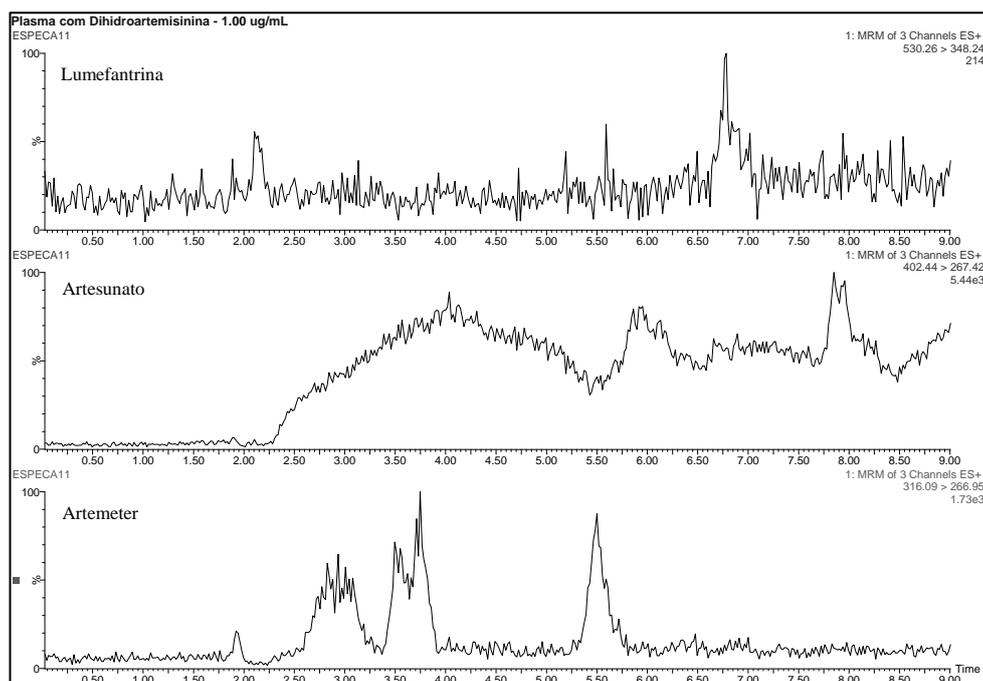


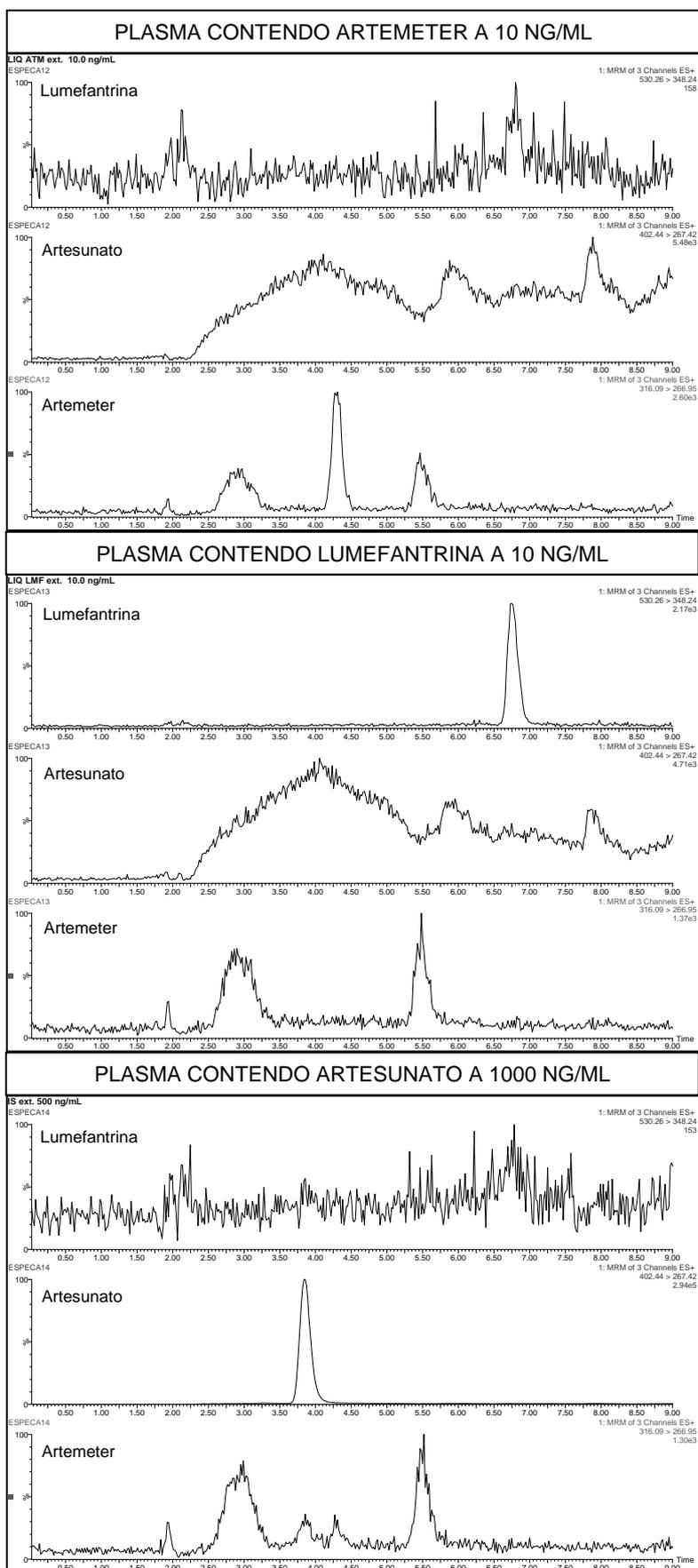
Figura 19 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasmas normal, lipêmico e hemolisado, para avaliação da seletividade do método.



**Figura 20 – Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS com a injeção de uma amostra plasmática contendo diidroartemisinina a 1000 ng/ml, para avaliação da seletividade do método.**

Foram feitas injeções de amostras de plasma contendo artemeter e lumefantrina na concentração do limite inferior de quantificação (10 ng/ml) e de artesunato na concentração de trabalho (1000 ng/ml), isoladamente, como demonstrado na Figura 21. Tal procedimento foi realizado com o objetivo de verificar se um fármaco apresenta possíveis interferentes na transição dos outros e para comparar a área de eventuais picos interferentes com a área dos analitos de interesse.

A resposta de picos interferentes deve ser inferior a 20% da resposta do fármaco no limite inferior de quantificação e inferior a 5% da resposta do padrão interno na concentração utilizada. Entretanto, em todas as análises realizadas, não foram visualizados picos interferentes nos mesmos tempos de retenção de artemeter, lumefantrina e artesunato e nenhum dos fármacos apresentou interferências nas transições dos outros.



**Figura 21 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasma contendo artemeter (10 ng/ml), lumefantrina (10 ng/ml) e artesunato (1000 ng/ml), isoladamente.**

### 2.1.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada na faixa de 10 a 1000 ng/ml para artemeter, e de 10 a 18000 ng/ml para lumefantrina, por meio da construção de curvas analíticas de sete pontos, cada um em duplicata. As curvas plotadas em três dias consecutivos indicaram correlação linear adequada para artemeter, na faixa de concentração avaliada. Os dados obtidos na curva analítica de artemeter do primeiro dia estão demonstrados na Tabela 37.

**Tabela 37 – Dados obtidos para construção da curva analítica de artemeter, no primeiro dia de análise, pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

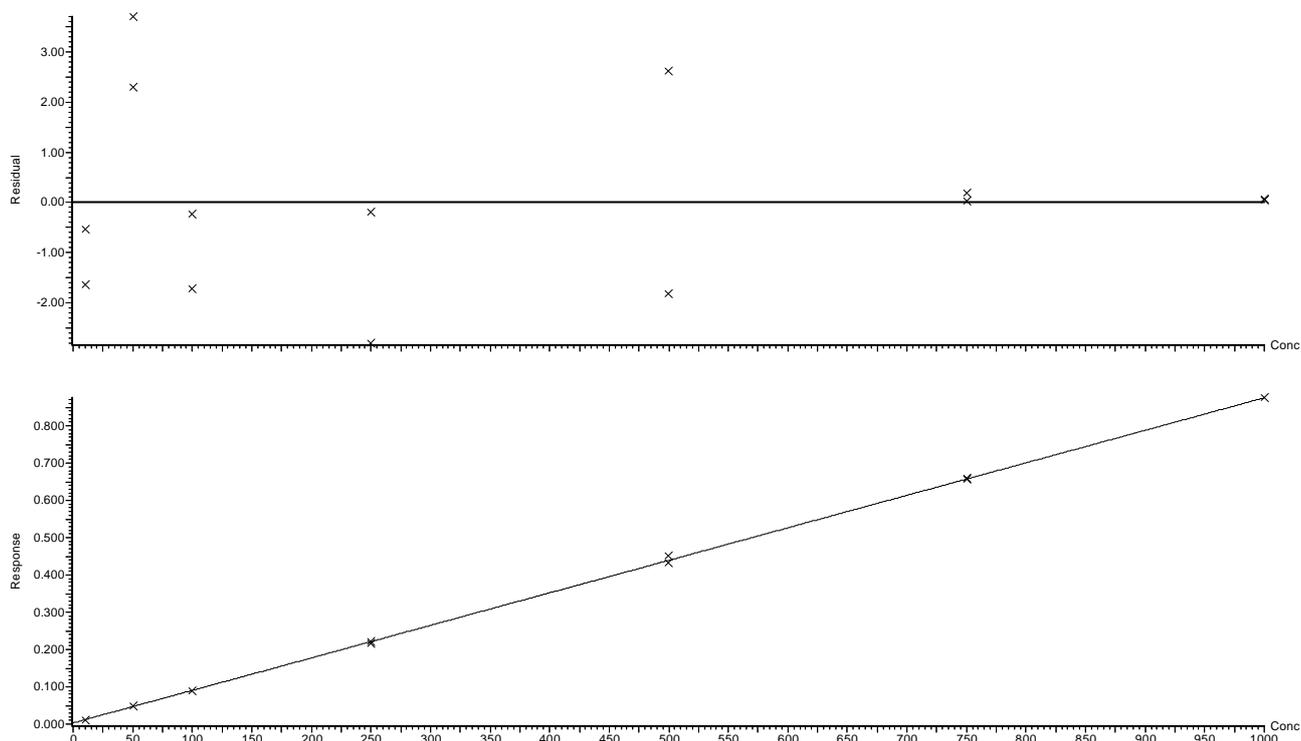
Ponto	Conc. nominal (ng/ml)	Área de artemeter	Área do padrão interno	Resposta	Conc. experimental (ng/ml)	Desvio (%)
1.1	10	633,6	52895,4	0,012	9,9	-1,2
1.2	10	628,3	53511,8	0,012	9,6	-4,0
2.1	50	2661,6	55386,6	0,048	51,6	3,3
2.2	50	2659,3	54231,7	0,049	52,8	5,6
3.1	100	5073,0	56022,7	0,091	100,8	0,8
3.2	100	5072,5	57338,4	0,088	98,4	-1,6
4.1	250	12660,0	57584,7	0,220	250,5	0,2
4.2	250	12475,5	58668,4	0,213	242,2	-3,1
5.1	500	25450,4	57790,0	0,440	505,9	1,2
5.2	500	25176,8	58968,4	0,427	490,3	-1,9
6.1	750	36934,8	56734,3	0,651	749,7	-0,0
6.2	750	37163,1	57135,9	0,650	749,0	-0,1
7.1	1000	51006,0	57726,2	0,884	1018,9	1,9
7.2	1000	49707,7	57875,4	0,859	990,3	-1,0

As três curvas analíticas de artemeter, obtidas em dias consecutivos, atenderam aos critérios de aceitação preconizados, uma vez que todas apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,98, desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ e desvio menor ou igual 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva. As equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação estão demonstrados na Tabela 38. Na Figura 22 está representada a curva analítica de artemeter obtida no primeiro dia, assim como o gráfico de resíduos correspondente. Observa-se que os resíduos estão distribuídos de forma aleatória no gráfico, de forma que não se verificou qualquer tendência na curva analítica de artemeter.

**Tabela 38 – Equações das retas e respectivos coeficientes de correlação obtidos para artemeter, na avaliação da linearidade do método bioanalítico.**

Dia	Equação da reta	Coefficiente de correlação
1	$Y = 0,000872 X + 0,003247$	0,99991
2	$Y = 0,000735 X + 0,000852$	0,99927
3	$Y = 0,000755 X + 0,001792$	0,99987

Compound name: Artemeter  
 Correlation coefficient:  $r = 0,999909$ ,  $r^2 = 0,999817$   
 Calibration curve:  $0,000872178 * x + 0,00324705$   
 Response type: Internal Std ( Ref 3 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



**Figura 22 – Gráfico de resíduos e curva analítica de artemeter obtidos por regressão linear no primeiro dia de análise, na faixa de 10 a 1000 ng/ml.**

Para construção das curvas analíticas de artemeter, utilizou-se fator de ponderação ou fator de peso (*weighting factor*) igual a  $1/x$ . Em métodos bioanalíticos, a utilização de fatores de ponderação é um procedimento usual, adotado para compensar o aumento da variância decorrente do aumento da concentração dos analitos. Quando a faixa de concentração no eixo x é consideravelmente ampla (normalmente maior do que uma ordem de magnitude), pode-se esperar que as variâncias de cada ponto individual sejam diferentes umas das outras. Desvios maiores observados nas concentrações mais elevadas tendem a influenciar a regressão linear de forma mais acentuada do que desvios

menores associados às concentrações mais baixas (ROZET *et al.*, 2007). Este fato pode ser visualizado na plotagem do gráfico de resíduos versus as concentrações dos analitos, no qual se observa a distribuição dos resíduos em forma de corneta, ou seja, ocorre aumento da variância dos resíduos (tanto positivos quanto negativos) a medida que a concentração no eixo x aumenta.

Assim, em métodos bioanalíticos, nos quais amplas faixas de concentração são necessárias, é comum não se verificar variâncias equivalentes ao longo das concentrações da curva, condição denominada heterocedasticidade. Uma forma efetiva de compensar esta situação é empregar a regressão linear ponderada (*weighted linear regression*), de forma a diminuir a influência das maiores variâncias verificadas nas maiores concentrações no ajuste da linha de regressão aos pontos da curva. Deve-se, então, escolher o fator de ponderação mais adequado ( $1/x$ ,  $1/x^2$ ,  $1/x^{1/2}$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$ ,  $1/y^{1/2}$ ) ao ajuste da reta aos pontos, de forma a obter menores desvios entre as concentrações experimentais e as nominais e coeficiente de correlação mais elevado. Além disso, com a utilização do fator de ponderação, é possível obter uma distribuição de resíduos aleatória ao longo das concentrações do eixo x (ALMEIDA *et al.*, 2002).

Como lumefantrina atinge concentrações plasmáticas consideravelmente elevadas, a faixa de concentração avaliada foi de 10 a 18000 ng/ml. Soluções estoque e amostras plasmáticas foram preparadas para conter artemeter e lumefantrina concomitantemente, de forma que as curvas de lumefantrina também apresentavam sete pontos.

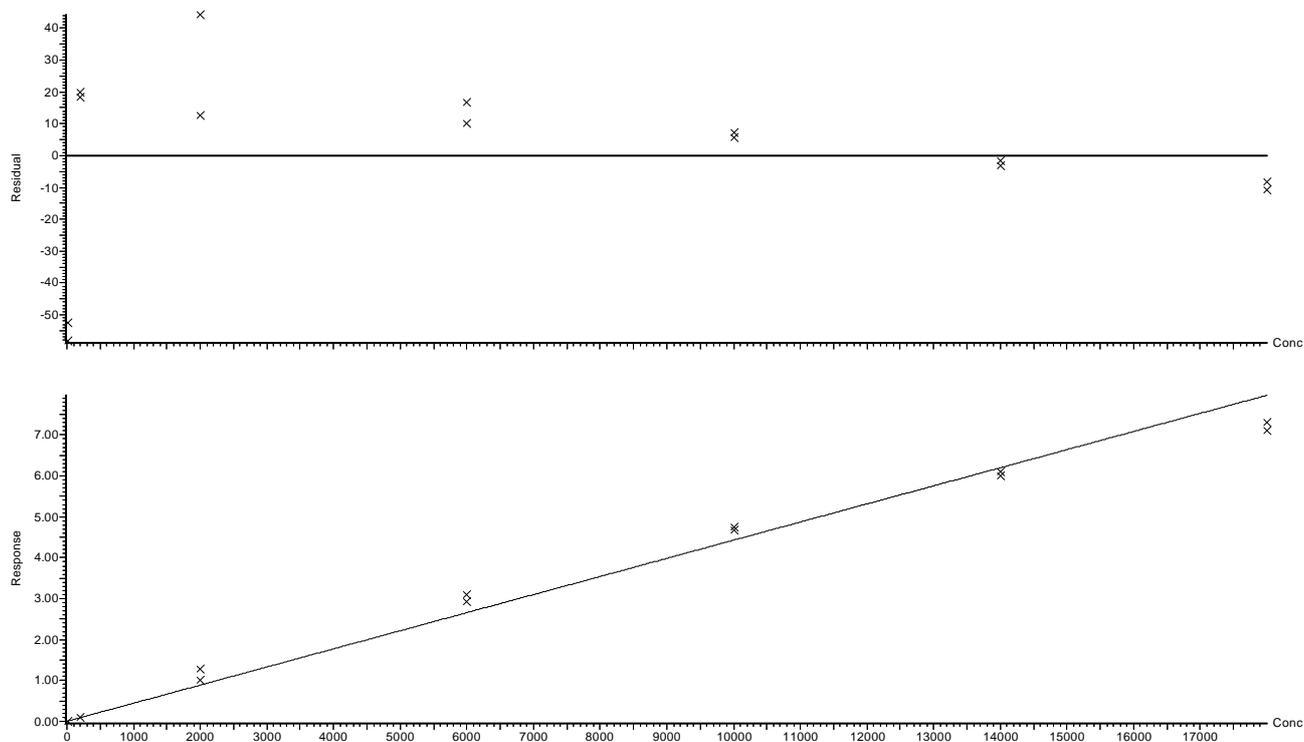
A inspeção visual da curva analítica de lumefantrina obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados demonstrou claramente perda de linearidade dos pontos mais elevados da curva. Apesar do valor do coeficiente de correlação obtido ( $r = 0,9945$ ) ser elevado e dentro da especificação, o gráfico de resíduos demonstrou tendência significativa, de forma que o modelo de regressão linear não mostrou-se adequado para lumefantrina. Na Figura 23 estão representados a curva linear de lumefantrina e o gráfico de resíduos correspondente, nos quais se pode constatar a inadequabilidade do modelo de regressão linear para lumefantrina.

Alguns procedimentos foram adotados com o objetivo de melhorar a linearidade da curva de lumefantrina e torná-la adequada ao modelo de regressão linear. Inicialmente, transformações matemáticas (log, ln, raiz quadrada) dos valores de concentração e/ou resposta foram avaliadas, entretanto, sem sucesso para melhorar a linearidade da curva.

Pensou-se em diluir as amostras ou adotar medidas para reduzir a área e conseqüentemente, a resposta de lumefantrina no gráfico. O empecilho para tais procedimentos seria a redução do sinal também de artemeter. Como o objetivo do método

é a quantificação simultânea de ambos os fármacos, a diluição ou redução do sinal de lumefantrina teria o mesmo impacto para artemeter, causando conseqüente perda de sensibilidade do método e aumento considerável no limite inferior de quantificação.

Compound name: Lumefantrina  
Correlation coefficient:  $r = 0.994520$ ,  $r^2 = 0.989071$   
Calibration curve:  $0.000442542 \cdot x + 0.00345277$   
Response type: Internal Std ( Ref 3 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



**Figura 23 – Gráfico de resíduos e curva analítica de lumefantrina obtidos por regressão linear, na faixa de 10 a 18000 ng/ml.**

Outro procedimento avaliado foi a redução do valor da energia do cone de lumefantrina de 40 eV para 35, 30 e 25 eV, com o objetivo de diminuir a ionização e a resposta deste fármaco, sem prejudicar a detecção de artemeter. As áreas dos picos de lumefantrina reduziram de forma significativa e proporcional com a diminuição gradativa da energia do cone, entretanto, as curvas obtidas demonstraram o mesmo perfil anterior, com coeficiente de correlação superior a 0,99, mas com desvio de linearidade nos últimos pontos e tendência no gráfico de resíduos.

Avaliou-se ainda a alteração do *split* do sistema. Por meio de uma conexão T, aproximadamente 80% do fluxo que saía do cromatógrafo era descartado e apenas 20% era introduzido no espectrômetro de massas. Com o objetivo de reduzir o sinal do detector, esta divisão de fluxo foi alterada, de forma que 90% do fluxo era descartado e

10% introduzido no detector. No entanto, esta medida não apresentou qualquer impacto na redução da resposta de lumefantrina ou na melhora do perfil de sua curva.

Foram realizadas, ainda, alterações nas condições cromatográficas, com o objetivo de separar melhor o pico de lumefantrina de possíveis interferentes que poderiam estar competindo com o fármaco pela ionização em concentrações mais elevadas. Este procedimento também não contribuiu para melhorar a linearidade da curva de lumefantrina.

Todos os artigos científicos publicados até então para quantificação de lumefantrina em matrizes biológicas (MANSOR *et al.*, 1996; ZENG *et al.*, 1996; LINDEGARDH *et al.*, 2005; ANNERBERG *et al.*, 2005) utilizaram espectrofotometria no ultravioleta para detecção do fármaco, não estando disponíveis na literatura artigos sobre quantificação de lumefantrina por espectrometria de massas. E em todos os quatro artigos publicados, a curva de lumefantrina foi linear, mesmo com as amplas faixas de concentração utilizadas. Assim, as mesmas soluções da curva foram injetadas no cromatógrafo e detectadas simultaneamente no detector DAD e no espectrômetro de massas. Curiosamente, a curva obtida pela detecção na região do ultravioleta, apesar de apresentar maior limite de quantificação, ajustou-se perfeitamente ao modelo de regressão linear, com valores de desvios e coeficiente de correlação adequados e sem tendências no gráfico de resíduos. Por outro lado, a curva obtida com as mesmas soluções no espectrômetro de massas demonstrou o mesmo perfil anterior, com perda de linearidade nos pontos mais elevados.

Quando eletrospray é utilizado como fonte de ionização, o sinal dos íons do analito sofre saturação em concentrações em torno de 10  $\mu\text{M}$ . Acima desta concentração, o sinal dos íons dos analitos tende a diminuir. Este fenômeno de saturação do sinal da amostra pode ser atribuído à quantidade de cargas insuficientes na gota durante o processo de ionização por eletrospray. Quando a superfície da gota está sobrecarregada com íons do analito, moléculas do analito e outros solutos, a passagem de um íon do analito do centro da gota até sua superfície para alcançar a fase gasosa é parcialmente bloqueada, e uma relação não-linear entre a concentração da amostra e o sinal do íon é esperada. Empiricamente, foi determinado que a saturação do sinal dos íons do analito em eletrospray ocorre em concentrações próximas a 10  $\mu\text{M}$  (BRUINS, 1998).

Pode-se inferir, então, que este processo de saturação ocorre com lumefantrina na faixa de concentração empregada no método. A concentração de 10  $\mu\text{M}$  mencionada por BRUINS *et al.* (1998) equivale a cerca de 5290 ng/ml de lumefantrina, de forma que a

quantificação de concentrações até 18000 ng/ml provavelmente leva à saturação de cargas na superfície da gota no processo de ionização por eletrospray.

Esta condição é comumente verificada em métodos bioanalíticos por LC-MS/MS, quando eletrospray é empregado como fonte de ionização, e não invalida o método ou a utilização da curva analítica para determinação das concentrações das amostras. Foi demonstrado que induzir uma função linear sistematicamente é um procedimento desnecessário e que pode levar a erros consideráveis nos resultados obtidos, situação comumente verificada em métodos bioanalíticos e imunobiológicos, nos quais as faixas de trabalho são consideravelmente amplas (ROZET *et al.*, 2007).

Ainda segundo o mesmo autor, uma fonte significativa de erro e imprecisão em determinações analíticas pode ser causada pela escolha inadequada do modelo estatístico para a curva analítica. No guia de validação de métodos bioanalíticos do FDA (FOOD AND DRUG, 2001), é recomendado que seja utilizado o modelo mais simples que descreva adequadamente a relação entre concentração e resposta.

Segundo HUBERT *et al.* (2007), diferentes funções de respostas podem ser consideradas durante as etapas de desenvolvimento e validação, e a escolha do modelo mais adequado depende do tipo método (físico-químico, bioanalítico, imunobiológico). Geralmente, a maioria dos métodos físico-químicos emprega regressão linear, com a reta passando pelo zero ou não. Quando métodos bioanalíticos são desenvolvidos, funções quadráticas devem ser consideradas em alguns casos, principalmente devido à ampla faixa de concentração avaliada.

Na literatura científica, trabalhos nos quais regressão quadrática foi utilizada para quantificação de fármacos por LC-ESI-MS/MS são facilmente encontrados (XUE *et al.*, 2003; KAWABATA & URASAKI, 2006; LI *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008; VLASE *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2008). Alguns autores mencionam que a regressão linear foi inicialmente avaliada, mas a curva ajustou-se melhor ao modelo quadrático. Além do processo de saturação que ocorre em eletrospray e de amplas faixas de concentração, a obtenção de curvas quadráticas parece estar relacionada também às características intrínsecas do fármaco analisado.

Desta forma, a curva analítica obtida por regressão quadrática foi adotada para a lumefantrina, com fator de ponderação  $1/x$ . Empregando-se este modelo, além de menores desvios entre as concentrações experimentais e nominais terem sido obtidos, o gráfico de resíduos não demonstrou qualquer tendência com o aumento da concentração e o valor do coeficiente de correlação aumentou, nos três dias de análise. Os dados

obtidos na curva analítica de lumefantrina por regressão quadrática no primeiro dia estão demonstrados na Tabela 39.

**Tabela 39 – Dados obtidos para construção da curva analítica de lumefantrina, no primeiro dia de análise, pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Ponto	Conc. nominal (ng/ml)	Área de lumefantrina	Área do padrão interno	Resposta	Conc. experimental (ng/ml)	Desvio (%)
1.1	10	395,6	52895,4	0,007	8,7	-13,1
1.2	10	392,5	53511,8	0,007	8,4	-15,7
2.1	200	6942,3	55386,6	0,125	220,2	10,1
2.2	200	6948,3	54231,7	0,128	225,2	12,6
3.1	2000	65262,3	56022,7	1,165	2131,5	6,6
3.2	2000	64899,7	57338,4	1,132	2069,4	3,5
4.1	6000	184227,7	57584,7	3,199	6149,2	2,5
4.2	6000	179987,1	58668,4	3,068	5877,0	-2,0
5.1	10000	276582,9	57790,0	4,786	9606,3	-3,9
5.2	10000	284852,5	58968,4	4,831	9708,5	-2,9
6.1	14000	375802,8	56734,3	6,624	14104,4	0,7
6.2	14000	375330,8	57135,9	6,569	13960,5	-0,3
7.1	18000	461590,1	57726,2	7,996	17962,7	-0,2
7.2	18000	471725,7	57875,4	8,151	18433,4	2,4

As três curvas analíticas de lumefantrina, obtidas em dias consecutivos, atenderam aos critérios de aceitação preconizados, uma vez que todas apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,98, desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ e desvio menor ou igual 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva. As equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação de lumefantrina estão demonstrados na Tabela 40.

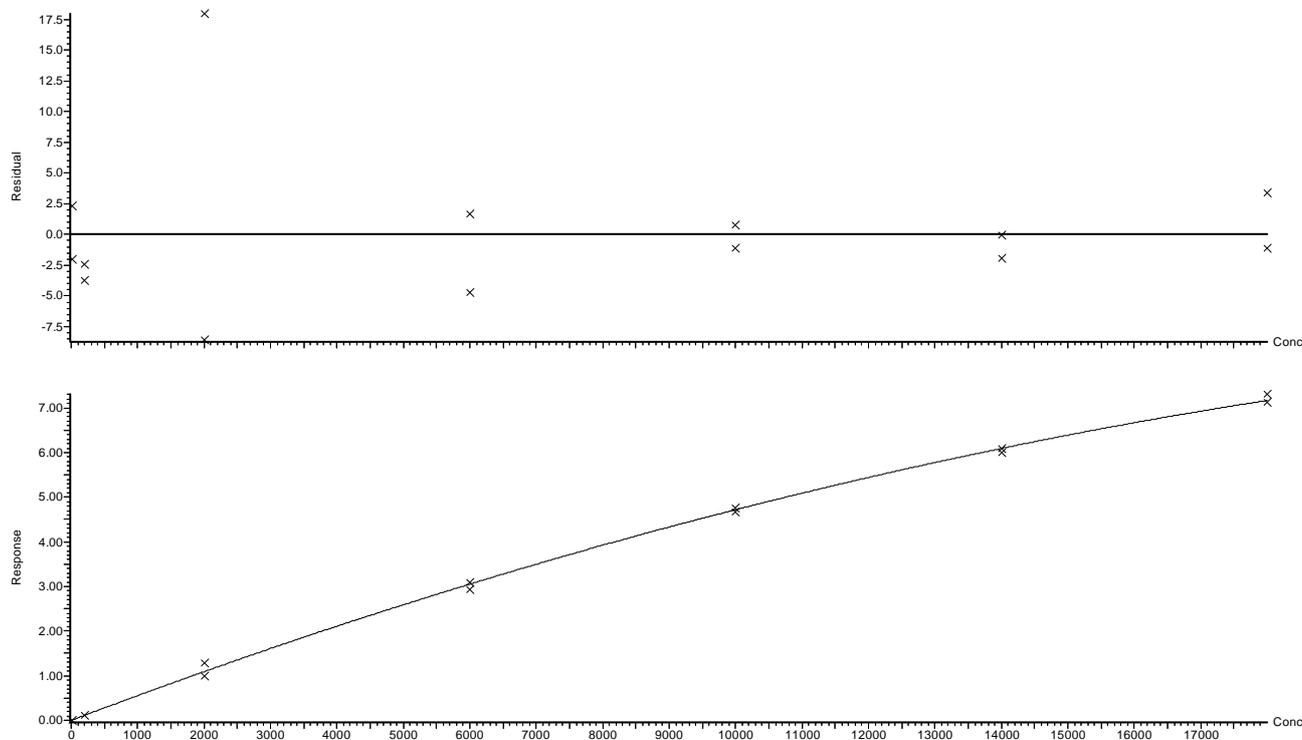
**Tabela 40 – Equações das retas e respectivos coeficientes de correlação obtidos para lumefantrina, na avaliação da linearidade do método bioanalítico.**

Dia	Equação da reta	Coefficiente de correlação
1	$Y = -9,2244e-009 X^2 + 0,000564 X + 0,000223$	0,99932
2	$Y = -9,0848e-009 X^2 + 0,000562 X + 0,001370$	0,99846
3	$Y = -8,0676e-009 X^2 + 0,000555 X + 0,000207$	0,99966

Na Figura 24 está representada a curva quadrática de lumefantrina e o gráfico de resíduos correspondente. Esta curva foi plotada com os mesmos dados de concentração e resposta demonstrados na Figura 23. Observa-se que os resíduos estão distribuídos de

forma aleatória no gráfico, demonstrando ausência de tendência e adequabilidade do modelo quadrático à curva de lumefantrina.

Compound name: Lumefantrina  
Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.998631$   
Calibration curve:  $-9.22442e-009 \cdot x^2 + 0.000564315 \cdot x + -0.000223114$   
Response type: Internal Std (Ref 3), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



**Figura 24 – Gráfico de resíduos e curva analítica de lumefantrina obtidos por regressão quadrática no primeiro dia de análise, na faixa de 10 a 18000 ng/ml.**

É interessante observar que a utilização apenas dos coeficientes de correlação ou determinação não é suficiente para avaliação precisa da linearidade do método. Em todas as curvas analíticas de lumefantrina obtidas por regressão linear, os valores destes coeficientes foram elevados (superiores a 0,98), apesar de haver uma nítida inadequação dos dados ao modelo, como demonstrado no gráfico de resíduos e desvios obtidos. Como exemplo, ROZET *et al.* (2007) propuseram quatro modelos estatísticos para avaliação da linearidade do método por LC-MS/MS para quantificação de loperamida em plasma (regressão linear, regressão linear com fator de ponderação  $1/x^2$ , regressão linear com transformação logarítmica e regressão quadrática). Os quatro modelos apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,99, entretanto, apenas a regressão linear ponderada forneceu valores de desvios baixos e resíduos aleatórios, sendo adequada para obtenção de resultados exatos.

Ainda segundo HUBERT *et al.* (2007), o coeficiente de determinação é um parâmetro apenas informativo para avaliação da qualidade dos resultados da linearidade. Os desvios entre as concentrações experimentais e teóricas da curva refletem a exatidão dos resultados e possibilitam avaliar de forma mais confiável a adequabilidade do modelo estatístico aos resultados obtidos.

### 2.1.3.3 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método bioanalítico foram avaliadas em três concentrações diferentes de artemeter e lumefantrina (CQB, CQM e CQA), em sextuplicata, em três dias consecutivos. Os valores obtidos nas análises intra-corrida e inter-corridas estão demonstrados nas Tabelas 41 e 42, respectivamente.

**Tabela 41 – Resultados da precisão e exatidão intra-corrida obtidos pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Replicata	Artemeter (ng/ml)			Lumefantrina (ng/ml)		
	30	400	800	30	7500	15000
1	29,32	401,61	808,02	34,69	7883,69	15733,87
2	30,59	390,89	811,10	32,63	7645,11	15459,55
3	29,22	397,64	808,54	31,67	7583,98	15427,33
4	27,70	376,03	817,36	31,78	7535,77	14996,62
5	28,41	386,90	780,85	30,48	7620,38	15703,86
6	29,59	406,78	808,44	30,29	7922,15	15812,00
Média (n=6)	29,14	393,31	805,72	31,92	7698,51	15522,21
DPR (%)	3,41	2,82	1,57	5,05	2,12	1,93
Exatidão (%)	97,13	98,33	100,71	106,41	102,65	103,48

De acordo com os resultados das Tabelas 41 e 42, observa-se que o método demonstrou ser preciso e exato para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina, uma vez que todos os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram inferiores a 15% e em todas as concentrações a exatidão se manteve dentro da faixa de 85% a 115%. Verifica-se, ainda, que a precisão do método variou de acordo com a concentração dos analitos, sendo que concentrações maiores apresentaram menor desvio padrão relativo para ambos os fármacos. A exatidão, por sua vez, se mostrou um parâmetro independente da concentração.

**Tabela 42 – Resultados da precisão e exatidão inter-corridas obtidos pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Dia	Replicata	Artemeter (ng/ml)			Lumefantrina (ng/ml)		
		30	400	800	30	7500	15000
1	1	29,32	401,61	808,02	34,69	7883,69	15733,87
	2	30,59	390,89	811,10	32,63	7645,11	15459,55
	3	29,22	397,64	808,54	31,67	7583,98	15427,33
	4	27,70	376,03	817,36	31,78	7535,77	14996,62
	5	28,41	386,90	780,85	30,48	7620,38	15703,86
	6	29,59	406,78	808,44	30,29	7922,15	15812,00
2	1	32,87	426,85	858,94	34,69	7146,14	15645,99
	2	32,45	403,93	828,47	31,03	7103,79	14923,46
	3	32,26	422,12	822,52	30,96	7182,04	15294,33
	4	33,37	420,53	819,38	28,65	6970,34	16046,36
	5	31,30	396,46	860,13	28,30	6674,45	15608,06
	6	33,01	403,34	832,54	28,82	7531,22	15497,15
3	1	31,13	400,80	819,73	33,44	7161,48	15356,29
	2	31,60	400,95	846,14	30,55	7640,90	15137,44
	3	31,66	381,33	795,77	29,84	7718,66	15059,35
	4	31,55	399,21	811,66	30,23	6766,77	14580,93
	5	31,11	394,53	819,73	30,72	6813,20	15063,87
	6	30,80	402,22	821,10	30,45	6883,57	15019,29
Média (n=18)		31,00	400,67	820,58	31,07	7321,31	15353,65
DPR (%)		5,18	3,28	2,42	5,93	5,46	2,44
Exatidão (%)		103,32	100,17	102,57	103,56	97,62	102,36

#### 2.1.3.4 Recuperação

A recuperação do método bioanalítico foi avaliada em três concentrações diferentes de artemeter e lumefantrina (CQB, CQM e CQA), em sextuplicata, por meio da comparação entre as áreas de soluções dos fármacos em fase móvel com aquelas obtidas com amostras plasmáticas submetidas ao processo de extração, nas mesmas concentrações. A recuperação do padrão interno (artesunato) também foi avaliada na concentração de trabalho utilizada (1000 ng/ml). Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 43.

**Tabela 43 – Resultados da recuperação do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Fármaco	Concentração (ng/ml)	Área média das amostras em fase móvel (n=6)	Área média das amostras extraídas (n=6)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
Artemeter	30	826,1	689,2	83,42	85,88
	400	9601,8	8207,5	85,48	
	800	19035,7	16892,3	88,74	
Lumefantrina	30	1154,9	939,7	81,37	82,11
	7500	120243,7	100047,4	83,20	
	15000	252389,1	206355,0	81,76	
Artesunato	1000	27263,3	23626,5	86,66	86,66

Foram obtidas porcentagens de recuperação superiores a 80% para todos os fármacos, demonstrando que o procedimento de extração por precipitação de proteínas empregado, apesar de ser consideravelmente simples e rápido, apresenta elevada eficiência de extração para todos os fármacos. Este parâmetro pode contribuir de forma direta para a sensibilidade do método bioanalítico, pois quando o método de extração é capaz de recuperar quantidades elevadas do fármaco, conseqüentemente as áreas dos picos são maiores, propiciando a obtenção de limites inferiores de quantificação menores.

#### 2.1.3.5 Efeito de matriz

A avaliação do efeito matriz foi realizada pela comparação das áreas dos picos dos analitos diluídos em fase móvel e diluídos no sobrenadante do plasma obtido após o processo de extração, segundo procedimento descrito por MATUSZEWSKI *et al.* (2003). Duas concentrações de artemeter e lumefantrina (CQB e CQA) e a concentração de trabalho de artesunato (1000 ng/ml) foram avaliadas, em amostras de plasma obtidas de seis voluntários diferentes. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 44. O desvio individual da área de cada amostra plasmática foi calculado em relação à área média da solução em fase móvel.

**Tabela 44 – Resultados do teste de efeito de matriz para o método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Amostra de plasma	Artemeter 30 ng/ml			Artemeter 800 ng/ml		
	Área média em fase móvel (n=6)	Área da solução em plasma	Desvio (%)	Área média em fase móvel (n=6)	Área da solução em plasma	Desvio (%)
1	1968,0	1983,8	0,80	47818,9	45821,6	-4,18
2		1972,8	0,24		49732,3	4,00
3		1949,5	-0,94		47223,3	-1,25
4		1938,5	-1,50		44154,0	-7,66
5		1872,5	-4,85		47481,0	-0,71
6		1963,4	-0,23		45575,1	-4,69
Amostra de plasma	Lumefantrina 30 ng/ml			Lumefantrina 15000 ng/ml		
	Área média em fase móvel (n=6)	Área da solução em plasma	Desvio (%)	Área média em fase móvel (n=6)	Área da solução em plasma	Desvio (%)
1	1330,6	1470,7	10,53	493702,9	500903,5	1,46
2		1392,3	4,64		500808,7	1,44
3		1346,3	1,18		503906,2	2,07
4		1385,7	4,14		488089,8	-1,14
5		1358,4	2,09		499343,4	1,14
6		1381,0	3,79		497225,8	0,71
Amostra de plasma	Artesunato 1000 ng/ml			Artesunato 1000 ng/ml		
	Área média em fase móvel (n=6)	Área da solução em plasma	Desvio (%)	Área média em fase móvel (n=6)	Área da solução em plasma	Desvio (%)
1	32077,1	31009,7	-3,33	32364,7	31917,3	-1,38
2		31867,0	-0,65		31938,8	-1,32
3		31093,1	-3,07		31634,5	-2,26
4		31177,5	-2,80		31406,8	-2,96
5		31646,9	-1,34		31419,4	-2,92
6		31746,9	-1,03		31643,0	-2,23

Os resultados obtidos demonstram que não houve efeito de matriz significativo para nenhum dos fármacos analisados, uma vez que todos os desvios obtidos ficaram dentro da faixa de  $\pm 15\%$ . Valores negativos de desvio indicam supressão de ionização, enquanto valores positivos indicam indução de ionização.

Na concentração baixa de lumefantrina (30 ng/ml), observa-se que todos os valores de desvio foram positivos, indicando ainda uma leve indução de ionização, mesmo após todos os procedimentos para eliminação do efeito de matriz realizados na etapa de

desenvolvimento e otimização do método. Entretanto, como todos os valores foram inferiores a 15%, considera-se que a indução de ionização não é significativa nos resultados finais do método.

É importante que esta avaliação do efeito de matriz seja realizada com amostras de plasma provenientes de diferentes voluntários, uma vez que os compostos endógenos responsáveis pela supressão ou indução de ionização podem ser suscetíveis à variação interindividual. Desta forma, pode-se verificar efeitos de matriz distintos, em amostras plasmáticas provenientes de voluntários diferentes.

Apesar do teste de efeito de matriz não ser preconizado pelos guias de validação atualmente disponíveis, sua avaliação é imprescindível para garantir a confiabilidade de métodos bioanalíticos por LC-MS/MS, principalmente quando eletrospray é utilizado como fonte de ionização. A precisão da determinação da recuperação do método, por exemplo, é um fator que depende diretamente da ausência de efeito de matriz. Por exemplo, a obtenção de baixas taxas de recuperação pode ser devido ao efeito de supressão de ionização pelo plasma, ao invés de estar relacionada com a baixa eficiência de extração do método. Por outro lado, deve-se investigar se elevadas taxas de recuperação não estão relacionadas à indução de ionização pela matriz biológica. Estes efeitos não podem ser ignorados, pois como mencionado anteriormente, a variabilidade interindividual pode ter um impacto significativo na extensão na qual os efeitos de matriz ocorrem.

#### 2.1.3.6 Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação do método foi confirmado por meio da análise em sextuplicata, em três dias consecutivos, de amostras plasmáticas contendo artemeter e lumefantrina e avaliação da relação sinal/ruído nos cromatogramas. A concentração de 10 ng/ml para ambos os fármacos apresentou resultados satisfatórios de precisão e exatidão, conforme demonstrado na Tabela 45.

**Tabela 45 – Resultados da precisão e exatidão para o limite inferior de quantificação obtidos pelo método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Parâmetro	Artemeter 10 ng/ml	Lumefantrina 10 ng/ml
Precisão intra-corrída (n=6) – DPR (%)	6,25	6,17
Precisão inter-corrídas (n=18) – DPR (%)	10,42	12,82
Exatidão intra-corrída (n=6)	88,25	85,43
Exatidão inter-corrídas (n=18)	100,42	93,38

Todos os valores de desvio padrão relativo foram inferiores a 20% e a exatidão se manteve dentro da faixa de 80% a 120%, demonstrando que a concentração de 10 ng/ml pode ser considerada seguramente como o limite inferior de quantificação do método.

Além disso, a relação sinal/ruído nos cromatogramas obtidos nesta concentração também foi avaliada. Os cromatogramas de artemeter e lumefantrina a 10 ng/ml estão demonstrados na Figura 21. Nesta concentração, as relações sinal/ruído obtidas para artemeter e lumefantrina foram 28 e 37, respectivamente, valores consideravelmente superiores ao mínimo preconizado (5), também demonstrando que a concentração de 10 ng/ml pode ser estabelecida com segurança como o limite inferior de quantificação para ambos os fármacos.

### **2.1.3.7 Estabilidade**

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e das condições de armazenamento empregadas. A avaliação da estabilidade dos fármacos na matriz biológica deve ser realizada após a validação dos parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, seletividade e limite de quantificação. Esta avaliação é necessária para se conhecer a estabilidade das amostras em questão e determinar o tempo no qual as mesmas se mantêm inalteradas nas condições utilizadas no método e na rotina do laboratório. Desta forma, todas as amostras plasmáticas devem ser analisadas dentro do período de tempo no qual foi comprovada sua estabilidade. A constatação de que as amostras plasmáticas apresentam estabilidade relativamente baixa em determinada condição não invalida o método, desde que todas as amostras sejam analisadas dentro do tempo no qual se verificou que as mesmas se mantiveram estáveis.

Em todas as avaliações de estabilidade, duas concentrações de artemeter e lumefantrina (CQB e CQA) foram analisadas em sextuplicata e as concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras recém-preparadas. Variações inferiores a 15% indicam que não há diferença significativa entre as concentrações das amostras recém-preparadas e amostras de estabilidade. Além disso, a precisão e exatidão da análise devem ser comprovadas pela obtenção de valores de desvio padrão relativo inferiores a 15% e exatidão dentro da faixa de 85% a 115%.

### 2.1.3.7.1 Estabilidade de curta duração (ECD)

A estabilidade de curta duração foi avaliada por um período de 6 horas. Durante este tempo, as amostras de plasma contendo os fármacos permaneceram a temperatura ambiente, sendo em seguida submetidas ao processo de extração. As concentrações foram comparadas com aquelas obtidas de amostras plasmáticas recém-preparadas, conforme demonstrado na Tabela 46, e verificou-se que não houve diferença significativa entre as mesmas, uma vez que a variação foi inferior a 15% para as duas concentrações de ambos os fármacos. Os valores de precisão e exatidão se mantiveram dentro da faixa preconizada.

**Tabela 46 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de curta duração (6 h) do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Parâmetros	Artemeter 30 ng/ml		Artemeter 800 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra ECD	Amostra recente	Amostra ECD
Conc. média (ng/ml) (n=6)	30,20	33,34	821,23	789,10
DPR (%)	2,67	6,35	2,72	1,90
Exatidão (%)	100,67	111,12	102,65	98,64
Variação (%)	10,37		-3,91	
Parâmetros	Lumefantrina 30 ng/ml		Lumefantrina 15000 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra ECD	Amostra recente	Amostra ECD
Conc. média (ng/ml) (n=6)	30,76	31,87	14857,09	14289,69
DPR (%)	7,26	6,53	6,12	8,63
Exatidão (%)	102,52	106,22	99,05	95,26
Variação (%)	3,60		-3,82	

### 2.1.3.7.2 Estabilidade de longa duração (ELD)

A estabilidade de longa duração foi avaliada em amostras plasmáticas armazenadas em freezer a -70 °C, que foram descongeladas e analisadas após 1, 2 e 3 meses de preparo. As concentrações determinadas e comparadas com aquelas de amostras recém-preparadas estão demonstradas na Tabela 47. Como não foi verificada diferença significativa entre as amostras plasmáticas armazenadas por até 3 meses em freezer a -70 °C, pode-se inferir que os fármacos se mantêm estáveis no plasma durante este período, na temperatura avaliada.

**Tabela 47 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de longa duração do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

<b>1 MÊS</b>				
<b>Parâmetros</b>	<b>Artemeter 30 ng/ml</b>		<b>Artemeter 800 ng/ml</b>	
	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>
Conc. média (ng/ml) (n=6)	28,94	27,46	779,21	750,56
DPR (%)	2,52	0,49	4,38	1,87
Exatidão (%)	96,48	91,52	97,40	93,82
Variação (%)	-5,14		-3,68	
<b>Parâmetros</b>	<b>Lumefantrina 30 ng/ml</b>		<b>Lumefantrina 15000 ng/ml</b>	
	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>
Conc. média (ng/ml) (n=6)	29,72	34,09	15022,07	15059,13
DPR (%)	8,59	3,34	3,47	3,40
Exatidão (%)	99,08	113,62	100,15	100,39
Variação (%)	14,67		0,25	
<b>2 MESES</b>				
<b>Parâmetros</b>	<b>Artemeter 30 ng/ml</b>		<b>Artemeter 800 ng/ml</b>	
	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>
Conc. média (ng/ml) (n=6)	28,18	29,91	792,53	774,00
DPR (%)	2,99	2,26	1,12	2,42
Exatidão (%)	93,93	99,70	99,07	96,75
Variação (%)	6,15		-2,34	
<b>Parâmetros</b>	<b>Lumefantrina 30 ng/ml</b>		<b>Lumefantrina 15000 ng/ml</b>	
	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>
Conc. média (ng/ml) (n=6)	26,97	27,11	14303,17	16123,04
DPR (%)	4,28	3,57	1,82	2,11
Exatidão (%)	89,88	90,37	95,35	107,49
Variação (%)	0,54		12,72	
<b>3 MESES</b>				
<b>Parâmetros</b>	<b>Artemeter 30 ng/ml</b>		<b>Artemeter 800 ng/ml</b>	
	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>
Conc. média (ng/ml) (n=6)	29,26	30,84	796,89	765,79
DPR (%)	5,24	3,27	2,06	3,82
Exatidão (%)	97,54	102,79	99,61	95,72
Variação (%)	5,38		-3,90	
<b>Parâmetros</b>	<b>Lumefantrina 30 ng/ml</b>		<b>Lumefantrina 15000 ng/ml</b>	
	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>	<b>Amostra recente</b>	<b>Amostra ELD</b>
Conc. média (ng/ml) (n=6)	29,67	27,03	13919,85	13910,59
DPR (%)	3,22	2,58	2,45	1,95
Exatidão (%)	98,91	90,10	92,80	92,74
Variação (%)	-8,91		-0,07	

### 2.1.3.7.3 Estabilidade pós-processamento (EPP)

A avaliação da estabilidade pós-processamento foi realizada mantendo-se amostras extraídas na bandeja do injetor automático, a 4 °C, por um período de 10 horas. A estabilidade do padrão interno também foi avaliada, comparando-se as áreas das amostras obtidas na avaliação da estabilidade com aquelas de amostras recentemente injetadas. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 48, observa-se que os fármacos, assim como o padrão interno, se mantiveram estáveis no injetor automático no intervalo de tempo avaliado (10 h).

**Tabela 48 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade pós-processamento (10 h) do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Parâmetros	Artemeter 30 ng/ml		Artemeter 800 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra EPP	Amostra recente	Amostra EPP
Conc. média (ng/ml) (n=6)	30,68	30,15	820,67	792,07
DPR (%)	3,16	1,73	2,02	2,60
Exatidão (%)	102,25	100,50	102,58	99,01
Variação (%)	-1,71		-3,48	
Parâmetros	Lumefantrina 30 ng/ml		Lumefantrina 15000 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra EPP	Amostra recente	Amostra EPP
Conc. média (ng/ml) (n=6)	28,24	31,27	15326,20	15589,08
DPR (%)	7,31	7,55	4,11	1,49
Exatidão (%)	94,14	104,22	102,17	103,93
Variação (%)	10,70		1,72	
Parâmetros	Artesunato (1000 ng/ml)			
	Amostra recente		Amostra EPP	
Área média (n=12)	57800,51		55913,97	
DPR (%)	2,54		3,72	
Variação (%)	-3,26			

Na primeira avaliação da estabilidade pós-processamento, devido a um problema no equipamento, a sequência de injeção foi interrompida durante a noite, de forma que a maior parte das amostras não foi injetada. Assim, todas as amostras foram reinjetadas no dia seguinte, porém, devido ao imprevisto, as amostras da estabilidade pós-processamento permaneceram na bandeja do injetor automático por 22 horas antes da injeção. Constatou-se que, para estas amostras, a variação foi superior a 15% em relação a amostras recém-injetadas, uma vez que a área do padrão interno diminuiu de forma significativa nas amostras da estabilidade. Provavelmente, a estabilidade de artesunato

no meio ácido do sobrenadante (ácido acético 0,5% em metanol) é limitada, de forma que ocorreu degradação significativa deste fármaco durante as 22 horas nas quais as amostras permaneceram no injetor automático. Como a determinação das concentrações plasmáticas de artemeter e lumefantrina depende da área do padrão interno, foi verificada diferença superior a 15% para estes fármacos. Conseqüentemente, as amostras plasmáticas não apresentam estabilidade pós-processamento durante 22 horas e todas devem ser injetadas em até 10 horas após a extração, período no qual se comprovou a estabilidade.

Esta constatação é importante quando se considera a dinâmica da execução das análises pelo método desenvolvido, pois o procedimento de extração é consideravelmente rápido, enquanto a corrida cromatográfica é mais demorada. Assim, se a extração de todas as amostras da sequência for realizada no início do dia, provavelmente as últimas amostras extraídas serão injetadas apenas no período da noite, permanecendo na bandeja do injetor automático por um tempo elevado. Este fator deve ser considerado na execução da análise, de forma a garantir que o tempo entre a extração e a injeção de todas as amostras seja inferior a 10 horas.

#### 2.1.3.7.4 Estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento (ECCD)

Amostras plasmáticas contendo os fármacos foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento e analisadas ao final do terceiro ciclo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 49. Foi verificado que os processos de congelamento e descongelamento não causaram degradação dos fármacos no plasma, por até três ciclos, conforme indicado pelas taxas de variação obtidas entre as amostras recém-preparadas e aquelas do estudo de estabilidade.

**Tabela 49 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento/descongelamento do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Parâmetros	Artemeter 30 ng/ml		Artemeter 800 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra ECCD	Amostra recente	Amostra ECCD
Conc. média (ng/ml) (n=6)	32,42	34,07	838,66	837,03
DPR (%)	4,20	1,64	1,83	9,94
Exatidão (%)	108,07	113,57	104,83	104,63
Variação (%)		5,09		-0,19

**Tabela 49 (Continuação)**

Parâmetros	Lumefantrina 30 ng/ml		Lumefantrina 15000 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra ECCD	Amostra recente	Amostra ECCD
Conc. média (ng/ml) (n=6)	33,22	32,63	15497,54	15108,54
DPR (%)	13,32	6,77	2,28	14,59
Exatidão (%)	110,73	108,76	103,32	100,72
Variação (%)		-1,78		-2,51

### 2.1.3.7.5 Estabilidade de solução padrão (ESP)

Para avaliação da estabilidade de solução padrão, soluções estoque dos fármacos em metanol:água (1:1) foram preparadas e armazenadas em geladeira por 6 horas, sendo em seguida feita a adição dos fármacos em plasma com estas soluções. As concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras nas quais as soluções padrão foram preparadas e imediatamente adicionadas em plasma (Tabela 50). Os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre estas amostras, de forma que o armazenamento das soluções padrão em geladeira por até 6 horas não altera a estabilidade de artemeter e lumefantrina.

**Tabela 50 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade de solução padrão do método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Parâmetros	Artemeter 30 ng/ml		Artemeter 800 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra ESP	Amostra recente	Amostra ESP
Conc. média (ng/ml) (n=6)	30,12	30,20	832,56	821,23
DPR (%)	3,81	2,67	4,05	2,72
Exatidão (%)	100,41	100,67	104,07	102,65
Variação (%)		0,26		-1,36
Parâmetros	Lumefantrina 30 ng/ml		Lumefantrina 15000 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra ESP	Amostra recente	Amostra ESP
Conc. média (ng/ml) (n=6)	28,24	32,29	15714,82	14857,09
DPR (%)	7,31	8,35	4,45	6,12
Exatidão (%)	94,14	107,62	104,77	99,05
Variação (%)		14,32		-5,46

Além disso, a estabilidade de artesunato em plasma também foi avaliada, por meio da adição de 50 µl da solução de padrão interno a 250 µl do plasma contendo os fármacos e permanência destas amostras a temperatura ambiente por 6 horas. Após

extração e análise, as concentrações plasmáticas de artemeter e lumefantrina obtidas foram comparadas com aquelas de amostras plasmáticas recém-preparadas (Tabela 51). Não foi verificada redução na área do padrão interno nas amostras de estabilidade. Para ambos os fármacos, as variações foram inferiores a 15%, demonstrando que não houve degradação do padrão interno no plasma, por até 6 horas, em temperatura ambiente.

**Tabela 51 – Resultados obtidos na avaliação da estabilidade do padrão interno em plasma no método bioanalítico para quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina.**

Parâmetros	Artemeter 30 ng/ml		Artemeter 800 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra ESP	Amostra recente	Amostra ESP
Conc. média (ng/ml) (n=6)	30,12	32,87	832,56	795,57
DPR (%)	3,81	10,80	4,05	6,81
Exatidão (%)	100,41	109,57	104,07	99,45
Variação (%)	9,12		-4,44	
Parâmetros	Lumefantrina 30 ng/ml		Lumefantrina 15000 ng/ml	
	Amostra recente	Amostra ESP	Amostra recente	Amostra ESP
Conc. média (ng/ml) (n=6)	28,24	30,27	15714,82	16062,08
DPR (%)	7,31	7,76	4,45	5,89
Exatidão (%)	94,14	100,89	104,77	107,08
Variação (%)	7,17		2,21	

Após avaliação de todos os tipos de estabilidade preconizados empregando-se o método desenvolvido, verificou-se que as amostras de plasma contendo os fármacos são estáveis por até 6 horas a temperatura ambiente, por 3 meses em freezer a -70 °C, por 10 horas no injetor automático após extração, e após três ciclos de congelamento/descongelamento. As soluções padrão estoque são estáveis por até 6 horas em geladeira e o padrão interno é estável no plasma por 6 horas a temperatura ambiente. A análise geral dos resultados obtidos demonstra estabilidade considerável de artemeter, lumefantrina e artesunato nas amostras plasmáticas e garantem um período de tempo adequado à realização da análise das amostras pelo método desenvolvido, na rotina do laboratório.

## 2.1.4 Avaliação da farmacocinética de artemeter e lumefantrina administrados em comprimidos de dose fixa combinada

### 2.1.4.1 Análise físico-química dos comprimidos utilizados no estudo

Os comprimidos de Coartem<sup>®</sup> utilizados no estudo, contendo 20 mg de artemeter e 120 mg de lumefantrina, foram previamente submetidos às análises físico-químicas para o controle de qualidade do medicamento. Os resultados destas análises estão demonstrados na Tabela 52.

**Tabela 52 - Resultados das análises físico-químicas dos comprimidos de Coartem<sup>®</sup> utilizados no estudo de farmacocinética.**

Teste	Especificação	Resultado
Forma farmacêutica	Comprimido	De acordo
Cor	-	Amarela
Peso médio	-	240,72 mg
Dureza	No mínimo 3 kgf	7,80 kgf
Friabilidade	No máximo 1,5%	0,15%
Desintegração	No máximo 30 min	5 min
Determinação de peso	± 7,5%	-0,88% a +2,16%
Uniformidade de conteúdo	85 a 115%; DPR ≤ 6,0%	Artemeter: 95,14% a 100,07%; DPR = 1,93% Lumefantrina: 96,54% a 101,05%; DPR = 1,39%
Identificação (CLAE)	Artemeter/Lumefantrina	Positivo
Teor (CLAE)	Artemeter: 20 mg/comp ou 90,0 a 110,0% VR Lumefantrina: 120 mg/comp ou 90,0 a 110,0% VR	Artemeter: 19,67 mg/comp ou 98,33% VR Lumefantrina: 119,96 mg/comp ou 99,96% VR
Resultado	<b>APROVADO</b>	

As especificações utilizadas para os testes foram aquelas preconizadas na Farmacopéia Brasileira 4<sup>a</sup> edição e o método por CLAE para identificação e doseamento foi desenvolvido anteriormente no presente trabalho. O medicamento cumpriu com as

especificações de todos os testes e os teores médios de artemeter e lumefantrina nos comprimidos foram 98,33% e 99,96% do valor rotulado, respectivamente.

A realização das análises físico-químicas anteriormente ao estudo farmacocinético, assim como a realização do estudo de equivalência farmacêutica antes do estudo de bioequivalência, é de extrema importância para garantir a qualidade do medicamento que será administrado aos voluntários. Por razões de caráter ético, não é apropriado submeter voluntários sadios que não necessitam de tratamento ou pacientes que já se encontram debilitados à administração de medicamentos que não apresentam qualidade comprovada.

#### 2.1.4.2 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos de artemeter e lumefantrina

Os seis voluntários participantes do estudo cumpriram com todos os critérios recomendados pela Resolução nº 1170 da ANVISA (BRASIL, 2006a) e passaram por todos os exames médico-laboratoriais exigidos, comprovando bom estado geral de saúde. Os dados sobre sexo, idade e índice de massa corporal (IMC) dos voluntários estão demonstrados na Tabela 53.

**Tabela 53 - Dados sobre sexo, idade e índice de massa corporal (IMC) dos voluntários participantes do estudo de farmacocinética de artemeter e lumefantrina.**

Voluntário	Sexo	Idade	Peso (kg)	Altura (m)	IMC
1	Feminino	21	60	1,67	21,5
2	Feminino	40	52	1,58	20,8
3	Feminino	27	60	1,59	23,7
4	Masculino	28	72	1,67	25,8
5	Masculino	25	73	1,80	22,5
6	Masculino	31	56	1,65	20,6

Os voluntários foram internados na noite anterior ao início do estudo. Às 7:00 horas da manhã seguinte, receberam quatro comprimidos de Coartem<sup>®</sup> com 200 ml de leite integral. As coletas de sangue foram realizadas nos tempos previamente estabelecidos no protocolo. Uma voluntária se queixou de cefaléia associada a náusea cerca de uma hora e dez minutos após a administração do medicamento. Ela foi examinada e orientada pela enfermeira plantonista. Não houve necessidade de administrar qualquer medicamento para conter os efeitos adversos relatados e a ocorrência foi registrada na ficha de

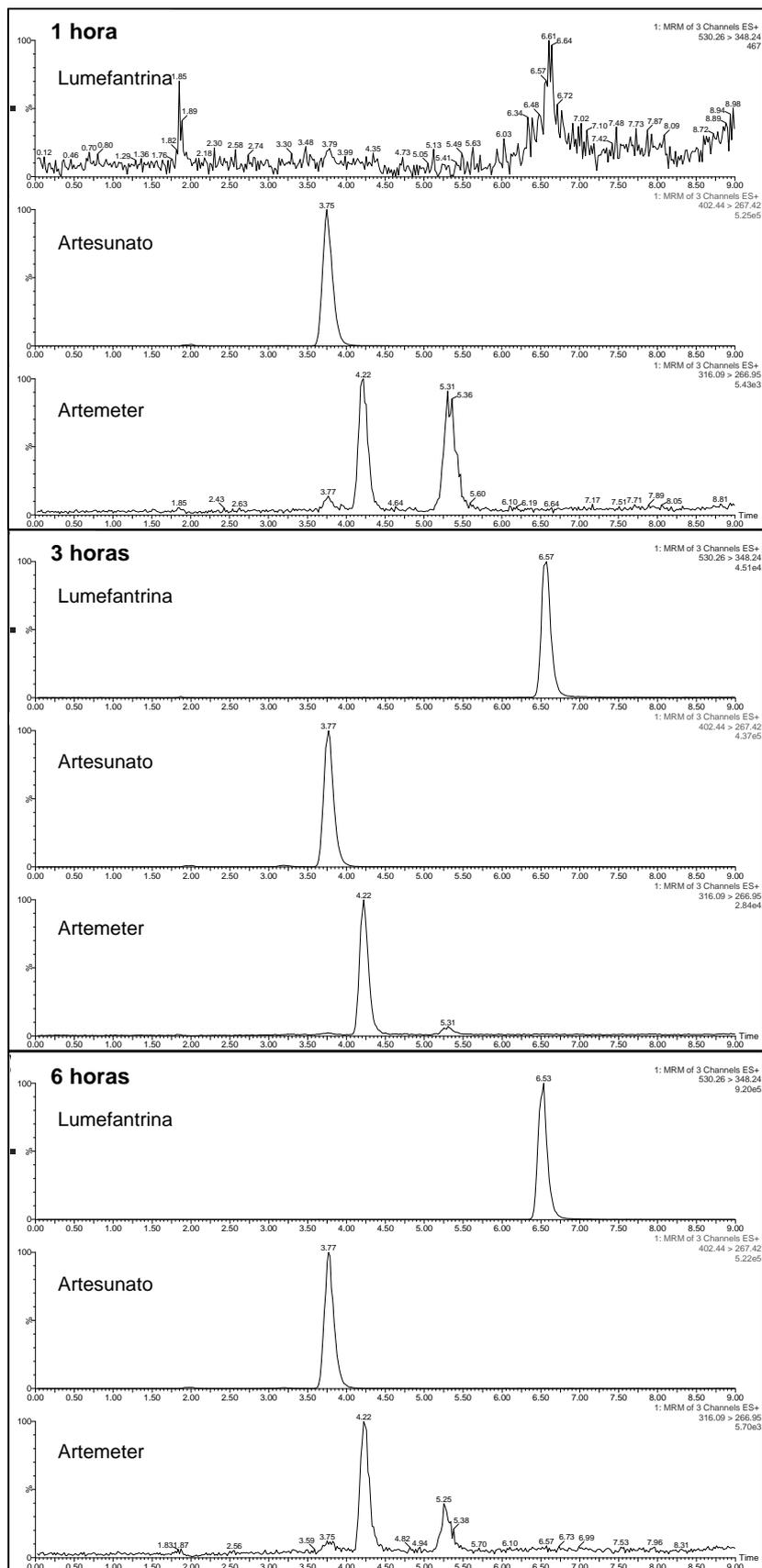
acompanhamento da voluntária. Não foram verificadas alterações na pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura corporal de nenhum voluntário durante o tempo em que permaneceram internados.

Durante o estudo, foram realizadas 22 coletas de sangue por voluntário, em 11 dias. As amostras de sangue foram centrifugadas, o plasma obtido foi fracionado em duas alíquotas e congelado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A primeira alíquota foi enviada acondicionada em gelo seco ao Laboratório de Bioequivalência do CEDAFAR em Belo Horizonte, enquanto a segunda foi mantida na Unidade Clínica do ICF em Aparecida de Goiânia.

A quantificação simultânea de artemeter e lumefantrina nas amostras de plasma dos voluntários foi realizada pelo método bioanalítico previamente desenvolvido e validado. Em cada sequência analítica, uma curva de calibração com os padrões de referência foi construída e amostras de controle de qualidade nas três concentrações (CQB, CQM e CQA) foram analisadas em triplicata, intercaladas com as amostras dos voluntários. De acordo com a Resolução RE n°899 da ANVISA (BRASIL, 2003), no mínimo 67% (quatro de seis) das amostras de controle de qualidade devem estar dentro de  $\pm 15\%$  dos seus valores nominais para que a corrida analítica seja aceita. Este critério foi atendido em todos os dias de análise.

Cromatogramas obtidos para o voluntário 1, após 1, 3 e 6 horas de administração do medicamento, estão representados na Figura 25. É importante ressaltar que as escalas dos cromatogramas não estão uniformizadas. Observa-se que uma hora após a administração do medicamento, a absorção de lumefantrina ainda não foi iniciada, de forma que apenas o ruído de linha de base é visualizado no cromatograma. Em três horas, o pico deste fármaco já é bastante intenso e atinge áreas mais elevadas em 6 horas. A absorção de artemeter inicia-se rapidamente, de forma que uma hora após a administração já é possível visualizar pico do fármaco no cromatograma. Em três horas, o pico de artemeter é intenso, começando a decair em seguida, e sua área em seis horas já é consideravelmente baixa. A intensidade do pico do padrão interno (artesunato) é constante ao longo do tempo.

As concentrações plasmáticas de lumefantrina e artemeter determinadas em cada tempo de coleta, para os seis voluntários, estão representadas nas Tabelas 54 e 55.



**Figura 25 – Cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS para amostras de plasmas do voluntário 1, após 1, 3 e 6 horas de administração oral de 80 mg de artemeter e 480 mg de lumefantrina.**

**Tabela 54 – Concentrações plasmáticas individuais de lumefantrina (LMF) obtidas após administração de quatro comprimidos de Coartem® (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em seis voluntários sadios.**

Tempo (h)	Concentração plasmática de LMF (ng/ml) por voluntário					
	1	2	3	4	5	6
0,00	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
0,25	NQ	51,201	NQ	NQ	NQ	NQ
0,50	NQ	53,957	NQ	NQ	NQ	NQ
0,75	26,453	57,613	NQ	NQ	NQ	NQ
1,00	26,649	56,723	NQ	NQ	NQ	NQ
1,50	26,846	55,804	10,662	10,002	NQ	NQ
2,00	31,445	53,428	18,248	45,575	17,946	10,724
3,00	77,883	47,935	224,253	588,290	77,032	50,784
4,00	357,736	146,501	547,061	1384,513	214,285	115,435
5,00	2009,999	258,094	2412,906	2761,659	829,594	416,778
6,00	2589,965	1607,352	2635,930	3359,627	897,471	402,754
8,00	2200,649	7118,711	2195,732	2855,186	611,867	307,725
10,0	1645,527	13724,75	1868,547	2360,061	438,429	237,558
12,0	1171,915	12111,97	1456,089	1830,420	376,538	199,452
24,0	494,998	4357,364	513,163	1407,872	165,745	99,208
36,0	271,986	1972,868	334,131	478,039	98,704	56,727
48,0	181,631	1169,807	208,721	390,361	66,050	40,681
72,0	119,553	601,894	123,665	247,072	38,437	24,712
120,0	63,489	352,441	59,527	114,427	23,057	14,357
168,0	39,170	248,579	37,913	69,481	14,950	10,256
216,0	32,068	171,642	24,222	45,486	10,110	NQ
264,0	30,420	122,321	14,833	31,582	10,766	NQ

NQ = valores de concentração plasmática inferiores ao limite de quantificação.

**Tabela 55 – Concentrações plasmáticas individuais de artemeter (ATM) obtidas após administração de quatro comprimidos de Coartem® (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em seis voluntários sadios.**

Tempo (h)	Concentração plasmática de ATM (ng/ml) por voluntário					
	1	2	3	4	5	6
0,00	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
0,25	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
0,50	21,223	NQ	NQ	NQ	NQ	11,220
0,75	32,106	NQ	10,154	10,686	11,463	14,696
1,00	45,820	NQ	10,344	12,212	13,709	60,091
1,50	80,016	NQ	10,051	15,923	12,484	49,996
2,00	66,118	NQ	38,609	51,799	21,194	40,278
3,00	64,777	NQ	73,787	46,229	19,994	24,366
4,00	36,613	NQ	32,352	24,452	13,967	16,809
5,00	22,537	22,741	13,606	14,662	11,117	10,349
6,00	12,016	24,472	10,580	10,061	NQ	NQ
8,00	NQ	NQ	10,283	NQ	NQ	NQ
10,0 - 264,0	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ

NQ = valores de concentração plasmática inferiores ao limite de quantificação.

Conforme observado nas Tabelas 54 e 55, um comportamento farmacocinético discrepante foi verificado para o voluntário 2. Enquanto artemeter foi quantificado no plasma do voluntário em apenas dois pontos de coleta, as concentrações plasmáticas de lumefantrina atingiram níveis consideravelmente elevados, comparados àqueles dos outros cinco voluntários. Segundo WHITE *et al.* (1999), ambos os fármacos são metabolizados pelo sistema do citocromo P450, entretanto, não há interação farmacocinética quando os fármacos são administrados em associação comparando-se à administração isolada dos mesmos. Estudos mais aprofundados seriam necessários para investigar o comportamento discrepante do voluntário 2 frente aos outros, como por exemplo, a verificação de diferenças genóticas dos indivíduos relacionadas à metabolização dos fármacos no organismo.

Para a realização das análises estatísticas dos dados, o voluntário 2 foi excluído do estudo, tendo em vista não seria possível construir a curva de concentração plasmática de artemeter, já que apenas dois pontos foram quantificáveis. Além disso, as concentrações plasmáticas discrepantes de lumefantrina aumentariam de forma considerável o erro padrão das medidas farmacocinéticas. Assim, foi realizada análise estatística dos dados obtidos para os cinco voluntários do estudo. As concentrações

plasmáticas médias, mínimas e máximas e os respectivos erros padrão obtidos para lumefantrina e artemeter estão representados nas Tabelas 56 e 57.

A partir dos valores médios obtidos, curvas de concentração plasmática em função do tempo foram plotadas para cada fármaco (Figuras 26 e 27).

**Tabela 56 – Análises das concentrações plasmáticas de lumefantrina (LMF) ao longo do tempo, após administração de quatro comprimidos de Coartem® (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em cinco voluntários sadios.**

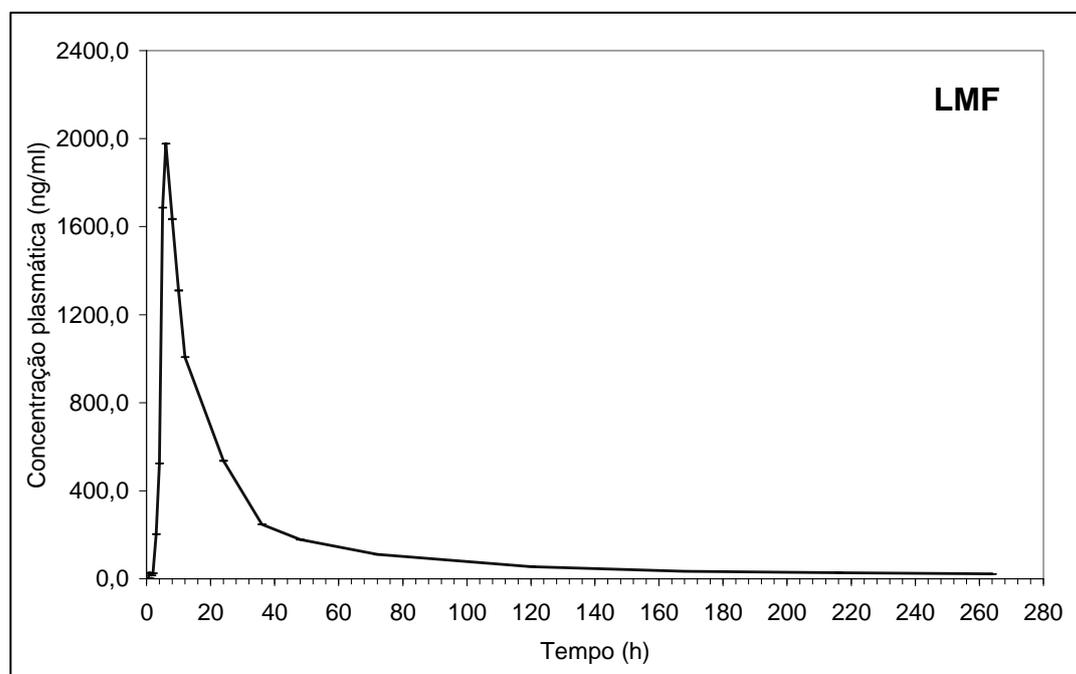
Tempo (h)	Concentração plasmática média (ng/ml)	Erro padrão	Concentração plasmática mínima (ng/ml)	Concentração plasmática máxima (ng/ml)
0,00	0,000	0,000	0,000	0,000
0,25	0,000	0,000	0,000	0,000
0,50	0,000	0,000	0,000	0,000
0,75*	26,453	0,000	26,453	26,453
1,00*	26,649	0,000	26,649	26,649
1,50	15,837	1,836	10,002	26,846
2,00	24,788	2,659	10,724	45,575
3,00	203,648	43,418	50,784	588,290
4,00	523,806	97,729	115,435	1384,513
5,00	1686,187	195,665	416,778	2761,659
6,00	1977,149	242,770	402,754	3359,627
8,00	1634,232	213,691	307,725	2855,186
10,0	1310,024	178,392	237,558	2360,061
12,0	1006,883	134,595	199,452	1830,420
24,0	536,197	100,473	99,208	1407,872
36,0	247,917	33,304	56,727	478,039
48,0	177,489	26,778	40,681	390,361
72,0	110,688	17,067	24,712	247,072
120	54,971	7,635	14,357	114,427
168	34,354	4,541	10,256	69,481
216	27,972	2,847	10,110	45,486
264	21,900	2,050	10,766	31,582

\*Resultados baseados em apenas uma observação.

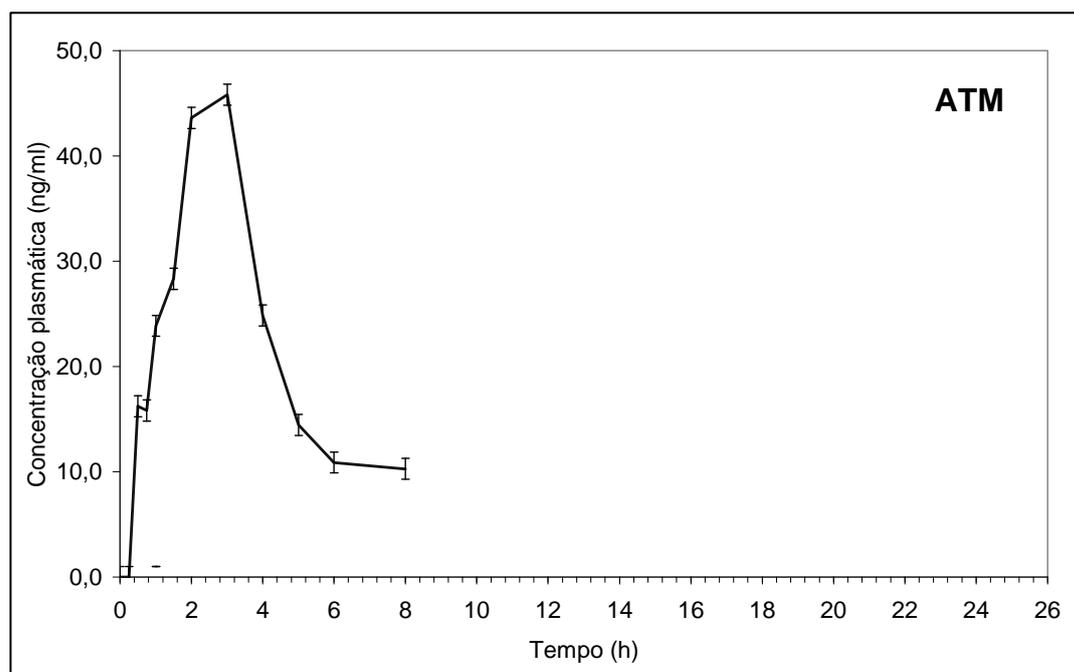
**Tabela 57 – Análises das concentrações plasmáticas de artemeter (ATM) ao longo do tempo, após administração de quatro comprimidos de Coartem® (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em cinco voluntários sadios.**

Tempo (h)	Concentração plasmática média (ng/ml)	Erro padrão	Concentração plasmática mínima (ng/ml)	Concentração plasmática máxima (ng/ml)
0,00	0,000	0,000	0,000	0,000
0,25	0,000	0,000	0,000	0,000
0,50	16,222	1,361	11,220	21,223
0,75	15,821	1,785	10,154	32,106
1,00	23,863	4,422	10,344	60,091
1,50	28,328	5,882	10,051	80,016
2,00	43,600	3,209	21,194	66,118
3,00	45,831	4,584	19,994	73,787
4,00	24,839	1,871	13,967	36,613
5,00	14,454	0,933	10,349	22,537
6,00	10,886	0,195	10,061	12,016
8,00*	10,283	0,000	10,283	10,283
10,0 - 264	0,000	0,000	0,000	0,000

\*Resultado baseado em apenas uma observação.



**Figura 26 – Curva de concentração plasmática média versus tempo de lumefantrina (LMF) obtida após administração de quatro comprimidos de Coartem® (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em voluntários sadios.**



**Figura 27** – Curva de concentração plasmática média versus tempo de artemeter (ATM) obtida após administração de quatro comprimidos de Coartem® (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em voluntários sadios.

Os parâmetros farmacocinéticos concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), tempo máximo ( $T_{m\acute{a}x}$ ), área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta ( $ASC_{0-t}$ ), área sob a curva do tempo zero ao infinito ( $ASC_{0-\infty}$ ), meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e constante de eliminação ( $K_e$ ) foram determinados para artemeter e lumefantrina (Tabela 58).

**Tabela 58** - Parâmetros farmacocinéticos de artemeter e lumefantrina obtidos após administração de quatro comprimidos de Coartem® (80 mg de artemeter + 480 mg de lumefantrina) em voluntários sadios.

Parâmetros farmacocinéticos	Artemeter	Lumefantrina
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	57,38 (21,19 – 80,02)	1979,95 (416,78 – 3359,63)
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	1,90 (1,00 – 3,00)	5,80 (5,00 – 6,00)
$ASC_{0-t}$ (ng.h/ml)	156,20 (69,66 – 250,05)	40664,64 (8110,29 – 83377,42)
$ASC_{0-\infty}$ (ng.h/ml)	184,70 (112,84 – 276,95)	42870,75 (8924,26 – 86385,23)
$t_{1/2}$ (h)	1,83 (1,55 – 2,69)	76,49 (55,01 – 99,02)
$K_e$ (1/h)	0,40 (0,26 – 0,45)	0,010 (0,007 – 0,013)

O valor de  $C_{m\acute{a}x}$  representa a média das cinco concentrações plasmáticas máximas observadas em cada voluntário. Da mesma forma,  $T_{m\acute{a}x}$  foi determinado pela média dos

cinco valores de tempo máximo dos voluntários. O valor de ASC foi calculado pelo método dos trapezóides, sendo que a área sob a curva do tempo zero ao infinito inclui a extrapolação da curva infinitamente no eixo x. Para o cálculo de  $K_e$ , foi feita regressão linear dos cinco últimos pontos de decaimento da curva, de forma que a inclinação obtida corresponde ao valor da constante de eliminação. A meia-vida foi determinada pela fórmula  $t_{1/2} = \ln 2 / K_e$ . Para realização dos cálculos e análises estatísticas, foram empregados os softwares Excel<sup>®</sup> e Equiv Test<sup>®</sup>.

De acordo com os dados obtidos, verifica-se que artemeter e lumefantrina apresentaram perfis farmacocinéticos consideravelmente distintos. A absorção de artemeter teve início rápido (0,5 h) e seu pico de concentração plasmática máxima foi atingido em 1,9 horas. Após 8 horas da administração do medicamento, não foi mais possível a quantificação de artemeter no plasma dos voluntários, indicando rápida eliminação do fármaco ( $K_e = 0,40 \text{ h}^{-1}$ ). Por outro lado, a absorção de lumefantrina foi lenta e a concentração plasmática máxima foi atingida em 5,8 horas. Além disso, lumefantrina foi lentamente eliminada e apresentou elevada meia-vida (cerca de 3 dias), sendo possível a quantificação do fármaco no plasma dos voluntários até 11 dias após a administração do medicamento.

Os resultados encontrados estão em concordância com os estudos disponíveis na literatura (WHITE *et al.*, 1999; EZZET *et al.*, 2000; ASHLEY *et al.*, 2007). Segundo estas referências, artemeter é absorvido de forma rápida e extensiva e é largamente convertido pelo metabolismo de primeira passagem em seu metabólito ativo, diidroartemisinina. Este metabólito é cerca de duas a três vezes mais ativo do que artemeter *in vitro*, mas igualmente ativo *in vivo*. Tanto diidroartemisinina quanto artemeter são rapidamente eliminados, com meia-vida em torno de uma hora. Em contraste com este perfil, a absorção de lumefantrina é lenta e irregular, sua distribuição é aparentemente ampla e sua eliminação é lenta, com meia-vida de três a seis dias.

Foi realizado levantamento dos parâmetros farmacocinéticos de artemeter e lumefantrina administrados por via oral em voluntários sadios e pacientes com malária, em diferentes referências da literatura (Tabelas 59 e 60), e estes valores foram comparados com aqueles obtidos no presente estudo.

**Tabela 59 - Parâmetros farmacocinéticos de artemeter administrados por via oral em voluntários sadios e pacientes com malária citados em diferentes referências da literatura.**

Referência	Tipo de voluntário	Dosagem	C <sub>máx</sub> (ng/ml)	T <sub>máx</sub> (h)	ASC <sub>0-t</sub> (ng.h/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)
Presente estudo	Sadio	Dose única (80 mg)	57,4	1,9	156,2	1,8
NAVARATNAN <i>et al.</i> (1995)	Sadio	Dose única (120 mg)	572,7	1,75	765,7	1,1
	Sadio	Dose única (240 mg)	408,2	1,75	960,7	1,8
KARBWANG <i>et al.</i> (1997a)	Sadio	Dose única (300 mg)	315	2	1350	1,9
KARBWANG <i>et al.</i> (1997b)	Sadio	Dose única (300 mg)	474	2	217	1,1
SHI <i>et al.</i> (2006)	Sadio	Dose única (200 mg)	267,9	0,9	466,8	3,1
MCGREADY <i>et al.</i> (2006)	Grávidas com malária	Doses múltiplas (80 mg a cada 12 h por 3 dias)	34,8	1,0	66,4	1,5

**Tabela 60 - Parâmetros farmacocinéticos de lumefantrina administrados por via oral em voluntários sadios e pacientes com malária citados em diferentes referências da literatura.**

Referência	Tipo de voluntário	Dosagem	C <sub>máx</sub> (ng/ml)	T <sub>máx</sub> (h)	ASC <sub>0-t</sub> (ng.h/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)
Presente estudo	Sadio	Dose única (480 mg)	1980	5,8	40665	76,5
MANSOR <i>et al.</i> (1996)	Sadio	Dose única (500 mg)	17668	6,0	48119	74,7
ZENG <i>et al.</i> (1996)	Sadio	Dose única (500 mg)	2034	6,2	-	69,6
EZZET <i>et al.</i> (2000)	Com malária	Doses múltiplas (480 mg a cada 12 h por 3 dias)	9000	54	561	76,8
ASHLEY <i>et al.</i> (2007)	Com malária	Doses múltiplas (480 mg a cada 12 h por 3 dias)	6980	3	410100	98,4
HARTZ <i>et al.</i> (2008)	Com malária	Doses múltiplas (480 mg a cada 12 h por 3 dias)	5720	52,4	272000	-
MCGREADY <i>et al.</i> (2006)	Grávidas com malária	Doses múltiplas (480 mg a cada 12 h por 3 dias)	7340	4	-	68

Conforme discutido anteriormente, os valores de  $T_{m\acute{a}x}$  e  $t_{1/2}$  tanto de artemeter quanto de lumefantrina estão de acordo com os dados previamente disponíveis na literatura.

Observa-se que a concentração plasmática máxima de artemeter obtida no presente estudo (57,4 ng/ml) foi inferior àquelas previamente descritas para voluntários sadios (267,9 a 572,7 ng/ml). Entretanto, é importante ressaltar que, além da dose administrada ter sido menor (80 mg), os estudos prévios foram realizados com artemeter de forma isolada, e não associado a lumefantrina. WHITE *et al.* (1999) mencionaram que as propriedades farmacocinéticas de artemeter e lumefantrina em associação não são significativamente diferentes daquelas obtidas quando os fármacos são administrados individualmente, ou seja, não há interação farmacocinética aparente. Entretanto, não há estudos publicados na literatura que fizeram a comparação simultânea da farmacocinética de medicamentos contendo artemeter isolado, lumefantrina isolada e ambos os fármacos associados, na mesma dose. Assim, não está completamente elucidado se há possíveis interações ou competição pela absorção e metabolização quando artemeter e lumefantrina são administrados concomitantemente.

Além disso, não há relatos na literatura sobre possíveis interações de artemeter com alimentos. A administração do medicamento foi realizada com 200 ml de leite integral, visando aumentar a absorção de lumefantrina, entretanto este fator pode, de alguma forma, ter causado redução da absorção de artemeter.

Apenas McGREADY *et al.* (2006) realizaram a avaliação farmacocinética concomitante de artemeter e lumefantrina associados em comprimidos de dose fixa combinada, administrados em pacientes grávidas com malária. Os autores relataram que as concentrações plasmáticas máximas de ambos os fármacos foram baixas e a eliminação de lumefantrina foi mais rápida, comparando-se com estudos prévios realizados com pacientes que não estavam grávidas, e sugerindo, inclusive, que seria necessário um ajuste da dosagem dos fármacos para estas pacientes.

Nos estudos sobre farmacocinética de lumefantrina, apenas MANSOR *et al.* (1996) e ZENG *et al.* (1996) realizaram administração em dose única (500 mg) e em voluntários sadios, assim como realizado no presente estudo. Observa-se que os parâmetros farmacocinéticos obtidos apresentaram elevada similaridade àqueles descritos por ZENG *et al.* (1996). MANSOR *et al.* (1996) avaliaram a farmacocinética de lumefantrina em apenas dois voluntários. A concentração plasmática máxima obtida foi consideravelmente elevada (17668 ng/ml) e curiosamente próxima àquela obtida para o voluntário 2 (13725

ng/ml), o que pode sugerir que alguns indivíduos apresentam absorção mais efetiva ou metabolização menos eficiente de lumefantrina.

Nos estudos de EZZET *et al.* (2000), ASHLEY *et al.* (2007) e HARTZ *et al.* (2008) foi realizada a administração de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada, no esquema terapêutico preconizado para o tratamento da malária (4 comprimidos a cada 12 horas, por três dias). Entretanto, os três autores avaliaram apenas a farmacocinética de lumefantrina, de forma que artemeter não foi quantificado no plasma dos pacientes. Apesar de ter sido empregado o mesmo esquema de doses múltiplas e o mesmo tipo de paciente, pode-se observar variabilidade considerável nos parâmetros farmacocinéticos obtidos para lumefantrina.

Alguns estudos presentes na literatura demonstram variabilidade interindividual considerável na farmacocinética de lumefantrina (WHITE *et al.*, 1999). O principal fator que determina a biodisponibilidade oral de lumefantrina, um fármaco altamente lipofílico, é a co-administração de alimentos ricos em gordura, sendo que sua biodisponibilidade pode aumentar até 16 vezes pela administração concomitante do medicamento com este tipo de refeição (WHITE *et al.*, 1999). EZZET *et al.* (2000) demonstraram que a biodisponibilidade oral de lumefantrina em pacientes que receberam uma refeição normal junto com o medicamento aumentou 336%, comparada com pacientes que receberam apenas água para sua administração.

Diferenças significativas nas propriedades farmacocinéticas de artemeter e lumefantrina são verificadas em pacientes com malária aguda, comparando-se a indivíduos saudáveis. Para lumefantrina, estas alterações podem ser geralmente atribuídas à ingestão de alimentos. Na fase aguda da malária, os pacientes apresentam anorexia e conseqüentemente ocorre diminuição da ingestão de alimentos. Assim, a biodisponibilidade de lumefantrina pode sofrer redução, mas aumenta de forma considerável a medida que o paciente recobra o apetite e passa a se alimentar de forma adequada (WHITE *et al.*, 1999). Outros fatores que podem ser responsáveis pela variabilidade interindividual na biodisponibilidade oral dos fármacos em pacientes com malária são alterações na motilidade e fluxo sanguíneo intestinal e metabolismo debilitado (EZZET *et al.*, 2000). Além disso, MCGREADY *et al.* (2006) demonstraram que gravidez é associada à redução das concentrações plasmáticas de artemeter e lumefantrina durante o tratamento de malária.

O principal determinante da eficácia do tratamento da malária com esta associação é a área sob a curva de lumefantrina, que reflete de forma precisa o grau de exposição dos parasitas a este fármaco após a eliminação de artemeter. Além disso, a concentração

plasmática de lumefantrina no sétimo dia após o início do tratamento é um indicativo simples e útil para a avaliação do sucesso da terapia em relação às taxas de cura. Se a concentração plasmática de lumefantrina no sétimo dia permanecer acima de 500 ng/ml, considera-se que a taxa de cura será superior a 94%, enquanto concentrações inferiores a 280 ng/ml indicam 49% de falha terapêutica ou recrudescência da doença (EZZET *et al.*, 2000; ASHLEY *et al.*, 2007). Esta relação, entretanto, é válida apenas quando a administração do medicamento é feita em doses múltiplas, no esquema terapêutico preconizado para o tratamento da malária.

É interessante observar que a diferença nas propriedades farmacocinéticas de artemeter e lumefantrina é, em grande parte, responsável pelo sucesso da utilização da associação no tratamento de malária. Pacientes com malária *falciparum* apresentam, em média, uma biomassa de parasitas entre  $10^9$  e  $10^{12}$ . A administração de seis doses de 80 mg de artemeter em três dias é capaz de reduzir a parasitemia para aproximadamente  $10^4$  parasitas. É exatamente esta biomassa residual que lumefantrina é responsável por eliminar nos dias subsequentes à administração do medicamento. Desta forma, artemeter promove rápida redução da parasitemia e dos sintomas clínicos, enquanto lumefantrina elimina os parasitas residuais devido à sua longa meia-vida. Assim, artemeter e lumefantrina apresentam propriedades farmacocinéticas complementares, levando a altas taxas de cura, baixa probabilidade de recrudescência da doença e de aparecimento de resistência (WHITE *et al.*, 1999).

Considerando a relação bem estabelecida entre as concentrações plasmáticas e a área sob a curva de lumefantrina com as taxas de cura da doença, métodos bionalíticos para quantificação deste fármaco em meio plasmático são ferramentas importantes para avaliação da eficácia do tratamento em pacientes com malária. Além disso, os métodos bioanalíticos podem ser úteis para ajudar na elucidação dos processos envolvidos na absorção, distribuição, metabolização e eliminação de artemeter e lumefantrina administrados concomitantemente, assim como na determinação dos fatores que alteram a farmacocinética destes fármacos tanto em indivíduos sadios quanto em pacientes com malária. Há, ainda, possibilidade de interesse futuro na produção nacional de medicamentos genéricos contendo esta associação, de forma que o método bioanalítico desenvolvido pode ser útil também para os estudos de bioequivalência.

## 2.2 Estudo de fragmentação de artemeter e lumefantrina por espectrometria de massas

De acordo com os espectros dos íons precursores e fragmentos obtidos para artemeter e lumefantrina por espectrometria de massas (Figuras 13 e 14), foram propostas estruturas e rotas de fragmentação para os principais íons. O analisador triplo quadrupolo é aplicado geralmente para determinações quantitativas, sendo sua exatidão na determinação de massas limitada ( $\pm 1$  Da). Este fator dificultou em parte a determinação dos fragmentos e rotas mais prováveis, de forma que, para alguns fragmentos, mais de uma rota de fragmentação foi proposta.

Apesar de eletrospray ser a fonte de ionização que apresenta maior probabilidade de preservar o íon precursor, o espectro de massas de artemeter já demonstrou vários fragmentos, provavelmente devido à labilidade da molécula a elevadas temperaturas e voltagens.

Os principais íons visualizados no espectro de massas de artemeter (Figura 13A) foram  $m/z$  231,23,  $m/z$  267,32,  $m/z$  284,30, além do íon precursor,  $m/z$  316,30. No espectro de fragmentação (Figura 13B), pode-se observar um pico principal em  $m/z$  267,01 e um pico secundário em  $m/z$  162,87. As propostas de estruturas e rotas fragmentação estão demonstradas nas Figuras 28 a 34.

No espectro de massas de artemeter, não foi possível visualizar o íon precursor  $[M+H]^+$ , correspondente a  $m/z$  299. Por outro lado, foram obtidos íons referentes aos adutos formados com amônia ( $[M+NH_4]^+$ ,  $m/z$  316) e sódio ( $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  321) no processo de ionização. As estruturas destes adutos estão demonstradas na Figura 28. Na Figura 29, está representado o fragmento  $m/z = 267$ , formado a partir da perda de uma molécula de metanol. Devido à elevada intensidade deste íon no espectro de fragmentação de artemeter, o mesmo foi selecionado como fragmento para quantificação.

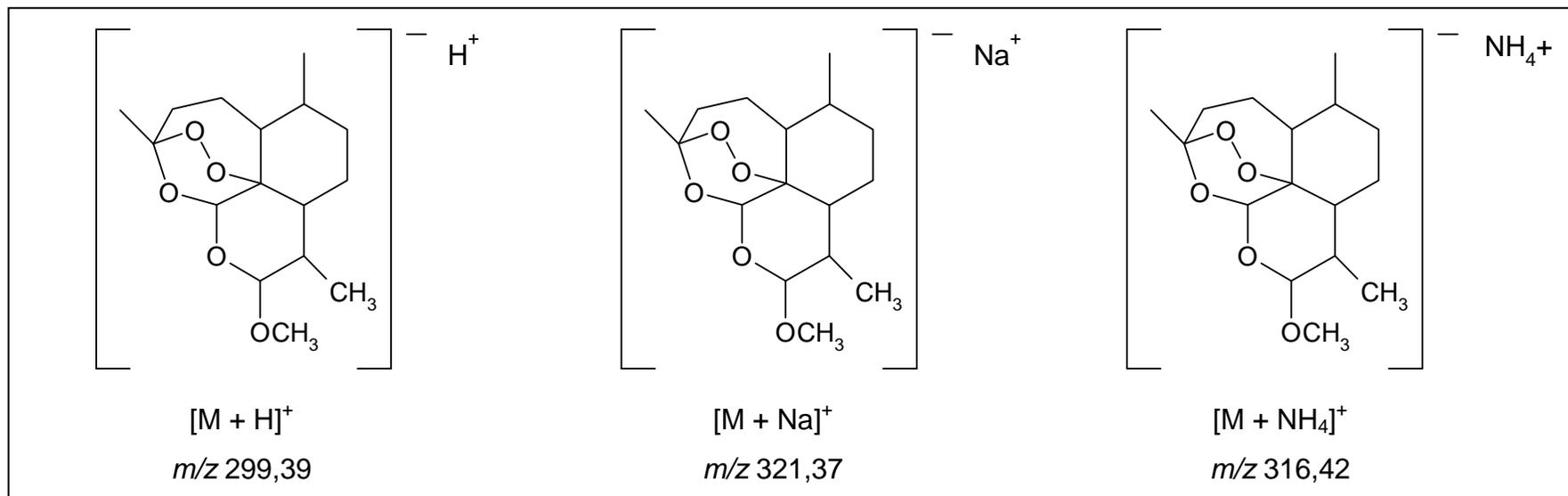


Figura 28 – Estruturas do íon  $m/z$  299 e dos adutos de sódio ( $m/z$  321) e amônia ( $m/z$  316) de artemeter.

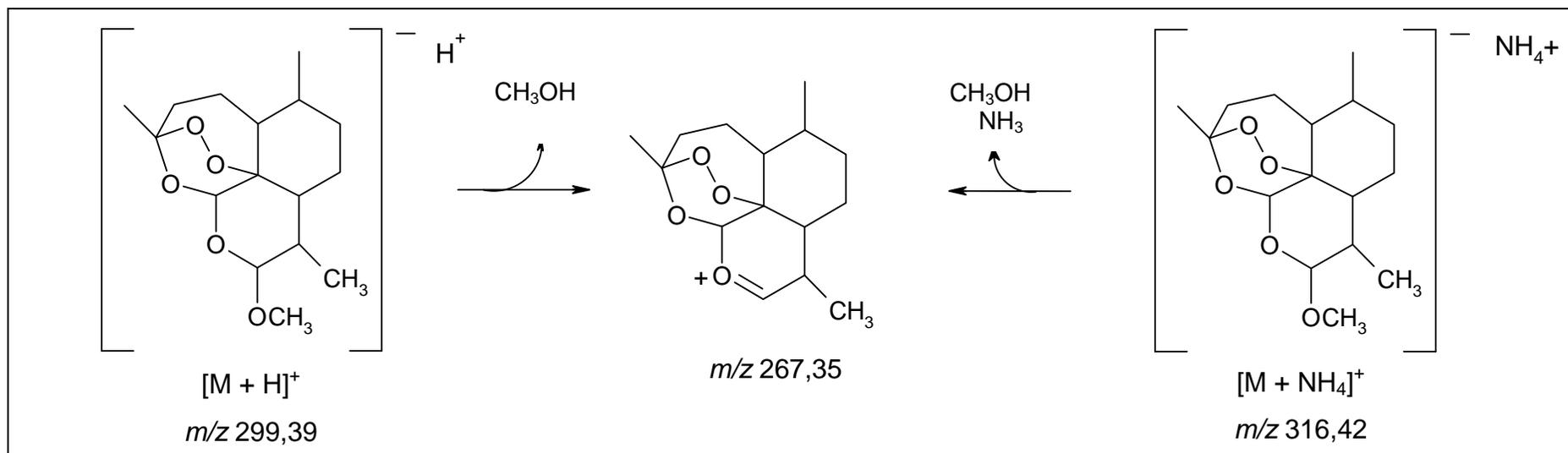
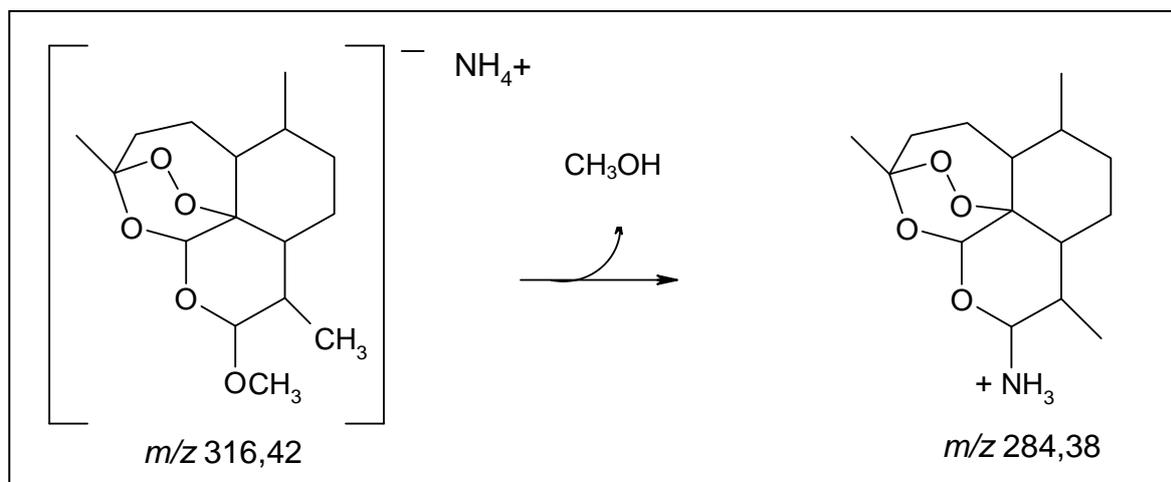


Figura 29 – Proposta para obtenção do fragmento de artemeter  $m/z$  267, a partir dos íons  $m/z$  299 e  $m/z$  316.

O fragmento  $m/z$  284, consideravelmente intenso no espectro do íon precursor, foi formado por meio da reação com amônia e perda de metanol (Figura 30).



**Figura 30** – Proposta para obtenção do fragmento de artemeter  $m/z$  284, a partir de  $m/z$  316.

O fragmento  $m/z$  231, também bastante intenso no espectro de massas de artemeter, foi formado a partir do íon  $m/z$  267. Duas rotas foram propostas para sua formação, sendo que em ambas ocorre quebra do anel peróxido de artemeter. Na primeira (Figura 31), este fragmento foi formado diretamente pela perda de duas moléculas de água do íon  $m/z = 267$ , enquanto na segunda proposta (Figura 32), as moléculas de água são perdidas em duas etapas, com a formação de um intermediário,  $m/z$  249. O íon  $m/z$  249 não foi visualizado em nenhum espectro obtido no estudo, entretanto, é um fragmento importante no trabalho de XING *et al.* (2006).

Foram propostas duas rotas para formação do fragmento  $m/z$  163, obtido no espectro de fragmentação de artemeter. Na Figura 33 está representada a formação deste íon a partir de  $m/z$  267, enquanto na Figura 34 uma rota mais simples está demonstrada, com formação de  $m/z$  163, a partir do íon  $m/z$  231.

Para confirmação de quais rotas seriam as mais prováveis de ocorrer, foi utilizado o recurso *Parent scan* do espectrômetro de massas, que permite identificar quais os íons precursores originaram determinado fragmento. Assim, foi feita infusão direta de uma solução do fármaco no detector e as massas do fragmento e do possível íon precursor foram introduzidas no *software*. A obtenção de um sinal de intensidade adequada é um indicativo de que aquele fragmento é proveniente do íon precursor proposto.

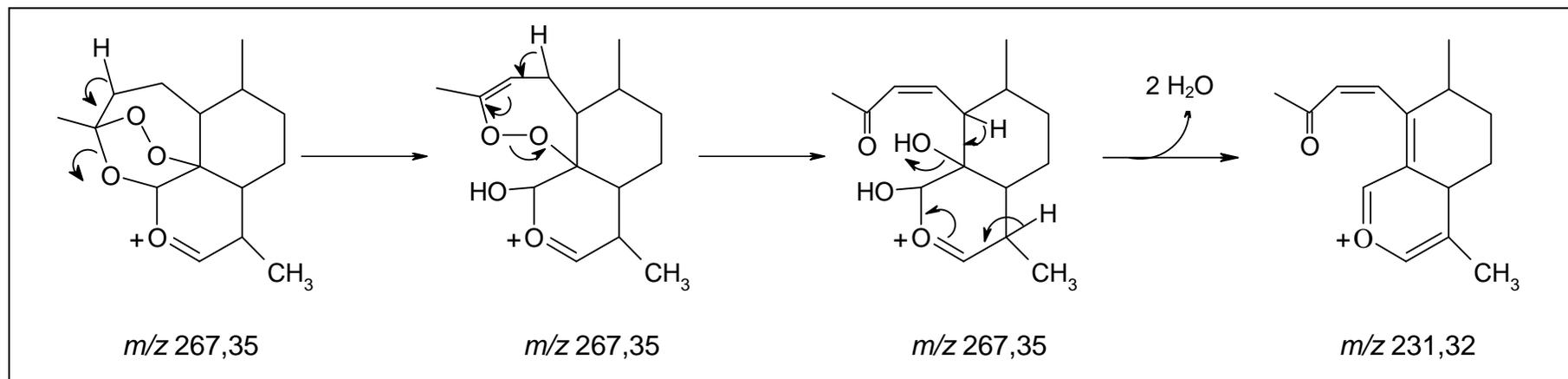


Figura 31 – Proposta A para obtenção do fragmento de artemeter  $m/z$  231, diretamente a partir do íon  $m/z$  267.

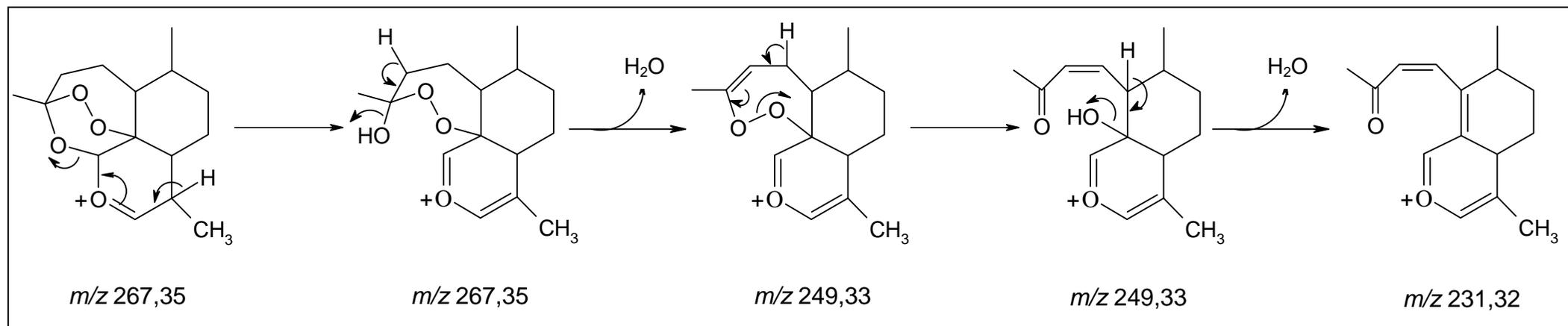
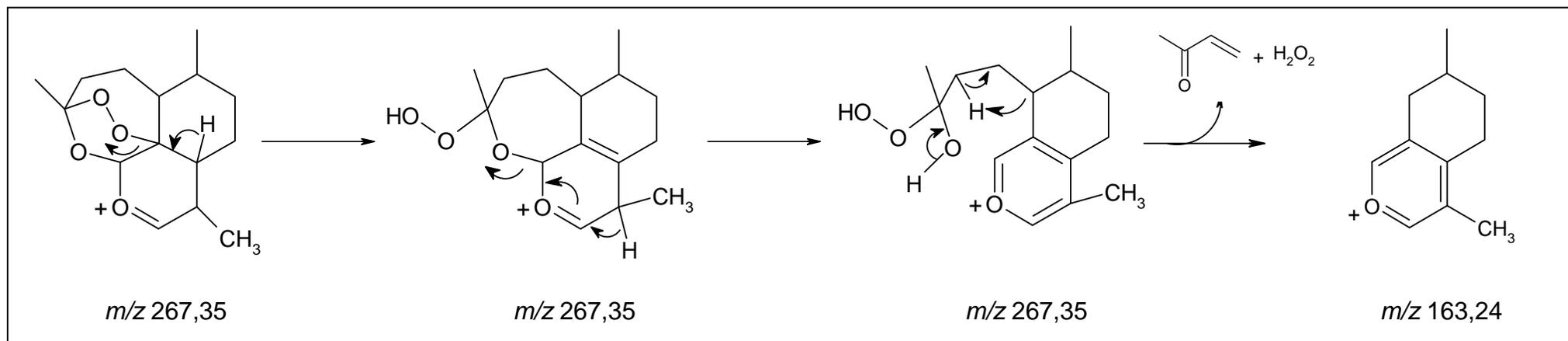
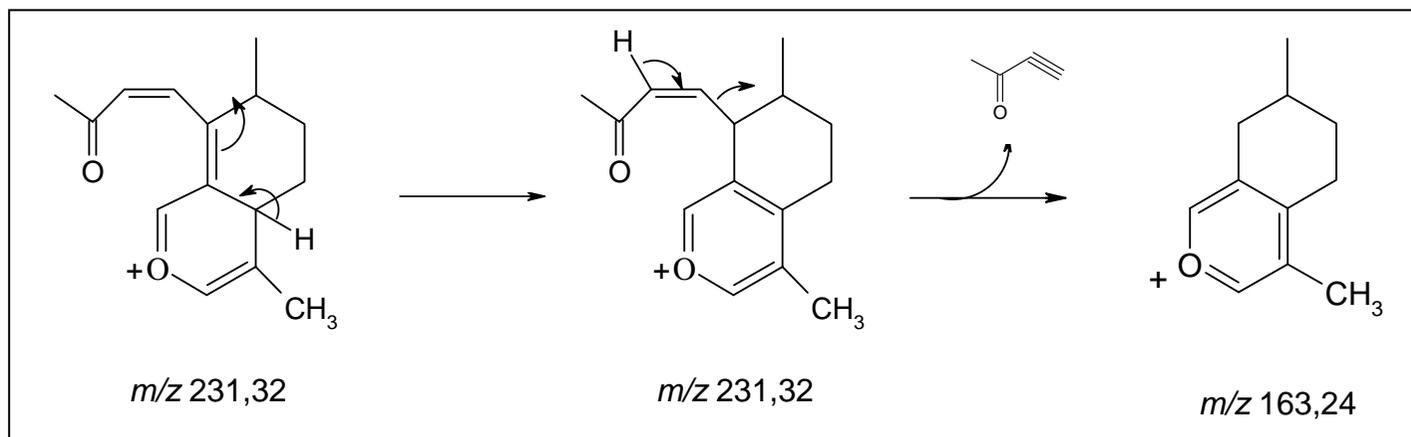


Figura 32 – Proposta B para obtenção do fragmento de artemeter  $m/z$  231, a partir do íon  $m/z$  267, via  $m/z$  249.



**Figura 33** – Proposta A para obtenção do fragmento de artemeter *m/z* 163, a partir do íon *m/z* 267.

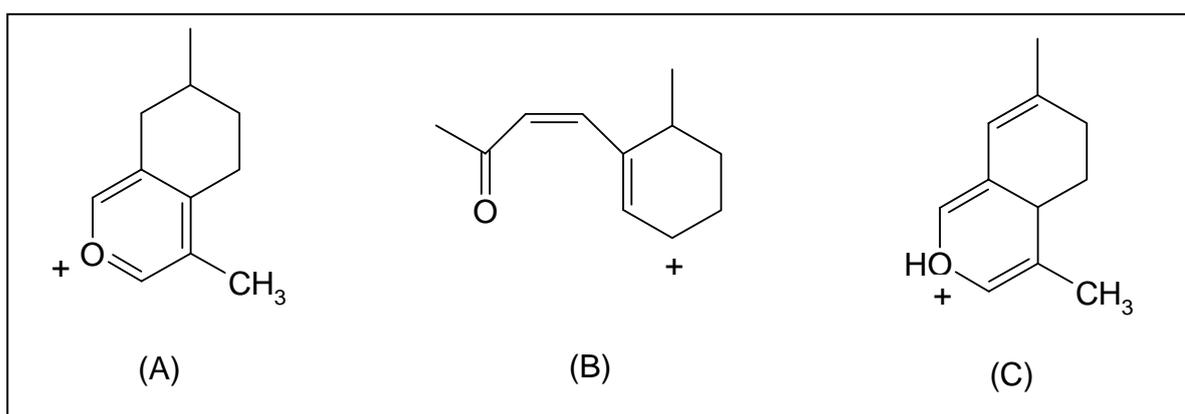


**Figura 34** – Proposta B para obtenção do fragmento de artemeter *m/z* 163, a partir do íon *m/z* 231.

Este procedimento foi realizado para o fragmento  $m/z$  231 e os íons  $m/z$  316,  $m/z$  299 e  $m/z$  267 foram identificados como íons precursores pelo equipamento. Já o íon  $m/z$  249 não forneceu sinais intensos como precursor de  $m/z$  231. Desta forma, poderia-se inferir que a rota mais provável para a formação do fragmento  $m/z$  231 seria a primeira, diretamente a partir de  $m/z$  267. Por outro lado, pode-se considerar também que a segunda rota proposta, via o intermediário  $m/z$  249, ocorre de forma consideravelmente rápida, ou seja, o fragmento  $m/z$  249 é imediatamente convertido em  $m/z$  231, de forma que não é possível identificá-lo nos espectros.

O mesmo procedimento foi realizado para identificação dos precursores do fragmento  $m/z$  163. Os íons  $m/z$  316,  $m/z$  284 e  $m/z$  267 forneceram sinais intensos, indicando a viabilidade da rota de fragmentação A, enquanto  $m/z$  231 apresentou apenas ruídos como precursor de  $m/z$  163. Da mesma forma, a ausência de sinal no *Parent scan* do íon  $m/z$  231 em relação ao fragmento  $m/z$  163 pode indicar que esta rota de fragmentação é menos provável ou que ela ocorre de forma consideravelmente rápida, não sendo possível identificar o íon  $m/z$  231 como precursor de  $m/z$  163.

É interessante observar que XING *et al.* (2006) e SHI *et al.* (2006) encontraram o fragmento  $m/z$  163 nos espectros de artemeter e propuseram estruturas distintas para o mesmo. As estruturas do fragmento  $m/z$  163 propostas no presente estudo e pelos autores citados estão representadas na Figura 35. As diferenças encontradas nas estruturas se devem, principalmente, às rotas de fragmentação propostas, que levaram à formação de moléculas distintas, mas com a mesma massa molar.



**Figura 35** – Estruturas propostas para o fragmento  $m/z$  163, (A) no presente estudo, (B) por XING *et al.* (2006) e (C) por SHI *et al.* (2006).

No espectro de massas de lumefantrina, foi obtido o íon precursor  $[M+H]^+$  de alta intensidade, correspondente a  $m/z$  530. No espectro de fragmentação, foi obtido o íon  $m/z$

348, como principal fragmento, além do íon secundário  $m/z$  385. Como a exatidão do analisador triplo quadrupolo é limitada ( $\pm 1$  Da), em alguns espectros obtidos, a relação massa/carga do principal fragmento foi 347.

Desta forma, foram propostas estruturas com massa 347,27 e 348,25 para o principal fragmento visualizado no espectro de lumefantrina. Três rotas foram sugeridas para a formação do fragmento 347,27 a partir do íon precursor 530 (Figuras 36 a 38).

As rotas A e B são parcialmente semelhantes. Em ambas ocorre a formação do fragmento final  $m/z$  347,27, que possui anel de quatro membros com nitrogênio e ligado a um anel aromático. Pode ocorrer, ainda, a abertura deste anel de quatro membros, ficando o nitrogênio com duas ligações duplas e carga positiva. A diferença entre as duas rotas está na formação inicial de anel nitrogenado de seis membros na rota A e de cinco membros na rota B. Esta diferença determina em qual dos dois anéis aromáticos clorados ocorrerá a ligação com o anel de quatro membros.

A rota C constitui um mecanismo alternativo, com formação de um alquino como intermediário, originando também o fragmento  $m/z$  347,27 como produto final. Nas três rotas o íon  $m/z$  347,27 é formado diretamente a partir da fragmentação do precursor  $m/z$  529,96, sem a formação de íons intermediários. Desta forma, não foi possível aplicar o recurso *Parent scan* do equipamento para verificação da rota de fragmentação mais provável.

Nas Figuras 39 e 40 estão demonstradas as propostas para a formação do fragmento  $m/z$  348,25, a partir do íon  $m/z$  384,72. Em ambas ocorre a perda de uma molécula de HCl, sendo que a diferença entre as rotas consiste na estrutura inicial do íon precursor  $m/z$  384,72. É interessante ressaltar que, em ambas as rotas, seria possível a perda de qualquer um dos três cloros da molécula.

Três rotas de fragmentação foram propostas para a obtenção do íon  $m/z$  385, a partir de  $m/z$  530. Na primeira delas (Figura 41), ocorre a quebra do grupamento amino, formando o intermediário  $m/z$  401, seguida pela perda de  $\text{CH}_4$ . Por esta rota, ocorre formação de fragmento com massa 384,67. Nas rotas B e C propostas (Figuras 42 e 43), ocorre perda de uma molécula de água, e em seguida, o grupamento amino é quebrado da molécula, por vias distintas. Há, ainda, a possibilidade de rearranjo com o anel aromático da molécula, com formação do íon tropílico correspondente. Em ambas as rotas, a massa do fragmento formado é 384,72.

Pelo recurso *Parent scan* do equipamento, verificou-se que o íon  $m/z$  530 apresentou sinais de maior intensidade como precursor de  $m/z$  385. O íon  $m/z$  512 também foi identificado como possível precursor deste íon, enquanto não foram obtidos

sinais de intensidade adequada que indicassem  $m/z$  401 como precursor de  $m/z$  385. Assim, pode-se inferir que as rotas B e C propostas, nas quais há formação do íon intermediário  $m/z$  512, seriam mais prováveis, ou que na primeira rota, a formação e conversão do íon  $m/z$  401 em  $m/z$  384 ocorre de forma consideravelmente rápida, não sendo possível identificar este íon nos espectros.

Dentre os estudos presentes na literatura, apenas WAHAJUDDIN *et al.* (2009) apresentaram a estrutura para o fragmento de lumefantrina obtido por espectrometria de massas. O fragmento utilizado para quantificação, entretanto, foi o íon  $m/z$  512, que corresponde à perda de uma molécula de água da estrutura da lumefantrina.

O estudo das rotas de fragmentação, apesar de não ser imprescindível para a determinação quantitativa, é uma ferramenta interessante para a elucidação estrutural dos fragmentos obtidos nos espectros de massas dos fármacos. A definição das estruturas dos íons e a determinação dos fragmentos mais característicos obtidos na fragmentação dos fármacos podem ser úteis em estudos de identificação de artemeter e lumefantrina em produtos farmacêuticos e meio biológico.

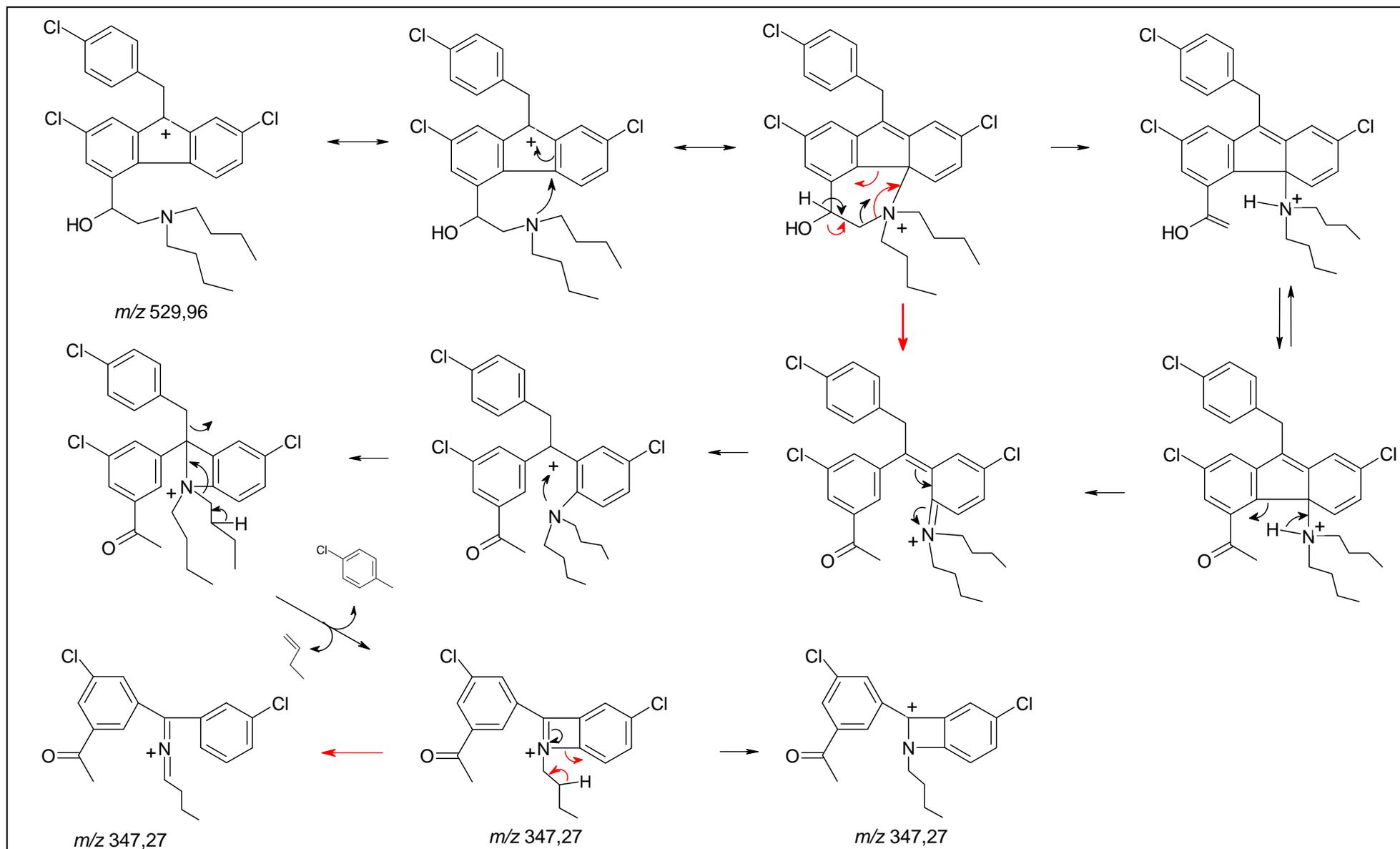


Figura 36 – Proposta A para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  347, a partir do íon  $m/z$  530.

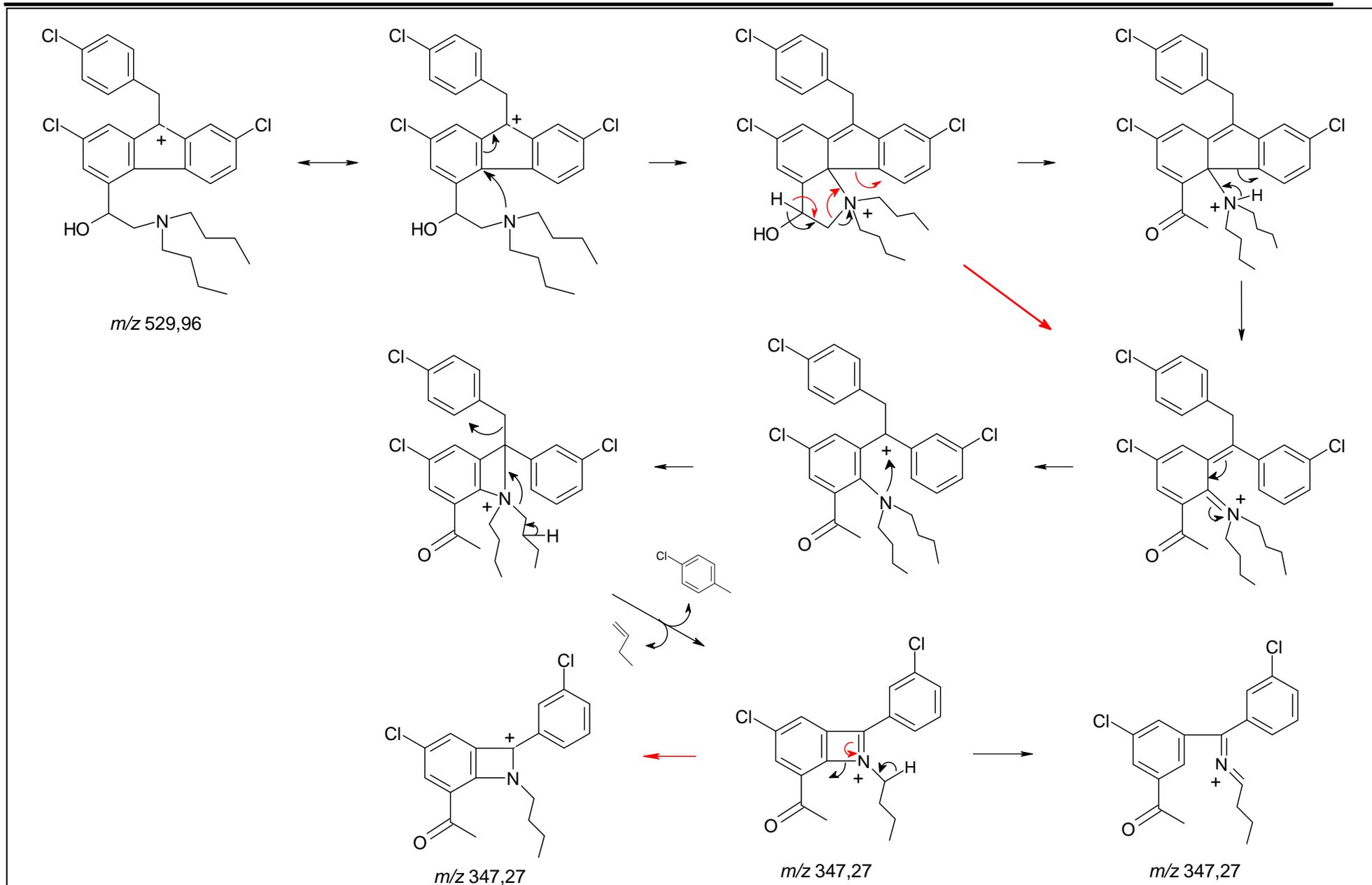


Figura 37 – Proposta B para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  347, a partir do íon  $m/z$  530.

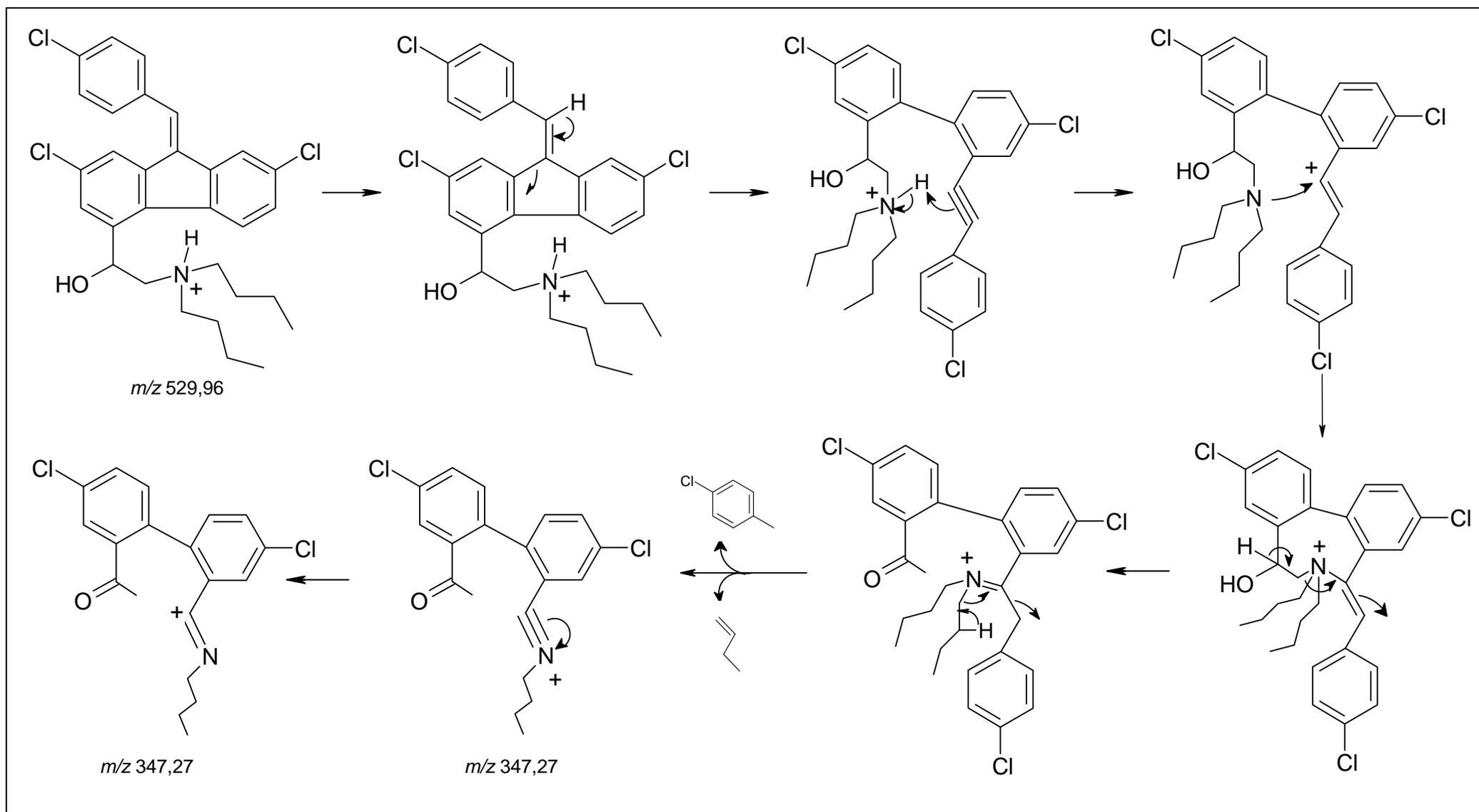
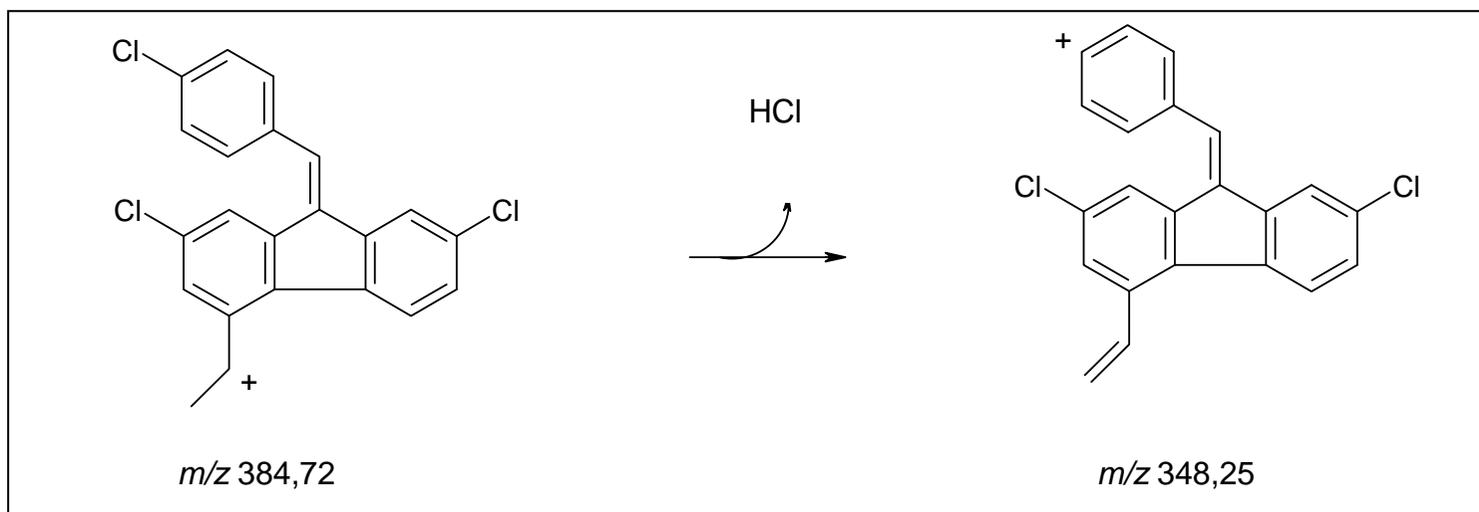
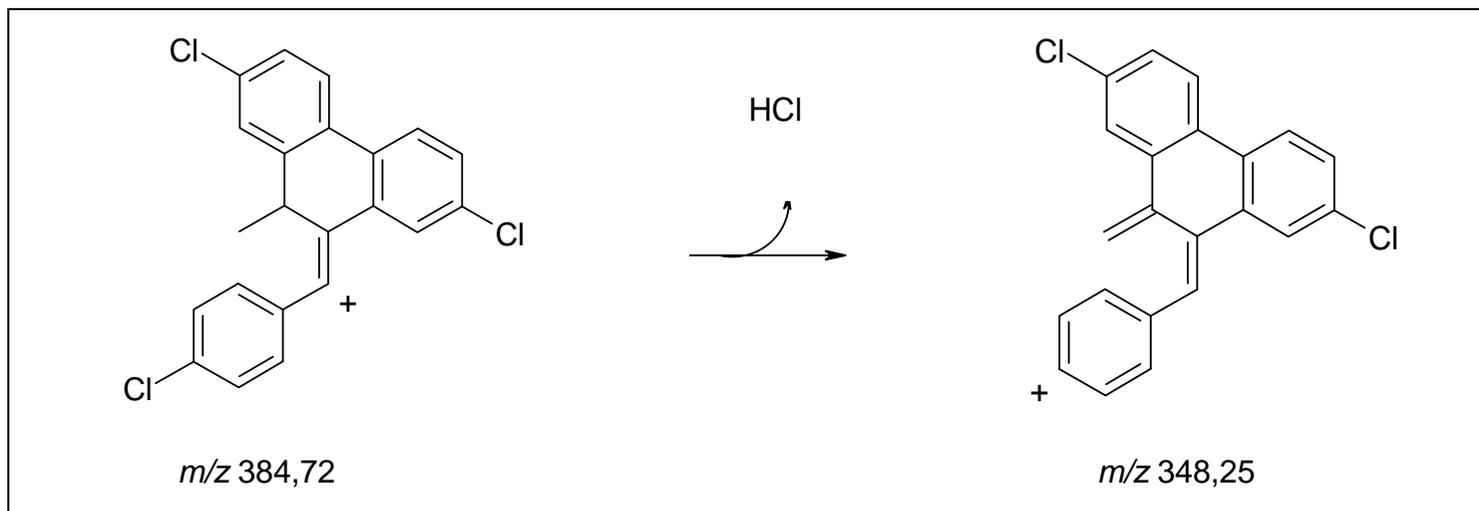


Figura 38 – Proposta C para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  347, a partir do íon  $m/z$  530.



**Figura 39** – Proposta A para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  348, a partir do íon  $m/z$  384.



**Figura 40** – Proposta B para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  348, a partir do íon  $m/z$  384.

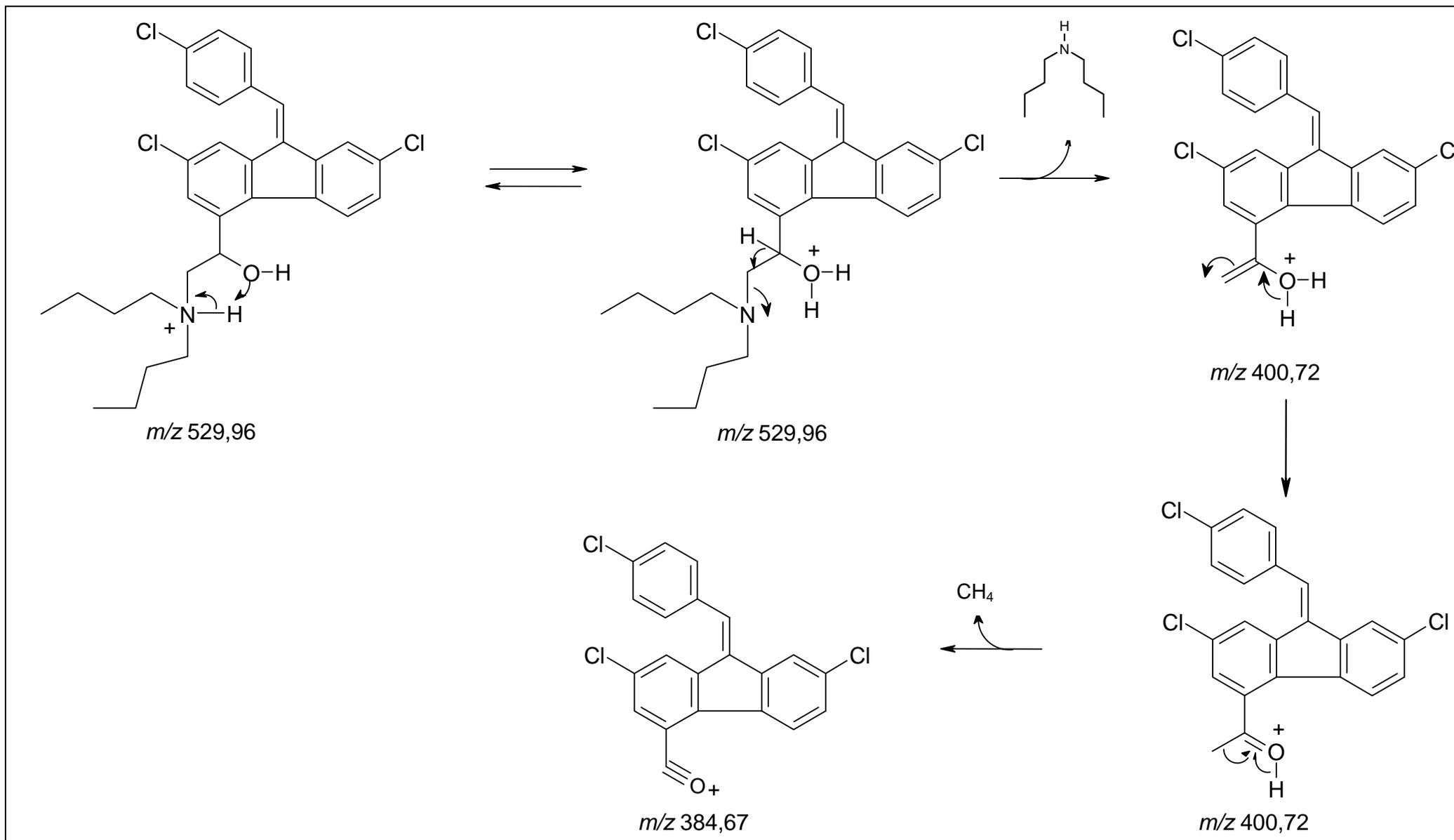


Figura 41 – Proposta A para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  385, a partir do íon  $m/z$  530.

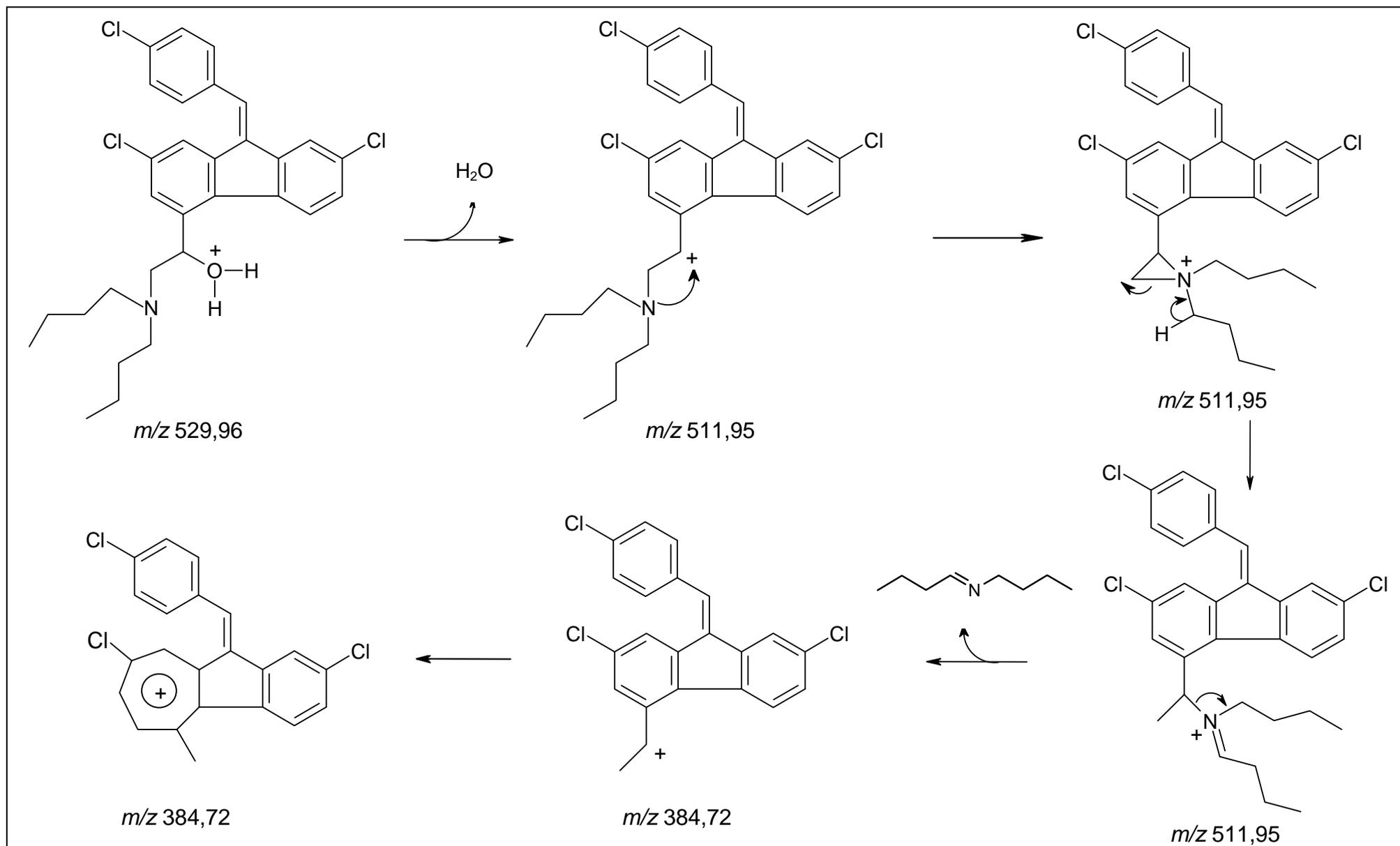


Figura 42 – Proposta B para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  385, a partir do íon  $m/z$  530.

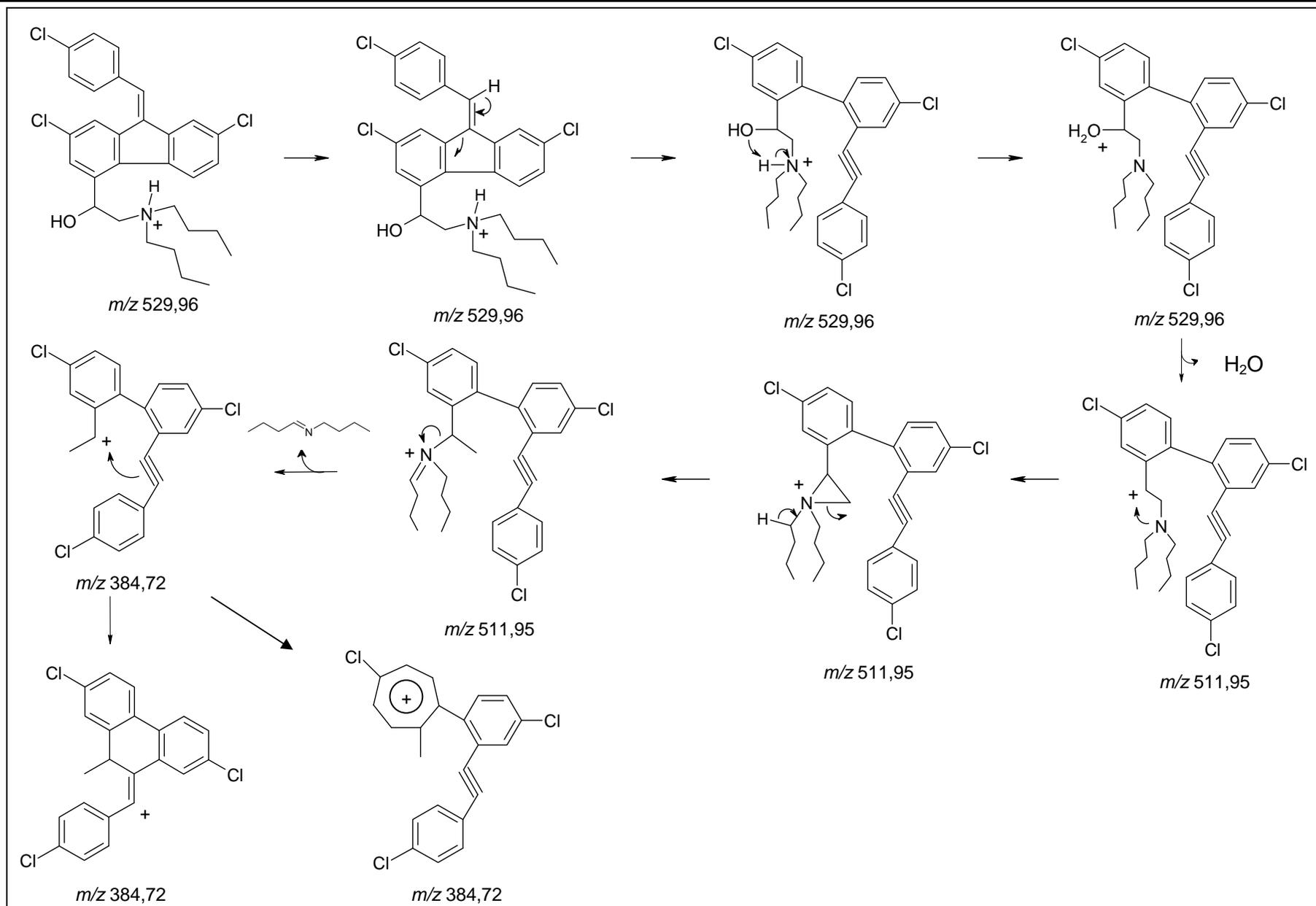


Figura 43 – Proposta C para obtenção do fragmento de lumefantrina  $m/z$  385, a partir do íon  $m/z$  530.

### 3 CONCLUSÕES

- A detecção de artemeter e lumefantrina por espectrometria de massas, empregando-se fonte de ionização eletrospray e analisador triplo quadrupolo, forneceu sinais de alta intensidade, permitindo a quantificação destes fármacos em concentrações plasmáticas consideravelmente baixas (LQ = 10 ng/ml) e de forma seletiva.

- O método bioanalítico desenvolvido demonstrou ser simples, rápido, preciso e exato, além de fornecer taxas de recuperação superiores a 80%, possibilitando a quantificação simultânea dos fármacos em plasma humano na faixa de 10 a 1000 ng/ml para artemeter e 10 a 18000 ng/ml de lumefantrina.

- O estudo clínico com voluntários permitiu a obtenção das curvas de absorção plasmática e dos parâmetros farmacocinéticos dos fármacos em associação, e comprovou a aplicabilidade do método desenvolvido em estudos de biodisponibilidade e bioequivalência.

- O estudo das rotas de fragmentação de artemeter e lumefantrina permitiu a elaboração de propostas para as estruturas dos fragmentos formados, e constitui ferramenta importante para a identificação destes fármacos em produtos farmacêuticos e meio biológico.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADARAMOYE, O. A.; OSAIMOJE, D. O.; AKINSANYA, A. M.; NNEJI, C. M.; FAFUNSO, M. A.; ADEMOWO, O. G. Changes in antioxidant status and biochemical indices after acute administration of artemether, artemether-lumefantrine and halofantrine in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, Copenhagen, v. 102, n. 4, p. 412-418, 2008.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

ANNERBERG, A.; SINGTOROJ, T.; TIPMANEE, P.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; LINDEGARDH, N. High throughput assay for the determination of lumefantrine in plasma. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 822, n. 1, p. 330-333, 2005.

ASHLEY, E. A.; STEPNIEWSKA, K.; LINDEGARDH, N.; MCGREADY, R.; ANNERBERG, A.; HUTAGALUNG, R.; SINGTOROJ, T.; HLA, G.; BROCKMAN, A.; PROUX, S.; WILAHPHAINGERN, J.; SINGHASIVANON, P.; WHITE, N. J. NOSTEN, F. Pharmacokinetic study of artemether-lumefantrine given once daily for the treatment of uncomplicated multidrug-resistant falciparum malaria. *Tropical medicine and international health*, Oxford, v. 12, n. 2, p. 201-208, 2007.

ATEMNKENG, M. A.; DE COCK, K.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Quality control of active ingredients in artemisinin-derivative antimalarials within Kenya and DR Congo. *Tropical medicine and international health*, Oxford, v. 12, n. 1, p. 68-74, 2007(a).

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

BATES, N.; HERRINGTON, J. Advocacy for malaria prevention, control and research in the twenty-first century. *American journal of tropical medicine and hygiene*, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 314-320, 2007.

BAKSHI, R.; HERMELING-FRITZ, I.; GATHMANN, I., ALTERI, E. An integrated assessment of the clinical safety of artemether-lumefantrine: a new oral fixed-dose combination antimalarial drug. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, London, v. 94, n. 4, p. 419-424, 2000.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 128-146.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 31 mai 2003. Disponível em: < <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>. Acesso em: 28 abr 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 abr 2006a. Disponível em: < [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT\\_VERSION&id=3690>](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=3690>) Acesso em: 20 maio 2008.

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. Brasília: Editora MS, 2006b.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, Amsterdam, v. 686, n. 1, p. 3-10, 1996.

BRUINS, A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of chromatography A*, Amsterdam, v. 794, n. 1, p. 345-357, 1998.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, v. 689, n. 1, p. 175-180, 1997.

CONSIGLIERI, V. O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 13-21, 2000.

DEBNATH, C.; HASLINGER, E.; LIKUSSAR, W.; MICHELITSCH, A. Determination of the antimalarial drug artemether in pharmaceutical preparations by differential pulse polarography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 638-643, 2006.

EZZET, F.; VAN VUGT, M.; NOSTEN, F.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lumefantrine (benflumetol) in acute falciparum malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Bethesda, v. 44, n. 3, p. 697-704, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*. Rockville, May 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>>. Acesso em: 24 nov 2008.

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

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W. L.; FORD, N.; WHITE, N. J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *The Lancet Infectious Diseases*, London, v. 2, n. 9, p. 564-573, 2002.

GUINOVRT, C.; ALONSO, P. L. Methods for determining vaccine efficacy and effectiveness and the main barriers to developing a fully deployable malaria vaccine.

*American journal of tropical medicine and hygiene*, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 276-281, 2007.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (ED). *Goodman & Gilman, As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Mac GrawHill, 2003. 1647 p.

HATZ, C.; SOTO, J.; NOTHDURFT, H. D.; ZOLLER, T.; WEITZEL, T.; LOUTAN, L.; BRICAIRE, F.; GAY, F.; BURCHARD, G.; ANDRIANO, K.; LEFEVRE, G.; DE PALACIOS, P. I.; GENTON, B. Treatment of acute uncomplicated falciparum malaria with artemether-lumefantrine in non-immune populations: a safety, efficacy and pharmacokinetics study. *American journal of tropical medicine and hygiene*, Baltimore, v. 78, n. 2, p. 241-247, 2008.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; POZO, O. J. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Heidelberg, v. 382, n. 4, p. 934-946, 2005.

HODEL, E. M.; ZANOLARI, B.; MERCIER, T.; BIOLLAZ, J.; KEISER, J.; OLLIARO, P.; GENTON, B. 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: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 877, n. 10, p. 867-886, 2009.

HOPFGARTNER, G.; BOURGOGNE, E. Quantitative high throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, New York, v. 22, n. 3, p. 195-214, 2003.

HUBERT, P.; NGUYEN-HUU, J. J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; COHEN, N.; COMPAGNON, P. A.; DEWÉ, M.; FEINBERG, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; VALAT, L.; ROZET, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part III. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 82-96, 2007.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008*. Rio

de Janeiro, março de 2003. Disponível em: < [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf)> Acesso em: 02 jul 2007.

INTERNATIONAL Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Methodology – Q2B*. Geneva, November 1996. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 23 jul 2006.

JENSEN, B. P.; SHARP, C. F.; GARDINER, S. J.; BEGG, E. J. Development and validation of a stereoselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of *S*- and *R*-metoprolol in human plasma. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 865, n. 1, p. 48-54, 2008.

KARBWANG, J.; NA-BANGCHANG, K.; MOLUNTO, P.; BANMAIRUROI, V.; CONGPUONG, K. Determination of artemether and its major metabolite, dihydroartemisinin, in plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, Amsterdam, v. 690, n. 1, p. 259-265, 1997a.

KARBWANG, J.; NA-BANGCHANG, K.; CONGPUONG, K.; MOLUNTO, P.; THANAVIBUL, A. Pharmacokinetics and bioavailability of oral and intramuscular artemether. *European Journal of Clinical Pharmacology*, New York, v. 52, n. 1, p. 307-310, 1997b.

KATZ, T. M.; MILLER, J. H.; HERBERT, A. A. Insect repellents: historical perspectives and new developments. *Journal of American academy of dermatology*, Saint Louis, v. 58, n. 5, p. 865-871, 2008.

KAWABATA, K.; URASAKI, Y. Simultaneous determination of azelnidipine and two metabolites in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 844, n. 1, p. 45-52, 2006.

KIBBE, A. H. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2000. 665 p.

KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American society for mass spectrometry*, New York, v. 11, n. 11, p. 942-950, 2000.

KNUDSON, A.; NICHOLIS, R. S.; GUERRA, A. P.; SANCHEZ, R. Perfiles clínicos del paludismo no complicado por *Plasmodium falciparum* en Córdoba, Colombia. *Biomédica*, Bogota, v. 27, n. 4, p. 581-593, 2007.

LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass spectrometry reviews*, New York, v. 25, n. 6, p. 866-880, 2006.

LAUFER, M. K., DJIMDE, A. A.; PLOWE, C. V. Monitoring and deterring drug-resistant malaria in the era of combination therapy. *American journal of tropical medicine and hygiene*, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 160-169, 2007.

LAW, B; TEMESI, D. Factors to consider in the development of generic bioanalytical high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric methods to support drug discovery. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 748, n. 1, p. 21-30, 2000.

LEVERENCE, R.; AVERY, M. J.; KAVETSKAIA, O.; BI, H.; HOP, C. E. C. A.; GUSEV, A. I. Signal suppression/enhancement in HPLC-ESI-MS/MS from concomitant medications. *Biomedical chromatography*, Hoboken, v. 21, n. 11, p. 1143-1150, 2007.

LI, X. N.; XU, H. R.; CHEN, W. L.; LIU, G. Y.; CHU, N. N.; YU, C. Determination of eprosartan in human plasma and urine by LC/MS/MS. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 853, n. 1, p. 47-53, 2007.

LINDEGARDH, N.; ANNERBERG, A.; BLESSBORN, D.; BERGQVIST, Y.; DAY, N.; WHITE, N. J. Development and validation of a bioanalytical method using automated solid-

phase extraction and LC-UV for the simultaneous determination of lumefantrine and its desbutyl metabolite in plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Amsterdam, v. 37, n. 5, p. 1081-1088, 2005.

MANSOR, S. M.; NAVARATNAM, V.; YAHAYA, N.; NAIR, N. K.; WERNSDORFER, W. H.; DEGEN, P. H. Determination of a new antimalarial drug, benflumetol, in blood plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, Amsterdam, v. 682, n. 2, p. 321-325, 1996.

MARTENSSON, A.; STROMBERG, J.; SISOWATH, C.; MSELLEM, M. I.; GIL, J. P.; MONTGOMERY, S. M.; OLLIARO, P.; ALI, A. S.; BJORKMAN, A. Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clinical infectious diseases*, Chicago, v. 41, n. 8, p. 1079-1086, 2005.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical chemistry*, Washington, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

MCGREADY, R.; STEPNIIEWSKA, K.; LINDEGARDH, N.; ASHLEY, E.; LA, Y.; SINGHASIVANON, P.; WHITE, N. J.; NOSTEN, F. The pharmacokinetics of artemether and lumefantrine in pregnant women with uncomplicated falciparum malaria. *European Journal of Clinical Pharmacology*, New York, v. 62, n. 2, p. 1021-1031, 2006.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. (ED). *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. 564 p.

MUHIA, D. K.; MBERU, E. K.; WATKINS, W. M. Differential extraction of artemether and its metabolite dihydroartemisinin from plasma and determination by high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B*, Amsterdam, v. 660, n. 1, p. 196-199, 1994.

NAVARATNAM, V.; MANSOR, S. M.; CHIN, L. K.; MORDI, M. N.; ASOKAN, M.; NAIR, N. K. Determination of artemether and dihydroartemisinin in blood plasma by high-

performance liquid chromatography for application in clinical pharmacological studies. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, Amsterdam, v. 669, n. 2, p. 289-294, 1995.

NONTPRASERT, A.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; DONDORP, A. M.; CLEMENS, R.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J. Neuropathologic toxicity of artemisinin derivatives in a mouse model. *American journal of tropical medicine and hygiene*, Baltimore, v. 67, n. 4, p. 423-429, 2002.

NOSTEN, F.; WHITE, N. J. Artemisinin based combination treatment of falciparum malaria. *American journal of tropical medicine and hygiene*, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 181-192, 2007.

NUNES, M. S.; FERREIRA, M. U. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the “symptomatic” vs “asymptomatic” dichotomy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, n. 3, p. 341-347, 2007.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F. C.; JACOME, R. L. R. P.; VAROTTI, F. P.; PÓVOA, M. M. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 715-740, 2009.

OMARI, A. A.; GAMBLE, C.; GARNER P. Artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria: a systematic review. *Tropical medicine and international health*, Oxford, v. 9, n. 2, p. 192 -199, 2004.

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

RANG, H.P; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Farmacologia*. 5 ed. São Paulo: Elsevier Editora Ltda., 2004. 904 p.

ROSENBERG, E. The potential of organic (electronpray and atmospheric pressure chemical ionization) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for

speciation analysis. *Journal of chromatography A*, Amsterdam, v. 1000, n. 1, p. 841-889, 2003.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of chromatography A*, Amsterdam, v. 1158, n. 1, p. 111-125, 2007.

SABARINATH, S.; RAJANIKANTH, M.; MADHUSUDANAN, K. P.; GUPTA, R. C. A sensitive and selective liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric assay for the simultaneous quantification of alpha-,beta-arteether and its metabolite dihydroartemisinin in plasma, useful for pharmacokinetic studies. *Journal of mass spectrometry*, Chichester, v. 38, n. 7, p. 732-742, 2003.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. *Nature*, London, v. 415, n. 6872, p. 680-685, 2002.

SANDRENAN, N.; SIOUFI, A.; GODBILLON, J.; NETTER, C.; DONKER, M.; VAN VALKENBURG. Determination of artemether and its metabolite, dihydroartemisinin, in plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection in the reductive mode. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, Amsterdam, v. 691, n. 1, p. 145-153, 1997.

SHANKS, G. D. Treatment of falciparum malaria in the age of drug-resistance. *Journal of postgraduate medicine*, Bombay, v. 52, n. 4, p. 277-280, 2006.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*. 5 ed. New York: McGraw Hill, 2005. 892 p.

SHARMA, S.; PATHAK, S. Malaria vaccine: a current perspective. *Journal of vector borne diseases*, New Delhi, v. 45, n. 1, p. 1-20, 2008.

SHI, B.; YU, Y.; LI, Z.; ZHANG, L.; ZHONG, Y.; SU, S.; LIANG, S. Quantitative analysis of artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma by LC with tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, New York, v. 64, n. 9, p. 523-530, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS/MS. *Chromatographia*, New York, v. 55, n. 1, p. S-95-S-99, 2002.

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

SOUPPART, C.; GAUDUCHEAU, N.; SANDRENAN, N.; RICHARD, F. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for the determination of artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 774, n. 2, p. 195-203, 2002.

STORPIRTIS, S.; CONSIGLIERI, V. O. Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos: aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. *Revista de farmácia e bioquímica da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 63-70, 1995.

SUTHERLAND, C. J.; ROSALYNN, O.; DUNYO, S.; JAWARA, M.; DRAKELEY, C. J.; ALEXANDER, N.; COLEMAN, R.; PINDER, M.; WALRAVEN, G.; TARGETT, G. A. T. Reduction of malaria transmission to *Anopheles* mosquitoes with a six-dose regimen of co-artemether. *Plos Medicine*, San Francisco, v. 2, n. 4, p. 338-346, 2005.

SWEETMAN, S.C. (ED.). *Martindale: The complete drug reference*. 34 ed., London: Pharmaceutical Press, 2005. p. 444-463.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry*, Toronto, v. 38, n. 4, p. 328-334, 2005.

THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. 4.ed. Geneva: World Health Organization, 2006. 1499 p.

THE MERCK INDEX. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13. ed. Rahway: Merck Co., 2001. 1818 p.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008. 3504 p.

THOMAS, C. G.; WARD, S. A. Selective determination, in plasma, of artemether and its major metabolite, dihydroartemisinin, by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of chromatography B*, Amsterdam, v. 583, n. 1, p. 131-136, 1992.

VAN AGTMAEL, M. A.; BUTTER, J. J.; PORTIER, E. J. G.; VAN BOXETEL, C. J. Validation of an improved reversed phase high performance liquid chromatography assay with reductive electrochemical detection for the determination of artemisinin derivatives in man. *Therapeutic drug monitoring*, New York, v. 20, n. 1, p. 109-116, 1998.

VAN VUGT, M.; LOOAREESUWAN, S.; WILAIRATANA, P.; MCGREADY, R.; VILLEGAS, L.; GATHMANN, I.; MULL, R.; BROCKMAN, A.; WHITE, N. J.; NOSTEN, F. Artemeter-lumefantrine for the treatment of multi-resistant falciparum malaria. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, London, v. 94, n. 5, p. 545-548, 2000.

VEKEMANS, J.; BALLOU, W. R. *Plasmodium falciparum* malaria vaccines in development. *Expert reviews in vaccines*, Oxford, v. 7, n. 2, p. 223-240, 2008.

VLASE, L.; LEUCUTA, S. E.; IMRE, S. Determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma by high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Talanta*, London, v. 75, n. 4, p. 1104-1109, 2008.

WAHAJUDDIN; SINGH, S. P.; JAIN, G. K. Determination of lumefantrine in rat plasma by liquid-liquid extraction using LC-MS/MS with electrospray ionization: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 877, n. 11, p. 1133-1139, 2009.

WANG, X.; PANG, J.; NEWMAN, R. A.; KERWIN, S. M.; BOWMAN, P. D.; STAVCHANSKY, S. Quantitative determination of fluorinated caffeic acid phenethyl ester derivative from rat blood plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 867, n. 1, p. 138-143, 2008.

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

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

WINSTANLEY, P. Modern chemotherapeutic options for malaria. *The lancet infectious diseases*, London, v. 1, n. 4, 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, n. 4, p. 209-218, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Malaria. Twentieth Report. WHO Technical Report Series, 892. Geneva, 2000. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/docs/ecr20\\_toc.htm](http://www.who.int/malaria/docs/ecr20_toc.htm)>. Acesso em: 24 abr 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Malaria. World Malaria Report 2008, 215. Geneva, 2008. Disponível em: <<http://apps.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008.pdf>>. Acesso em: 16 nov 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Procurement of artemether-lumefantrine (Coartem<sup>®</sup>) through WHO. Geneva, 2003. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/cmc\\_upload/0/000/015/789/CoA\\_website5.pdf](http://www.who.int/malaria/cmc_upload/0/000/015/789/CoA_website5.pdf)>. Acesso em: 24 abr 2006.

XIA, Y. Q.; MILLER, J. D.; BAKHTIAR, R.; FRANKLIN, R. B.; LIU, D. Q. Use of a quadrupole linear ion trap mass spectrometer in metabolite identification and bioanalysis.

*Rapid communications in mass spectrometry*, Chichester, v. 17, n. 11, p. 1137-1145, 2003.

XING, J.; YAN, H.; ZHANG, S.; REN, G.; GAO, Y. A high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of artemisinin in rat plasma. *Rapid communications in mass spectrometry*, Chichester, v. 20, n. 9, p. 1463-1498, 2006.

XU, H. R.; LI, X. N.; CHEN, W. L.; CHU, N. N. Simultaneous determination of desloratadine and its active metabolite 3-hydroxydesloratadine in human plasma by LC/MS/MS and its application to pharmacokinetics and bioequivalence. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Amsterdam, v. 45, n. 4, p. 659-666, 2007.

XUE, Y. J.; TURNER, K. C.; MEEKER, J. B.; PURSLEY, J.; ARNOLD, M. UNGER, S. Quantitative determination of pioglitazone in human serum by direct-injection high performance liquid chromatography mass spectrometry and its application to a bioequivalence study. *Journal of chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, Amsterdam, v. 795, n. 2, p. 215-226, 2003.

YAMAGUCHI, J.; OHMICH, M.; JINGU, S.; OGAWA, N.; HIGUCHI, S. Utility of postcolumn addition of 2-(2-methoxyethoxy)ethanol, a signal enhancing modifier, for metabolite screening with liquid chromatography and negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, Washington, v. 71, n. 23, p. 5386-5390, 1999.

YAMAGUCHI, J.; OHMICH, M.; HASEGAWA, M.; YOSHIDA, H.; OGAWA, N.; HIGUCHI, S. Identification of rat urinary and biliary metabolites of esonarimod, a novel antirheumatic drug, using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with postcolumn addition of 2-(2-methoxyethoxy)ethanol, a signal enhancing modifier. *Drug metabolism and disposition*, Baltimore, v. 29, n. 6, p. 806-812, 2001.

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

ZENG, M.; LU, Z.; YANG, S.; ZHANG, M.; LIAO, J.; LIU, S.; TENG, X. Determination of benflumetol in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography

with ultraviolet detection. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, Amsterdam, v. 681, n. 2, p. 299-306, 1996.

ZHANG, J.; MCCOMBIE, G.; GUENAT, C.; KNOCHENMUSS, R. FT-ICR mass spectrometry in the drug discovery process. *Drug discovery today*, Kidlington, v. 10, n. 9, p. 635-642, 2005.

ZHOU, S.; SONG, Q.; TANG, Y.; NAIDONG, W. Critical review of development, validation and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. *Current pharmaceutical analysis*, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 3-14, 2005.

## APÊNDICE A

Publicações e manuscritos decorrentes do trabalho



## Short communication

## Comparison of HPLC, UV spectrophotometry and potentiometric titration methods for the determination of lumefantrine in pharmaceutical products

Isabela da Costa César\*, Fernando Henrique Andrade Nogueira, Gérson Antônio Pianetti

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 February 2008

Received in revised form 23 April 2008

Accepted 9 May 2008

Available online 17 May 2008

## Keywords:

Lumefantrine

Antimalarials

HPLC

UV spectrophotometry

Potentiometric titration

## ABSTRACT

This paper describes the development and evaluation of a HPLC, UV spectrophotometry and potentiometric titration methods to quantify lumefantrine in raw materials and tablets. HPLC analyses were carried out using a Symmetry C<sub>18</sub> column and a mobile phase composed of methanol and 0.05% trifluoroacetic acid (80:20), with a flow rate of 1.0 ml/min and UV detection at 335 nm. For the spectrophotometric analyses, methanol was used as solvent and the wavelength of 335 nm was selected for the detection. Non-aqueous titration of lumefantrine was carried out using perchloric acid as titrant and glacial acetic acid/acetic anhydride as solvent. The end point was potentiometrically determined. The three evaluated methods showed to be adequate to quantify lumefantrine in raw materials, while HPLC and UV methods presented the most reliable results for the analyses of tablets.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The incidence of malaria worldwide is estimated to be 300–500 million clinical cases each year, with about 90% of these occurring in Africa, mostly caused by *P. falciparum*. One of the greatest difficulties facing malaria control worldwide is the spread and intensification of parasite resistance to anti-malarial drugs. The limited number of such drugs has led to increasing difficulties in the development of antimalarial drug policies and adequate disease management [1]. The search for new antimalarial drugs involving novel molecular targets and treatment regimens, which should provide both high efficacy and safety for use, has become an urgent subject of study [2].

Lumefantrine (previously called benflumetol) was synthesized originally in the 1970s by the Academy of Military Medical Sciences in Beijing, China [3]. It is a racemic fluorene derivative, named 2-dibutylamino-1-[2,7-dichloro-9-(4-chlorobenzylidene)-9H-fluoren-4-yl]-ethanol (Fig. 1). It conforms structurally, physico-chemically and in mode of action to the aryl amino alcohol group of antimalarial agents including quinine, mefloquine and halofantrine [4].

Nowadays, lumefantrine is commercially available in a coformulated product with artemether, in a fixed dose combination

(artemether 20 mg+lumefantrine 120 mg) [5]. Many studies have proved that this association is highly effective in the treatment of several types of malaria, mainly multi-drug-resistant *falciparum* malaria, resulting in high cure rates and stronger prevention against reinfection [6–8]. This drug association is the first line therapy for uncomplicated malaria recommended by World Health Organization (WHO), mainly in countries where malaria is resistant to conventional treatments [9].

Previous studies have reported the determination of lumefantrine, all of them employing high performance liquid chromatography with UV detection at 335 nm and focusing mainly in its quantitation in plasma or blood [3,10–12]. However, methods for lumefantrine determination in pharmaceutical products, such as raw material and tablets, have not been reported to date, and lumefantrine monographs are not available in official pharmacopoeias. The increasing utilization of this antimalarial drug as first line treatment for malaria in many countries demands the development of new and alternative methods to successfully determine lumefantrine in raw material and pharmaceutical dosage forms.

The purpose of this study was to develop and validate analytical methods to quantify lumefantrine in raw materials and tablets, using HPLC, UV spectrophotometry and potentiometric titration. The results obtained by these methods were statistically compared, using analysis of variance (ANOVA). In addition, the reliability and feasibility of them were evaluated, focusing on routine quality control analysis.

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 34096982; fax: +55 31 34096976.  
E-mail address: [isaccesar@bol.com.br](mailto:isaccesar@bol.com.br) (I.C. César).

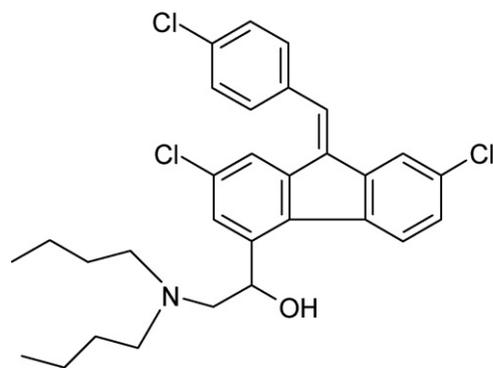


Fig. 1. Chemical structure of lumefantrine.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

Lumefantrine reference standard and raw material were purchased from Dafra Pharma (Turnhout, Belgium). Coartem<sup>®</sup> tablets (artemether 20 mg + lumefantrine 120 mg) (Novartis, Basel, Switzerland) were kindly donated by Brazilian Health Ministry. Water was purified using a Millipore system (Bedford, MA, USA). Methanol, trifluoroacetic acid, dichloromethane (HPLC grade) and perchloric acid, glacial acetic acid and acetic anhydride (analytical grade) were obtained from Tedia (Fairfield, OH, USA).

### 2.2. Instruments and analytical conditions

The HPLC analyses were carried out on an Agilent 1200 system (Palo Alto, CA, USA), composed of a quaternary pump, autosampler, diode array detector (DAD) and HP ChemStation software. The column used was a Symmetry C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm i.d.; 5 μm particle size) from Waters (Milford, MA, USA), maintained at 30 °C. DAD detection was performed at 335 nm and UV spectra from 200 to 400 nm were recorded on-line for peak identification. The mobile phase consisted of methanol and 0.05% trifluoroacetic acid (80:20), at a flow rate of 1.0 ml/min. The injection volume was 20 μl.

Ultraviolet spectrophotometric analyses were carried out on a Shimadzu UV 160A (Shimadzu, Kyoto, Japan) spectrophotometer, in a 1 cm quartz cuvette. The wavelength of 335 nm was selected for the quantitation of lumefantrine and the measurements were obtained against methanol as a blank.

Lumefantrine non-aqueous titration was carried out on a Titrator DL53 (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA), equipped with a combination glass electrode DG113 (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA), containing 1 M LiCl in ethanol as the inner solution. 0.1 M perchloric acid volumetric solution was prepared in glacial acetic acid/acetic anhydride, and standardized with potassium biphthalate, previously dried at 120 °C for 2 h. The end point was determined potentiometrically.

### 2.3. Preparation of standard and sample solutions

**Lumefantrine standard solution:** Approximately 15 mg of lumefantrine reference standard were accurately weighed and transferred to a 50 ml volumetric flask. Dichloromethane (1 ml) was added to ensure complete solubilization and the solution was diluted to volume with methanol. An aliquot of 4 ml of the obtained solution was transferred to a 50 ml volumetric flask. The volume was adjusted with either methanol for spectrophotometric analysis or mobile phase for chromatographic analysis, resulting in solutions of 24 μg/ml.

**Lumefantrine sample solutions:** Approximately 30 mg of lumefantrine raw material, or a portion of the powdered tablets equivalent to about 30 mg of lumefantrine, were accurately weighed and transferred to a 100 ml volumetric flask. Dichloromethane (2 ml) was added and the solution was diluted to volume with methanol. An aliquot of 4 ml of this solution was transferred to a 50 ml volumetric flask. The volume was adjusted with either methanol for spectrophotometric analysis or mobile phase for chromatographic analysis, to obtain a solution at 24 μg/ml of lumefantrine.

### 2.4. Validation

The optimized spectrophotometric and chromatographic methods were completely validated according to the procedures described in ICH guidelines Q2(R1) for the validation of analytical methods [13].

**Linearity:** Standard solutions containing 300 μg/ml of lumefantrine in methanol were prepared, in triplicate. Aliquots of these solutions were diluted in mobile phase (for HPLC analysis) or methanol (for UV analysis), to five different concentrations, corresponding to 12, 18, 24, 30 and 36 μg/ml of lumefantrine. Calibration curves with concentration versus peak area or absorbance were plotted for each method and the obtained data were subjected to regression analysis using the least squares method.

**Precision:** The intra-day precision was evaluated by analyzing six tablet samples ( $n = 6$ ), at 100% of the test concentration (24 μg/ml), using the UV and the HPLC methods. Similarly, the inter-day precision was evaluated in three consecutive days ( $n = 18$ ). Lumefantrine contents and the relative standard deviations (R.S.D.) were calculated.

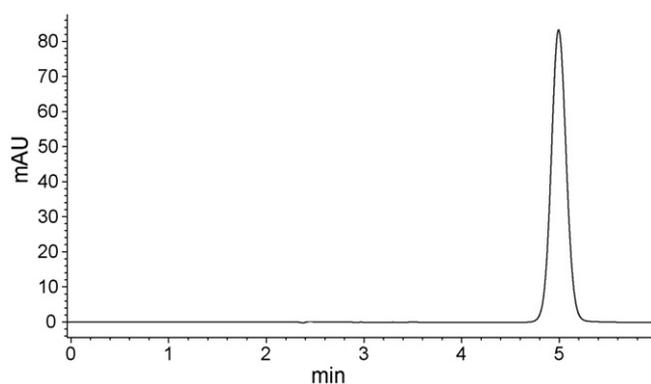
**Accuracy:** Lumefantrine reference standard was accurately weighed and added to a mixture of the tablet excipients, at three different concentrations (18, 24 and 30 μg/ml). At each concentration, samples were prepared in triplicate and the recovery percentage was determined by UV and HPLC methods.

**Specificity:** A solution containing a mixture of the tablet excipients was prepared using the sample preparation procedure and injected onto the chromatograph, to evaluate possible interfering peaks. For the spectrophotometric analysis, the UV spectrum of this solution was recorded in the range of 200–400 nm, to evaluate the presence of possible interfering bands at 335 nm. In addition, spectral purities of lumefantrine peaks in chromatograms obtained with sample solutions were evaluated using the UV spectra recorded by the diode array detector.

**Detection and quantitation limits:** Diluted lumefantrine standard solutions were prepared and analyzed by both chromatographic and spectrophotometric methods, at decreasing concentrations, in the range of 0.01–0.40 μg/ml. For the HPLC method, the limit of detection (LOD) was defined as the concentration for which a signal-to-noise ratio of 3 was obtained and, for the limit of quantitation (LOQ), a signal-to-noise ratio of 10 was considered. To determine the limits of detection and quantitation in the UV method, the absorbance values, UV spectra and relative standard deviation of the measured values of the diluted solutions were evaluated.

### 2.5. Analysis of lumefantrine raw material and tablets

Samples of Coartem<sup>®</sup> tablets and lumefantrine raw material, employed for manufacturing pharmaceutical formulations, were analyzed by the validated HPLC and UV methods and also by potentiometric titration. Before the analysis, the tablets were weighed and finely powdered. The sample solutions for the HPLC and UV analyses were prepared as described in Section 2.3. For the



**Fig. 2.** Chromatogram obtained for a lumefantrine sample solution at 24  $\mu\text{g/ml}$ , using Symmetry  $\text{C}_{18}$  column (250 mm  $\times$  4.6 mm i.d.; 5  $\mu\text{m}$  particle size) at 30  $^{\circ}\text{C}$  and mobile phase composed of methanol and 0.05% trifluoroacetic acid (80:20), at a flow rate of 1.0 ml/min. Detection was performed at 335 nm.

potentiometric titration, 200 mg of lumefantrine were accurately weighed in a titration vessel, followed by the addition of 10 ml of acetic anhydride and 40 ml of glacial acetic acid. Samples were submitted to mechanical agitation until complete solubilization, before automatic titration.

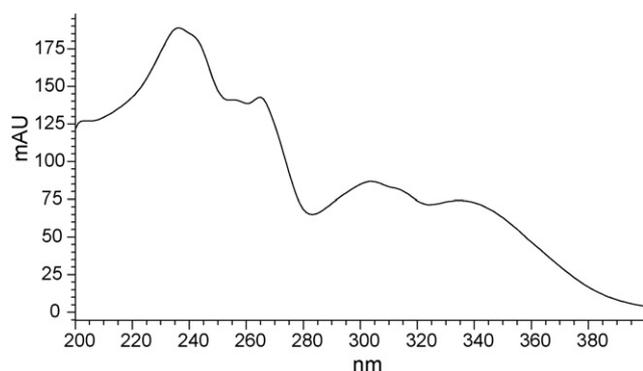
The lumefantrine contents were determined using the three methods and the obtained results were statistically compared using ANOVA test and Tukey's multiple comparison test, applied at 0.05 significance level.

### 3. Results and discussion

During the chromatographic method development, methanol showed to be a more adequate organic solvent than acetonitrile, regarding the lumefantrine retention. Acidification of the mobile phase with trifluoroacetic acid was necessary in order to assure that lumefantrine was completely in the ionized form and thus obtaining a satisfactory peak shape. Hence, using a mobile phase pH of 2.8 and a  $\text{C}_{18}$  column with about 19% hydrocarbon load, an adequate peak symmetry (tailing factor = 1.04) and short run time (6 min) were achieved, as demonstrated in the chromatogram of Fig. 2.

After the evaluation of the lumefantrine UV spectrum, in the range of 200–400 nm (Fig. 3), the wavelength of 335 nm was selected for detection, due to the adequate molar absorptivity of lumefantrine in this region and the higher selectivity of this wavelength regarding possible interfering compounds or solvents in the samples.

The non-aqueous potentiometric titration of lumefantrine showed a well-defined inflexion on the titration curve, precisely



**Fig. 3.** UV spectrum of lumefantrine sample solution at 24  $\mu\text{g/ml}$ , in methanol.

**Table 1**

Overview of the linearity data obtained for lumefantrine by the chromatographic and spectrophotometric methods

Regression parameters	HPLC	UV
Regression coefficient ( $r^2$ )	0.9999	0.9999
Slope $\pm$ standard error	34.06 $\pm$ 0.10	0.0291 $\pm$ 0.0001
Intercept $\pm$ standard error	1.70 $\pm$ 2.60	-0.0008 $\pm$ 0.0019
Relative standard error (%)	0.40	0.35
Concentration range ( $\mu\text{g/ml}$ )	12–36	12–36
Number of points	5	5

indicating the end point. The potentiometric determination was less subjective and more precise than the use of visual indicators, therefore this method was chosen for the analyses.

#### 3.1. Validation

A linear relationship was found between the lumefantrine concentrations and the response of both HPLC and UV methods. The regression analysis data are presented in Table 1. High regression coefficients ( $r^2$ ) values were obtained (0.9999 for both methods). A random pattern of the regression residues was found and no significant deviation of linearity was detected in the assayed range.

The precision data obtained for the evaluated methods are demonstrated in Table 2. All methods presented R.S.D. values lower than 2.0%, assuring a good precision. Potentiometric titration presented more precise results, compared to the instrumental methods.

Accuracy was investigated by means of a standard addition experiment. Both chromatographic and spectrophotometric methods exhibited mean recoveries ( $n=9$ ) close to 100% (Table 2), demonstrating an adequate accuracy.

In the evaluation of the specificity of the HPLC method, peak purities higher than 99.0% were obtained for lumefantrine in the chromatograms of sample solutions, demonstrating that other compounds did not co-elute with the main peak. The chromatogram obtained with the mixture of the tablet excipients showed no interfering peaks in the same retention time of lumefantrine. For the UV method, no absorption band was found at 335 nm, in the spectrum obtained with a mixture of the tablet excipients in methanol. Therefore, the method showed to be selective to quantify lumefantrine at this wavelength.

Considering the signal-to-noise ratio of 3 and 10, the LOD and LOQ obtained for the chromatographic method were 0.02 and 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. In the spectrophotometric analysis, at a concentration of 0.10  $\mu\text{g/ml}$  of lumefantrine, it was possible to identify the absorption band at 335 nm and the corresponding absorbance value was 0.004. Hence, this concentration was settled as the detection limit. The quantitation limit of the UV method was 0.30  $\mu\text{g/ml}$ , defined as the lower concentration that provided an adequate precision (R.S.D. < 2.0%) and absorbance value (0.010). According to the obtained results (Table 2), HPLC proved to be a more sensitive method, allowing the quantitation of lumefantrine in concentrations around five times lower than the UV method.

**Table 2**

Validation parameters of the evaluated methods for lumefantrine determination

Validation parameters	HPLC	UV	Potentiometric titration
Intra-day precision, $n=6$ (R.S.D., %)	0.45	0.65	0.29
Inter-day precision, $n=18$ (R.S.D., %)	0.67	0.62	0.46
Accuracy, $n=9$ (mean recovery, %)	99.42	98.81	–
LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.02	0.10	–
LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.05	0.30	–

**Table 3**  
Lumefantrine contents in raw material and tablet samples obtained by HPLC, UV and potentiometric titration ( $n = 12$ )

Samples	Lumefantrine content (%) $\pm$ S.D.		
	HPLC	UV	Potentiometric titration
Raw material	99.47 $\pm$ 0.60	99.05 $\pm$ 0.82	99.82 $\pm$ 0.27
Tablet	97.94 $\pm$ 0.67	98.03 $\pm$ 0.73	101.41 $\pm$ 0.63

S.D.: standard deviation.

### 3.2. Analysis of lumefantrine raw material and tablets

The validated chromatographic and spectrophotometric methods and the potentiometric titration were applied to the analysis of lumefantrine in raw material and Coartem<sup>®</sup> tablets (Table 3). ANOVA test revealed statistically significant difference between the results obtained for both raw material and tablets samples, from the distinct methods, at a confidence level of 0.05. Turkey's multiple comparison test demonstrated that, for the raw material analysis, the means obtained by HPLC and UV, as well as those obtained by HPLC and titration, were statistically equivalents ( $p > 0.05$ ); however, there was a significant difference between the values obtained by UV and titration ( $p < 0.05$ ). For the analysis of the tablets, Turkey's test revealed statistic equivalence between HPLC and UV means ( $p > 0.05$ ) and showed that the results of the titration method were statistically different from those obtained by HPLC and UV ( $p < 0.05$ ).

A higher mean lumefantrine content was found when potentiometric titration was applied to the tablet analyses. The presence of excipients with basic characteristic in the tablet matrix, such as magnesium stearate, might interfere in the titration process, leading to higher values. Hence, potentiometric titration with perchloric acid did not show to be an adequate method to quantify lumefantrine in tablets.

Regarding the raw material analyses, potential interferences were not identified in any of the evaluated methods, although non-aqueous titration and spectrophotometric analysis could quantify degradation products or related substances that present similar chemical structure [14]. Chromatographic analysis showed to be the most sensitive and selective method, and might be applied successfully for lumefantrine trace analysis and quantitation in biologic matrices. We cannot discharge, however, the analyses time and cost. The spectrophotometric method and non-aqueous titration are clearly less expensive and require shorter analysis time, besides the easily of handling.

Since the use of lumefantrine as a potent antimalarial drug is widespread around the malaria endemic areas, the development and validation of simple and reliable methods are essential to assure

the quality of the raw materials and pharmaceutical formulations marketed nowadays. The problem of counterfeit or substandard antimalarials is well established all over the world [15] and simple methods to identify and precisely quantify these drugs may be an important tool to avoid treatment inefficacy and development of resistance due to the exposition to subtherapeutic doses.

## 4. Conclusion

HPLC, UV spectrophotometry and potentiometric titration showed to be adequate methods to quantify lumefantrine in raw materials, while for the analyses of the tablets, the chromatographic and spectrophotometric methods presented the most reliable results. Since these methods are rapid and simple, they may be successfully applied to quality control analyses, with the aim of quantifying and identifying lumefantrine in pharmaceutical products.

## Acknowledgement

The authors would like to thank Brazilian Health Ministry, for the Coartem<sup>®</sup> donation, and CNPq, for the financial support.

## References

- [1] World Health Organization, WHO Expert Committee on Malaria, 20th Report, WHO Technical Report Series-892, Geneva, 2000, p. 71.
- [2] P.J. Guerin, P. Olliaro, F. Nosten, P. Druilhe, R. Laxminarayan, F. Binza, W.L. Kilama, N. Ford, N.J. White, *Lancet Infect. Dis.* 2 (2002) 564–573.
- [3] S.M. Mansor, V. Navaratnam, N. Yahaya, N.K. Nair, W.H. Wernsdorfer, P.H. Degen, *J. Chromatogr. B.* 682 (1996) 321–325.
- [4] F. Ezzet, M. Van Vugt, F. Nosten, S. Looareesuwan, N.J. White, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000) 697–704.
- [5] A.A. Omari, C. Gamble, P. Garner, *Trop. Med. Int. Health.* 9 (2004) 192–199.
- [6] R. Bakshi, I. Hermeling-Fritz, I. Gathmann, E. Alteri, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94 (2000) 419–424.
- [7] A. Martensson, J. Stromberg, C. Sisowath, M.I. Msellem, J.P. Gil, S.M. Montgomery, P. Olliaro, A.S. Ali, A. Bjorkman, *Clin. Infect. Dis.* 41 (2005) 1079–1086.
- [8] C.J. Sutherland, R. Ord, S. Dunyo, M. Jawara, C.J. Drakeley, N. Alexander, R. Coleman, M. Pinder, G. Walraven, G.A.T. Targett, *PLoS Med.* 2 (2005) 338–346.
- [9] World Health Organization, Antimalarial Drug Combination Therapy, Report of a WHO Technical Consultation, WHO, Geneva, 2001.
- [10] M. Zeng, Z. Lu, S. Yang, M. Zhang, J. Liao, S. Liu, X. Teng, *J. Chromatogr. B.* 681 (1996) 299–306.
- [11] N. Lindegardh, A. Annerberg, D. Blessborn, Y. Bergqvist, N. Day, N.J. White, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 1081–1088.
- [12] A. Annerberg, T. Singtoroj, P. Tipmanee, N.J. White, N.P.J. Day, N. Lindegardh, *J. Chromatogr. B.* 822 (2005) 330–333.
- [13] Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)—ICH harmonized tripartite guideline, in: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- [14] H.R.N. Marona, E.E.S. Schapoval, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001) 227–229.
- [15] M.D. Green, D.L. Mount, R.A. Wirtz, *Trop. Med. Int. Health.* 6 (2001) 980–982.



## Short communication

## Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection

Isabela da Costa César\*, Fernando Henrique Andrade Nogueira, Gérson Antônio Pianetti

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 February 2008

Received in revised form 9 May 2008

Accepted 20 May 2008

Available online 28 May 2008

## Keywords:

Artemether

Lumefantrine

Antimalarials

HPLC-UV

Fixed dose combination tablets

## ABSTRACT

This paper describes the development and validation of a HPLC-UV method (210 nm) for the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets. The method showed to be linear ( $r^2 > 0.99$ ), precise (R.S.D.  $< 2.0\%$ ), accurate (recovery of 101.07% for artemether and 101.58% for lumefantrine), specific and robust. Four batches of artemether–lumefantrine tablets were assayed by the validated method. The artemether contents in the tablets varied from 98.61% to 103.35%, while lumefantrine contents were 97.92–100.48%.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Malaria is the world's most important parasitic infection, ranking among the major health and developmental challenges for the poor countries of the world [1]. One of the greatest challenges facing malaria control worldwide is the spread and intensification of parasite resistance to antimalarial drugs. The limited number of such drugs has led to increasing difficulties in the development of antimalarial drug policies and adequate disease management [2].

Artemisinin-based combination therapy (ACT) is increasingly being advocated as promising treatment. ACT is based on the use of two drugs with different modes of action: an artemisinin-derivative that causes rapid and effective reduction of parasite biomass and gametocyte carriage and a partner drug that has a longer duration of action [3].

Artemether–lumefantrine is an ACT widely used nowadays and consists of a registered fixed dose combination of artemether (20 mg) and lumefantrine (120 mg) in tablets (Fig. 1). The rationale is that artemether will rapidly reduce parasitemia, resulting in symptomatic relief, and lumefantrine will eliminate the remaining parasites [4]. World Health Organization (WHO) recommends this association as first line therapy for falciparum malaria in endemic areas [5].

The increasing use of artemether–lumefantrine association as an effective treatment for resistant malaria demands the need of analytical methods to simultaneously quantify these drugs in tablets in order to evaluate its quality. Some papers have described the analysis of artemether in plasma, based on HPLC with electrochemical [6–8] or mass spectrometry detection [9]. Few methods are available to assay artemether in pharmaceutical products [10,11]. The quantitative determination of lumefantrine in plasma has been described using HPLC with UV detection [12–15]. However, there is no method reported regarding the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine.

Hence, the aim of this study was to develop and validate a HPLC method, using UV detection, to simultaneously quantify artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets. Due to the low molar absorptivity of artemether in the UV region (210 nm), and the lower concentration of this drug in the tablets compared to lumefantrine, standard addition of artemether was carried out to improve its detection. The validated method was applied to the analysis of tablets containing the artemether–lumefantrine association (20 + 120 mg).

## 2. Experimental

## 2.1. Reagents and materials

Artemether and lumefantrine reference standards were purchased from Dafra Pharma (Turnhout, Belgium). Coartem® (Novartis, Basel, Switzerland) tablets were kindly donated by

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 34096982; fax: +55 31 34096976.  
E-mail address: [isaccesar@bol.com.br](mailto:isaccesar@bol.com.br) (I.d.C. César).

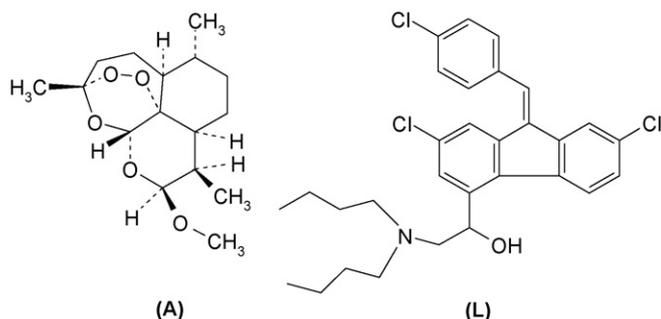


Fig. 1. Chemical structures of artemether (A) and lumefantrine (L).

Brazilian Health Ministry and Co-artesiane<sup>®</sup> tablets were purchased from Dafra Pharma (Turnhout, Belgium). Ultra-pure water was obtained from a Millipore system (Bedford, MA, USA). Acetonitrile, trifluoroacetic acid and chloroform (HPLC grade) were obtained from Tedia (Fairfield, OH, USA).

## 2.2. Instrumental and analytical conditions

The HPLC analyses were carried out on an Agilent 1200 system (Palo Alto, CA, USA), composed of a quaternary pump, autosampler, diode array detector (DAD) and HP ChemStation software. The columns evaluated were a Zorbax SB-Ciano (150 × 4.6 mm i.d.; 5 μm particle size) from Agilent (Santa Clara, CA, USA) and a Symmetry C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm i.d.; 5 μm particle size) from Waters (Milford, MA, USA), both maintained at 30 °C. UV detection was performed at 210 nm. UV spectra from 190 to 400 nm were online recorded for peak identification. The injection volume was 20 μl. An isocratic mobile phase containing acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid (60:40, v/v) was used at a flow rate of 1.0 ml/min. The separation of artemether and lumefantrine was evaluated in different proportions of these solvents and, for each condition, retention factor (*k*) and resolution (*R*) were calculated. In order to determine *k*, *t*<sub>0</sub> was estimated by injecting a 0.01% (w/v) NaNO<sub>3</sub> solution in mobile phase onto the chromatograph. The optimized condition was achieved using the Zorbax SB-Ciano column and a mobile phase composed of acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid (60:40), pH 2.35.

## 2.3. Preparation of standard solutions

### 2.3.1. Artemether–lumefantrine standard solution

Approximately 40 mg of artemether and 30 mg of lumefantrine reference standards were accurately weighed and transferred to a 100 ml volumetric flask. Chloroform (2 ml) was added to ensure complete solubilization, followed by the addition of 80 ml of acetonitrile. The volume was filled to the mark with 0.05% trifluoroacetic acid, to obtain a solution at 400 μg/ml of artemether and 300 μg/ml of lumefantrine.

### 2.3.2. Artemether stock solution

Approximately 175 mg of artemether reference standard was accurately weighed and transferred to a 100 ml volumetric flask. Chloroform (2 ml) was added to ensure complete solubilization and the flask volume was completed with acetonitrile. The final concentration was 1750 μg/ml of artemether.

### 2.3.3. Artemether work solution

An aliquot of 10 ml of artemether stock solution was transferred to a 50 ml volumetric flask and the volume was adjusted with mobile phase, to obtain a solution at 350 μg/ml of artemether.

## 2.4. Analysis of fixed dose combination tablets

Three different batches of Coartem<sup>®</sup> and one batch of Co-artesiane<sup>®</sup> were analyzed using the validated method. Artemether standard was added to the samples, with the aim of increasing the peak area of artemether in the chromatograms and thereby improving the detection of this compound. Due to the poor solubility of lumefantrine, chloroform was added to ensure the complete solubilization of the samples. For the analysis, six replicates of each batch were assayed. The tablets were weighed and finely powdered. An accurately weighed portion of the powder, equivalent to about 25 mg of artemether and 150 mg of lumefantrine, was transferred to a 100 ml volumetric flask followed by the addition of 5 ml of chloroform. The solution was sonicated for 3 min and diluted with acetonitrile to volume. An aliquot of 10 ml of this solution was transferred to a 50 ml volumetric flask and 10 ml of the artemether stock solution (described in Section 2.3) was added. The volume was adjusted with mobile phase. An artemether work solution was also prepared by diluting 10 ml of the artemether stock solution to 50 ml with mobile phase. To calculate artemether content in the tablets, the peak area of artemether obtained in the artemether work solution was subtracted from the peak area of artemether obtained in the sample solutions. The difference corresponds to the amount of artemether originally present in the tablet samples.

## 2.5. Validation

### 2.5.1. Linearity

Standard solutions containing 750 μg/ml of lumefantrine were prepared, in triplicate. Aliquots of these solutions were diluted in mobile phase to five different concentrations, corresponding to 150, 225, 300, 375 and 450 μg/ml of lumefantrine. For the artemether, solutions were prepared using the standard addition procedure. Stock sample solutions containing 250 μg/ml of artemether were prepared in triplicate. An aliquot of these sample solutions was diluted in mobile phase and 10 ml of artemether stock solution, corresponding to 350 μg/ml of artemether, was added. Therefore, the final concentrations were 375, 387.5, 400, 412.5 and 425 μg/ml of artemether. Calibration curves for concentration versus peak area were plotted for each compound and the obtained data were subjected to regression analysis using the least squares method with a weighting factor of 1/*x*.

### 2.5.2. Precision

The intra-day precision was evaluated by analyzing six sample solutions (*n* = 6), at the final concentration of analyses (400 μg/ml of artemether and 300 μg/ml of lumefantrine). Similarly, the inter-day precision was evaluated in three consecutive days (*n* = 18). The artemether and lumefantrine concentrations were determined and the relative standard deviations (R.S.D.) were calculated.

### 2.5.3. Accuracy

Artemether and lumefantrine reference standards were accurately weighed and added to a mixture of the tablet excipients, at three different concentration levels (300, 400 and 500 μg/ml of artemether and 225, 300 and 375 μg/ml of lumefantrine). At each level, samples were prepared in triplicate and the recovery percentage was determined.

### 2.5.4. Specificity

Spectral purities of artemether and lumefantrine chromatographic peaks were evaluated using the UV spectra recorded by a diode array detector. In addition, a solution containing a mixture

**Table 1**  
Chromatographic parameters for artemether and lumefantrine at different mobile phase compositions using a Zorbax SB-Ciano column

Mobile phase composition, Acetonitrile:0.05% trifluoroacetic acid	Artemether retention factor ( <i>k</i> )	Lumefantrine retention factor ( <i>k</i> )	Resolution ( <i>R</i> )
80:20	0.32	0.28	0.00
75:25	0.38	0.36	0.00
70:30	0.48	0.56	0.00
65:35	0.63	0.91	0.54
60:40	0.86	1.53	2.38
55:45	1.14	2.19	3.23

of the tablet excipients was prepared using the sample preparation procedure and injected onto the chromatograph, to evaluate possible interfering peaks.

### 2.5.5. Robustness

Six sample solutions were prepared and analyzed under the established conditions and by variation of the following analytical parameters: flow rate of the mobile phase (0.8, 1.0 and 1.2 ml/min), acetonitrile proportion in mobile phase (58%, 60% and 62%), mobile phase pH (2.15, 2.35 and 2.55) and column temperature (25, 30 and 35 °C). The artemether and lumefantrine contents were determined for each condition and the obtained data were submitted for statistical analysis (ANOVA test).

### 2.5.6. Detection and quantitation limits

Combined standard solutions were prepared by sequential dilutions and injected onto the chromatograph, at decreasing concentrations, in the range of 0.13–15 µg/ml of artemether and 0.10–11.25 µg/ml of lumefantrine. The limit of detection was defined as the concentration for which a signal-to-noise ratio of 3 was obtained and, for quantitation limit, a signal-to-noise ratio of 10 was considered.

## 3. Results and discussion

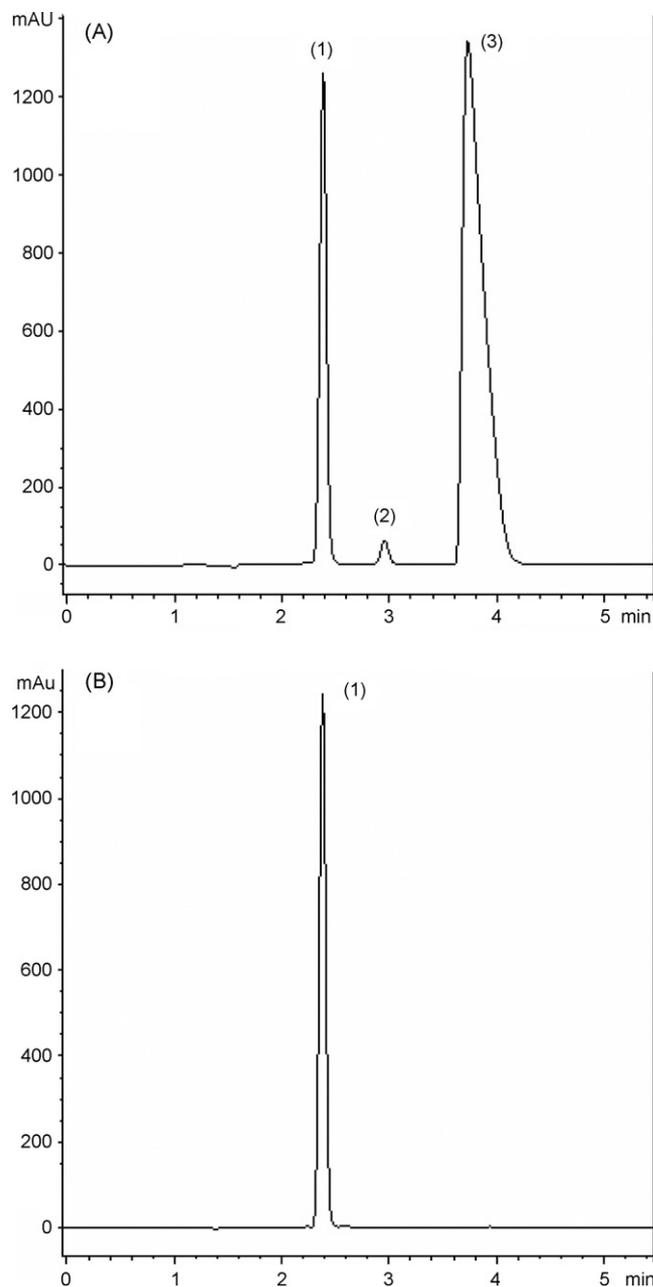
The chromatographic parameters were initially evaluated using a Symmetry C<sub>18</sub> column and a mobile phase composed of acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid (80:20). Under these conditions, the retention factors obtained for artemether and lumefantrine were 5.05 and 0.61, respectively. In spite of achieving a good resolution, this condition exhibited a long run time, since artemether peak was eluted after 9 min. Hence, the Symmetry C<sub>18</sub> was substituted by a Zorbax SB-Ciano column. Using this column, different proportions of mobile phase solvents were evaluated, to obtain an adequate resolution between artemether and lumefantrine peaks (Table 1). The mobile phase composed of acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid (60:40) promoted an adequate separation (*R*=2.38), and a short run time (5 min), and so, this condition was adopted in subsequent analyses (Fig. 2A).

Artemether shows UV absorption only in the initial wavelengths of the spectrum (200–220 nm), due to the absence of chromophores in its structure. Nevertheless, the artemether absorptivity is considerably low in this region, resulting in HPLC-UV methods with poor sensitivity. Hence, a HPLC method with UV detection was developed by means of artemether standard addition to the sample solutions. This approach allowed an adequate artemether detection and consequently quantitation at 210 nm.

### 3.1. Validation

#### 3.1.1. Linearity

A linear correlation was found between the peak areas and the concentrations of artemether and lumefantrine, in the assayed range. The regression analysis data are presented in Table 2. The



**Fig. 2.** Chromatograms obtained for (A) a sample solution at 400 µg/ml of artemether and 300 µg/ml of lumefantrine and (B) a mixture of the tablet excipients, using a Zorbax SB-Ciano column (150 × 4.6 mm i.d.; 5 µm) and a mobile phase composed of acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid (60:40), at a flow rate of 1.0 ml/min. Detection was performed at 210 nm. Peak assignment: (1) chloroform; (2) artemether and (3) lumefantrine.

regression coefficients (*r*<sup>2</sup>) obtained were higher than 0.99 for both compounds, which attest the linearity of the method.

#### 3.1.2. Precision

Mean contents of artemether and lumefantrine in the intraday precision analysis (*n*=6) were 405.95 µg/ml (R.S.D.=1.23%) and 297.03 µg/ml (R.S.D.=0.89%), respectively. For the inter-day precision (*n*=18), the mean contents obtained were 406.92 µg/ml (R.S.D.=1.07%) and 297.35 µg/ml (R.S.D.=0.89%) for artemether and lumefantrine, respectively. R.S.D. values, lower than 2.0%, assure the precision of the method.

**Table 2**  
Calibration curve data for artemether and lumefantrine

Regression parameters	Artemether	Lumefantrine
Regression coefficient, $r^2$	0.9984	0.9998
Slope $\pm$ standard error	1.08 $\pm$ 0.01	56.80 $\pm$ 0.24
Intercept $\pm$ standard error	-100.61 $\pm$ 4.74	192.65 $\pm$ 76.25
Relative standard error (%)	0.25	0.57
Concentration range ( $\mu\text{g/ml}$ )	375–425	150–450
Number of points	5	5

### 3.1.3. Accuracy

It was investigated by means of addition of artemether and lumefantrine reference standards to a mixture of the tablet excipients. Artemether mean recovery ( $n=9$ ) was 101.07% (R.S.D. = 0.52%) and lumefantrine mean recovery was 101.58% (R.S.D. = 0.25%), demonstrating the accuracy of the method.

### 3.1.4. Specificity

Peak purities higher than 99.0% were obtained for artemether and lumefantrine in the chromatograms of sample solutions, demonstrating that other compounds did not co-elute with the main peaks. The chromatogram obtained with the mixture of the tablet excipients showed no interfering peaks in the same retention time of artemether and lumefantrine (Fig. 2B).

### 3.1.5. Robustness

Statistical analysis showed no significant difference between results obtained employing the analytical conditions established for the method and those obtained in the experiments in which variations of some parameters were introduced. Thus, the method showed to be robust for changes in mobile phase flow rate from 0.8 to 1.2 ml/min, acetonitrile proportion from 58% to 62%, mobile phase pH in the range of 2.15–2.55 and column temperature from 25 to 35 °C.

### 3.1.6. Detection and quantitation limits

According to the determined signal-to-noise ratio, artemether and lumefantrine presented limits of detection of 5 and 0.1  $\mu\text{g/ml}$  and limits of quantitation of 15 and 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. However, the objective of the method is the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine, so that the values obtained for artemether should be considered as the limit of method sensitivity. Hence, the detection limit established was 5  $\mu\text{g/ml}$  of artemether and 3.75  $\mu\text{g/ml}$  of lumefantrine and the quantitation limit was 15  $\mu\text{g/ml}$  of artemether and 11.25  $\mu\text{g/ml}$  of lumefantrine, the same compounds proportion found in the sample solutions injected onto the chromatograph.

### 3.2. Analysis of fixed dose combination tablets

Samples of fixed dose combination tablets (Coartem<sup>®</sup> and Co-artesiane<sup>®</sup>) containing 20 mg of artemether and 120 mg of lumefantrine were analyzed using the validated method. The results obtained are presented in Table 3. All analyzed batches presented artemether and lumefantrine contents very close to the labeled amount. The artemether content in the tablet samples varied from 98.61% to 103.35%, while lumefantrine content varied from 97.92% to 100.48%.

The development of simple and reliable methods is essential to assure the identification and quantitative determination of antimalarial drugs, since the problem of counterfeit or substandard

**Table 3**

Contents of artemether and lumefantrine in the fixed dose combination tablets ( $n=6$ )

Sample tablet	Batch	Content (%) $\pm$ S.D.	
		Artemether	Lumefantrine
Coartem <sup>®</sup>	A	101.69 $\pm$ 1.09	99.02 $\pm$ 0.63
	B	103.35 $\pm$ 1.25	97.92 $\pm$ 0.24
	C	98.61 $\pm$ 0.59	98.89 $\pm$ 0.53
Co-artesiane <sup>®</sup>	A	101.71 $\pm$ 1.00	100.48 $\pm$ 0.23

S.D. = standard deviation.

antimalarials is well established all over the world. The use of these poor quality drugs might contribute to the development of plasmodium resistance in endemic areas due to the exposition to anti-infective subtherapeutic doses [10,11]. The quality control of the antimalarial pharmaceutical preparations marketed nowadays may help to assure the treatment efficacy and avoid the development of resistance to antimalarial drugs.

## 4. Conclusion

This study was the first report of simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets. The developed method showed to be a simple and suitable technique to quantify these antimalarials and might be employed for quality control analysis, as well as in further studies in other matrices, such as plasma. The artemether–lumefantrine tablets analyzed by the validated method showed adequate quality and drug contents in concordance with the labeled amount.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Brazilian Health Ministry, for the Coartem<sup>®</sup> donation, and CNPq, for the financial support.

## References

- [1] P.J. Guerin, P. Olliaro, F. Nosten, P. Druilhe, R. Laxminarayan, F. Binza, W.L. Kilama, N. Ford, N.J. White, *Lancet Infect. Dis.* 2 (2002) 564–573.
- [2] World Health Organization, WHO Expert Committee on Malaria, 20th Report, WHO Technical Report Series – 892, Geneva, 2000, p. 71.
- [3] A. Martensson, J. Stromberg, C. Sisowath, M.I. Msellem, J.P. Gil, S.M. Montgomery, P. Olliaro, A.S. Ali, A. Bjorkman, *Clin. Infect. Dis.* 41 (2005) 1079–1086.
- [4] A.A. Omari, C. Gamble, P. Garner, *Trop. Med. Int. Health* 9 (2004) 192–199.
- [5] World Health Organization, Antimalarial Drug Combination Therapy, Report of a WHO Technical Consultation, WHO, Geneva, 2001.
- [6] V. Navaratnam, S.M. Mansor, L.K. Chin, M.N. Mordi, M. Asokan, N.K. Nair, *J. Chromatogr. B* 669 (1995) 289–294.
- [7] J. Karbwang, K. Na-bangchang, P. Molunto, V. Banmairuroi, K. Congpuong, *J. Chromatogr. B* 690 (1997) 259–265.
- [8] N. Sandrenan, A. Sioufi, J. Godbillon, C. Netter, M. Donker, V. Valkenburg, *J. Chromatogr. B* 691 (1997) 145–153.
- [9] C. Souppart, N. Gauducheau, N. Sandrenan, F. Richard, *J. Chromatogr. B* 774 (2002) 195–203.
- [10] M.D. Green, D.L. Mount, R.A. Wirtz, *Trop. Med. Int. Health* 6 (2001) 980–982.
- [11] M.A. Atemnkeng, K. De Cock, J. Plaisier-Vercammen, *Trop. Med. Int. Health* 12 (2007) 68–74.
- [12] M. Zeng, Z. Lu, S. Yang, M. Zhang, J. Liao, S. Liu, X. Teng, *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 299–306.
- [13] S.M. Mansor, V. Navaratnam, N. Yahaya, N.K. Nair, W.H. Wernsdorfer, P.H. Degen, *J. Chromatogr. B* 682 (1996) 321–325.
- [14] N. Lindegardh, A. Annerberg, D. Blessborn, Y. Bergqvist, N. Day, N.J. White, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 1081–1088.
- [15] A. Annerberg, T. Singtoroj, P. Tipmanee, N.J. White, N.P.J. Day, N. Lindegardh, *J. Chromatogr. B* 822 (2005) 330–333.

## Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test

Isabela da Costa César\*, Gerson Antônio Pianetti

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

Youden's test is a reliable method to evaluate the robustness of analytical methods, by means of an experiment design which involves seven analytical parameters combined in eight tests. In the present study, we assessed the robustness of a chromatographic method to quantify lumefantrine in raw material samples, using Youden's test. Hence, it was possible to determine the effect of each analytical parameter in the final analysis results. Youden's test showed to be a simple and feasible procedure to evaluate the robustness of chromatographic methods.

**Uniterms:** Lumefantrine/determination. Youden's test. High Performance Liquid Chromatography/quantitative analysis.

O teste de Youden constitui um método confiável para avaliação da robustez de métodos analíticos, por meio de um delineamento que envolve sete parâmetros analíticos combinados em oito experimentos. No presente estudo, a robustez de um método cromatográfico para quantificação de lumefantrina em matéria-prima farmacêutica foi avaliada utilizando-se o teste de Youden. Assim, foi possível determinar o efeito de cada parâmetro analítico nos resultados finais das análises. O teste de Youden se mostrou um procedimento simples e confiável para a avaliação da robustez de métodos cromatográficos.

**Unitermos:** Lumefantrina/determinação. Teste de Youden. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/análise quantitativa.

### INTRODUCTION

In pharmaceutical analysis, often an intensive method validation is required, in order to meet the strict regulations set by the regulatory authorities. In this context, nowadays, robustness testing is gaining interest and becoming increasingly more important. In the past, these tests were often not performed due to their complexity, to the many possible experimental set-ups (usually by experimental designs) and analysis methods, and also due to the lack of guidelines (Dejaegher, Heyden, 2007).

The robustness of an analytical method is the measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method parameters, and provides an indication of its reliability during normal usage. The robustness of a chromatographic method, for example,

may be evaluated by variations in parameters such as mobile phase composition, pH and ionic strength, temperature and different lots or suppliers of columns (ICH, 1996; Brasil, 2003; The United States Pharmacopoeia, 2007). The evaluation of robustness should be considered during the method development phase. In fact, the process of validating a method cannot be separated from the actual development of the method conditions, since it is not possible to know whether the method conditions are acceptable until validation studies are performed. The development and validation of a new analytical method may therefore be an iterative process (Green, 1996).

The evaluation of the robustness of chromatographic methods often is complex and laborious, taking into account the large number of analytical parameters that should be considered to carry out the test. Some authors select specific analytical parameters to be evaluated, introducing small variations in the nominal conditions and the statistical interpretation is performed by means of Student's *t*-test or ANOVA test (Dejaegher, Heyden, 2007).

\*Correspondence: I. C. César. Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Pres. Antônio Carlos 6627 - 31270-901 - Belo Horizonte - MG, Brasil. E-mail: isaccesar@bol.com.br



volumetric flask and the volume was adjusted with mobile phase.

### Robustness evaluation by means of Youden's test

The robustness evaluation of the chromatographic method for the lumefantrine quantitation was performed using the method proposed by Youden e Steiner (1975). Seven analytical parameters were selected and small variations were induced in the nominal values of the method. Then, eight runs were performed aiming to determine the influence of each parameter in the final result. The seven analytical parameters employed, as well as the introduced variations are demonstrated at Table I. The analytical conditions at the nominal values are represented by capital letters and the conditions with the small variation are represented by lowercase letters.

The seven parameters and its respective variations were combined in eight assays or chromatographic runs, performed in a random order. Table II demonstrates the factorial combination of the parameters for the Youden's test. The analyses results are shown by letters from *s* to *z*. Hence, when combination 1 was assayed, the obtained

result was *s*. When combination 2 was assayed, the obtained result was *t*, and so successively.

In each combination, three injections of each sample and standard solutions were carried out, at the work concentration (24 µg/ml). After the change of chromatographic column or mobile phase composition, 30 min were awaited for system stabilization. The evaluated results in each combination were peak area, retention time (Rt), tailing factor (T), theoretical plates number (N) and lumefantrine content.

To determine the influence of variations of each parameter in the final result, the mean of the four values corresponding to the capital letters (nominal conditions) was compared to the mean of the four values corresponding to the lowercase letters (altered conditions). For example, to evaluate the effect of the column temperature in the final result of the analyses, the following equation was employed:

$$\text{Effect } C/c = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4} \quad \text{Eq. (1)}$$

Thus, the influence of the seven analytical parameters regarding the peak area, retention time (Rt), tailing factor

**TABLE I** – Analytical parameters and variations for the robustness evaluation of the chromatographic method for lumefantrine quantitation

	Parameter	Nominal condition			Variation		
A/a	Methanol concentration in mobile phase	80%	-	A	77%	-	a
B/b	Mobile phase pH	2.8	-	B	3.1	-	b
C/c	Column temperature	30 °C	-	C	35 °C	-	c
D/d	Mobile phase flow rate	1.0	-	D	1.2	-	d
E/e	Column supplier	Symmetry	-	E	Ace	-	e
F/f	Methanol supplier	Tedia	-	F	J.T. Baker	-	f
G/g	Chromatograph model	Agilent 1200	-	G	HP 1100	-	g

**TABLE II** – Factorial combination of the analytical parameters for robustness evaluation by Youden's test

Analytical parameter	Factorial combination							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Methanol concentration	A	A	A	A	a	a	a	a
Mobile phase pH	B	B	b	b	B	B	b	b
Column temperature	C	c	C	c	C	c	C	c
Mobile phase flow rate	D	D	d	d	d	d	D	D
Column supplier	E	e	E	e	e	E	e	E
Methanol supplier	F	f	f	F	F	f	f	F
Chromatograph model	G	g	g	G	g	G	G	g
<b>Result</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

(T), theoretical plates number (N) and lumefantrine content were evaluated. By means of Youden's test, it is possible to establish certainly the parameters which present higher influence in the final result of the analyses and perform a more rigorous control in the eventual variations of these parameters that may occur during a routine analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

The assays for the robustness evaluation of the chromatographic method were carried out simultaneously in both equipments, Agilent 1200 e HP1100. A Symmetry column was initially tested in Agilent 1200 chromatograph, while the analyses were performed with Ace column

at HP1100 chromatograph. Afterward, the columns were changed in the equipments.

The results obtained in the eight runs to the lumefantrine sample and standard solutions are demonstrated in Table III. The values presented in the table represent the average of three injections of each solution.

To evaluate the effect of each parameter, the average of the four values corresponding to altered conditions was subtracted from the average of the four values obtained at the nominal conditions, as demonstrated in Eq. (1). The effects of the parameter variations in the analysis results are presented in Table IV.

Using the criteria of Youden's test, the chromatographic method showed to be highly robust regarding the

**TABLE III** – Results obtained in eight runs performed for robustness evaluation, for lumefantrine sample (Sam.) and standard (Stan.) solutions

Condition	Area		Retention time		Tailing factor		N		Content (%)
	Sam.	Stan.	Sam.	Stan.	Sam.	Stan.	Sam.	Stan.	
1	858	839	4.91	4.40	1.06	0.94	4730	4433	99.63
2	876	855	6.71	6.67	1.95	1.92	5254	5276	99.80
3	727	709	3.89	3.89	1.04	1.04	3924	3927	99.85
4	719	703	5.63	5.61	2.57	2.56	3433	3418	99.63
5	726	711	10.26	10.25	1.92	1.90	5350	5456	99.48
6	710	694	5.66	5.60	1.09	1.09	4509	4403	99.64
7	857	838	12.27	11.75	2.54	3.00	5056	3598	99.60
8	870	852	4.55	4.40	1.05	1.02	5020	4467	99.51

**TABLE IV** – Effects of the analytical parameters in content, retention time (Rt), tailing factor (T) and theoretical plates number (N) of the chromatographic method for lumefantrine quantitation

Effect	Content (%)*	Rt (min)*	Tailing factor*	N*
Methanol concentration (A = 80%; a = 77%)	99.73 – 99.56 = <b>0.17</b>	5.14 – 8.00 = <b>-2.86</b>	1.62 – 1.75 = <b>-0.14</b>	4263 – 4481 = <b>-218</b>
Mobile phase pH (B = 2.8; b = 3.1)	99.64 – 99.65 = <b>-0.01</b>	6.73 – 6.41 = <b>0.32</b>	1.46 – 1.90 = <b>-0.44</b>	4892 – 3853 = <b>1039</b>
Column temperature (C = 30 °C; c = 35 °C)	99.64 – 99.65 = <b>-0.01</b>	7.57 – 5.57 = <b>2.00</b>	1.72 – 1.65 = <b>0.07</b>	4353 – 4391 = <b>-38</b>
Mobile phase flow rate (D = 1.0 ml/min; d = 1.2 ml/min)	99.64 – 99.65 = <b>-0.01</b>	6.81 – 6.34 = <b>0.47</b>	1.72 – 1.65 = <b>0.07</b>	4443 – 4301 = <b>142</b>
Column supplier (E = Symmetry, e = Ace)	99.66 – 99.63 = <b>0.03</b>	4.57 – 8.57 = <b>-4.00</b>	1.02 – 2.34 = <b>-1.32</b>	4308 – 4437 = <b>-129</b>
Methanol supplier (F = Tedia; f = J.T. Baker)	99.56 – 99.72 = <b>-0.16</b>	6.17 – 6.98 = <b>-0.81</b>	1.61 – 1.76 = <b>-0.16</b>	4443 – 4301 = <b>142</b>
Chromatograph model (G = Agilent 1200; g = HP1100)	99.63 – 99.66 = <b>-0.03</b>	6.84 – 6.30 = <b>0.54</b>	1.90 – 1.47 = <b>0.43</b>	3963 – 4782 = <b>-819</b>

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

lumefantrine content, when variations in seven analytical parameters were introduced. The highest variation in the lumefantrine content was 0.17%, when the concentration of methanol in the mobile phase was altered; a value considerably low and not significant in routine analyses.

The retention time of lumefantrine peak was more considerably influenced by three analytical parameters. The decrease of the methanol concentration reduced the eluent strength of the mobile phase and induced the increase of the retention time of the lumefantrine peak. The change of column supplier promoted the same effect. In spite of both columns possess the same stationary phase (octadecyl silane chemically bonded to silica) and the same length (250 mm), changes in the supplier or even in the batch of the columns may result in significant alterations in the stationary phase selectivity. In addition, the change of the column supplier promoted also an increase of the tailing factor, due to the selectivity alteration and band broadening that is observed with the increase of retention time.

The increase of column temperature from 30 °C to 35 °C induced a reduction of 2 minutes in the retention time of the lumefantrine peak. In this case, a special care must be taken, since the combination of high temperatures with pH values close to the work limits of the column (such as pH 2.8) may reduce its useful life due to the silica hydrolysis in the stationary phase.

The apparent pH of the mobile phase presented considerable effect in the peak tailing factor. The use of a mobile phase with apparent pH of 2.8 assures the complete ionization of lumefantrine, which is a weak base. The increase of the mobile phase pH may alter the ionization, so that the analyte will be partially non ionized, resulting in peak tailing. The chromatograph model was another parameter that demonstrated influence on tailing factor. This fact may be due to a dead volume in the connections between the equipment modules.

The number of the theoretical plates is a parameter that takes into account the retention time, as well as the band broadening of the analyte peak. High retention times and low band broadening provide an elevate column efficiency. Thus, it was possible to observe a direct correlation between the theoretical plates number and the retention time and tailing factor in the results of Table IV. The increase of the apparent pH of the mobile phase, for example, promoted an increase in the tailing factor and consequently a significant decrease in the theoretical plates number, indicating reduction of the column efficiency. The change of the chromatograph model presented the inverse effect, i.e., tailing factor decrease and so, increase of the-

oretical plates number. The alteration of column supplier did not promote significant variations in the theoretical plates number, probably because the increase of the tailing factor was compensated by the considerable increase of the retention time.

Some parameters such as mobile phase flow rate and methanol supplier presented low influence in the evaluated factors of the chromatographic method.

## CONCLUSION

Youden's test showed to be a reliable and useful tool for the robustness evaluation of the chromatographic method for lumefantrine quantitation in raw material. By means of this test, it was possible to evaluate the effect of seven analytical parameters in the final result of the analyses, performing only eight runs. Therefore, Youden's test can be successfully applied for the robustness evaluation in validation process of analytical methods by HPLC.

## REFERENCES

- ANNERBERG, A.; SINGTOROJ, T.; TIPMANEE, P.; WHITE, N. J.; DAY, N. P. J.; LINDEGARDH, N. High throughput assay for the determination of lumefantrine in plasma. *J. Chromatogr. B*, v.822, n.1-2, p.330-333, 2005.
- BAKSHI, R.; HERMELING-FRITZ, I.; GATHMANN, I., ALTERI, E. An integrated assessment of the clinical safety of artemether-lumefantrine: a new oral fixed-dose combination antimalarial drug. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.94, n.4, p.419-424, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 31 mai 2003. Available at: < <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>. Access on: 28 abr. 2006.
- 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. Brasília: Editora MS, 2006. p 1-4.
- CÉSAR, I.C.; NOGUEIRA, F.H.A.; PIANETTI, G.A. Comparison of HPLC, UV spectrophotometry and potentiometric titration methods for the determination of lumefantrine in pharmaceutical products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.48, n.3, p.223-226, 2008.

- DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. *J. Chromatogr. A*, v.1158, n.1-2, p.138-157, 2007.
- GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.*, v.68, n.1, p.305-309, 1996.
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008*. Rio de Janeiro, março de 2003. Available at: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf)> Access on: 02 jul. 2007.
- INTERNATIONAL Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Methodology – Q2B*. Geneva, November 1996. Available at: <<http://www.ich.org>>. Access on: 23 jul. 2006.
- LINDEGARDH, N.; ANNERBERG, A.; BLESSBORN, D.; BERGQVIST, Y.; DAY, N.; WHITE, N. J. Development and validation of a bioanalytical method using automated solid-phase extraction and LC-UV for the simultaneous determination of lumefantrine and its desbutyl metabolite in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.37, n.5, p.1081-1088, 2005.
- MANSOR, S. M.; NAVARATNAM, V.; YAHAYA, N.; NAIR, N. K.; WERNSDORFER, W. H.; DEGEN, P. H. Determination of a new antimalarial drug, benflumetol, in blood plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v.682, n.2, p.321-325, 1996.
- MARTENSSON, A.; STROMBERG, J.; SISOWATH, C.; MSELLEM, M. I.; GIL, J. P.; MONTGOMERY, S. M.; OLLIARO, P.; ALI, A. S.; BJORKMAN, A. Efficacy of artesunate plus amodiaquine versus that of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated childhood *Plasmodium falciparum* malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clin. Infect. Dis.*, v.41, n.8, p.1079-1086, 2005.
- SUTHERLAND, C. J.; ROSALYNN, O.; DUNYO, S.; JAWARA, M.; DRAKELEY, C. J.; ALEXANDER, N.; COLEMAN, R.; PINDER, M.; WALRAVEN, G.; TARGETT, G. A. T. Reduction of malaria transmission to *Anopheles* mosquitoes with a six-dose regimen of co-artemether. *Plos Med.*, v.2, n.4, p.338-346, 2005.
- THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 30. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007. 3504 p.
- YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. *Statistical manual of AOAC* – Association of Official Analytical Chemistry. Washington: AOAC, 1975. 88 p.

Received for publication on 08<sup>th</sup> july 2008

Accepted for publication on 12<sup>th</sup> september 2008



---

**Pedido de versão em inglês-BJPS-Aceite**

De: **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**  
Para: **Isabela**  
Assunto: Pedido de versão em inglês-BJPS-Aceite  
Data: 01/04/2009 16:20  
[Trab139-08-Corrigido.doc 89.75 KB](#)

---

Prezado autor,

Cumpre-nos informar que, a partir de 2009, completados 10 anos de sua reformulação editorial, a **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, iniciará nova fase em sua edição. Passará a ser denominada apenas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, publicando artigos somente em língua inglesa.

Esta decisão tem o objetivo de fazer com que o periódico alcance maior penetração no Exterior, consolidando-se como principal veículo de divulgação das Ciências Farmacêuticas no Brasil e possibilitando maior abrangência internacional. Tal fato facilitará sua indexação em bases como ISI Thompson, por exemplo, com medida de índices de impacto, fator utilizado para qualificar as publicações no meio acadêmico.

Face ao exposto, vimos solicitar-lhe o **envio de versão em inglês** do **Trab139-08**, de sua autoria, que **foi aceito para publicação**, para sua inserção nos fascículos que serão editados que comporão o volume 45, 2009.

Informamos, que a partir deste ano, só estamos aceitando submissão de trabalhos na língua inglesa, em atendimento à nova política editorial.

Colocamo-nos à disposição para os esclarecimentos que se fizerem necessários.

Aproveito para já indicar-lhes especialista em língua inglesa que temos sugerido aos autores.

Sr. Fábio Amaral Di Fini

Tel. (11) 4051-2800 e 8373-2933

E-mail: [biopharma@write.me.com](mailto:biopharma@write.me.com)

[biopharma@globo.com](mailto:biopharma@globo.com)

[pesquisa.clinica@gmail.com](mailto:pesquisa.clinica@gmail.com)

Agradecemos, desde já, a atenção de V. Sa.

Meus cumprimentos.

Leila R. de Carvalho Aranha

Editoria Executiva

---

A senha do assinante Bolmail é secreta. Nenhum funcionário do Bolmail está autorizado a solicitá-la. [Trocar senha](#).

**Quantitation of artemether in pharmaceutical raw material and injections by high performance liquid chromatography**

**Isabela da Costa César\*, Géron Antonio Pianetti**

*Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais*

**\*Correspondence:**

I. C. César  
Departamento de Produtos Farmacêuticos  
Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627  
31270-901 - Belo Horizonte - MG, Brasil  
E-mail: isaccesar@bol.com.br

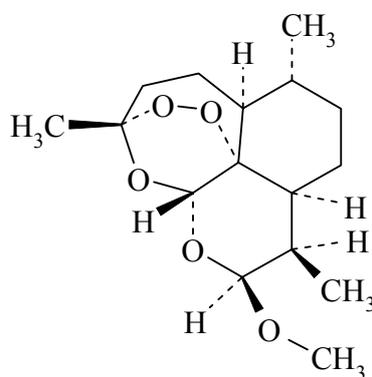
*The quantitation of artemether in pharmaceutical raw material and injection was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection. A Zorbax C<sub>18</sub> column (150 x 4.6 mm; 5 μm), at 30 °C, and a mobile phase composed of acetonitrile and water (70:30), at a flow rate of 1 ml/min, were used. The detection wavelength was 216 nm and the injection volume was 20 μl. The method showed to be linear ( $r^2=0,9999$ ), precise (RSD < 2,0% to intra-day and inter-days precision), accurate and selective regarding possible impurities and excipients of the samples. The detection and quantitation limits were 8 μg/ml and 25 μg/ml, respectively. The obtained artemether content in the raw material analysis was 99.26% and in the injection, 102.08%. The optimized and validated method may be successfully employed to quality control routine analyses.*

**UNITERMS:** Artemether. HPLC. Antimalarials.

## INTRODUCTION

Nowadays, malaria is the world's most important parasitic infection and the effective control of this disease is a great challenge in the public health area in poor countries (Guerin *et al.*, 2002). The incidence of malaria worldwide is estimated to be 300-500 million clinical cases each year, with about 90% of these occurring in Africa, mostly caused by *Plasmodium falciparum*. Malaria is thought to kill between 1.1 and 2.7 million people worldwide each year, of whom about 1 million are children under the age of 5 years in Africa (World, 2000). Due to the widespread *P. falciparum* resistance to conventional antimalarial drugs, many countries have been facing difficulties to the effective malaria control and treatment. Nowadays, there are reported cases of resistance to all classes of antimalarials, except to artemisinin e its derivatives (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

Artemether, also named dihydroartemisinin methyl ether (Figure 1), is a synthetic derivative of artemisinin, widely used in the malaria treatment in endemic areas. This drug can be administered as an oily solution by intramuscular injection or in tablets, orally (Karbwang *et al.*, 1997). In addition, artemether can be associated with lumefantrine, in fixed dose combination tablets containing 20 mg of artemether and 120 mg of lumefantrine, consisting the first line therapy to the treatment of *falciparum* malaria in Brazil (Brasil, 2006).



In spite of the intensification of the artemether use to the malaria treatment in endemic areas, the scientific literature is still scarce regarding analytical methods aiming the quantitation of this drug in pharmaceutical products and the evaluation of the quality of the available formulations. The International Pharmacopeia 4 ed. (International, 2006) presents monographs of artemether raw material and injection. The assay methods to these products are high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection (216 nm) and an alternative method in which artemether is submitted to acid hydrolysis, followed by detection in UV spectrophotometer, at 254 nm.

The quantitation of artemether in pharmaceutical products was described by Atemnkeng *et al.* (2007a), who performed the determination of artemisinin derivatives in medicines used in Kenia and Congo, while Atemnkeng *et al.* (2007b), in a second study, quantified artemether, methylparaben and propylparaben in a pediatric formulation dry suspension. César *et al.* (2008) carried out the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets. All these works employed high performance liquid chromatography with ultraviolet detection to the artemether quantitation. Currently, there are not available studies about the quantitative determination of artemether in pharmaceutical raw material or in injections, employed in the treatment of malaria patients in Brazil.

Thus, the aim of the present work was quantifying artemether in pharmaceutical raw material and injection. The method described in International Pharmacopeia 4 ed. was adapted to the analyses and the parameters linearity, intra-day precision, inter-day precision, accuracy and selectivity were properly validated. The optimized method was employed to evaluate the quality of the artemether injections used nowadays in the malaria treatment in Brazil.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents and materials**

Artemether chemical reference substance (batch 10203215, purity 100.0%) and raw material (batch 061010-4087ER) were purchased from Dafra Pharma (Turnhout, Belgium). Samples of artemether injection (80 mg/ml – Cipla, batch ZD6375) were kindly donated by Brazilian Health Ministry. Acetonitrile (HPLC grade) and isopropyl alcohol, acetone, chloroform and ether (analytical grade) were purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA). Water was purified using a Millipore system (Bedford, MA, USA).

### **Chromatographic conditions**

The HPLC analyses were carried out on Agilent 1200 system (Palo Alto, CA, USA), composed of quaternary pump, autosampler, diode array detector (DAD) and HP ChemStation software. The column used was Zorbax C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size) from Agilent, maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile and water, at a flow rate of 1 ml/min. Different proportions of these solvents were evaluated, aiming to optimize the retention time and peak symmetry. The optimized mobile phase was composed of acetonitrile 70% and water 30%. The detection was performed at 216 nm and the injection volume was 20 µl.

### **Preparation of standard and sample solutions of artemether**

*Standard solution:* approximately 20 mg of artemether reference standard were accurately weighed, transferred to a 5 ml volumetric flask and diluted in mobile phase (acetonitrile:water – 70:30). The volume was adjusted with mobile phase, so that the final concentration was 4 mg/ml.

*Sample solution of raw material:* approximately 100 mg of artemether raw material, previously dried at 60 °C in vacuum oven for 3 h, were accurately weighed, transferred to a 25 ml volumetric flask and diluted in mobile phase (acetonitrile:water – 70:30). The volume was adjusted with mobile phase, so that the final concentration was 4 mg/ml.

*Sample solution of injection:* an aliquot of 5 ml of the artemether injection was transferred to a 100 ml volumetric flask. Several solvents were evaluated regarding the miscibility with the

injection, and the mixture of isopropyl alcohol and acetonitrile (75:25) showed to be adequate to the dilution. The volume was adjusted with this solvent, so that the final concentration was 4 mg/ml.

## **Validation**

After the optimization of the chromatographic conditions, the parameters linearity, intra-day precision, inter-day precision, accuracy, selectivity, limit of detection and limit of quantitation were evaluated, according to the specifications described in Resolução RDC n°899 da ANVISA (Brasil, 2003), aiming to validate the method.

*Linearity:* artemether stock solutions, at 8 mg/ml, were prepared in acetonitrile, in triplicate. Aliquots of these solutions were diluted in mobile phase to five different concentrations. The evaluated linear range was from 50% to 150% of the test concentration, which corresponds to the concentration range from 2 to 6 mg/ml of artemether. The analytical curve with peak area versus artemether concentration was plotted and the obtained data were subjected to the regression analysis.

*Precision:* the intra-day precision was evaluated by means of six determinations at 100% of test concentration (4 mg/ml), to the raw material and injection. Artemether sample solutions were prepared as described previously. To evaluate the inter-day precision, the same procedure was adopted, performing the analyses in two consecutive days. In each analysis, the artemether content and the relative standard deviation (R.S.D.) were calculated.

*Accuracy:* the accuracy was evaluated by the standard addition method and known amounts of the reference standard were added to the artemether injection. Artemether standard solutions, at three different concentrations, were added to the injection, so that the final concentrations were 3 mg/ml, 4 mg/ml and 5 mg/ml, corresponding to 75%, 100% and 125% of the test concentration. In each concentration, the solutions were prepared in triplicate and the recovery was calculated.

*Selectivity:* the selectivity of the chromatographic method was determined by the evaluation of the spectral purity of the artemether peaks obtained in chromatograms of standard and sample

solutions. This test was performed by means of the overlap of ultraviolet spectra obtained in different points of the chromatographic peak, with the aim of verifying whether other substances co-eluted at the same retention time of the artemether peak.

*Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ):* these limits were calculated using the analytical curve parameters (standard deviation of intercept and slope), according to the equations described at Resolução RDC n°899 (Brasil, 2003).

### **Analyses of artemether raw material and injection**

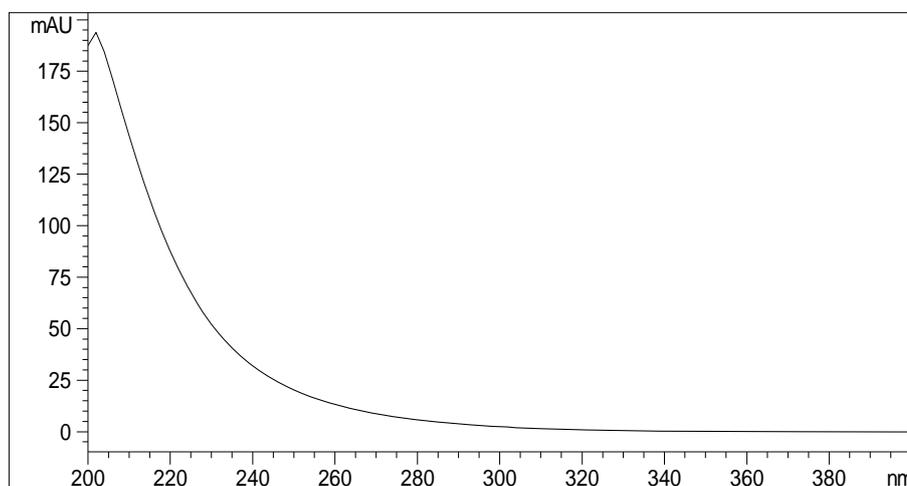
Samples of artemether raw material and injection were analyzed using the optimized and validated HPLC method. The solutions for the analyses were prepared following the previously described procedure. The artemether mean content and the relative standard deviation (R.S.D.) were determined in each analyzed sample.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Initially, the artemether spectrum at ultraviolet region was obtained, in the range of 200 to 400 nm, using the diode array detector (DAD) of the chromatograph, with a solution at 4 mg/ml in mobile phase. The maximum absorption wavelengths were verified, as well as the artemether absorptivity at ultraviolet region (Figure 2).

According to the obtained spectrum, artemether absorbs only in the initial ultraviolet region. Hence, the artemether detection is possible at 216 nm, however, considering its low molar absorptivity, the work concentration of the solutions employed in the analyses must be considerably high. Following the procedure described at International Pharmacopeia 4 ed., it is necessary to use standard and sample solutions containing 10 mg/ml of artemether. In the developed method, the artemether work concentration was 4 mg/ml. At this concentration, the artemether peak presents

adequate intensity required to the integration and quantitation, besides reducing the consumption of artemether reference standard for the preparation of the solution.



**Figure 2** – Ultraviolet spectrum obtained at DAD, using an artemether solution at 4 mg/ml in mobile phase, injection volume of 20  $\mu$ l.

Some adaptations in the chromatographic conditions described at International Pharmacopeia 4 ed. were carried out to the quantitation of artemether in the raw material and injection. In the pharmacopeia procedure, the length of the chromatographic column should be 250 mm and acetonitrile concentration in the mobile phase is 62%. With the aim of reducing the analyses time and improve the peak symmetry, the column length was reduced to 150 mm and the acetonitrile concentration was increased to 70%. At these conditions, it was possible obtaining a symmetric peak, with tailing factor of 1.25 and retention time of 6.70 min (Figure 3).

Some problems regarding the preparation of the injection sample solution were faced. According to the procedure described at International Pharmacopeia 4 ed., the injection should be quantitatively diluted in mobile phase, resulting in a diluted solution at the work concentration. However, the execution of this procedure resulted in the separation of the solution in two phases, since the artemether injection is highly oily and immiscible with the mobile phase and with pure acetonitrile. Thus, the miscibility of the artemether injection with several solvents was evaluated

and it was verified that the injection was miscible only with organic solvents, such as acetone, chloroform, ether and isopropyl alcohol.

As isopropyl alcohol also presented adequate miscibility with the employed mobile phase, this solvent was selected to the dilution. The proportion of isopropyl alcohol in acetonitrile was evaluated, and a diluent constituted of isopropyl alcohol 75% and acetonitrile 25% showed to be adequate to the dilution of the injection and the subsequent analyses in the chromatograph.

## Validation

*Linearity:* the obtained analytical curve indicated adequate linear correlation between the artemether concentrations and the peak areas, in the range of 2 to 6 mg/ml. Data of the regression analysis are demonstrated in Table I. The regression coefficient ( $r^2 = 0,9999$ ) indicated that, in the evaluated concentration range, the peak areas were directly proportional to the artemether concentrations and, thus, the method presented adequate linearity. The R.S.D. value lower than 2.0% demonstrated the precision of the analytical curve.

**TABLE I** – Results of the regression analyses obtained for the HPLC method to the artemether quantitation.

<b>Regression parameters</b>	<b>Results</b>
Regression coefficient ( $r^2$ )	0,9999
Slope $\pm$ standard deviation	32237 $\pm$ 26
Intercept $\pm$ standard deviation	6,89 $\pm$ 2,780
Relative standard deviation (%)	0,06
Concentration range (mg/ml)	2 – 6
Number of points	5

*Precision:* the intra-day precision of the HPLC method was evaluated by means of six determinations at 100% of the test concentration (4 mg/ml). In the analyses of artemether in the raw material, the R.S.D. values for intra-day ( $n=6$ ) and inter-days ( $n=12$ ) precision were 0.49% and

0.48%, respectively. To the injection, the values were 1.31% and 0.89% to the intra-day and inter-days precision, respectively. Thus, the method precision was demonstrated for both samples, since all the obtained R.S.D. values were lower than 2.0%.

*Accuracy:* the accuracy was evaluated by the standard addition method, in three different concentrations. The recovery obtained at the concentrations 3 mg/ml, 4 mg/ml and 5 mg/ml were 100.17%, 99.59% and 100.90%, respectively. The mean recovery was 100.22%, proving the accuracy of the HPLC method.

*Selectivity:* the determination of the spectral purity of the artemether chromatographic peaks was performed in the DAD detector. The peak purities obtained with solutions of artemether standard, raw material and injection were, respectively, 99.95%, 99.99% and 99.93%. The high peak purity values indicated that other substances did not co-eluted with the artemether peak and that the method is selective to the quantitation of artemether in raw material and injection.

*Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ):* the determination of these limits was carried out using the equation that considers the parameters of the analytical curve. The obtained LOD and LOQ values were 8 µg/ml and 25 µg/ml, respectively. Due to the low absorptivity of artemether in the ultraviolet region, LOD and LOQ were relatively high, however, these values are adequate to the quantitation of the artemether solutions at the test concentration employed in the method.

The results obtained in the validation process of the HPLC method are summarized in Table II.

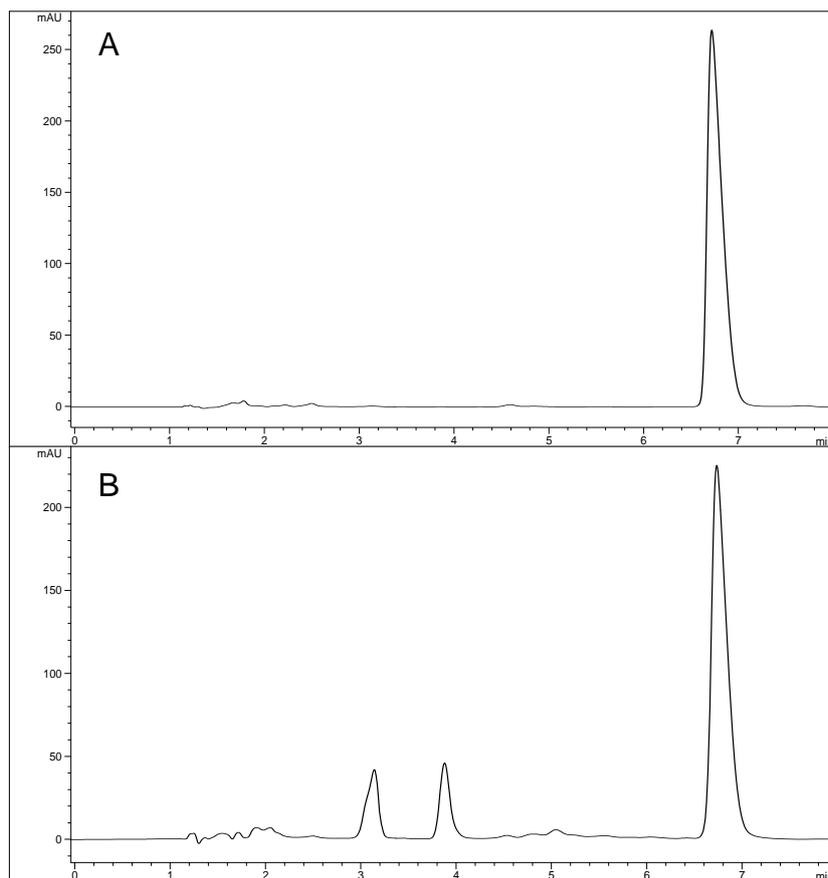
**TABLE II** – Results of the validation process of the HPLC method for the artemether quantitation.

<b>Validation parameters</b>	<b>Results</b>
Intra-day precision	
Raw material – RSD	0.49 %
Injection – RSD	1.31 %
Inter-days precision	
Raw material – RSD	0.48 %
Injection – RSD	0.89 %
Accuracy	
Mean recovery	100.22%
Selectivity – peak spectral purity	
Standard	99.95 %
Raw material	99.99 %
Injection	99.93 %
Limit of detection	8 µg/ml
Limit of quantitation	25 µg/ml

### **Analyses of artemether raw material and injection**

The optimized and validated method was applied to the quantitation of artemether in pharmaceutical raw material and injection. The mean content of the analyzed raw material was 99.26%, while for the injection, the content was 102.08%. The chromatograms obtained in the analyses of the raw material and injection are demonstrated in Figure 3.

In both chromatograms, the artemether peak was eluted at 6.70 min. For the injection, two other peaks can be observed in the chromatogram. The first one at 3.15 min is probably relative to the oil or other excipients of the formulation. The second peak at 3.90 min corresponds to the isopropyl alcohol employed in the sample preparation. The identity of the peaks was confirmed by the ultraviolet spectra obtained at the DAD. In all analyses, chromatographic resolution between the peaks of artemether and isopropyl alcohol or excipients was achieved.



**FIGURE 3** – HPLC chromatograms obtained in a Zorbax C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm, 5 µm) column, at 30 °C, mobile phase composed of acetonitrile and water (70:30), flow rate of 1 ml/min and detection at 216 nm. Samples of artemether: (A) raw material; (B) injection.

## CONCLUSION

The optimized and validated HPLC method showed to be adequate for the quantitation and quality evaluation of artemether in pharmaceutical raw material and injections, and it can be successfully employed for routine analyses in quality control. Considering the intensification of the use of artemether in the treatment of malaria in endemic areas, the availability of simple and rapid analytical methods is essential to evaluate the quality of the formulations used nowadays.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Brazilian Health Ministry, for the artemether injection donation, and Brazilian Pharmacopeia, for the financial support.

## RESUMO

### **Quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica e solução injetável por cromatografia líquida de alta eficiência**

*A quantificação de artemeter em matéria-prima farmacêutica e solução injetável foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta. Empregou-se coluna Zorbax C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm; 5 µm), mantida a 30 °C, e fase móvel composta por acetonitrila e água (70:30), com fluxo de 1 ml/min. A detecção foi realizada a 216 nm, e o volume de injeção foi 20 µl. O método se mostrou linear ( $r^2=0,9999$ ), preciso (DPR < 2,0% para precisão intra-dia e inter-dias) e seletivo em relação a possíveis impurezas e excipientes das amostras. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 8 µg/ml e 25 µg/ml, respectivamente. O teor médio de artemeter obtido na análise da matéria-prima farmacêutica foi 99,26% e na solução injetável, 102,08%. O método otimizado e validado pode ser utilizado com sucesso para análises rotineiras em controle de qualidade.*

**Unitermos:** Artemeter. CLAE. Antimaláricos.

## REFERENCES

ATEMNKENG, M. A.; DE COCK, K.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Quality control of active ingredients in artemisinin-derivative antimalarials within Kenya and DR Congo. *Trop. Med. Int. Health*, v.12, p.68-74, 2007(a).

ATEMNKENG, M. A.; MARCHAND, E.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Assay of artemether, methylparaben and propylparaben in a formulated paediatric antimalarial dry suspension. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.43, p.727-732, 2007(b).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 31 mai 2003. Disponível em: < <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>. Acesso em: 28 abr. 2006.

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. Brasília: Editora MS, 2006. p. 1-4.

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.

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. *Lancet Infect. Dis.*, v.2, p.564-573, 2002.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 2006. 1499 p.

KARBWANG, J.; NA-BANGCHANG, K.; CONGPUONG, K; MOLUNTO, P.; THANAVIBUL, A. Pharmacokinetics and bioavailability of oral and intramuscular artemether. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v.52, p.307-310, 1997.

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

WORLD Health Organization. WHO Expert Committee on Malaria. Twentieth Report. WHO Technical Report Series, 892. Geneva, 2000. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/docs/ecr20\\_toc.htm](http://www.who.int/malaria/docs/ecr20_toc.htm)>. Acesso em: 24 abr. 2006.



---

● **Submission Confirmation**

De: TALANTA   
Para: [isaccesar@bol.com.br](mailto:isaccesar@bol.com.br)   
Assunto: Submission Confirmation  
Data: 11/09/2009 16:48

---

Dear Dr. Isabela Costa César,

Your submission entitled "LIQUID CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE SIMULTANEOUS QUANTITATION OF ARTEMETHER AND LUMEFANTRINE IN HUMAN PLASMA: APPLICATION FOR A PHARMACOKINETIC STUDY" has been received by Talanta

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/tal/>.

Your username is: isabela  
Your password is: césar254

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Talanta

---

A senha do assinante Bolmail é secreta. Nenhum funcionário do Bolmail está autorizado a solicitá-la. [Troc](#)

**LIQUID CHROMATOGRAPHY – TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE  
SIMULTANEOUS QUANTITATION OF ARTEMETHER AND LUMEFANTRINE IN  
HUMAN PLASMA: APPLICATION FOR A PHARMACOKINETIC STUDY**

**Isabela Costa César<sup>a\*</sup>, José Antônio de Aquino Ribeiro<sup>a</sup>, Leonardo de Souza  
Teixeira<sup>b</sup>, Karini Bruno Bellorio<sup>b</sup>, Fernanda Crunivel de Abreu<sup>b</sup>, Josianny  
Mesquita Moreira<sup>b</sup>, Paula Rocha Chellini<sup>a</sup>, Gerson Antônio Pianetti<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Farmacêuticas, Alameda Coronel Eugênio Jardim 53, 74175-100, Goiânia, GO, Brasil.

\* Corresponding author

*Tel:* +55 31 34096967; *fax:* +55 31 34096976

*E-mail address:* [isaccesar@bol.com.br](mailto:isaccesar@bol.com.br)

## ABSTRACT

A liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) method for the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in human plasma was developed and validated. Artesunate was used as internal standard (I.S.). The analytes were extracted by a protein precipitation procedure and separated on a reversed-phase Zorbax SB-Ciano column with a mobile phase composed of methanol and 10 mM aqueous ammonium acetate containing 0.2% (v/v) of acetic acid and 0.1% (v/v) of formic acid. Multiple reaction monitoring using the transitions  $m/z$  316.3  $\rightarrow$   $m/z$  266.8,  $m/z$  530.3  $\rightarrow$   $m/z$  347.7 and  $m/z$  402.2  $\rightarrow$   $m/z$  266.8 was performed to quantifying artemether, lumefantrine and artesunate, respectively. Calibration curves were plotted over the range of 10-1000 ng/ml for artemether and 10-18000 ng/ml for lumefantrine. The lower limit of quantitation was 10 ng/ml for both drugs. The mean R.S.D values in the intra-run precision were 2.6% and 3.0% and in the inter-run precision were 3.6% and 4.6% for artemether and lumefantrine, respectively. The mean accuracy values were 102.0% and 101.2% for artemether and lumefantrine, respectively. The validated method was successfully applied to determine the plasma concentrations of artemether and lumefantrine in healthy volunteers.

**Keywords:** artemether; lumefantrine; LC-MS/MS; plasma; pharmacokinetics; malaria.

## 1. Introduction

Due to the widespread resistance of *Plasmodium falciparum* to conventional antimalarial drugs, many countries have been facing problems regarding the treatment of uncomplicated malaria [1]. The main therapy now recommended by the World Health Organization is artemisinin-based combination therapy (ACT), associations of an artemisinin derivative and other structurally unrelated and slowly eliminated antimalarial [2]. Artemether-lumefantrine (Fig. 1), a registered fixed dose combination of artemether (20 mg) and lumefantrine (120 mg), is the most common ACT used in malaria endemic areas. The rationale is that artemether will rapidly reduce parasitaemia, promoting symptomatic relief, and lumefantrine will eliminate residual parasites [3].

The quantitative determination of artemether and lumefantrine in plasma is essential to evaluate the bioavailability and pharmacokinetics of these antimalarials co-administrated. Previous studies suggested that area under the plasma lumefantrine concentration-time curve was the principal determinant of cure [4] and artemether formulations with high bioavailability are considerably important to the clinical efficacy [5]. Therefore, it is essential to establish a sensitive, accurate and selective method to the simultaneous determination of artemether and lumefantrine concentrations in plasma.

Some studies have been reported for determining either artemether [5-10] or lumefantrine [4, 11-16] in human plasma. McGready et al. [17] evaluated the pharmacokinetics of both drugs in pregnant women; however artemether and lumefantrine analyses were carried out separately. César et al. [18] developed a LC-UV method for the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in fixed

dose combination tablets. Nevertheless, ultraviolet detection is not adequate for artemether quantitation in biological matrix, due to its low sensitivity and selectivity. The majority of artemether quantitation in plasma employed electrochemical detection, only Souppart et al. [9] and Shi et al. [10] detected this drug by mass spectrometry, using atmospheric pressure chemical ionization (APCI).

The aim of this study was to develop and validate a LC-ESI-MS/MS method for simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in human plasma. The method was applied to a pharmacokinetic study in healthy volunteers who received the fixed dose combination tablets.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals and reagents*

Artemether, lumefantrine and artesunate (internal standard) reference standards were purchased from Dafra Pharma (Turnhout, Belgium). Coartem<sup>®</sup> (Novartis, Basel, Switzerland) tablets were kindly donated by Brazilian Health Ministry. Ultra-pure water was obtained from a Millipore system (Bedford, MA, USA). Methanol (HPLC grade) was purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA) and acetic acid, formic acid and ammonium acetate (analytical grade) were from J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

### *2.2. Instrumentation and analytical conditions*

The HPLC-ESI-MS/MS analyses were carried out on a Waters system (New Castle, DE, USA), composed of a binary pump 1525 $\mu$ , a sample manager 2777, a column oven TCM/CHM and a Quattro LC triple quadrupole mass spectrometer, equipped with an electrospray ion source. MassLynx v 4.1 software was used for data acquisition and analysis. LC separation was performed on a Zorbax SB-Ciano (150 x 4.6 mm i.d.; 5  $\mu$ m particle size) from Agilent (Santa Clara, CA, USA) with a similar Zorbax SB-Ciano security guard column (12,5 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of (A) methanol and (B) 10 mM aqueous ammonium acetate containing 0.2% (v/v) of acetic acid and 0.1% (v/v) of formic acid, using a linear gradient elution of 60-100% B at 0-7 min, followed by isocratic elution of 60% B at 7-9 min, at a flow rate of 1 ml/min. The injection volume was 50  $\mu$ l.

Mass spectrometric detection was performed using electrospray ion source in positive ionization mode. Nitrogen was used as both the nebulizing and desolvation gas and argon was used as collision gas ( $1.8 \times 10^{-3}$  to  $2.0 \times 10^{-3}$  mbar). The ion source parameters were: capillary 3.5 kV; extractor 2 V; RF lens 0.5 V; source temperature 80 °C; desolvation temperature 150 °C; artemether and artesunate cone 15 V and lumefantrine cone 45 V. The multiplier was set at 650 V. The collision energies were optimized at 10 eV for artemether and artesunate and 40 eV for lumefantrine. Multiple reaction monitoring (MRM) was employed for data acquisition. The precursor ions of artemether and artesunate were the ammonium adduct  $[M+NH_4]^+$  and  $[M+H]^+$  was the precursor ion of lumefantrine. The MRM fragmentation transitions were  $m/z$  316.3  $\rightarrow$   $m/z$  266.8,  $m/z$  530.3  $\rightarrow$   $m/z$  347.7 and  $m/z$  402.2  $\rightarrow$   $m/z$  266.8 for artemether, lumefantrine and artesunate, respectively. The scan dwell time was set 0.35 s for each channel.

### *2.3. Preparation of standard solutions*

Stock solutions of artemether (250 µg/ml) and artesunate (500 µg/ml) were prepared by dissolving the accurately weighed reference substance in methanol. Lumefantrine stock solution (2500 µg/ml) was prepared in a similar way using methanol and glacial acetic acid (100:2) as solvent. The work solution of artesunate (I.S.) was prepared by diluting the stock solution with methanol to a final concentration of 5 µg/ml. All stock solutions were prepared immediately before the use.

### *2.4. Preparation of calibration and QC samples*

The work solutions containing both artemether and lumefantrine were prepared by serial dilutions of the stock solutions with methanol and water (50:50). Seven calibrations samples were prepared by spiking appropriate amounts of these work solutions in blank plasma obtained from healthy volunteers. The concentration of the calibration samples in plasma were 10, 50, 100, 250, 500, 750 and 1000 ng/ml for artemether and 10, 200, 2000, 6000, 10000, 14000 and 18000 ng/ml for lumefantrine. Quality control (QC) samples in plasma were prepared in a similar way, at high, middle and low concentrations: 30, 400 and 800 ng/ml for artemether and 30, 7500 and 15000 ng/ml for lumefantrine. QC samples were used in the validation process and analyzed during the pharmacokinetics study at intervals in each run, to verify the performance and suitability of the assay. All samples were stored at -70 °C and brought to room temperature before use.

## *2.5. Sample preparation*

A 50 µl aliquot of the IS solution (5 µg/ml of artesunate in methanol) was added to 250 µl of plasma sample. The sample was vortex mixed for 30 s. A 450 µl aliquot of glacial acetic acid 0.5% (v/v) in methanol was added and vortex mixed for 40 s. Then, the samples were centrifuged at 10 000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to a vial and a 50 µl aliquot was injected in the chromatographic system.

## *2.6. Method validation*

The validation process was carried out according to Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, recommended by US Food and Drug Administration [19].

Selectivity of the method was evaluated by assaying human blank plasma samples from six different donors, including one lipemic and one hemolyzed plasma. These samples were compared to those containing artemether or lumefantrine at the lower limit of quantitation (LLOQ) or artesunate at 1000 ng/ml. In addition, plasma samples spiked with caffeine (1 µg/ml), dexchlorpheniramine (76 ng/ml), metamizole (5 µg/ml), acetaminophen (20 µg/ml) or dihydroartemisinin, the main artemether metabolite (1 µg/ml) were also evaluated to ensure no interference in the method.

Linearity was assessed by 7-point calibration curves in human plasma in duplicate in three consecutive days. The curves were constructed by plotting the peak area ratio of each antimalarial to the IS versus the concentration of artemether or lumefantrine. The concentration range evaluated for artemether was 10-1000

ng/ml and for lumefantrine was 10-18000 ng/ml. The LLOQ was established as the lowest concentration of calibration curve at which precision was within 20% and accuracy was within  $\pm 20\%$ . In addition, the analyte response at this concentration should be at least 5 times the baseline noise.

To evaluate the precision and accuracy of the method, QC samples at three concentration levels (30, 400 and 800 ng/ml for artemether and 30, 7500 and 15000 ng/ml for lumefantrine) were analyzed in six replicates on three different days. Intra-run and inter-run precision were calculated using the relative standard deviation (RSD%). Accuracy was expressed as percentage calculated by the formula (observed concentration / nominal concentration) x 100. The accuracy was required to be within  $\pm 15\%$ , and the intra-run and inter-run precisions should not exceed 15%.

The extraction recovery of the method was determined by comparing the peak areas obtained from the plasma samples with those of direct injected standards, at the same concentration. It was evaluated by analyzing six replicates containing 30, 400 and 800 ng/ml of artemether and 30, 7500 and 15000 ng/ml of lumefantrine. The recovery of IS was determined in a similar way, at the work concentration (1000 ng/ml of artesunate).

The matrix effect was evaluated to verify whether the potential ion suppression or enhancement due to the co-elution matrix components existed in the analysis. The peak areas of artemether and lumefantrine from the spike-after-protein precipitation samples were compared to those of the standard solutions in the mobile phase, at the same concentrations. This experiment was carried out with blank plasma samples from six different donors, at low and high QC concentrations of artemether and lumefantrine.

The stability of the analytes in plasma was evaluated under a variety of storage and handling conditions using the low and high QC samples, in six replicates. Freeze-thaw stability was evaluated after three complete free/thaw cycles (-70 to 23 °C) on consecutive days. Short-term temperature stability was assessed by analyzing samples that were kept at ambient temperature (23 °C) for 6 h. Long term stability was performed at plasma samples that were stored at -70 °C, for 1, 2 and 3 months. To evaluate the post-preparative stability, QC samples were extracted and kept in the autosampler (4 °C) for 10 h before the injection. The stabilities of the work solutions of artemether, lumefantrine and IS at 4 and 23 °C for 6 h were also evaluated. The analytes were considered stable when 85-115% of the initial concentrations were found.

### *2.7. Application to a clinical pharmacokinetic study*

The validated method was used to determine the plasma concentration of artemether and lumefantrine in a pharmacokinetic study using the fixed dose combination tablets. Five healthy volunteers received a single oral dose of 80 mg of artemether and 480 mg of lumefantrine, corresponding to 4 tablets of the fixed dose combination, with 200 ml of milk. The blood samples (10 ml) were collected into heparinized tubes at 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 216 and 264 h after drug administration. Plasma samples were obtained by centrifugation at 2000 rpm for 10 min and frozen at -70 °C until analyses. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Conditions for MS/MS

Initially, the ionization and detection of the analytes in the mass spectrometer was evaluated by atmospheric pressure chemical ionization (APCI), according to the previous works of Souppart et al. [9] and Shi et al. [10] for artemether. However, this ion source provided artemether precursor ion  $[M+H]^+$  at considerably low intensity, besides lumefantrine could not be adequately detected. Xing et al. [20] and Sabarinath et al. [21] performed the quantitation of artemisinin derivatives by LC-MS/MS using electrospray ionization, by means of monitoring the ammonium adduct  $[M+NH_4]^+$  as the precursor ion. Hence, 10 mM ammonium acetate buffer was included in the mobile phase and the precursor ions  $[M+NH_4]^+$  of artemether  $m/z$  316 (298 g/mol of artemether + 18 g/mol of ammonium) and artesunate  $m/z$  402 (384 g/mol of artemether + 18 g/mol of ammonium) could be properly detected. The source and desolvation temperatures were reduced to 80 °C and 150 °C, respectively, aiming promoting the adduct formation and increasing the precursor ion intensities. The optimized conditions showed to be also adequate to the lumefantrine ionization, with the detection of the precursor ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  530. The optimization of the collision energy was performed for the purpose of selecting abundant daughter ions of the analytes for MRM detection. At collision energy of 10 V, artemether and artesunate (IS) presented the same intense product ion at  $m/z$  267. For lumefantrine, the major product ion was  $m/z$  348, at collision energy of 40 V. The product ion mass spectra of artemether and lumefantrine are presented in Fig. 2.

### 3.2. Conditions for HPLC

The use of 10 mM ammonium acetate buffer in the mobile phase was essential to detect the ammonium adduct  $[M+NH_4]^+$  of artemether and artesunate. Mobile phase acidification with acetic acid and formic acid was important to ensure an adequate lumefantrine peak shape and to promote the ionization of the analytes in the positive mode. Methanol provided more intense and symmetric chromatographic peaks, compared to acetonitrile, so that this solvent was adopted in the analyses. Initially, an isocratic elution condition was evaluated (10 mM ammonium acetate buffer:methanol – 20:80). However, interference of the matrix components was detected, resulting in high recoveries percentages due to an ionization enhancement of the analytes. Thus, a gradient elution of 60 to 100% of methanol from 0 to 7 min was employed and no matrix effect was verified in this optimized condition. The column re-equilibration time was 2 min, with 60% of methanol, so that the total run time was 9 min. The retention times were about 3.8, 4.2 and 6.7 min for artesunate (IS), artemether and lumefantrine, respectively. Chromatograms obtained with the developed method are shown in Fig. 3.

### 3.3. Sample extraction

Artesunate was selected as the internal standard for the quantitative determination of artemether and lumefantrine, since it was stable and presented the same chemical behavior of the analytes in the plasma extraction procedure. Liquid-liquid extraction was initially considered for sample preparation. However, compared to protein precipitation, this procedure showed to be considerably time consuming

and laborious, resulting in reduction of precision and recovery rate of the assay. The developed protein precipitation procedure is simple, robust and provided high recovery rates for all analytes, resulting in a fast and easily handling analysis.

### *3.4. Method validation*

No significant interference was detected at the retention times of the analytes, in the six different blank plasma chromatograms (Fig. 3). The plasma samples spiked with caffeine, dexchlorpheniramine, metamizole, acetaminophen or dihydroartemisinin did not present response at the ion transitions selected for the analytes quantitation.

The artemether calibration curves showed to be linear over the range 10-1000 ng/ml, with a regression coefficient higher than 0.998. A typical artemether standard curve was  $y = 0.0008638x + 0.0034456$ , with a weighted factor  $1/x$ . For lumefantrine, a linear regression model was evaluated first; however, a weighted ( $1/x$ ) quadratic regression model provided a better fit for the validation data. A typical lumefantrine curve was  $y = -6.3343e-009x^2 + 0.0005588x + 0.0026244$ , with regression coefficients  $> 0.997$ . The residuals had no tendency of variation with concentration for both artemether and lumefantrine. The obtained LLOQ was 10 ng/ml for both drugs, with a precision of 10.4% and 12.8% in terms of R.S.D. and accuracy of 100.4% and 93.4%, for artemether and lumefantrine, respectively.

The intra-run and inter-run precision and accuracy were calculated by analyzing six replicates of QC samples at three concentration levels, in three different days. The obtained data are shown in Table 1. The mean R.S.D values in the intra-run precision were 2.6% and 3.0% and the inter-run precision were 3.6% and 4.6%

for artemether and lumefantrine, respectively. The mean accuracy values were 102.0% and 101.2% for artemether and lumefantrine, respectively. These data indicated reproducible LC-MS/MS results, and that the assay was accurate and reliable.

The mean recovery rates of artemether and lumefantrine ( $n=18$ ), determined at three concentrations, were 85.9% and 82.1%, respectively. The recovery of the IS was shown to be 86.7% ( $n=18$ ). The recovery data are shown in Table 1.

The matrix effect was evaluated by comparing the peak areas of artemether and lumefantrine from the spike-after-protein precipitation samples with those of the standard solutions in the mobile phase. The observed variation did not exceed the range 85-115%, so that in the present LC-MS/MS method, the matrix effects for all analytes were not significant.

The results of stability experiments showed that artemether and lumefantrine plasma samples were stable for up to 6 h at 23 °C, for 3 months at -70 °C, for 10 h after extraction in the autosampler and after three complete free/thaw cycles on consecutive days, as the R.E values were within  $\pm 15\%$  for both analytes, at low and high concentrations. Samples spiked with IS were stable for at least 6 h at 23 °C.

### *3.5. Application to a clinical pharmacokinetic study*

The validated method was applied to a pharmacokinetic study in healthy volunteers. The sensitivity and specificity of the method showed to be adequate to accurately characterizing the pharmacokinetics of artemether and lumefantrine. The mean plasma concentration-time curves of artemether and lumefantrine are shown in Fig. 4. The main pharmacokinetic parameters of both drugs were calculated. The

mean  $C_{\max}$  for artemether, 57.37 ng/ml, was reached 1.9 h ( $T_{\max}$ ) after drug administration, whereas for lumefantrine a  $C_{\max}$  of 1979.95 ng/ml was reached after 5.8 h. The mean values of  $AUC_{0-t}$  obtained were 156.20 and 40664.64 ng.h/ml for artemether and lumefantrine, respectively. The elimination half-life of artemether and lumefantrine were 1.8 and 76.5 h, respectively. These results are consistent with those previously reported [4, 10, 22], which demonstrate a rapid absorption and elimination of artemether, while lumefantrine present a long elimination half-life and could be detected in the volunteers' plasma up to 11 days.

#### **4. Conclusion**

The developed HPLC-ESI-MS/MS method allowed the simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in human plasma and provided simple and rapid analyses, as well as sensitive and reliable results. Thus, this method showed to be suitable for routine high throughput analyses and may be successfully applied to pharmacokinetic and bioequivalence studies of artemether and lumefantrine in human subjects.

#### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Brazilian Health Ministry, for the Coartem<sup>®</sup> donation.

## References

- [1] A. Martensson, J. Stromberg, C. Sisowath, M.I. Msellem, J.P. Gil, S.M. Montgomery, P. Olliaro, A.S. Ali, A. Bjorkman, *Clin. Infect. Dis.* 41 (2005) 1079-1086.
- [2] F. Nosten, N.J. White, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77 (2007) 181-192.
- [3] A.A. Omari, C. Gamble, P. Garner, *Trop. Med. Int. Health.* 9 (2004) 192-199.
- [4] F. Ezzet, M. Van Vugt, F. Nosten, S. Looareesuwan, N.J. White, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000) 697-704.
- [5] J. Karbwang, K. Na-Bangchang, K. Congpuong, P. Molunto, A. Thanavibul, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 52 (1997) 307-310.
- [6] V. Navaratnam, S.M. Mansor, L.K. Chin, M.N. Mordi, M. Asokan, N.K. Nair, *J. Chromatogr. B.* 669 (1995) 289-294.
- [7] J. Karbwang, K. Na-Bangchang, P. Molunto, V. Banmairuroi, K. Congpuong, *J. Chromatogr. B.* 690 (1997) 259-265.
- [8] N. Sandrenan, A. Sioufi, J. Godbillon, C. Netter, M. Donker, V. Valkenburg, *J. Chromatogr. B.* 691 (1997) 145-153.
- [9] C. Soupart, N. Gauducheau, N. Sandrenan, F. Richard, *J. Chromatogr. B.* 774 (2002) 195-203.
- [10] B. Shi, Y. Yu, Z. Li, L. Zhang, Y. Zhong, S. Su, S. Liang, *Chromatographia.* 64 (2006) 523-530.
- [11] S.M. Mansor, V. Navaratnam, N. Yahaya, N.K. Nair, W.H. Wernsdorfer, P.H. Degen, *J. Chromatogr. B.* 682 (1996) 321-325.
- [12] M. Zeng, Z. Lu, S. Yang, M. Zhang, J. Liao, S. Liu, X. Teng, *J. Chromatogr. B.* 681 (1996) 299-306.

- [13] N. Lindegardh, A. Annerberg, D. Blessborn, Y. Bergqvist, N. Day, N.J. White, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 1081-1088.
- [14] A. Annerberg, T. Singtoroj, P. Tipmanee, N.J. White, N.P.J. Day, N. Lindegardh, J. Chromatogr. B. 822 (2005) 330-333.
- [15] E.A. Ashley, K. Stepniewska, N. Lindegardh, R. McGready, A. Annerberg, R. Hutagalung, T. Singtoroj, G. Hla, A. Brockman, S. Proux, J. Wilahphaingern, P. Singhasivanon, N.J. White, F. Nosten, Trop. Med. Int. Health 12 (2007) 201-208.
- [16] Wahajuddin, S.P. Singh, G.K. Jain, J. Chromatogr. B. 877 (2009) 1133-1139.
- [17] R. McGready, K. Stepniewska, N. Lindegardh, E.A. Ashley, Y. La, P. Singhasivanon, N.J. White, F. Nosten, Eur. J. Clin. Pharmacol. 62 (2006) 1021-1031.
- [18] I.C. César, F.H.A. Nogueira, G.A. Pianetti, J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 951-954.
- [19] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- [20] J. Xing, H. Yan, S. Zhang, G. Ren, Y. Gao, Rapid Commun. Mass Spectrom. 20 (2006) 1463-1498.
- [21] S. Sabarinath, M. Rajanikanth, K.P. Madhusudanan, R.C. Gupta, J. Mass Spectrom. 38 (2003) 732-742.
- [22] N.J. White, M. Van Vugt, F. Ezzet, Clin. Pharmacokinet. 37 (1999) 105-125.

Table 1

Precision, accuracy and recovery data for the assay of artemether and lumefantrine by LC-MS/MS.

Validation parameters	Artemether quality control concentration (ng/ml)			Lumefantrine quality control concentration (ng/ml)		
	30	400	800	30	7500	15000
Precision (R.S.D.%)						
Intra-run ( <i>n</i> = 6)	3.4	2.8	1.6	5.1	2.1	1.9
Inter-run ( <i>n</i> = 18)	5.2	3.3	2.4	5.9	5.5	2.4
Accuracy (%)						
Intra-run ( <i>n</i> = 6)	97.1	98.3	100.7	106.4	102.7	103.5
Inter-run ( <i>n</i> = 18)	103.3	100.2	102.6	103.6	97.6	102.4
Recovery (%) ( <i>n</i> = 6)	83.4	85.5	88.7	81.4	83.2	81.8

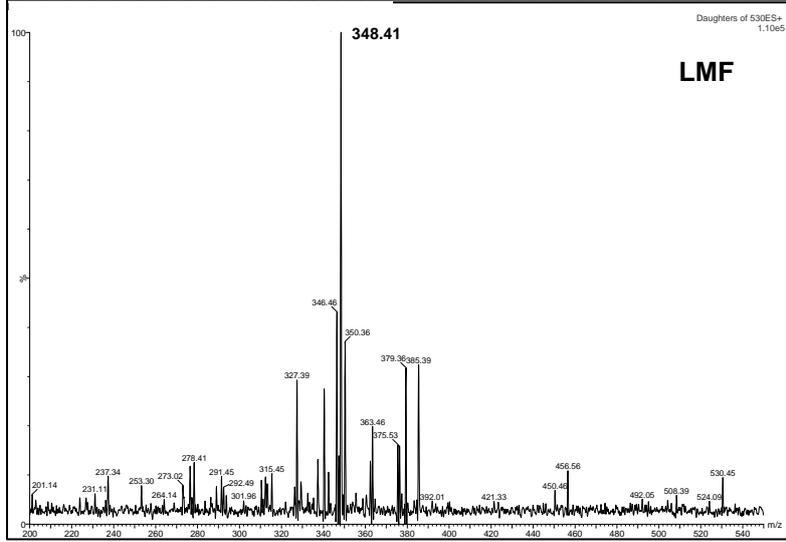
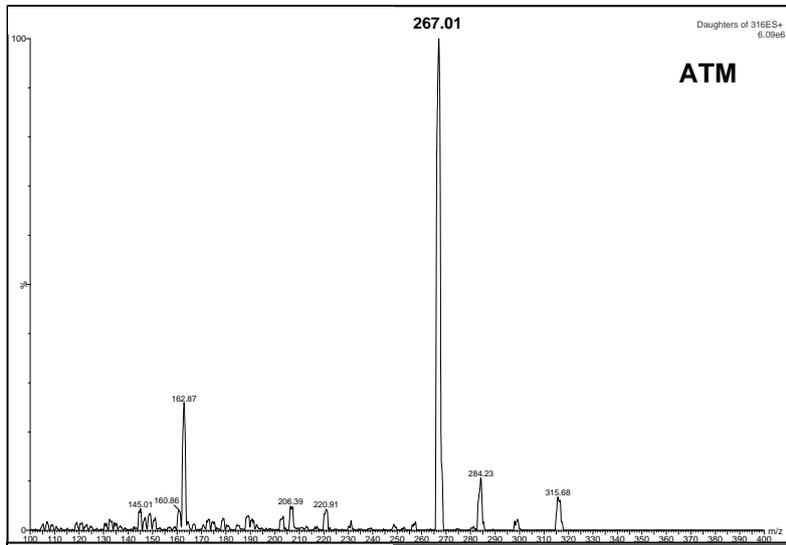
**Fig 1.** Chemical structures and molar mass of artemether, artesunate (IS) and lumefantrine.

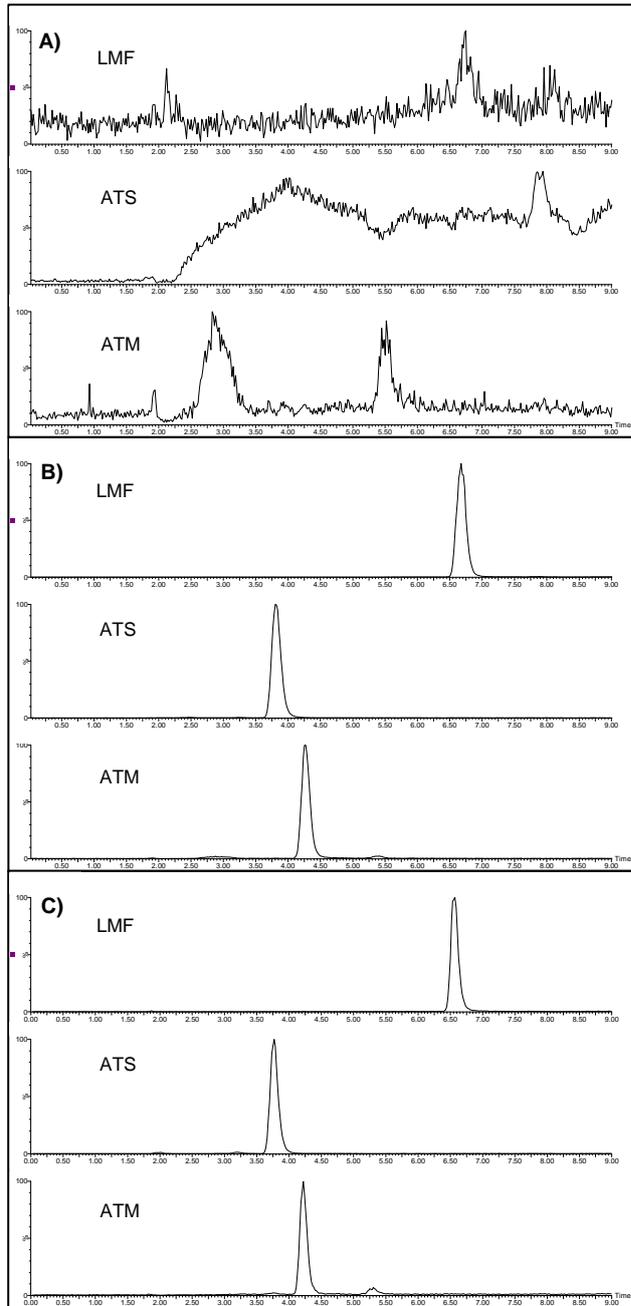
**Fig 2.** Product ion mass spectra of artemether (ATM) and lumefantrine (LMF). The product ions monitored were  $m/z$  267 for artemether and  $m/z$  348 for lumefantrine.

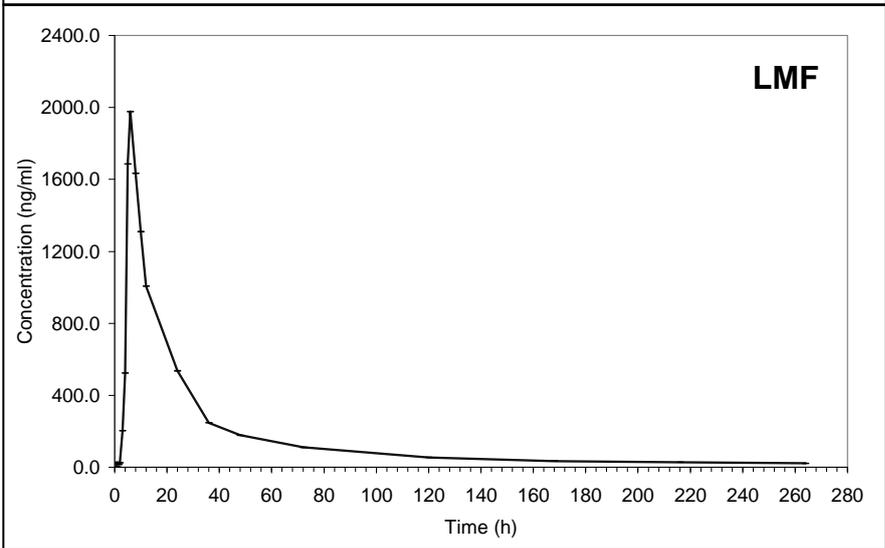
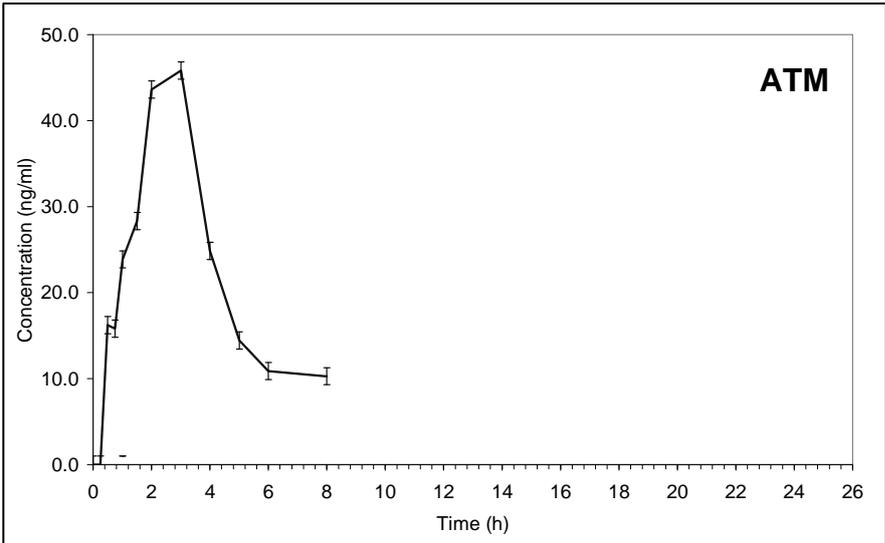
**Fig 3.** MRM chromatograms of (A) blank plasma, (B) blank plasma spiked with artemether (ATM), lumefantrine (LMF) and artesunate (ATS) standards at CQM and (C) volunteer plasma collected 3 h after oral administration of a single dose of 80 mg of artemether and 480 mg of lumefantrine.

**Fig 4.** Plasma concentrations of artemether (ATM) and lumefantrine (LMF) after oral administration of a single dose of 80 mg of artemether and 480 mg of lumefantrine.









## APÊNDICE B

Termo de consentimento livre e esclarecido para a etapa clínica  
do estudo de farmacocinética

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
(Pesquisa científica em seres humanos – Resolução CNS 196/96)

**1. IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO**

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_  
Identidade: \_\_\_\_\_ Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Telefones: \_\_\_\_\_

**2. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

**Título:** Avaliação da farmacocinética de artemeter e lumefantrina administrados em comprimidos de dose fixa combinada.

**Pesquisadores envolvidos:** Prof. Gerson Antônio Pianetti (orientador/coordenador); Msc. Isabela da Costa César (doutoranda); Msc. Leonardo de Souza Teixeira (diretor executivo do ICF), Médico Guilherme Jorge da Silva (Investigador clínico), MSc. Karini Bruno Bellorio (Pesquisadora responsável pela etapa clínica), BSc. Fernanda Cruvinel de Abreu (Pesquisadora responsável pela revisão do protocolo e elaboração do relatório clínico), BSc. Josianny Mesquita Moreira (Pesquisadora responsável pelo recrutamento dos voluntários), BSc. Sílvia Letícia Pinheiro (Enfermeira responsável pela internação dos voluntários).

**Objetivo do estudo:** o objetivo do presente estudo é avaliar a farmacocinética e biodisponibilidade de artemeter e lumefantrina administrados em comprimidos de dose fixa combinada, utilizados para o tratamento de malária *falciparum*.

**Importância do estudo:** com a intensificação do uso da associação de artemeter-lumefantrina como um tratamento promissor para malária causada por *P. falciparum* resistente, torna-se imprescindível o estudo da biodisponibilidade e farmacocinética dos fármacos associados, por meio de métodos bioanalíticos para quantificação simultânea dos mesmos em plasma. Há, ainda, possibilidade de interesse na produção de medicamentos genéricos futuramente, de forma que tais métodos bioanalíticos podem ser úteis também para os estudos de bioequivalência.

**Procedimentos:** para ser incluído no estudo, você será submetido a exames clínicos e laboratoriais, com coleta de uma amostra de sangue e uma de urina. No dia anterior ao estudo, você deverá comparecer ao centro clínico do ICF – Instituto de Ciências Farmacêuticas às 19:00 horas. Você receberá uma dose do medicamento (80 mg de artemeter e 480 mg de lumefantrina) com 200 ml de leite integral. Para avaliar a absorção dos fármacos pelo organismo, serão realizadas coletas de 10 ml de sangue, nos tempos: 0h; 0,25h; 0,5h; 0,75h; 1h; 1,5h; 2h; 3h; 4h; 5h; 6h; 8h; 10h; 12h; 24h; 36h; 48h; 72h; 120h; 168h; 216h e 264 horas, após administração do medicamento. No total, serão realizadas 22 coletas, que correspondem a 220 ml de sangue, em 11 dias. Você deverá ficar em jejum de 10 horas antes da administração do medicamento até quatro horas depois de tomar o medicamento. Você chegará no centro clínico às 19 horas do dia anterior à administração do medicamento e deverá permanecer até 12 horas após a sua administração, sendo liberado em seguida e tendo que retornar para as coletas posteriores.

**Ocorrência de efeitos indesejáveis:** o medicamento contendo a associação de artemeter e lumefantrina é usado para o tratamento de malária e já é comercializado e utilizado mundialmente, inclusive no Brasil. A associação de artemeter e lumefantrina é geralmente bem tolerada por crianças e adultos. Os efeitos adversos que ocorrem com maior frequência são dor de cabeça,

tonteira, dor abdominal e anorexia. Outros possíveis efeitos adversos relacionados à administração da associação são vômito, náusea, diarreia, dor muscular, cansaço, tosse e palpitação. Porém, como a administração será em dose única, composta de 80 mg de artemeter e 480 mg de lumefantrina, o aparecimento de efeitos adversos é menos provável. A administração de medicamentos poderá causar efeitos colaterais, reações anafiláticas (reações alérgicas) sérias e outras reações imprevisíveis, podendo em alguns casos, provocar a morte. Você deve compreender que a participação neste tipo de estudo envolve riscos que podem ser imprevistos, relacionados ou não ao estudo em questão. Os riscos associados à coleta de sangue em seu braço podem incluir: dor, hematoma (mancha roxa), sangramento no local onde o sangue foi retirado, tontura, desmaio e, em ocasiões raras, infecção. A coleta será acompanhada por um médico que poderá atender os voluntários no caso de alguma eventualidade, além de esclarecer qualquer dúvida.

**Benefícios esperados:** como benefício, você terá acesso ao resultado de todos os exames clínicos e laboratoriais realizados, podendo verificar seu estado de saúde atual. Além disso, o estudo trará benefícios aos pacientes com malária, pela elucidação dos processos de absorção e eliminação dos fármacos no organismo, além da possibilidade futura destes pacientes terem acesso a medicamentos genéricos e de alta qualidade. Esse estudo possui grande importância, pois a malária é a infecção parasitária que mais causa mortes no mundo e o uso correto de medicamentos de qualidade para o tratamento é essencial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

**Métodos alternativos existentes:** atualmente, não existem outros métodos que possam ser aplicado em estudos desse tipo.

**Forma de acompanhamento e assistência:** durante o período do estudo, haverá o acompanhamento dos voluntários por profissionais da área da saúde, como médicos, enfermeiros e farmacêuticos, para monitorar as condições de saúde e atender os voluntários no caso de alguma eventualidade ou efeito adverso severo, além de esclarecer qualquer dúvida. Os pesquisadores estarão à disposição dos voluntários para quaisquer esclarecimentos nos telefones (31) 3409-6982 e (31) 9692-2044 (Msc Isabela da Costa César), (31) 3409-6975 (Prof. Gérson Antônio Pianetti), (62) 3240-1999 (Atendimento a voluntários do ICF – Instituto de Ciências Farmacêuticas), (62) 9971-7861 (Médico Guilherme Jorge da Silva) e (62) 9299-6754 (Equipe de enfermagem do ICF).

**Garantia de sigilo:** na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e que os dados particulares serão confidenciais.

**Ressarcimento de despesas:** cada voluntário receberá R\$450,00 (quatrocentos e cinquenta reais), como forma de ressarcimento de despesas referentes à sua participação na pesquisa.

**Outros esclarecimentos:** você terá garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida que possa surgir, em qualquer etapa do estudo, e também terá a liberdade de retirar seu consentimento e sair do estudo no momento em que desejar.

### **3. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

Após ter sido devidamente informado sobre a justificativa e objetivos do estudo e os procedimentos a que serei submetido, e receber garantia de ser esclarecido sobre qualquer dúvida e de ter a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, consinto, de livre e

espontânea vontade, em participar da pesquisa “Avaliação da farmacocinética e biodisponibilidade de artemeter e lumefantrina administrados em comprimidos de dose fixa combinada”.

Declaro que li atentamente este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tendo nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo, recebendo explicações sobre o estudo, que responderam por completo minhas dúvidas. Também estou certificando que toda a informação prestada, incluindo minha história médica, é verdadeira até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada e datada deste documento.

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde ao pesquisador principal, membros da equipe, auditores, patrocinador do estudo, Comitê de Ética em Pesquisa e membros de órgãos regulamentares envolvidos, nas mesmas condições determinadas.

Eu dou meu consentimento de forma voluntária e me ofereço para participar deste estudo.

Ao assinar este Termo de Consentimento eu não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste estudo.

Assinatura do voluntário: \_\_\_\_\_

Aparecida de Goiânia, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**FAVOR DATAR SUA PRÓPRIA ASSINATURA NO MOMENTO DA MESMA**

Assinatura do farmacêutico: \_\_\_\_\_

Aparecida de Goiânia, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**FAVOR DATAR SUA PRÓPRIA ASSINATURA NO MOMENTO DA MESMA**

Assinatura do médico: \_\_\_\_\_

Aparecida de Goiânia, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**FAVOR DATAR SUA PRÓPRIA ASSINATURA NO MOMENTO DA MESMA**

Testemunha 1: \_\_\_\_\_

Aparecida de Goiânia, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**FAVOR DATAR SUA PRÓPRIA ASSINATURA NO MOMENTO DA MESMA**

Testemunha 2: \_\_\_\_\_

Aparecida de Goiânia, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**FAVOR DATAR SUA PRÓPRIA ASSINATURA NO MOMENTO DA MESMA**

## ANEXO A

Ofício de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da UFMG



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

Parecer nº. ETIC 464/08

**Interessado(a): Prof. Gerson Antônio Pianetti**  
**Departamento de Produtos Farmacêuticos**  
**Faculdade de Farmácia - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 1º. de dezembro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação da farmacocinética e biodisponibilidade de artemeter e lumefantrina administrados em comprimidos de dose fixa combinada"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**