



“Comparación de las biodisponibilidades in vitro de Artesunato tabletas de diferentes procedências”

por:

Ofelia del Rosario Villalva Rojas

Disertación presentada como requisito para la obtención del título de

Magíster en Ciencias en el Área de la Salud Pública

Orientadora: Dra. Mariana Conceição de Souza

Lima, Perú, Mayo de 2014

DEDICATORIA

A mi esposo; Benjamín y mis hijas; María Laura, Cristina y Micaela, quienes son mi mayor motivación, mi apoyo constante, por su paciencia, por entenderme y por acompañarme a cumplir mis metas.

A mi madre, porque siempre me ha alentado a luchar por mis sueños, por sus continuos consejos, a esa mujer que aunque ya no es parte de este mundo material, siempre está allí para mí y doy gracias a Dios que la tiene a su lado.

A mis hermanos, especialmente a mi hermano Manuel, por su confianza y por alentarme a lograr este sueño con esfuerzo y dedicación.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Salud, por haber gestionado este convenio entre el INS y la Escuela de Salud Pública de FIOCRUZ - Brasil, por las facilidades para estudiar, por darme esta gran oportunidad de formar parte de la primera promoción, que de otra forma, no hubiera podido hacerlo.

Al Centro Nacional de Control de Calidad, por brindarme sus instalaciones, equipamiento, e insumos para realizar los ensayos de este estudio.

A las profesoras Alicia Domínguez de Ugá y Sheyla María Lemos Lima de la Escuela de Salud Pública de FIOCRUZ, quienes nos han acompañado muy de cerca y han confiado en este proyecto, por la dedicación que han puesto para cumplir el sueño de llevar a cabo la primera maestría INS– FIOCRUZ.

A todo el equipo de profesores de la Escuela de Salud Pública de FIOCRUZ que vinieron a compartir sus conocimientos y experiencias.

A mi tutora y coautora de este estudio, Mariana Conceição de Souza, por el apoyo que me ha brindado siempre, por todos sus aportes al estudio, por facilitarme las muestras de Farmanguinhos.

A mi colega Miguel Grande, coautor de este proyecto, por su apoyo en la ejecución de la parte práctica.

A Elba Freyre, Técnica del Laboratorio de Fisicoquímica, por el apoyo en la parte laboratorial del estudio y a todas aquellas personas que de una u otra forma han aportado para hacer posible lograr esta meta.

RESUMEN

En las décadas pasadas se incrementó los casos de malaria en los países de la cuenca amazónica, incluyendo la aparición de *P. falciparum* y la resistencia a los medicamentos de primera línea; Cloroquina y Sulfadoxina/Pirimetamina, adicionalmente en estudios recientes se reportaron deficiencias en la calidad de los medicamentos antimaláricos⁴³. Por lo que Perú cambió su esquema de tratamiento para *P. falciparum* no complicada: con Mefloquina más Artesunato en la selva y Sulfadoxina/Pirimetamina en la costa norte. En el esquema de tratamiento de Perú, se utiliza un medicamento genérico nacional (multifuelle) que no ha demostrado ser intercambiable con el medicamento original, debido a que la regulación actual no ha implementado este requisito; aunque en la Ley 29459, ya se señale como parte de los requisitos del Registro Sanitario y que se espere entre en vigencia gradualmente. **Objetivo:** comparar las disponibilidades in vitro de las tabletas de Artesunato usadas por la estrategia sanitaria de malaria en Perú, con las tabletas de Artesunato fabricadas en empresas precalificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Brasil y Ghana. **Metodología:** para los ensayos de control de calidad y pruebas de cinética de disolución se utilizó la Farmacopea Non Standard de Los Estados Unidos, las guías de FDA y OMS. **Resultados:** las tabletas de las tres procedencias son homogéneas, los porcentajes de IFA varían entre 94% y 98% de la cantidad declarada. En la cinética de disolución; en pH 6,8 las tabletas de AS2 (93,64%) y AS3 (91,49%), presentan una velocidad de disolución muy rápida, (mayor al 85%, en 15 minutos, según FDA); mientras que AS1 presenta 72,06%. En pH 4,5 los máximos porcentajes liberados son: 87.26% (45 min); 76.05% (20 min) y 71.20% (30 min), para AS1, AS2 y AS3 respectivamente. En pH 1,2: AS1 no disuelve (las tabletas estaban intactas al término de los 60 minutos, mientras que AS2: 52.87% (20 min) y AS3: 27.98% (30 min). **Conclusión:** El antimalárico utilizado en Perú, cumple las especificaciones de la Farmacopea Non Standard de Estados Unidos y los requisitos según la ley 29459, sin embargo estos ensayos no son suficientes para aseverar intercambiabilidad; se requiere realizar estudios in vivo de bioequivalencia.

Palabras clave: Artesunato, malaria, cinética de disolución, Antimaláricos.

ABSTRACT

Malaria cases have increased in the countries of the Amazon basin in the past decades, including the appearance of *P. falciparum* and resistance to first-line drugs; Chloroquine and Sulfadoxine/Pyrimethamine. In recent studies were reported deficiencies in the quality of antimalarial drugs, because of that Peru changed the treatment scheme for uncomplicated *P. falciparum*, and begin to use Mefloquine plus Artesunate for Amazon Area and Sulfadoxine/Pyrimethamine on the North coast. In Peruvian treatment scheme, is used a national generic drug (multisource), which one did not demonstrate to be interchangeable with the innovator, because, this is not yet a requirement to get the Sanitary Register, according to Law 29459, and hopefully it will be implemented gradually. **Objective:** compare the *in vitro* availability of Artesunate tablets used by the health strategy against malaria in Peru, with Artesunate tablets manufactured by WHO prequalified manufactures from Brazil and Ghana. **Methodology:** testing and dissolution kinetics tests were performed with Non Standard Pharmacopoeia of the United States, FDA and WHO guidelines. **Results:** the three batches are homogeneous. It was found that the amount of Artesunate of three samples is between 94 % and 98 % of stated amount. Dissolution profile in pH 6.8, at 15 minutes shows 72.06 % for AS1; 93.64 % for AS2 and 91.49 % for AS3. In pH 4,5 they show 68.79%; 74.35%; 57.97 %, for AS1; AS2 and AS3 respectively; finally in pH 1,2 we found that AS1 did not dissolve the API, for AS2 was 51.20% and for AS3; 24.72%. So AS2 and AS3 present very fast dissolution rate in pH 6,8 (more than 85%, in 15 minutes, according FDA). While AS1, at this period of time only has 72.06%. In the others pHs, neither of three samples have dissolved more than 85% in 30 minutes. **Conclusion:** The Drug used in Peru comply the requirements according to US Non Standard Pharmacopoeia based in law 29459, however these test are not sufficient to ensure it is interchangeable. It is necessary to perform bioequivalence studies.

Keywords: Artesunate, malaria, dissolution kinetics

INDICE

1. FUNDAMENTO TEORICO.....	13
1.1 Ciclo biológico del Plasmodium.....	14
1.2 Acción Farmacológica de Artemisinin.....	18
1.3 Situación actual de la Reglamentación en el Perú	19
2. JUSTIFICACION Y RELEVANCIA	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo general.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	23
4.1. Instalaciones.....	23
4.2. Personal.....	23
4.3. Muestras de estudio.....	24
4.4. Estándar de referencia (patrón de referencia).....	25
4.5. Equipamiento.....	25
4.6. Procedimiento.....	26
4.6.1. Descripción de caracteres físicos.....	26
4.6.2. Ensayo de peso promedio	30
4.6.3. Identificación y determinación del IFA.....	30

4.6.4.	Adecuabilidad del sistema cromatográfico.....	30
4.6.5.	Preparación de las muestras en estudio.....	31
4.6.6.	Preparación del estándar de referencia.....	31
4.6.7.	Ensayo de uniformidad de contenido por unidad de dosis	32
4.6.8.	Preparación de la curva de calibración.....	33
4.6.9.	Cinética de disolución in vitro	33
5.	RESULTADOS.....	35
6.	DISCUSION.....	67
7.	CONCLUSION.....	70
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	72

Índice de Figuras

Figura No 1 Ciclo de vida del Plasmodium.....	14
Figura No 2 Línea de tiempo de la malaria y los medicamentos de tratamiento.....	18
Figura No 3 Envase mediato de las tabletas de AS1.....	26
Figura No 4 Envase Inmediato de las tabletas de AS1.....	27
Figura No 5 Forma y superficie de las tabletas de AS1.....	27
Figura No 6 Envase mediato de las tabletas de AS 2.....	28
Figura No 7 Envase Inmediato de las tabletas de AS2	28
Figura No 8 Forma y superficie de las tabletas de AS2.....	28
Figura No 9 Envase mediato de las tabletas de AS3.....	29
Figura No 10 Envase Inmediato de las tabletas de AS3.....	29
Figura No 11 Forma y superficie de las tabletas de AS3.....	30
Figura No 12 Cromatograma de la inyección del blanco.....	36
Figura No 13 Cromatograma de Adecuabilidad del sistema cromatográfico.....	37
Figura No 14 Cromatograma del estándar de trabajo del ensayo de contenido.....	38
Figura No 15 Cromatograma del ensayo de contenido de AS1.....	40
Figura No 16 Cromatograma del ensayo de contenido AS2.....	41
Figura No 17 Cromatograma del ensayo de contenido AS3.....	42

Figura No 18 Cromatograma Uniformidad de contenido de dosis unitaria de AS1...	45
Figura No 19 Cromatograma Uniformidad de contenido de dosis unitaria de AS2...	46
Figura No 20 Cromatograma Uniformidad de contenido de dosis unitaria de AS3...	47
Figura No 21 Cromatograma del estándar de referencia de Artesunato en medio de disolución a pH 6,8.....	50
Figura No 22 Cromatograma de AS1 en medio de disolución a pH 6,8.....	51
Figura No 23 Cromatograma de AS2 en medio de disolución a pH 6,8.....	52
Figura No 24 Cromatograma de AS3 en medio de disolución a pH 6,8.....	53
Figura No 25 Curva de calibración en medio de disolución a pH 6,8.....	54
Figura No 26 Comportamiento farmacocinético de las tabletas de AS1, AS2 y AS3 en medio de disolución a pH 6,8.....	54
Figura No 27 Cromatograma del estándar de referencia de Artesunato en medio de disolución a pH 4,5.....	56
Figura No 28 Cromatograma de AS1 en medio de disolución a pH 4,5.....	57
Figura No 29 Cromatograma de AS2 en medio de disolución a pH 4,5.....	58
Figura No 30 Cromatograma de AS3 en medio de disolución a pH 4,5.....	59
Figura No 31 Curva de calibración en medio de disolución a pH 4,5.....	60
Figura No 32 Comportamiento farmacocinético de las tabletas de AS1; AS2 y AS3 en medio de disolución a pH 4,5.....	60
Figura No 33 Cromatograma del estándar en medio de disolución a pH 1,2.....	61

Figura No 34 Cromatograma de AS1 en medio de disolución a pH 1,2.....	62
Figura No 35 Cromatograma de AS2 en medio de disolución a pH 1,2.....	63
Figura No 36 Cromatograma de AS3 en medio de disolución a pH 1,2.....	64
Figura No 37 Curva de calibración en medio de disolución a pH 1,2.....	65
Figura No 38 Comportamiento farmacocinético de AS2 y AS3 en medio de disolución a pH 1,2.....	65

Índice de Tablas

Tabla No 1 Casos de malaria en Perú por especies y por años.....	13
Tabla No 2 Datos de Adecuabilidad del sistema cromatográfico.....	38
Tabla No 3 Resultados del control de calidad.....	43
Tabla No 4 Resultados de la Uniformidad de contenido por unidad de dosis.....	48
Tabla No 5 Porcentajes obtenidos en los perfiles de disolución.....	66

Siglas y abreviaciones

AS/MQ	: Artesunato/Mefloquina
BP	: Farmacopea Británica
CNCC	: Centro Nacional de Control de Calidad
BCS	: Clasificación biofarmacéutica
DARES	: Dirección de Abastecimiento de Recursos estratégicos
DIGEMID	: Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas
EsSALUD	: Seguro social de Perú
FDA	: Food and Drugs Administration
HPLC	: Cromatografía líquida de alta resolución
IFA	: Ingrediente farmacéutico activo
INS	: Instituto Nacional de Salud

MINSA : Ministerio de Salud

OMS : Organización Mundial de la Salud

RAVREDA : Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos

SP/AS : Sulfadoxina, Pirimetamina/Artesunato

TC : Terapia combinada

USP : Farmacopea de Los Estados Unidos

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2012, más de 3,4 millones de personas estuvieron con riesgo a enfermarse con malaria, llegando a enfermarse aproximadamente 207 millones de esos hay 627 mil muertes a causa de esta enfermedad, siendo 482 mil niños⁴⁸.

En Perú en los cinco últimos años, es que en el 2009 se han presentado la mayor cantidad de casos reportados¹.

Tabla 1: Casos de malaria en Perú, por especies y por años.

Tipo de Diagnóstico	Año				
	2,009	2,010	2,011	2,012	2,013
<i>P. Vivax</i>	29746	20935	17820	22940	35275
<i>P. Falciparum</i>	3578	1807	2210	3221	6472
Notificados	33,324	22,742	20,030	26,161	41,747

La mayoría de casos en el Perú se reportan en especialmente en las ciudades de Loreto, Piura, Tumbes, San Martín, Junín y Madre de Dios².

Las especies de malaria que se presentan en el mundo son cinco: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y el descrito más recientemente, *P. Knowlesi*, según Spinello, 2013. En Perú, solo se presenta las tres primeras especies.

1.1 El ciclo biológico del *Plasmodium*

Comprende tres fases, tal como se puede ver en la Figura No 1 empieza con el ciclo sexual con la transmisión natural de la enfermedad, cuando la hembra del *Anopheles* pica al huésped y a través de su saliva introduce los esporozoitos en la circulación sanguínea, de allí pasan al hígado dando inicio al ciclo exoeritrocítico durante el cual se inicia la reproducción de los esporozoitos en el hígado, donde se dividen y forman los merozoítos. Finalmente, los merozoítos salen del hígado y pasan a la sangre para invadir los glóbulos rojos, dando inicio al ciclo eritrocítico². Los parásitos crecen en los gametocitos inmaduros y pueden ser absorbidos por un mosquito que pica a un nuevo huésped completando el ciclo de vida.

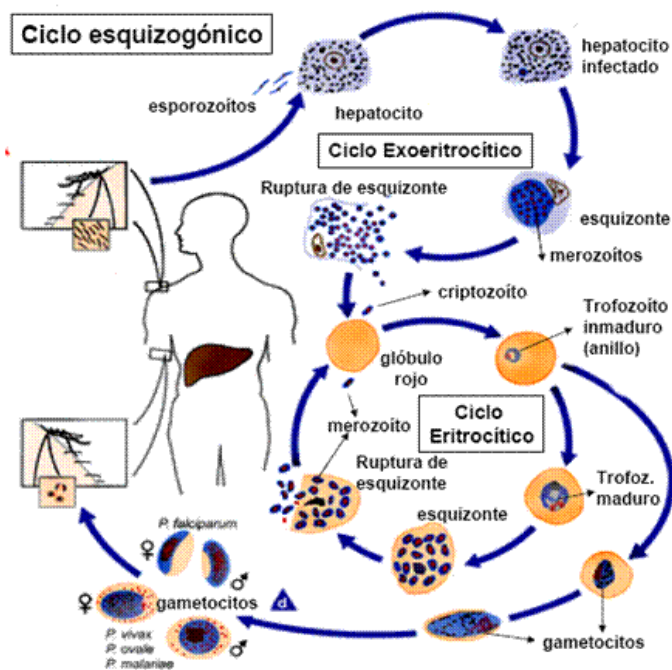


Figura No 1 Ciclo de vida del *Plasmodium*

La malaria es una enfermedad infecciosa febril aguda, cuyos síntomas aparecen entre los 10 y los 15 días después de la picadura del mosquito. Entre los primeros síntomas que aparecen está la fiebre, dolor de cabeza, escalofríos y vómitos, y si no se da un tratamiento al paciente dentro de las primeras 24 horas, la enfermedad de la malaria por *P. falciparum* puede agravarse y causar la muerte de la persona. En los niños de zonas endémicas se pueden presentar anemia grave, sufrimiento respiratorio. y en el adulto, frecuentemente se puede observar afectación multiorgánica. Sin embargo, en zonas endémicas se puede evidenciar que los habitantes adquieran inmunidad parcial, lo que podría originar la aparición de infecciones asintomáticas.

El tratamiento debe hacerse en base a un diagnóstico, pero también podría basarse solamente en la sintomatología, en aquellos casos cuando no es factible realizar el diagnóstico parasitológico, debido a la carencia de laboratorios para realizar un diagnóstico adecuado, sobre todo en lugares alejados.

Para diagnosticar la malaria se consideran las manifestaciones clínicas y debe confirmarse a través de pruebas laboratoriales, de forma microscópica de la sangre, con lo que se busca demostrar la presencia o ausencia del parásito. Uno de los métodos para este diagnóstico es la técnica de coloración de giemsa, con la que se observa la gota gruesa y el frotis. Otro método es el de diagnóstico inmunológico, el cual incluye métodos inmunoserológicos². Inmediatamente después del diagnóstico de la enfermedad, se procede a iniciar el tratamiento.

La malaria fue descubierta alrededor de 1900 y, desde esa época se empieza a dar un tratamiento usando Quinina. Posteriormente en los años 1932 se utiliza

Mepacrina como una alternativa de Quinina, para luego entre los años 1946 y 1975 pasar a utilizar Cloroquina. El éxito del tratamiento junto al uso del DDT, como insecticidas, y las mejoras de las condiciones socioeconómicas de la población, de esa época, hicieron que los casos de malaria disminuyan.

En los últimos 50 años, se ha usado drogas como Artesunato, Cloroquina y Sulfadoxina/Pirimetamina, sin embargo en la mayoría de países tropicales este tratamiento ya no funcionan, debido a que surgió resistencia a estos medicamentos en Asia y América del Sur, y se fue extendiendo también a África. Como consecuencia, la resistencia ha empeorado la morbilidad y ha aumentado la mortalidad ya que en esos tiempos, no se le dio la importancia debida a la vigilancia, o era muy insipiente y lo mismo pasó con los métodos clínicos y epidemiológicos utilizados para medir morbilidad y mortalidad.

En el Perú, desde 1955 las autoridades sanitarias tomaron conciencia para erradicar esta enfermedad, por lo que empezaron a desarrollar una serie de actividades para lograrlo, sobre todo en la Amazonia y la costa norte. Pero recién en la década de 1980 se aplicó el tratamiento monoterápico de Cloroquina para los casos de malaria por *P. vivax* y *P. falciparum*, luego se veía la necesidad de asociarlo con Primaquina, para prevenir las recaídas por *P. vivax*, y eliminar los gametocitos de *P. falciparum*, también para prevenir la transmisión, y en casos de malaria complicada o resistente, se usaba Quinina por vía parenteral y Sulfadoxina/Pirimetamina.

En la Figura No 2 se puede apreciar el resurgimiento de la malaria versus el tratamiento con los medicamentos que se contaba en ese momento, desde el uso de

quinina hasta el tratamiento combinado, recomendado por la OMS. Se señala que en el año 1990, reemerge la malaria asociada a un tema de resistencia de *P. falciparum* a la Cloroquina y Sulfadoxina/Pyrimetamina. De esta forma, a nivel mundial se implementó la adecuación de la estrategia de erradicación, basada en modelos de intervención⁴¹ con políticas definidas, tratamientos eficaces y sostenibles, para evitar la farmacorresistencia. De la misma forma, que el ministerio de salud peruano necesitaba toda la información disponible a fin de poder establecer una política nacional de medicamentos Antimaláricos, para así reducir o prevenir la morbilidad y mortalidad.

Es así, que desde el 2006, en la primera edición de la guía para el tratamiento de malaria, la OMS recomienda el uso de una terapia de combinación, basada en Artemisinín (ACT), y sus derivados, como Artesunato, Artemeter y Dihidroartemisinín, para aplicarlo como tratamiento de primera línea⁹.

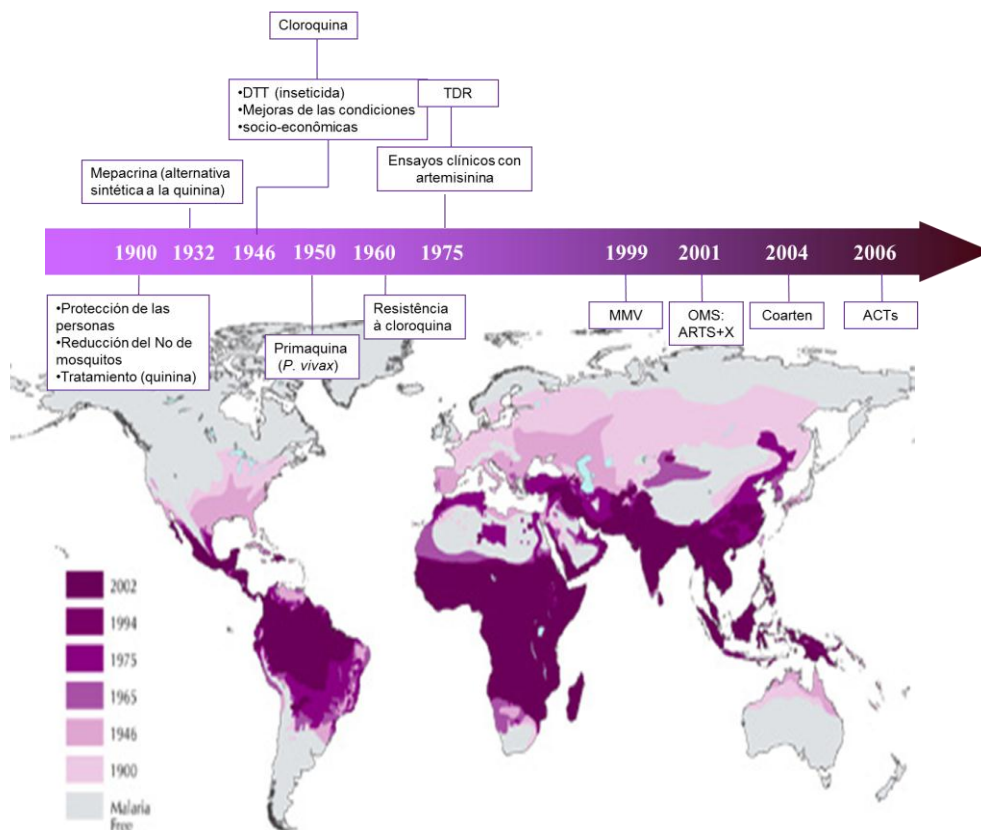


Figura No 2 Línea del tiempo de malaria y los medicamentos de tratamiento

Los derivados de Artemisinín comprenden una nueva familia de fármacos, cuya acción es rápida y efectiva contra las cepas resistentes a la Cloroquina, especialmente en los lugares de alta resistencia como el sudeste de Asia y el Pacífico¹⁰. Esta terapia combinada, se recomienda para prolongar la efectividad del tratamiento de primera línea contra la malaria. Como se señala líneas arriba, en varios países del mundo se observa resistencia de *P. falciparum* a Cloroquina y a otros medicamentos Antimaláricos, por lo que hace necesario el desarrollo de nuevas drogas eficaces¹¹ o el desarrollo de una vacuna.

1.2 Acción Farmacológica de Artemisin:

Después de la administración oral, Artesunato se absorbe y alcanza rápidamente su concentración máxima (Cmax) en el plazo de 45 a 90 minutos. Se metaboliza

en el hígado y por hidrólisis simple o por las esterasas en el plasma, da lugar al Dihidroartemisinín que también es eficaz contra malaria, por el mismo mecanismo de acción. El período de la eliminación es aproximadamente 1 a 2 horas y siguen la excreción urinaria y biliar.

Artesunato tiene un enlace peróxido, el cual se rompe dentro del parásito, formando radicales libres, ambos tienen efecto citotóxico directo sobre las células y las membranas subcelulares. Los radicales libres se forman y alternadamente ejercen también una acción tóxica. Esto forma la parte esencial del mecanismo de acción de Artesunato y explica su efecto rápido. Artemisinín y sus derivados semi sintéticos, como Artesunato y Dihidroartemisinín son schizontocidas sanguíneos, típicos en todas las formas de malaria. Además de eso, el mecanismo de acción depende de la predisposición genética del hospedero.

Es importante también resaltar que los parásitos expuestos a concentraciones no adecuadas de Artesunato se tornan resistentes a ese fármaco¹³ de allí la importancia que a la par de los estudios in vivo, previamente, es básico realizar un eficiente control de calidad en proceso de fabricación de este tipo de medicamentos, y la autoridad regulatoria debe hacer una constante vigilancia sanitaria.

1.3 Situación actual de la reglamentación en Perú:

Como se ha dicho anteriormente aquí, es bueno resaltar la trascendencia de la Ley 29459, Ley de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos

Sanitarios, del 2009, en la que se señala que el Estado y la sociedad son los encargados de proteger la salud de la población y que los medicamentos constituyen un bien social.

En el marco del acceso universal de medicamentos, se promueve el uso de medicamentos multifuente; aquellos que son terapéuticamente equivalentes o intercambiables al medicamento innovador, el cual previamente ha demostrado eficacia, seguridad y calidad, todo esto con la finalidad de disminuir el gasto público se ha implementado las compras corporativas a gran escala, y aquí entran especialmente los productos que se utilizan en las estrategias sanitarias.

Según se señala en el Reporte 40 de la OMS, las autoridades Regulatorias de cada país deben asegurar que los medicamentos que se encuentran en el mercado nacional deben estar sujetos a control de calidad y deben cumplir los estándares aceptables tanto de seguridad, como de eficacia y calidad y por supuesto todos los requisitos de buenas prácticas de manufactura, buenas prácticas de almacenamiento y distribución, así mismo los productos multifuente deben demostrar intercambiabilidad.

En Perú se está encaminando de manera gradual hacia la implementación de buenas prácticas de manufactura, buenas prácticas de laboratorio en las empresas farmacéuticas peruanas y extranjeras que comercialicen en el mercado peruano, ya que con estas exigencias se busca garantizar la calidad de los medicamentos, por lo que estudios como este, van a respaldar la política del uso de medicamentos genéricos en el país, para cumplir con la política de abaratar costos de los medicamentos.

Sin embargo, se enfatiza que, este es solo parte de las exigencias que se debe cumplir, pues aún falta para estar a la vanguardia de los países de alta vigilancia y es la exigencia de que todos los productos multifuente (genéricos, copia, similares, entre otros nombres asignados) demuestren *intercambiabilidad in vivo o in vitro*, según corresponda, y de esta manera asegurar eficacia de los Antimaláricos y todos los medicamentos en general. Ya que según lo que se indica en la Ley actual 29459, los ensayos obligatorios para el primer lote antes de salir al mercado, son, caracteres físico (descripción de la forma farmacéutica), la identificación del principio activo y de los grupos propios de la molécula, disolución, o desintegración, peso promedio, friabilidad, dureza, humedad (en ciertos casos), uniformidad de dosis unitaria, límite microbiano (según el tipo de producto), productos de degradación (según el tipo de producto).

Entre las pruebas críticas que se exigen como vigilancia sanitaria, para tabletas están, caracteres físicos, identificación del principio activo, contenido del principio activo, peso promedio y disolución, pero para obtener el Registro sanitario están además la prueba de uniformidad de dosis unitaria, límite microbiano, dureza, friabilidad, y cuando corresponda también agua, productos de degradación y otras que el fabricante señale en su protocolo de análisis del producto terminado.

Los requisitos y las pruebas que se exigen actualmente para la obtención del Registro Sanitario, no son suficientes para demostrar que el principio activo alcanza los niveles de concentración necesarios para demostrar eficacia, en este caso Artesunato, por sus características de solubilidad y permeabilidad, según la Clasificación biofarmacéutica, se encuentra en la Clase IV, lo que significa que

tiene baja solubilidad y baja permeabilidad. Este concepto clasifica a los IFAs tomando en cuenta su solubilidad en agua y la permeabilidad intestinal, y se adiciona la disolución como un factor mas que influye en el comportamiento del producto terminado de formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata.

2. JUSTIFICACIÓN Y RELEVANCIA

Para optimizar resultados con los esquemas de tratamiento para malaria, es necesario verificar los niveles de la concentración del medicamento en la sangre de los pacientes, por lo que, se propone efectuar estudios de disponibilidad in vitro, a fin de asegurar la calidad de los medicamentos que el Ministerio de Salud de Perú está adquiriendo para la estrategia sanitaria de malaria. Un paso importante previo a la realización de los estudios de Biodisponibilidad, son los estudios in vitro de cinética de disolución, los cuales en algunos casos pueden predecir el comportamiento in vivo del fármaco, ya que estos se efectúan en medios de disolución que semejan los pHs fisiológicos del organismo.

Y como señala Salomón Durand et al. *“a finales del año 2001, el Perú fue el primero en los países de Las Américas en implementar la terapia combinada (TC) de Artesunato/Mefloquina (AS/MQ) y Sulfadoxina/ Pirimetamina/Artesunato (SP/AS) como terapia de primera línea para la malaria no complicada por P. falciparum, luego se sumaron Bolivia, Brasil, Guyana y Ecuador para adoptar también este esquema de tratamiento a la TC⁴³”*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Comparar la disponibilidad in vitro de las tabletas de Artesunato usadas por la estrategia sanitaria en contra de la malaria de Perú, con las tabletas fabricadas por empresas precalificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Brasil y Ghana.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar el control de calidad de cada una de las muestras
- Realizar las pruebas de cinética de disolución en pH de 1,2; 4,5 y 6,8

4. METODOLOGIA

4.1 Instalaciones

Los ensayos analíticos fisicoquímicos, los perfiles de disolución y la parte estadística fueron realizados en el Centro Nacional de Control de Calidad del INS, el cual es un laboratorio acreditado internacionalmente con la norma ISO 17025 y reconocida como laboratorio de referencia de la OMS. Las condiciones ambientales de las áreas donde se realizaron los ensayos, como temperatura y humedad son registradas y monitoreadas diariamente.

4.2 Personal: El personal (el investigador, co- investigador), son analistas del centro y están calificadas para el uso de todos los equipos que se usan en el estudio, y el técnico de laboratorio está entrenado para realizar las actividades de apoyo.

4.3 Muestras de estudio

Se analizaron Artesunato tabletas procedentes de la empresa SINOPHARM LIMITED en Ghana – África, ya esta es una empresa farmacéutica precalificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y porque recibió la transferencia tecnológica de la empresa de China, innovadora de Artesunato, también se utilizaron tabletas de Artesunato/Mefloquina fabricados por Farmanguinhos de Brasil, por ser el país más cercano a Perú, que haya sido precalificado por OMS, y las tabletas de Artesunato adquiridas por la estrategia de malaria de Perú.

Estas empresas para ser precalificadas por la OMS, deben cumplir una serie de especificaciones y requisitos, lo que es verificado por este organismo, a través de inspecciones periódicas, entre los requisitos esta el cumplimiento de BPM y otros estándares internacionales.

Las tabletas AS2 se denominaron a las tabletas de Artesunato 50 mg provenientes de una empresa farmacéutica de Perú y fueron donadas por la Dirección de Abastecimiento de Recursos Estratégicos (DARES) del Ministerio de Salud. Estas tabletas son usadas por la estrategia sanitaria en contra de la malaria de Perú, las tabletas de Artesunato 20 mg, codificadas como AS1 fueron donadas gentilmente por SINOPHARM, de China, pero son actualmente fabricadas en Ghana-África, como se mencionó anteriormente, esta empresa farmacéutica africana recibió la transferencia tecnológica del innovador chino. Finalmente AS3 son las tabletas de Artesunato 100 mg + Mefloquina, fabricado por Farmanguinhos - Brasil, esta empresa farmacéutica también es precalificada por OMS y específicamente recibió el encargo de implementar la fabricación de esta combinación

para luego hacer la transferencia a empresas farmacéuticas de la India⁴⁸ y actualmente se ha iniciado la transferencia a Perú.

4.4 Estándares de referencia (patrón de referencia): proporcionados por el banco de estándares del Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Salud.

- Artesunato, lote AT/20101001 y
- Dihidroartemisinín, como estándar interno; marca SIGMA, Lote D7439

4.5 Equipamiento: Todos los equipos cuentan con su programa de calibración, verificación y/o calificación actualizada.

- Equipo de disolución modelo VK 7025, marca Varian, a 100 rpm,
- Equipo de HPLC, marca Agilent 1100, con detector UV-VIS, a 216 nm,
- Balanza Analítica, marca Sartorius
- pHmetro, marca ThermoOrion
- Sonicador,
- Equipo de filtración por vacío, equipado con membrana de Nylon de 0,45 μ de poro y 47 mm de diámetro para desgasificar los medios de disolución.
- Material de vidrio volumétrico calibrado, (matraces, pipetas, probetas, etc)

- Filtro jeringa de Nylon de 0,45 μ de tamaño de poro.

4.6 Procedimiento

4.6.1 La descripción de los caracteres físicos de las tabletas se ha realizado a través de una evaluación organoléptica, tomando en cuenta la forma de las tabletas, los bordes, las superficies, el color de la cubierta y el núcleo, también se tomó en cuenta si tenían alguna inscripción en alguna de las superficies. No se ha contrastado con las especificaciones propias de cada fabricante debido a que no se cuenta con dicha información, por lo que en la descripción solo ha tomado en cuenta la homogeneidad de las unidades evaluadas⁴⁹.

Muestras de AS1

Envase mediato: Como se muestra en la Figura No 3, es una caja de cartón blanco con azul claro, impreso en color azul claro, blanco y negro entre otros datos: el nombre del producto, dosis, número de lote, fecha de vencimiento,

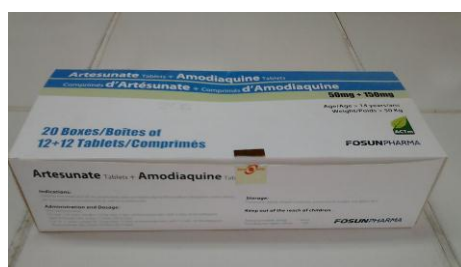


Figura No 3 Envase mediato de las tabletas de AS1

Envase inmediato: Como se muestra en la Figura No 4, corresponde a un blíster metálico, impreso en negro con los datos del producto, como nombre, dosis, número de lote, fecha de vencimiento, contiene doce tabletas blancas de Artesunato y doce tabletas de color amarillo de Mefloquina.



Figura No 4 Envase inmediato de las tabletas de AS1

Superficie de las tabletas



Figura No 5 Forma y superficie de las tabletas de AS1

Muestras de AS2

Envase mediato: Como se muestra en la Figura No 6, es una caja de cartón blanco y rosado, impreso en color blanco y negro, entre otros datos: el nombre del producto, dosis, número de lote, fecha de vencimiento,



Figura No 6 Envase mediato de las tabletas de AS2

Envase inmediato: Como se muestra en la Figura No 7, corresponde a un blíster por un lado metálico, y el otro plastificado; impreso en negro con los datos del producto, como nombre, dosis, número de lote, fecha de vencimiento, contiene diez tabletas de color rosado de Artesunato.



Figura No 7 Envase inmediato de las tabletas de AS2

Superficie de las tabletas



Figura No 8 Forma y superficie de las tabletas de AS2

Muestras de AS3

Envase mediato: Como se muestra en la Figura No 9, es una caja de cartón blanco con franjas amarillas y rojas, impreso en color blanco, y negro, entre otros datos: el nombre del producto, dosis, número de lote, fecha de vencimiento.



Figura No 9 Envase mediato de las tabletas de AS3

Envase inmediato Como se muestra en la Figura No 10, corresponde a un blíster metálico, impreso en negro con los datos del producto, como nombre, dosis, número de lote, fecha de vencimiento, contiene tres tabletas de color celeste de Artesunato y Mefloquina.



Figura No 10 Envase inmediato de AS3

Superficie de las tabletas



Figura No 11 Forma y superficie de las tabletas de AS3

4.6.2 Ensayo de peso promedio,

Se utilizaron 20 unidades, las que se pesaron de manera individual cada una de ellas, este ensayo se realizó bajo las exigencias de la Farmacopea Británica edición 2013 (BP 2013), ya que el CNCC-INS tiene acreditado este método según la Farmacopea Británica.

4.6.3 Ensayos de identificación y determinación del contenido del ingrediente farmacéutico activo (IFA),

Se utilizaron las mismas tabletas del peso promedio, las que se trituraron hasta obtener un polvo fino homogéneo, según la monografía de la farmacopea Non Standard de la USP²⁸.

Para la identificación del principio activo (Artesunato) de las tabletas en estudio se compararon los tiempos de retención de los picos en los cromatograma de las tabletas de estudio versus el cromatograma del estándar.

4.6.4 Adecuabilidad del sistema cromatográfico, es una parte de los procedimientos analíticos que se deben cumplir antes de llevar a cabo el ensayo, y se basa en

que el equipamiento, la parte electrónica, las operaciones analíticas, los estándares de referencia y las muestras constituyen un todo durante el análisis. Los parámetros que se deben cumplir están establecidos previamente, según el método o procedimiento que se va a evaluar, ejemplo en HPLC, para este estudio está Resolución, factor de cola, desviación estándar entre otros.

Para este paso se preparó una solución conteniendo 0,4 mg/mL de Artesunato en acetonitrilo y 0,4mg/mL de Dihidroartemisinín en acetonitrilo. La fase móvil estaba compuesta de una mezcla de acetonitrilo y buffer fosfato (1.36 g/L de fosfato de potasio dihidrógeno en agua y ajustado a pH 3,0 con ácido fosfórico) en proporción 12:13 filtrada con filtro de poro 0,45 μ m. El sistema cromatográfico se basó en el capítulo <621>, de cromatografía de la USP, con detector UV a 216 nm, columna cromatográfica Ascentis C18 150 x 2,1 mm, 5 μ m, marca Supelco, flujo 0,5 ml/min y a una temperatura de 30°C.

Como requisito previo a la ejecución de los ensayos de identificación y contenido del principio activo en cada uno de los lotes, se llevó a cabo la prueba de cumplimiento de adecuación del sistema del HPLC, para lo cual se utilizaron los estándares de Artemisinín y de Dihidroartemisinín, y como parámetros de cumplimiento se evaluaron factor de cola, resolución entre los picos de Artemisinín e Dihidroartemisinín, no menor que 1.5, la desviación estándar relativa, entre las inyecciones del estándar de referencia no mayor de 1.5%, y como criterio de aceptación del porcentaje de diferencia entre los estándares de trabajo y el de control un valor no mayor de 2.0 %.

4.6.5 Preparación de las muestras en estudio:

Se preparó un pool de 20 tabletas de cada uno de los orígenes de Artesunato, las mismas unidades que se utilizaron para el peso promedio. Estas se pulverizaron homogéneamente y se tomaron pesos exactos equivalentes a 100 mg de Artesunato, diluidos en acetonitrilo grado HPLC, marca Merck en un matraz volumétrico de 25 ml, obteniéndose una concentración de 4 mg/ml; de cada origen se prepararon soluciones por duplicado.

4.6.6 Preparación del estándar de referencia:

Se pesó aproximadamente 40 mg del estándar de referencia de Artesunato (peso exacto) por duplicado (uno como estándar control y otro estándar de trabajo), se diluyeron con acetonitrilo grado HPLC, marca Merck, en matraces volumétricos de 10 ml, obteniéndose una concentración de 4 mg/ml.

Todas estas soluciones se filtraron con filtro de membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF) 0,45 μm y se inyectaron 20 μl en el equipo de HPLC, por cada solución de las muestras en estudio se inyectaron dos veces y del estándar de referencia de trabajo por quintuplicado y del estándar control por triplicado.

4.6.7 Ensayo de uniformidad de contenido de dosis unitaria, se tomaron diez table-

tas seleccionadas al azar, de cada uno de los lotes, se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL; para las tabletas AS1 y AS2 conteniendo 50 mg de Artesunato por tableta; y en matraz volumétrico de 20 ml para las tabletas de AS3,

que contenían 100 mg de Artesunato por tableta; se diluyeron en acetonitrilo obteniéndose una concentración de 4 mg/mL para todos los casos,

Se tomaron alícuotas y se filtraron con filtro PVDF 0.45 μ m y se inyectaron 20 μ l en el HPLC, con las mismas condiciones cromatográficas que para los ensayos de identificación y contenido del principio activo. El ensayo Uniformidad de Dosis Unitaria se llevó a cabo según el capítulo (905) de la USP.

4.6.8 Preparación de la curva de calibración: se preparó una curva de calibración en cada uno de estos pH, para lo que se pesó aproximadamente 12,5 mg (peso exacto), se llevó a un matraz volumétrico de 25 ml de esa solución se prepararon diluciones de 1 en 50 ml (0,01mg/mL), 2 en 50 ml (0,02 mg/mL); 3 en 50 ml (0,03 mg/mL); 4 en 50 ml 0,04 mg/mL); 5 en 50 ml (0,05 mg/mL); 6 en 50 ml (0,06 mg/mL), correspondiente a las seis concentraciones; de 20%; 40%; 60%; 80%; 100% y 120% de Artesunato respectivamente.

4.6.9 Cinética de disolución in vitro, se analizaron 12 tabletas de cada uno de los lotes en los medios de disolución establecidos en los requerimientos de OMS y FDA, a pH 1,2; 4,5 y 6,8.

Seis tabletas, por vez; se colocaron en un cada vaso de disolución con 900 mL del medio desgasificado ya sea a pH 1,2; 4,5; ò 6,8 según correspondía; se tomó alícuotas de 10 mL por cada tiempo establecido 10; 15; 20; 30; 45 y 60 minutos, reponiéndose el volumen sacado, con el mismo medio de disolución, esta alícuota se filtró inmediatamente con filtro PVDF 0,45 μ m y se colocó en el equipo de HPLC, con las mismas condiciones que la determinación del contenido. Antes

de inyectar la curva de calibración se inyectó un blanco conteniendo el medio de disolución correspondiente.

El medio de disolución fluido gástrico simulado sin enzimas 0,1 N pH 1.2 se preparó a partir de una solución de ácido clorhídrico concentrado (37%), y cloruro de sodio.

El medio de disolución buffer acetato pH 4.5 se preparó con ácido acético glacial y acetato de sodio.

El medio de disolución buffer fosfato pH 6.8, se preparó con fosfato monobásico de potasio y solución de hidróxido de sodio, para todos se empleó agua destilada, y el medio antes de colocarlo en los vasos fueron filtrados y desgasificados en la bomba al vacío usando un filtro de PVDF de 0,45 μm . El pH se midió en el pH metro marca Metrhon.

Previo a realizar los perfiles de disolución se llevó a cabo la verificación del equipo disolutor, para lo cual se toma en cuenta los requerimientos, como la distancia del fondo del vaso de disolución y la paleta, $(2,5 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm})$, la temperatura del medio de disolución de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, esta temperatura se mide al inicio y al final del ensayo. El material de vidrio utilizado esta calibrado. Los análisis y pruebas así como el uso y registro de los equipos se realizaron bajo las exigencias de las normas ISO 17025 y las BPL/OMS.

5. RESULTADOS

Los datos obtenidos del control de calidad de los tres lotes analizados, nos indican que todos ellos cumplen las especificaciones de la farmacopea Non Standard de la USP²⁸. Al observar las características físicas de cada uno de las procedencias, se puede decir que son homogéneas, tanto las superficies, los lados y los bordes, en ninguna tableta se ha observado la presencia de rajaduras, rebabas ni manchas.

Previo a la inyección de los estándares se inyectó un blanco, que correspondía a la fase móvil, en cuyo Cromatograma no se evidencia ningún pico cromatográfico en los tiempos de retención que corresponde al estándar de referencia de Artesunato o Dihidroartemisinín, como se evidencia en la Figura 12.

En la prueba de Adecuabilidad del sistema cromatográfico del HPLC, se cumplieron con todos los parámetros requeridos por la monografía de la farmacopea Non Standard de la USP²⁸: para el factor de cola (0.95 -1.05) se obtuvo 0.94, para la resolución entre los picos de Artemisinín y de Dihidroartemisinín (no menor que 1.5) se obtuvo 2.10; Figura 13, adicionalmente, la desviación estándar relativa entre las inyecciones del estándar de referencia (no mayor de 1.5) se obtuvo un promedio de 0.46%, y como criterio de aceptación del porcentaje de diferencia entre los estándares de trabajo y el de control (no mayor de 2.0 %), se obtuvo 0.16%.

Después se inyectaron las muestras de todos los lotes, para los ensayos de identificación y la determinación del contenido de Artesunato, así como para el ensayo de uniformidad de dosis unitarias.

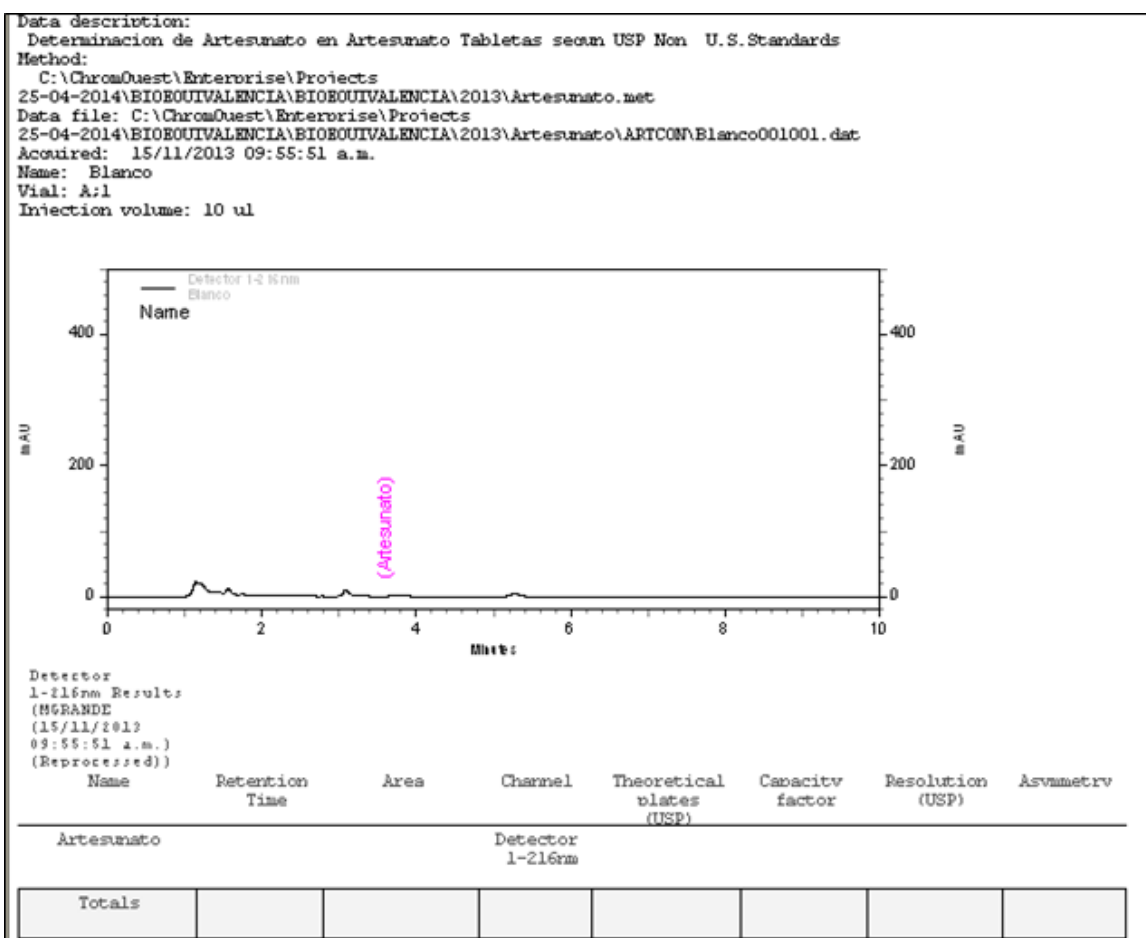


Figura No 12: Cromatograma del Blanco en el que se inyecta solo la fase móvil.

Data description:
 Determinacion de Artesunato en Artesunato Tablet as secun USP Non U.S.Standards
 Method:
 C:\ChromQuest\Enterprise\Projects
 25-04-2014\BIOEQUIVALENCIA\BIOEQUIVALENCIA\2013\Artesunato.met
 Data file: C:\ChromQuest\Enterprise\Projects
 25-04-2014\BIOEQUIVALENCIA\BIOEQUIVALENCIA\2013\Artesunato\ARTCON\SST003003.dat Acquired:
 06/05/2014 04:08:26 p.m.
 Name: SST
 Vial: A:2
 Injection volume: 10 ul

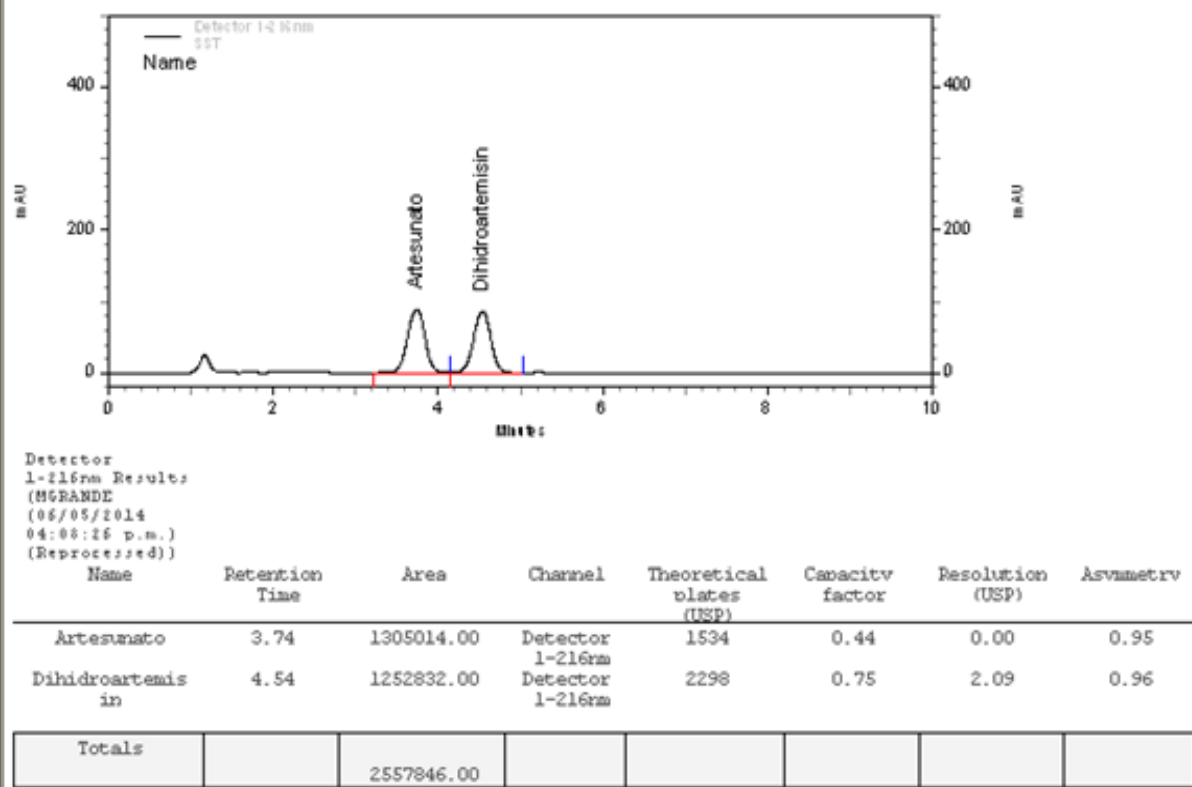


Figura No 13 Cromatograma de Adecuabilidad del sistema cromatográfico entre el estándar de referencia de Artesunato y de Dihydroartemisin

Tabla No 2: Datos de Adecuabilidad del sistema cromatográfico, según US Non Standard Farmacopea

Analito	Tiempo de retención (min)	Factor de cola (0.95 - 1.05)	Resolución (No menor que 1.5)	DSR entre ambos picos (No más de 2%)	% de diferencia entre estándares (No más de 2%)
Artesunato	3.7	0.95	2.1	0.46	0.16
Dihidroartemisinina	4.6				

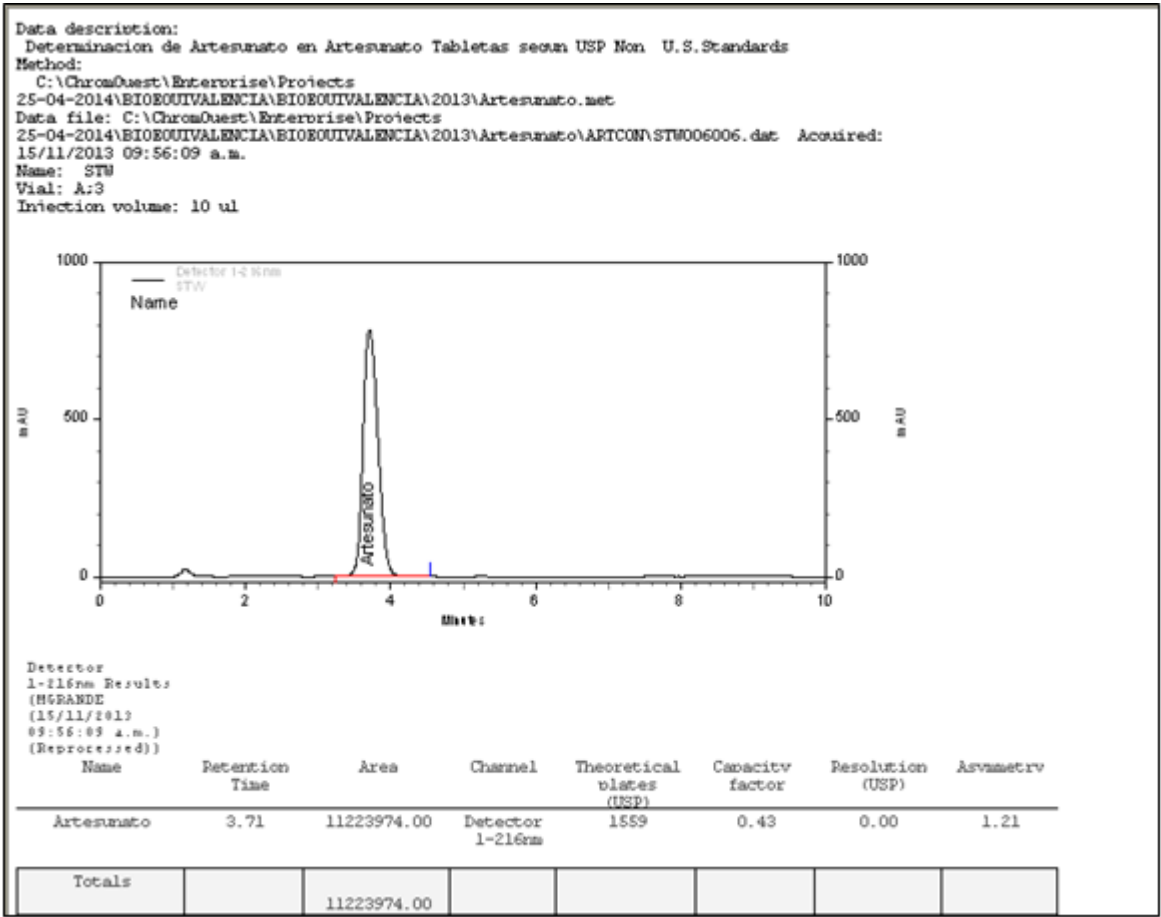


Figura No 14: Cromatograma correspondiente al estándar de referencia de trabajo (STW), cuya concentración es de 100%

En el ensayo de identificación se evidencia la presencia de un pico cromatográfico en el mismo tiempo de retención 3,7 minutos que eluye el analito del estándar de referencia; Figura 14; lo que indica la presencia del principio activo Artesunato en las tabletas de los lotes analizados.

En la prueba para determinar el porcentaje de contenido del principio activo Artesunato por método cromatográfico se hallaron: para AS1 un 48,4 mg/tab (98,8 %) y se observa en la Figura 15, Tabla 3. Para AS2 se halló 49,11 mg/tab (98,2 %) lo que se observa en la Figura 16, Tabla 3 y para AS3, se halló 93,80 mg/tab (93,80 %) se observa en la Figura 17, Tabla 3. Todos los lotes cumplen con las especificaciones de la Farmacopea Non Standard de Los Estados Unidos, de 90% a 110% de la cantidad declarada de Artesunato.

Los porcentajes de las tabletas se hallaron mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Área M}}{\text{Área St}} \times \text{Conc St} \times \frac{\text{Vol}}{\text{Peso M}} \times \text{Pp} = \text{mg/tab} \times \frac{100}{\text{C. rotul}} = \%$$

Área M = Área de la muestra

Área St = Área del estándar

Conc St = concentración del estándar

Vol = Volumen en que se diluye la muestra

Peso M = Alícuota pesada de cada muestra

Pp = peso promedio

C. rotul = cantidad rotulada

Data description:
 Determinacion de Artesunato en Artesunato Tabletts segun USP Non U.S.Standards
 Method:
 C:\ChromQuest\Enterorise\Projects
 25-04-2014\BIOEQUIVALENCIA\BIOEQUIVALENCIA\2013\Artesunato.met
 Data file: C:\ChromQuest\Enterorise\Projects
 25-04-2014\BIOEQUIVALENCIA\BIOEQUIVALENCIA\2013\Artesunato\ARTCON\MP2-FOSUNPHARMA
 -205021021.dat Acquired: 15/11/2013 09:56:36 a.m.
 Name: MP2-FOSUNPHARMA -205
 Vial: A:8
 Injection volume: 10 ul

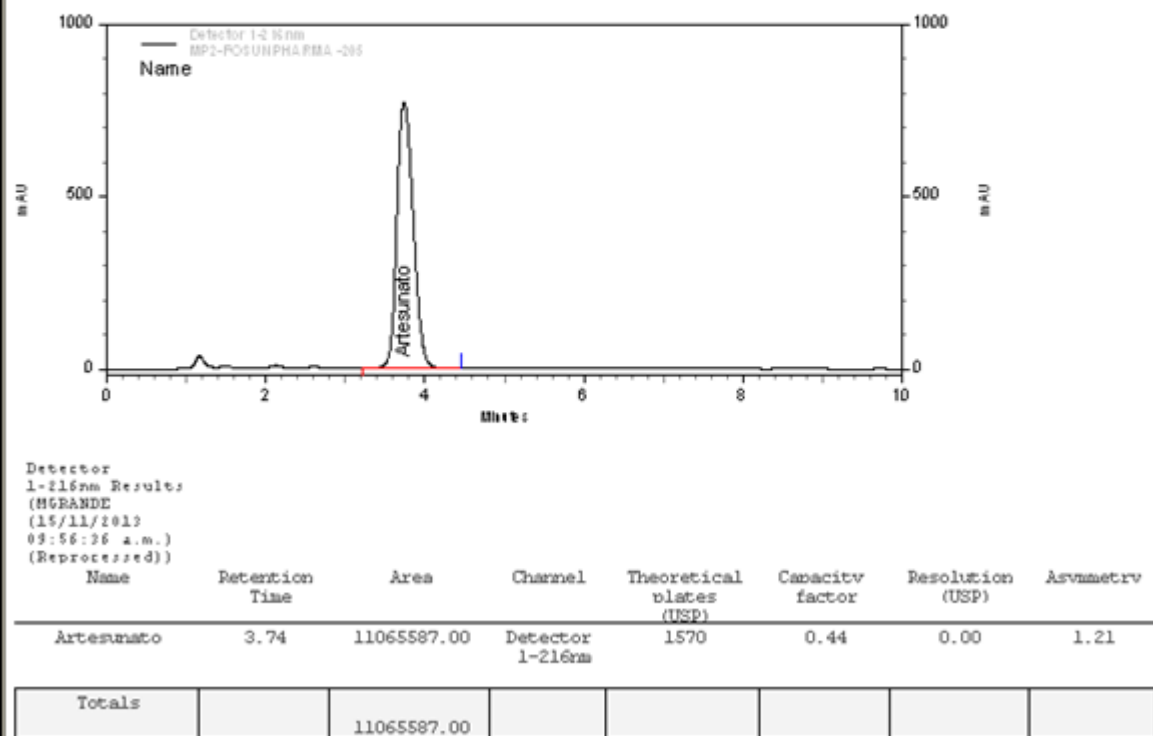
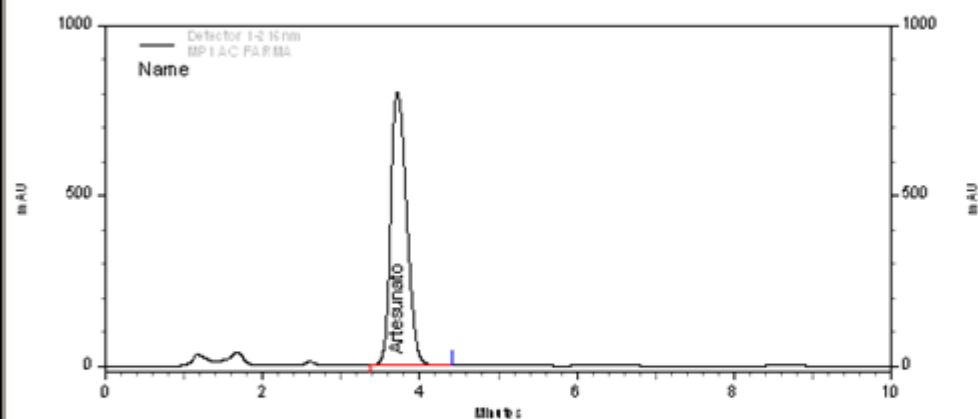


Figura No 15. Cromatograma correspondiente al ensayo de contenido de AS1

Data description:
 Determinacion de Artesunato en Artesunato Tablet as segun USP Non U.S.Standards
 Method:
 C:\ChromQuest\Enterprise\Projects
 25-04-2014\BIOEQUIVALENCIA\BIOEQUIVALENCIA\2013\Artesunato.met
 Data file: C:\ChromQuest\Enterprise\Projects
 25-04-2014\BIOEQUIVALENCIA\BIOEQUIVALENCIA\2013\Artesunato\ARTCON\MP1 AC FARMA014014.dat
 Acquired: 15/11/2013 09:56:27 a.m.
 Name: MP1 AC FARMA
 Vial: A:5
 Injection volume: 10 ul



Detector
 1-216nm Results
 (HGRANDE
 (15/11/2013
 09:56:27 a.m.)
 (Reprocessed))

Name	Retention Time	Area	Channel	Theoretical plates (USP)	Capacity factor	Resolution (USP)	Asymmetry
Artesunato	3.72	11298600.00	Detector 1-216nm	1612	0.43	0.00	1.25
Totals		11298600.00					

Figura No 16 Cromatograma correspondiente al ensayo de contenido de AS2

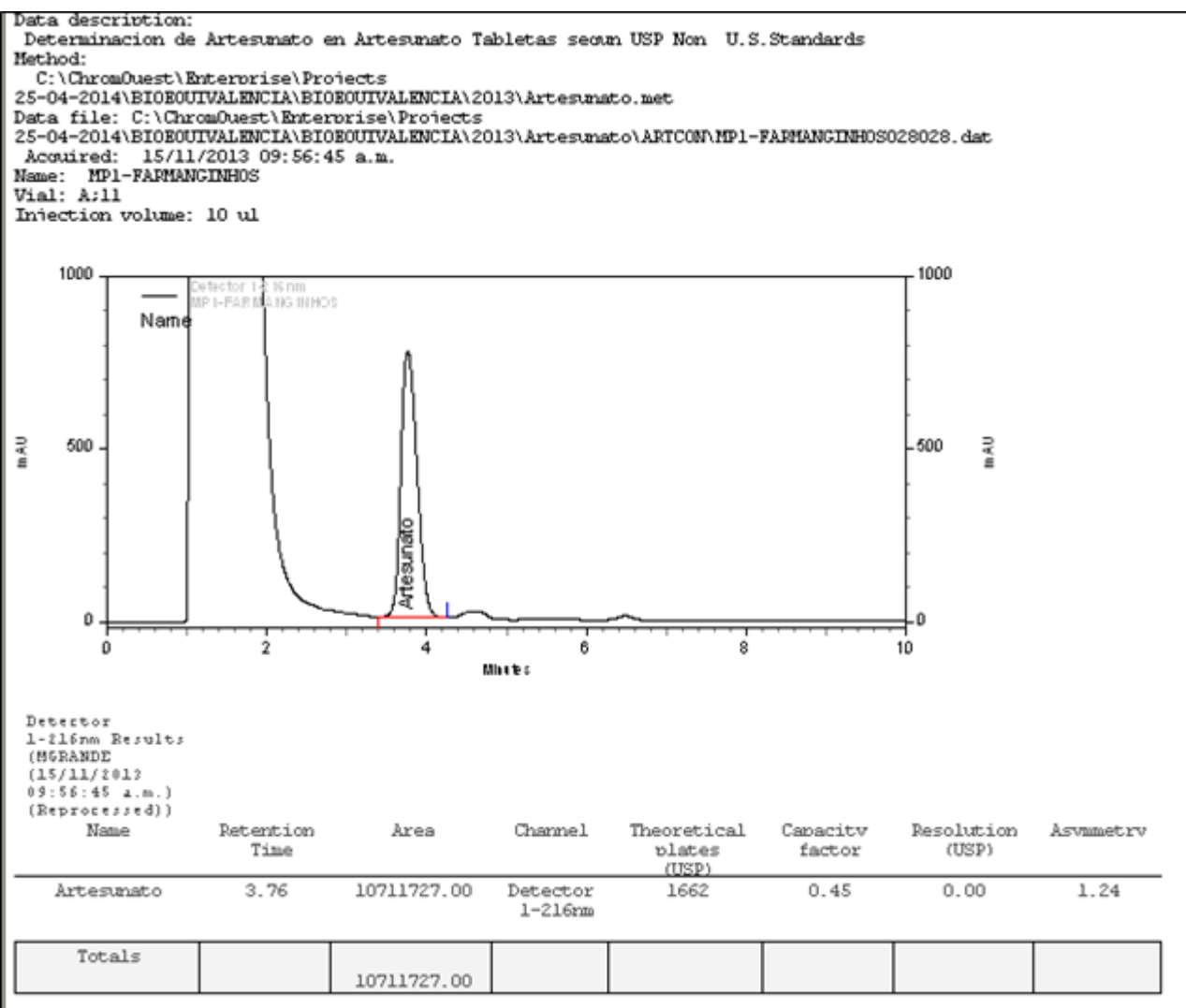


Figura No 17 Cromatograma correspondiente al ensayo de contenido de AS3

Tabla No 3: Resultados del control de calidad, donde TR es el Tiempo de retención.

Tabletas	Control de calidad			
	Características físicas de las tabletas	Identificación de IFA (El TR de la muestra debe corresponder al del estándar de referencia)	Contenido del IFA 90 % - 110 %	Peso Promedio (mg) N = 20 tabletas
AS1	Tableta de forma circular, con ranura central en uno de sus lados y con la inscripción "AS 50" en el otro lado. De bordes enteros. De color blanco.	El TR del pico de Artesunato en la Figura 4 de AS1 corresponde al de la Figura 3	48,4 mg/tab (98,8 %)	X = 270,1 Max = 280,1 Min = 261,3
AS2	Tableta de forma circular, biconvexa, con ranura en uno de sus lados, de bordes enteros, con cubierta de color rosado y a la fractura presenta polvo compacto de color blanco.	El TR del pico de Artesunato en la Figura 5 de AS1 corresponde al de la Figura 3	49,11 mg/tab (98,2 %)	X = 360,9 Max = 365,7 Min = 356,5
AS3	Tableta de forma circular, biconvexa, de bordes enteros, con cubierta de color celeste y a la fractura presenta polvo compacto de color blanco.	El TR del pico de Artesunato en la Figura 6 de AS1 corresponde al de la Figura 3	93,80mg/tab (93,80 %)	X = 466,9 Max = 478,8 Min = 443,5

En el ensayo de uniformidad de contenido por unidad de dosis, nos permite evaluar la homogeneidad en el contenido del fármaco entre las unidades de dosificación del lote durante el tableado y demás procesos. El cumplir con este requerimiento garantiza que el lote es uniforme en las unidades con respecto a su contenido de fármaco. En cuanto a la fabricación demuestra el cumplimiento de los parámetros y requisitos de buenas prácticas de manufactura. En este ensayo, los resultados de todos los lotes analizados cumplen las especificaciones de la farmacopea Non Standard de Los Estados Unidos, ver Tabla No 4.

Entonces, si decimos que este ensayo nos indica el grado de homogeneidad de la forma farmacéutica en relación a la dosificación, y si vemos los resultados obtenidos en el

presente estudio, se puede afirmar que las tabletas de AS2 con un AV=6,0 presentan mayor uniformidad entre las unidades ensayadas en relación a las tabletas de AS3 con un AV = 10,1; que AS1 con un AV = 11,2; lo que significa que tienen mayor dispersión entre las unidades analizadas, tal como se muestra en la Tabla No 4.

El porcentaje de cada tableta se determinó mediante la fórmula:

$$\frac{\text{Área M}}{\text{Área St}} \times \text{Conc St} \times \frac{\text{Vol}}{1} = \text{mg/tab} \times \frac{100}{\text{C. rotul}} = \%$$

Área M = Área de la muestra

Área St = Área del estándar

Conc St = concentración del estándar

Vol = Volumen en que se diluye la muestra

C. rotul = cantidad rotulada

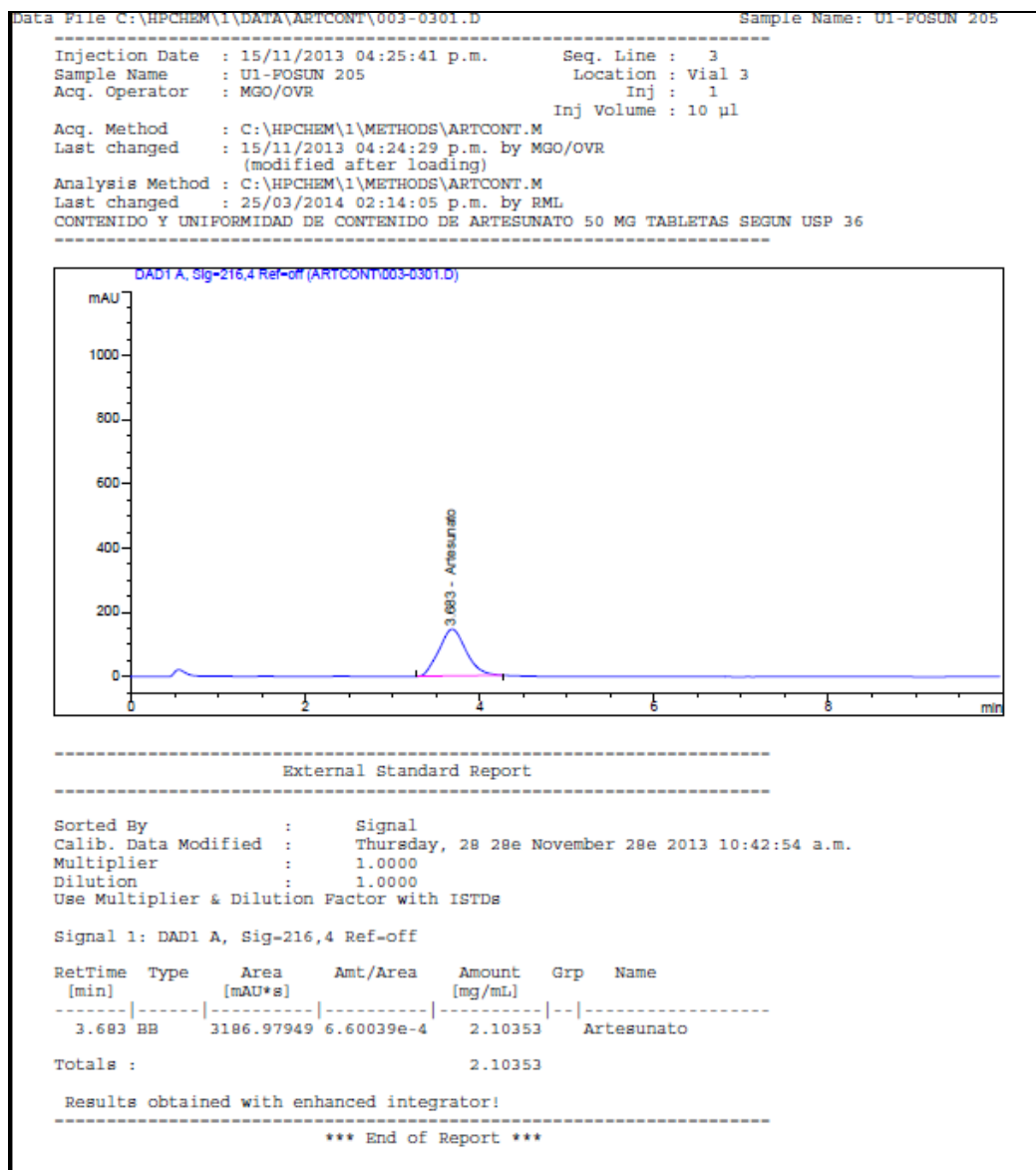


Figura No 18 Cromatograma correspondiente al ensayo de Uniformidad de contenido de dosis unitaria de las tabletas de AS1

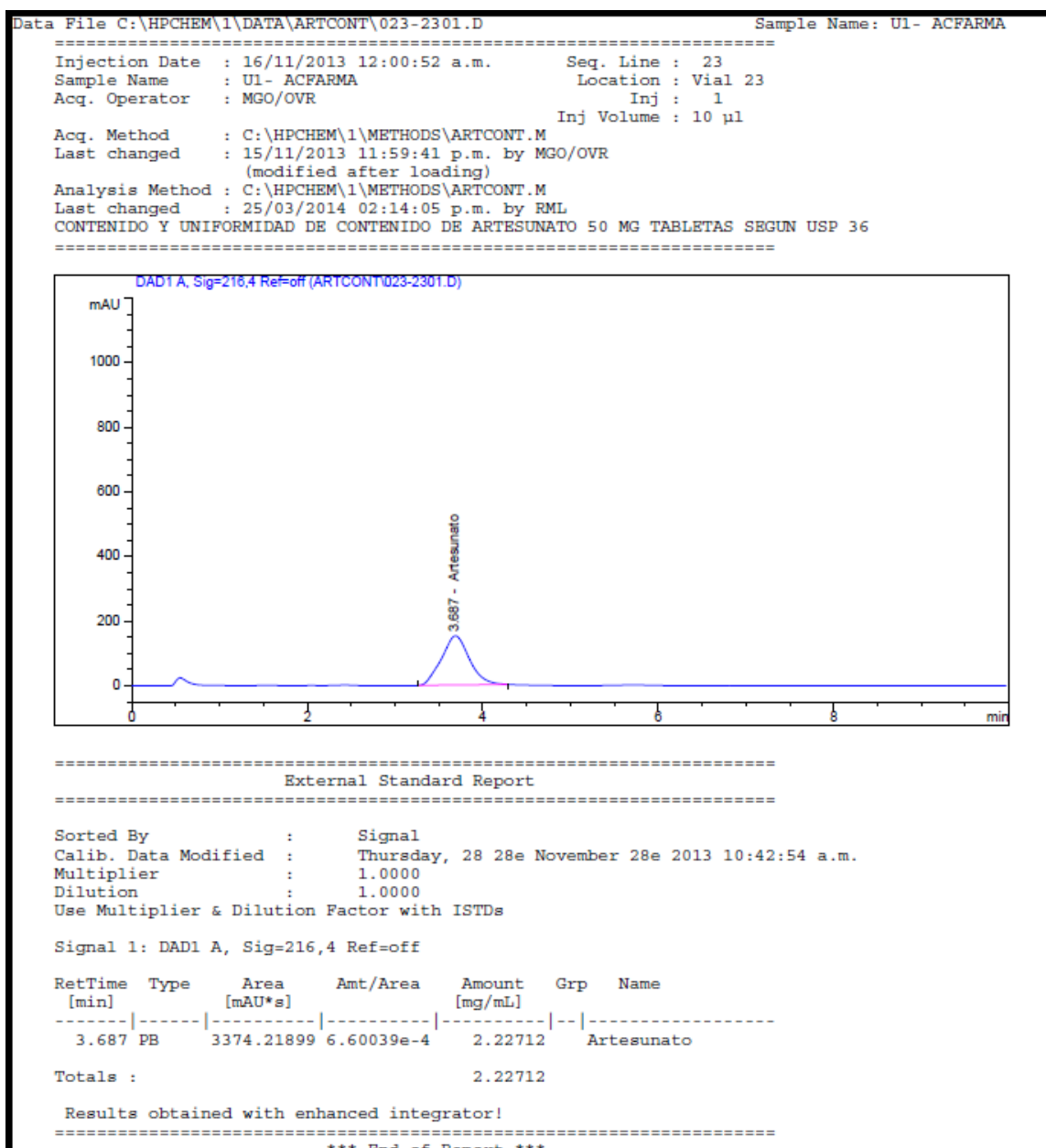


Figura No 19.- Cromatograma correspondiente al ensayo de Uniformidad de contenido de dosis unitaria de las tabletas de AS2

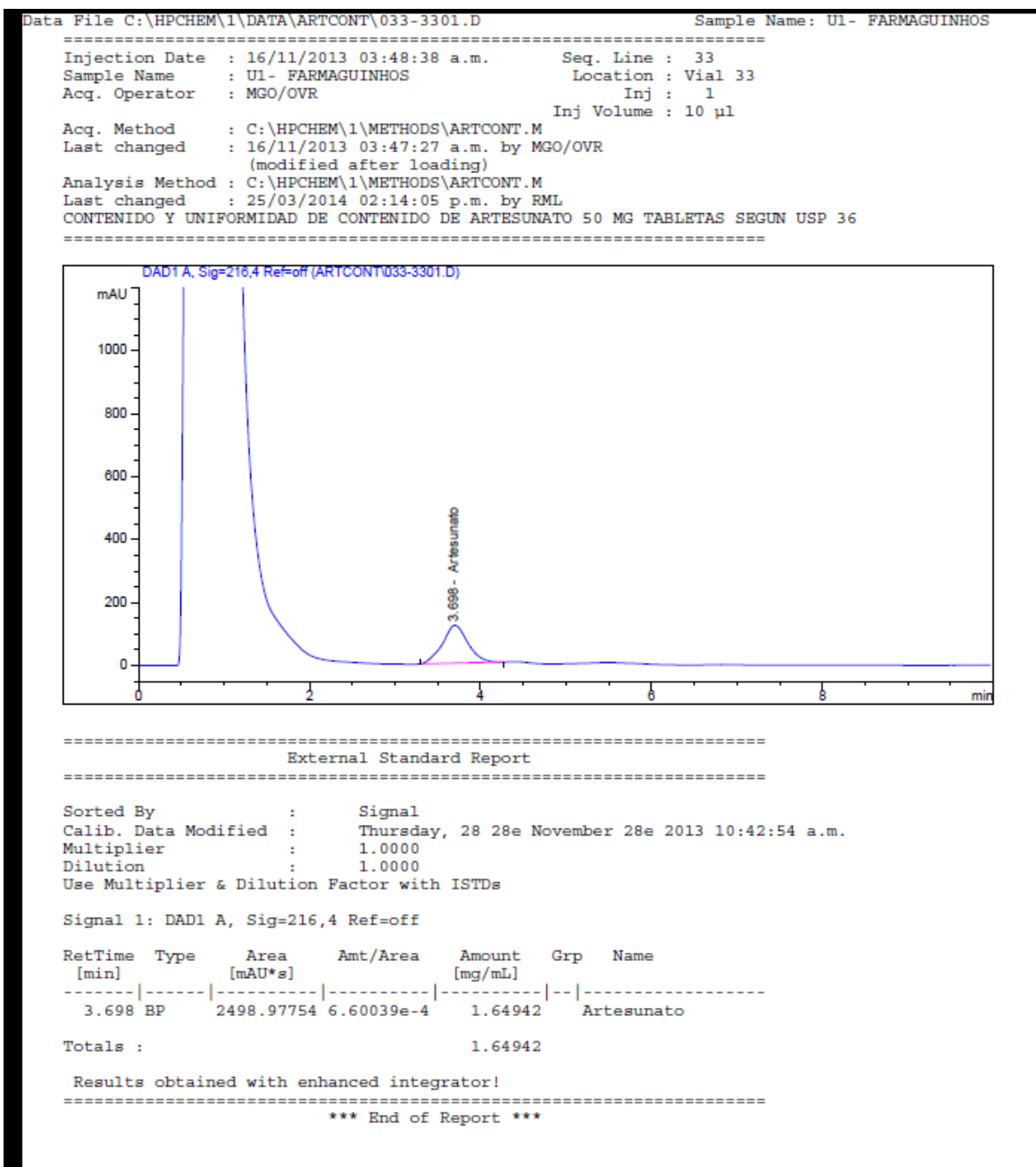


Figura No 20 Cromatograma correspondiente al ensayo de Uniformidad de contenido de dosis unitaria de las tabletas de AS3

Tabla No 4: Resultados de la prueba de Uniformidad de contenido por unidad de dosis

Uniformidad de dosis unitaria n = 10 tabletas (%)			
No Unidades	AS1	AS2	AS3
1	94.74	101.56	93.72
2	97.15	100.93	98.82
3	96.74	103.64	102.61
4	95.69	99.08	102.12
5	98.74	100.82	103.08
6	95.81	103.88	109.73
7	107.67	99.43	100.67
8	96.09	98.63	103.27
9	92.45	103.21	103.01
10	95.60	106.02	102.91
k =	2.4	2.4	2.4
s =	4.07	2.41	4.02
x =	97.07	101.72	102.0
T =	100.0	100.0	100.0
M =	98.5	101.5	101.5
Máx =	107,67%	106,02%	109,73%
Min =	92,45 %	98,63%	93,72%
AV (máx. 15) =	11,2	6,0	10,1

n = Número de unidades de la muestra

k = Constante de aceptabilidad

s = Desviación estándar de la muestra

DRS = Desviación estándar relativa

M = Valor de Referencia

T = El promedio de los límites de la potencia especificados en la monografía individual

AV = Valor de aceptación y se calcula con la siguiente fórmula:

$$AV = (M - X) + k. s$$

Cromatograma de las muestras en medio a pH 6,8

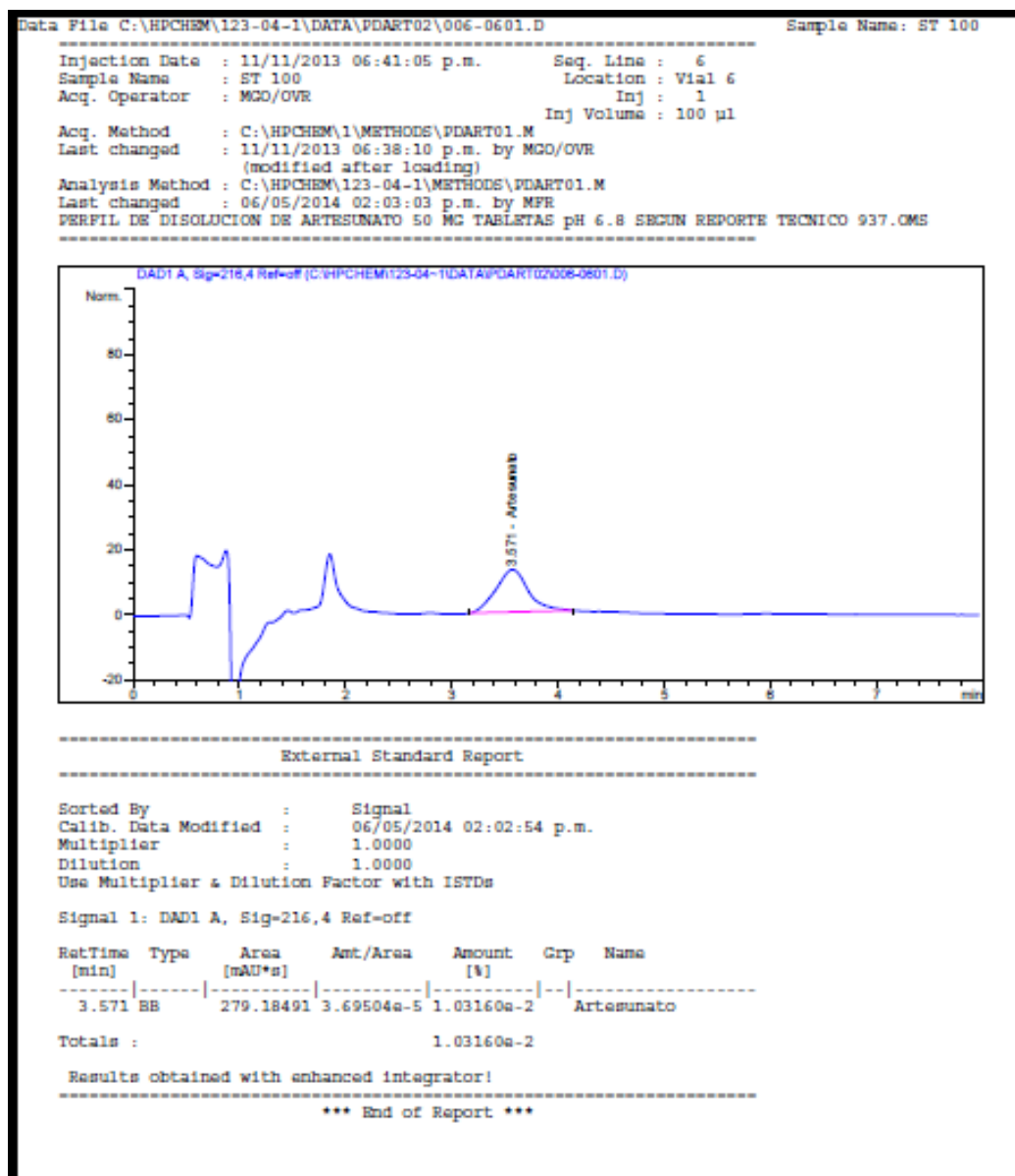


Figura No 21 Cromatograma del estándar de referencia de Artesunato al 100% en pH 6,8

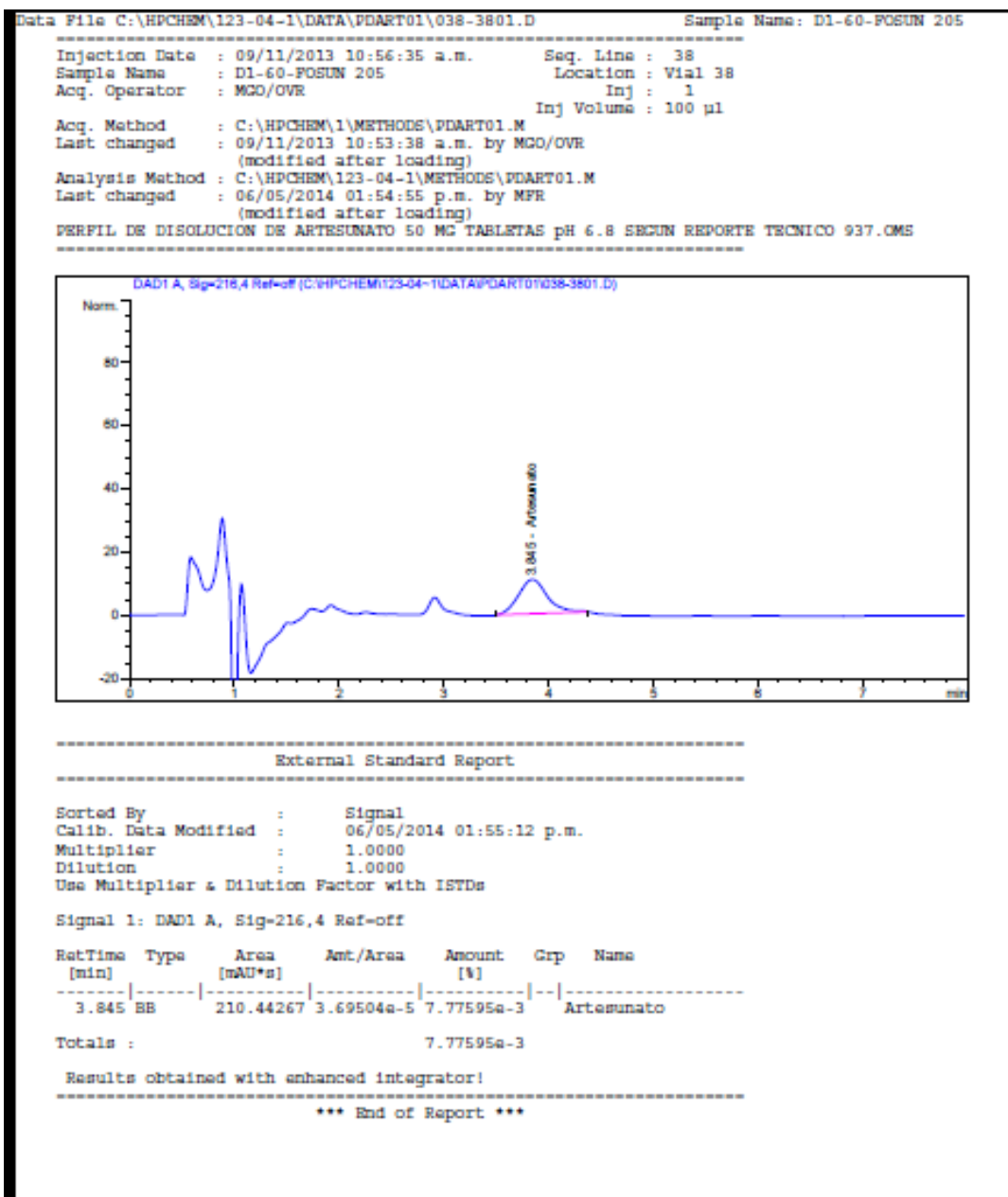


Figura No 22 Cromatograma de las tabletas de AS1 en pH 6,8

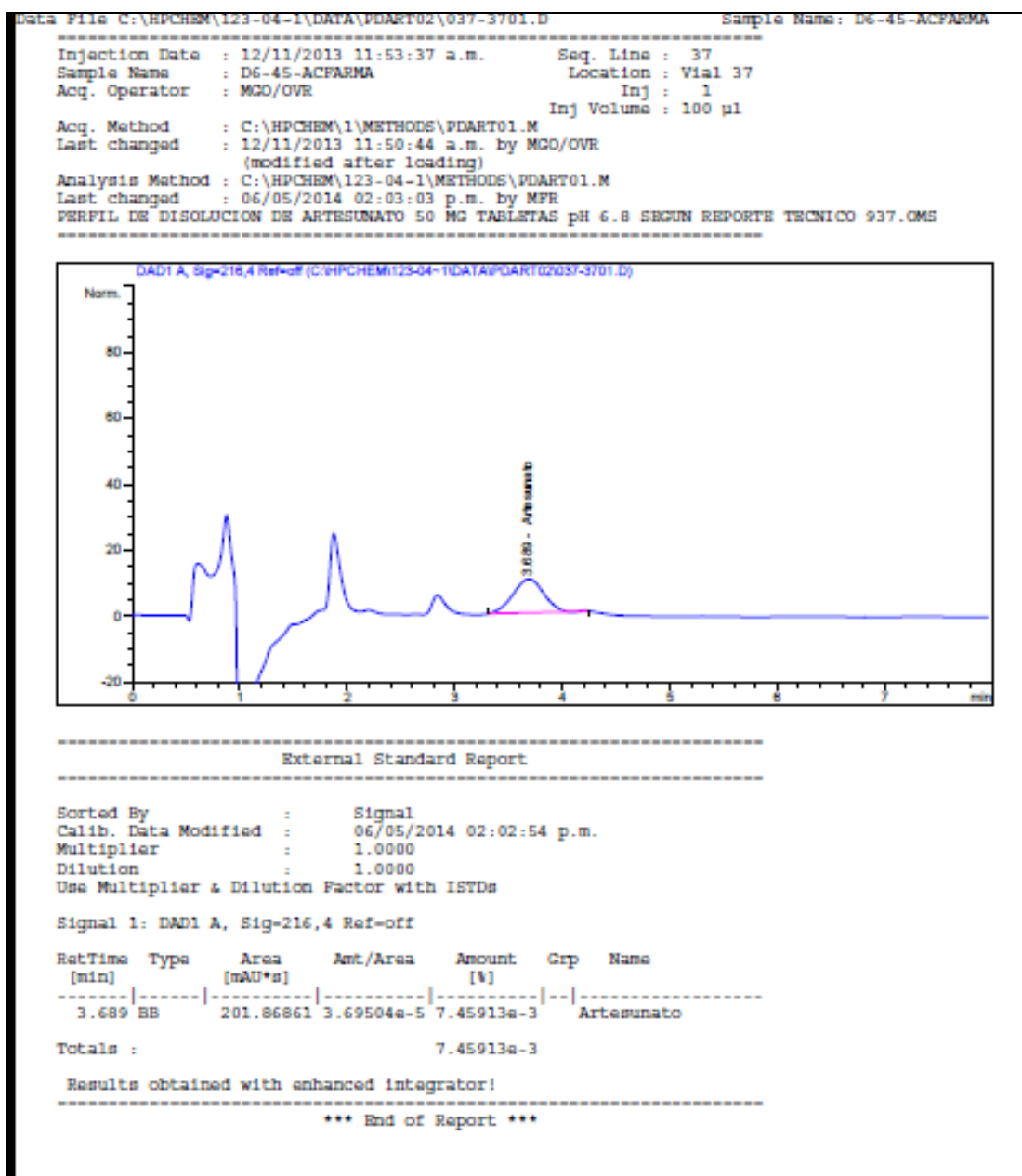


Figura No 23 Cromatograma de las tabletas de AS2 en pH 6,8

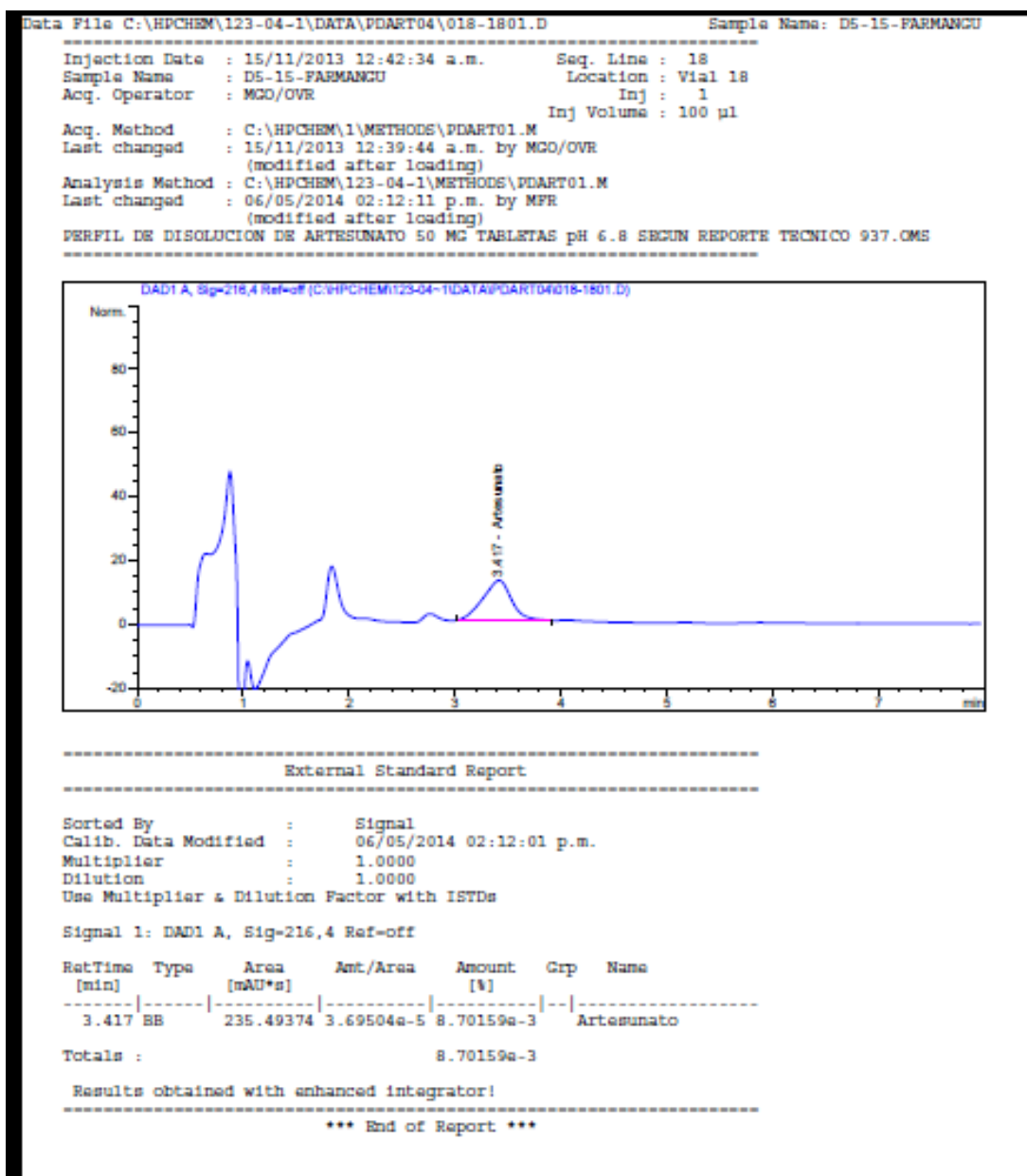


Figura No 24 Cromatograma de las tabletas de AS3 en pH 6,8

Resultado del comportamiento cinético de las tabletas en los diferentes medios de disolución

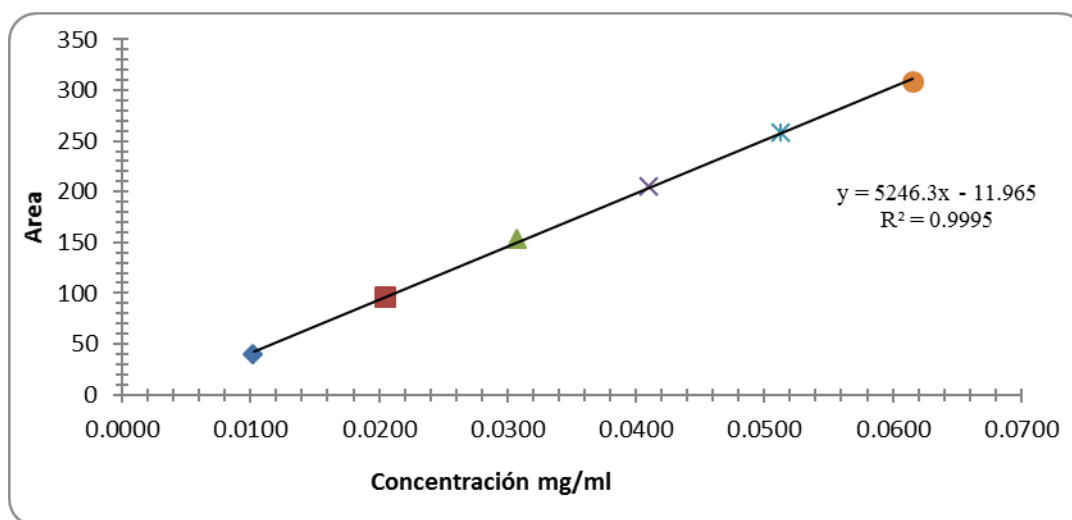


Figura No 25 Curva de calibración en medio de disolución a pH 6,8; Las concentraciones en los puntos señalados en el gráfico son al 20%; 40%; 60%; 80%; 100%; y 120%, de la concentración teórica y que corresponden a 0.0103; 0.0205; 0.0308; 0.0410; 0.0513; 0.0616 mg/mL respectivamente.

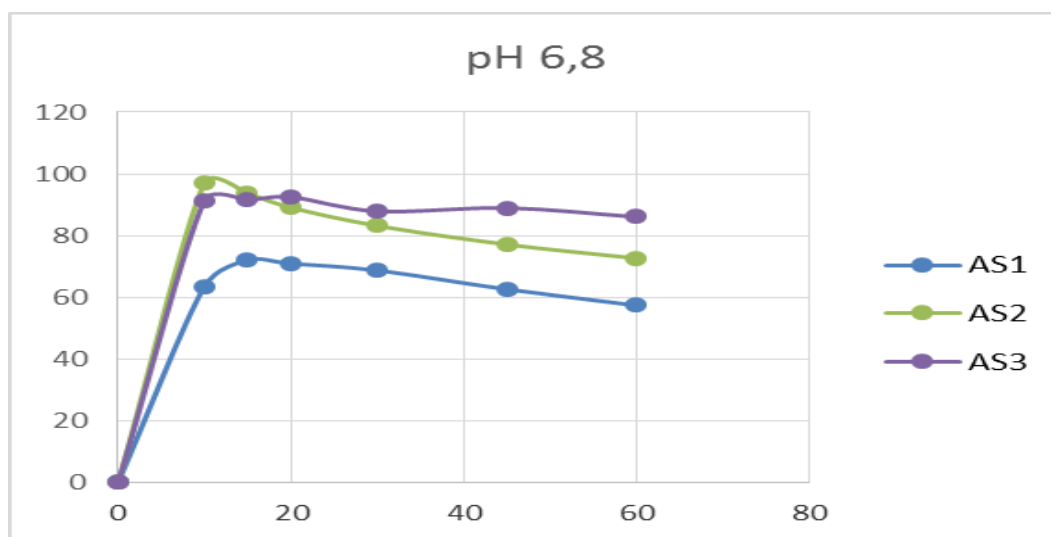


Figura No 26 Comportamiento farmacocinético de las tabletas en medio de disolución a pH 6,8

En esta Figura 26, se observa el comportamiento cinético de cada una de las formulaciones de Artesunato en el medio de disolución a pH 6,8. Lo que podemos evidenciar es, cómo se disuelven las tabletas en el tiempo, siendo este comportamiento de una forma similar en las tres procedencias, a pesar que hay una diferencia en el porcentaje que se disuelve en cada tiempo. Las tabletas de AS3 se encuentra entre 91.45 a los 10 minutos y 86.09% a los 60 minutos. Y AS2 se encuentra entre 97.16 % a los 10 minutos y 72.68% a los 60 minutos. Mientras que AS1 se disuelve el 63,55% en los primeros 10 minutos y 57,39% a los 60 minutos.

Cromatogramas de las muestras en medio a pH 4,5

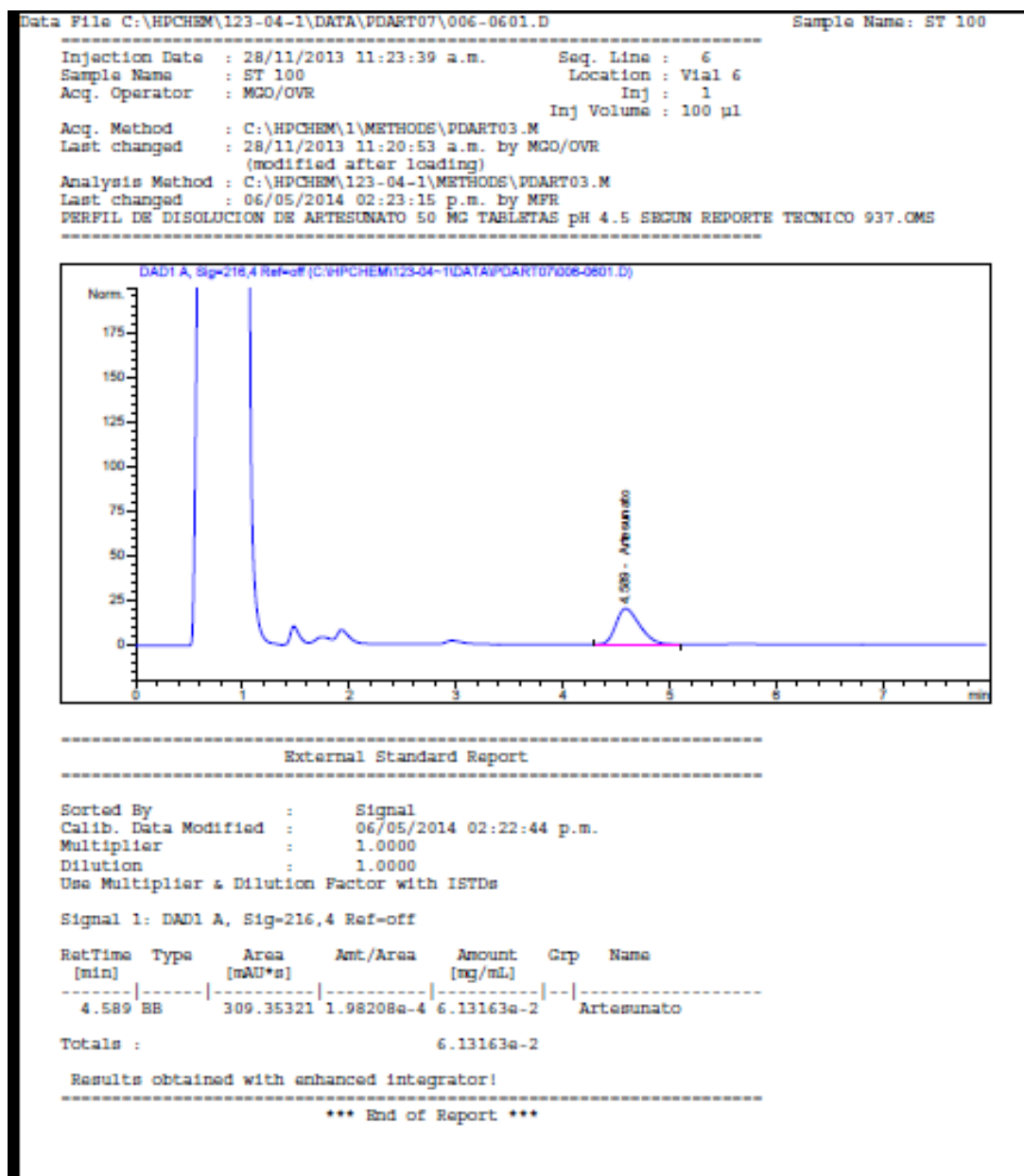


Figura No 27 Cromatograma del estándar de referencia de Artesunato al 100% en pH 4,5.

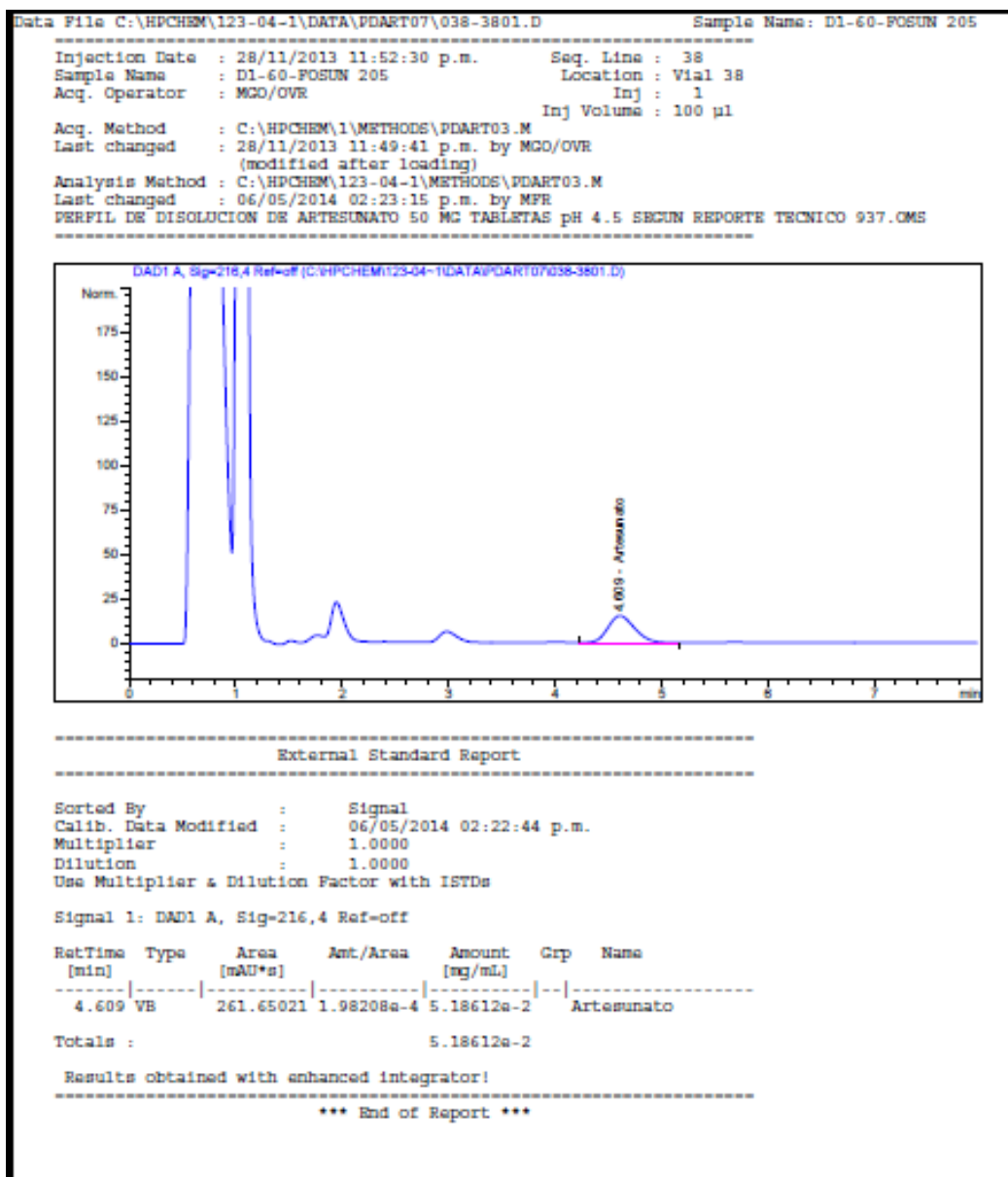


Figura No 28 Cromatograma las tabletas de AS1 en pH 4,5

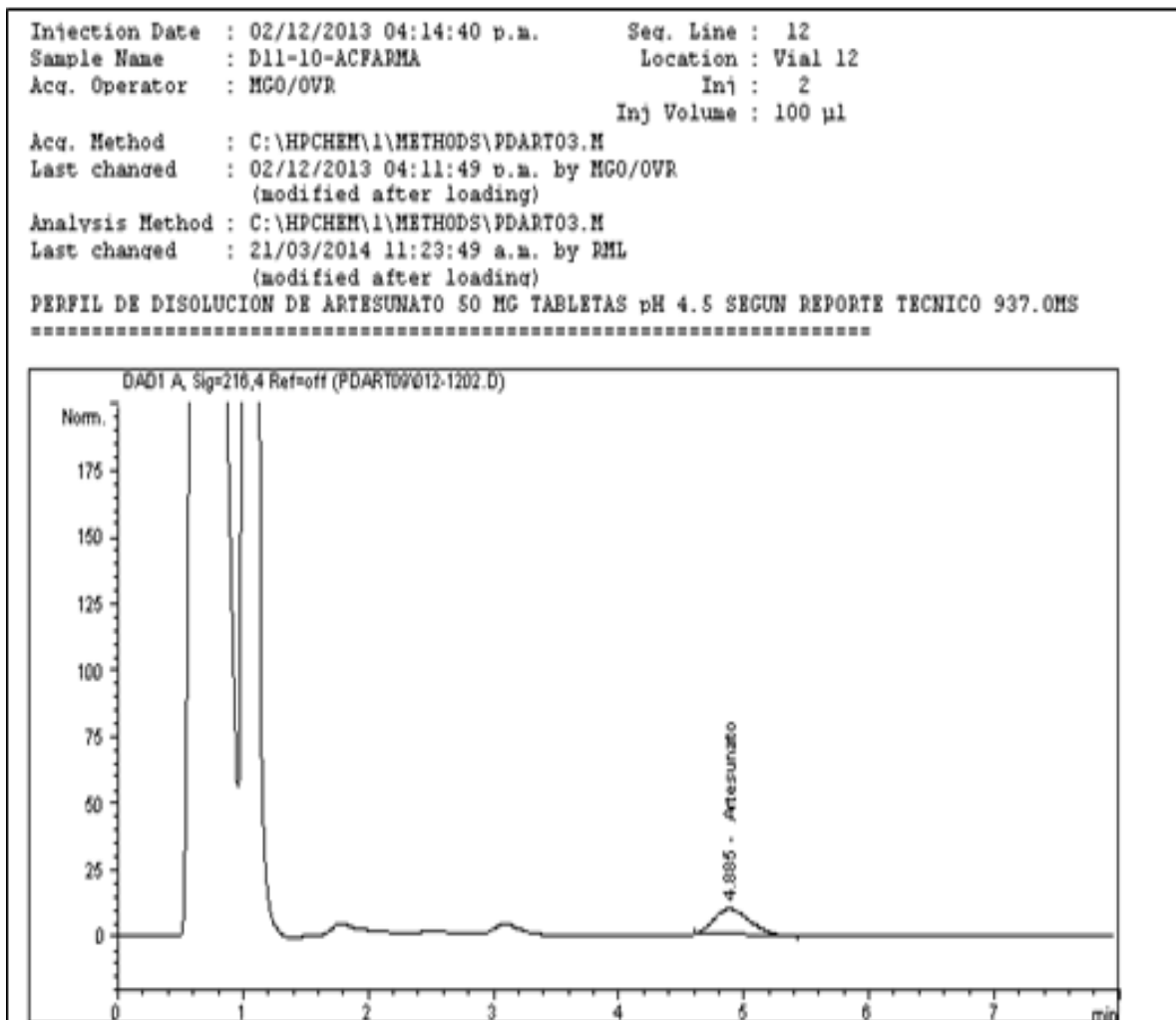


Figura No 29 Cromatograma de las tabletas de AS2 en pH 4,5

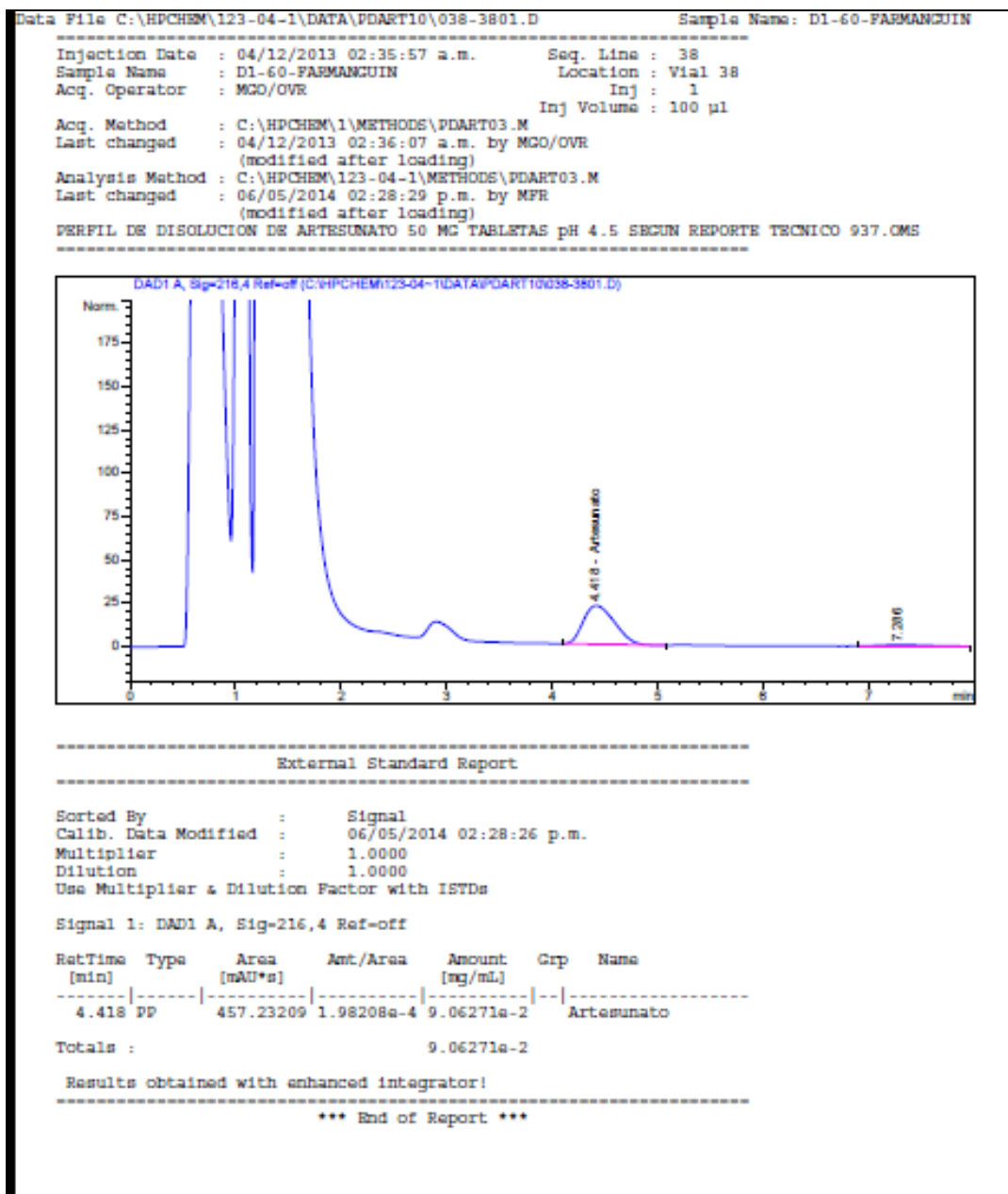


Figura No 30 Cromatograma de las tabletas de AS3 en pH 4,5

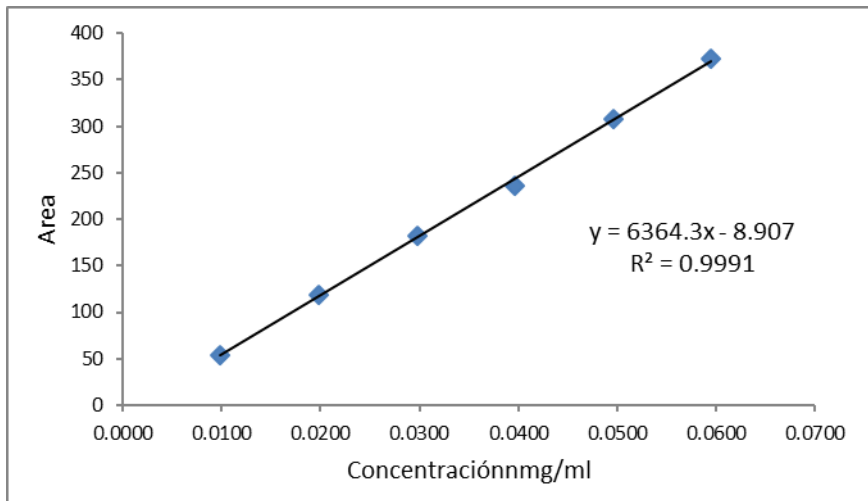


Figura No 31 Curva de calibración en medio de disolución a pH 4,5 Las concentraciones en los puntos señalados son al 20%; 40%; 60%; 80%; 100%; y 120%, que corresponden a 0,0099; 0,0198; 0,0297; 0,397; 0,0496; 0,0595 mg/mL respectivamente.

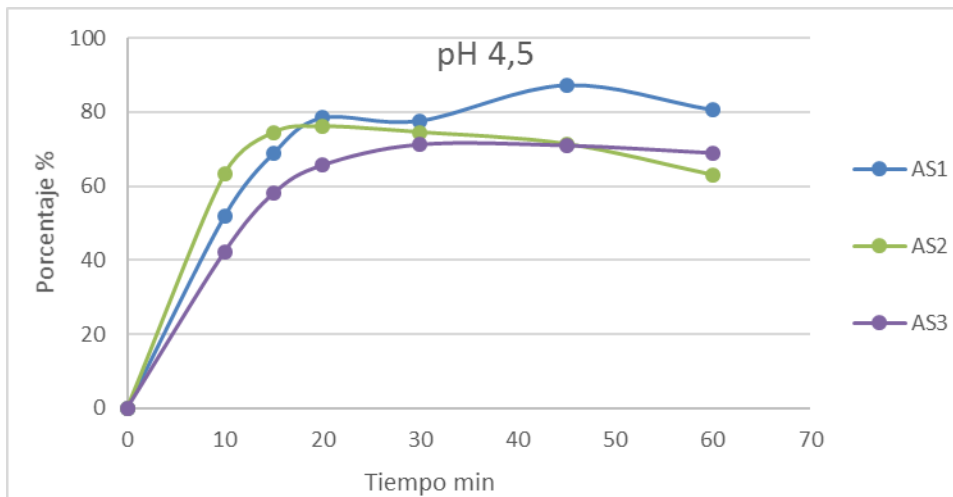


Figura No 32 Comportamiento farmacocinético de las tabletas de Artesunato de AS1; AS2 y AS3 en medio de disolución a pH 4,5

Cromatogramas de las muestras en medio a pH 1,2

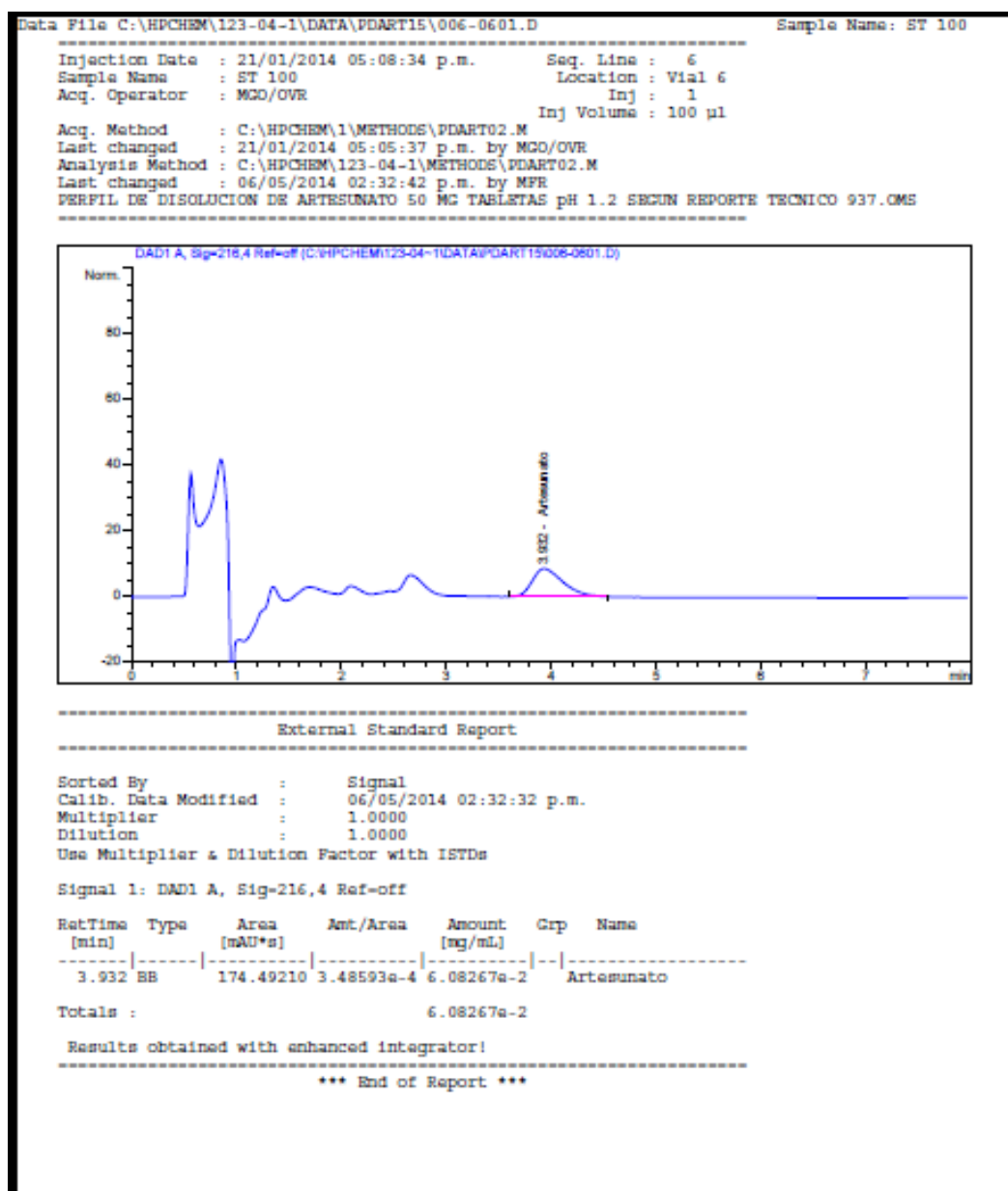


Figura No 33: Cromatograma del estándar de referencia de Artesunato al 100% en pH 1,2

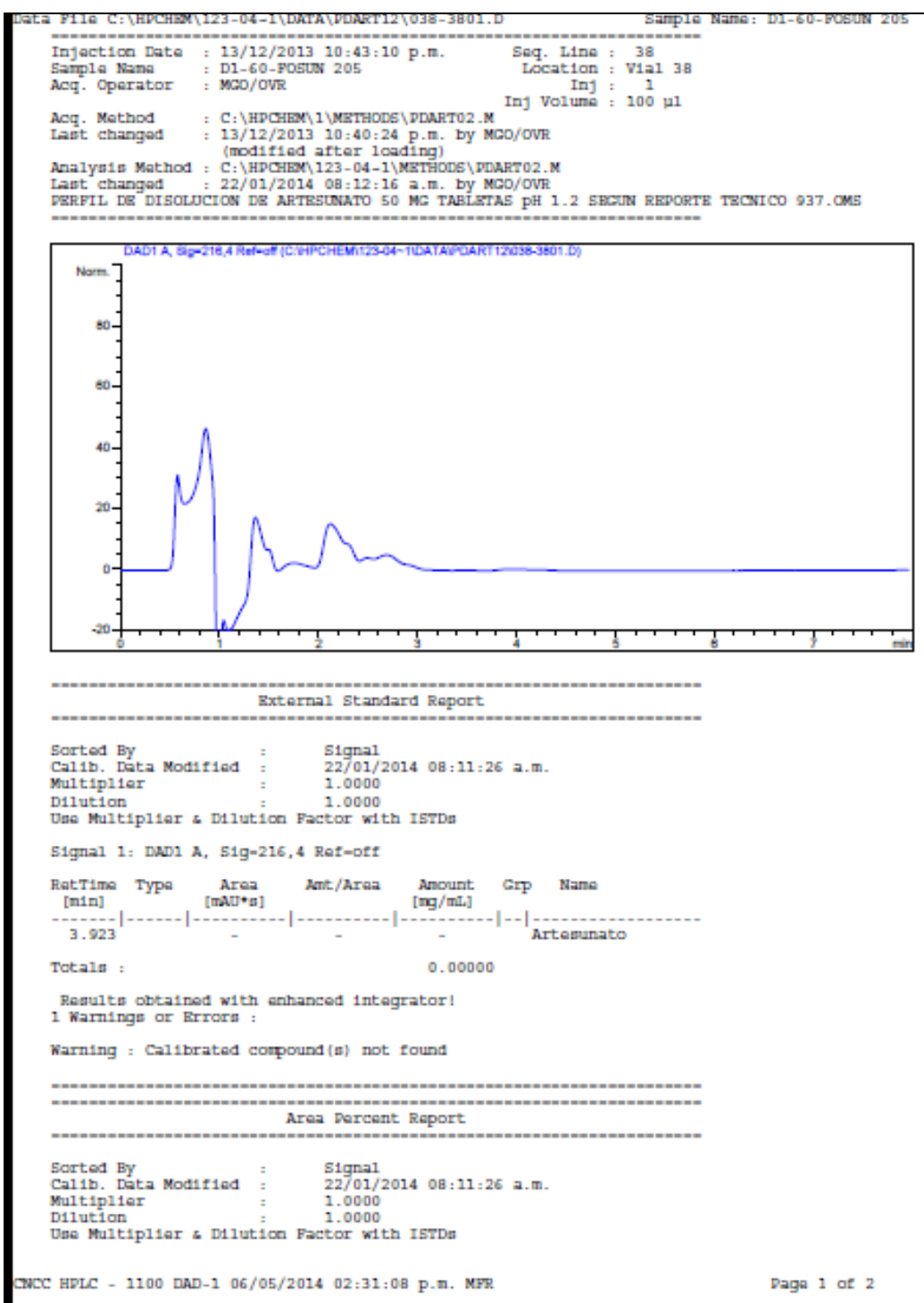


Figura No 34 Cromatograma de las tabletas de AS1 en pH 1,2

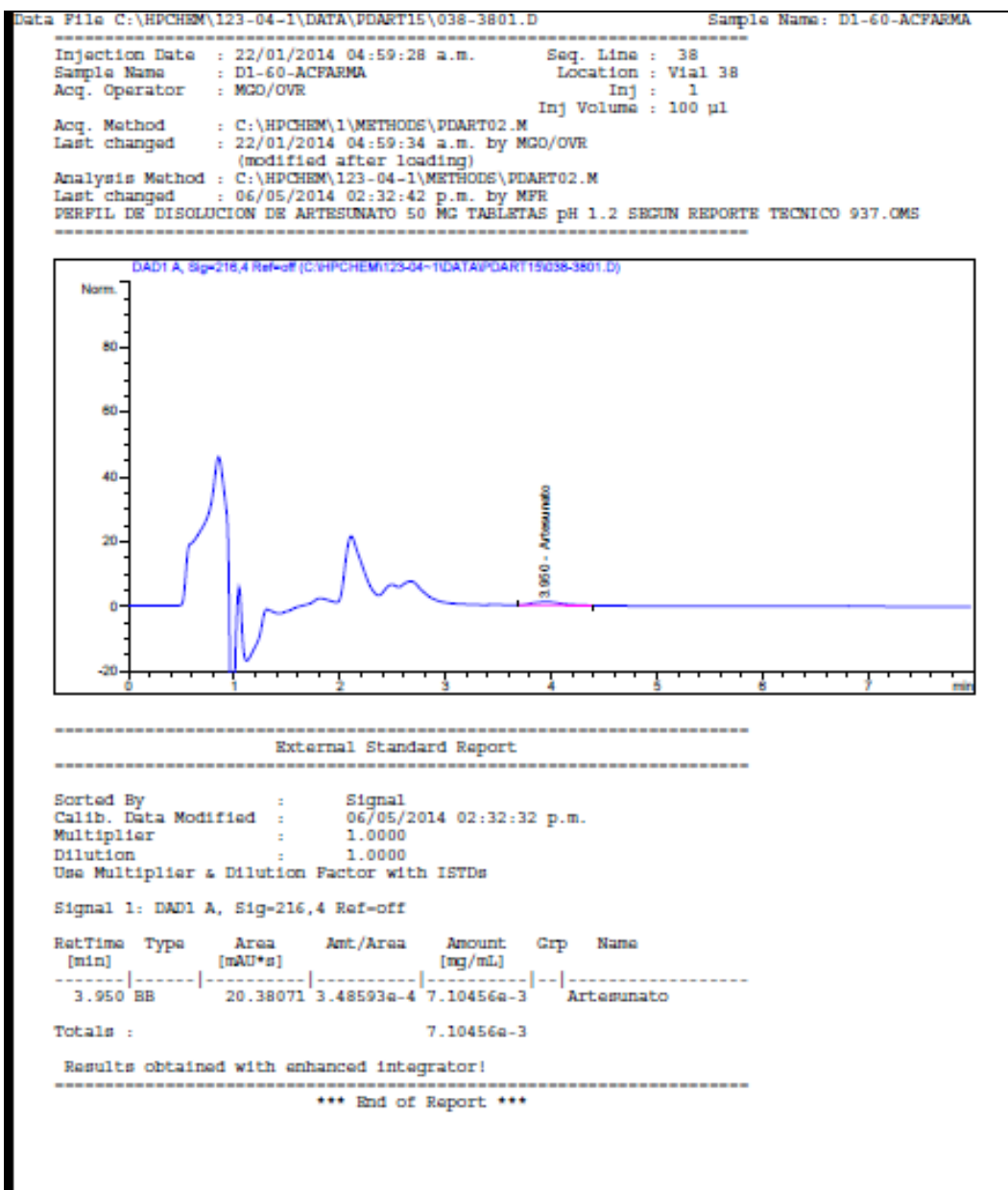
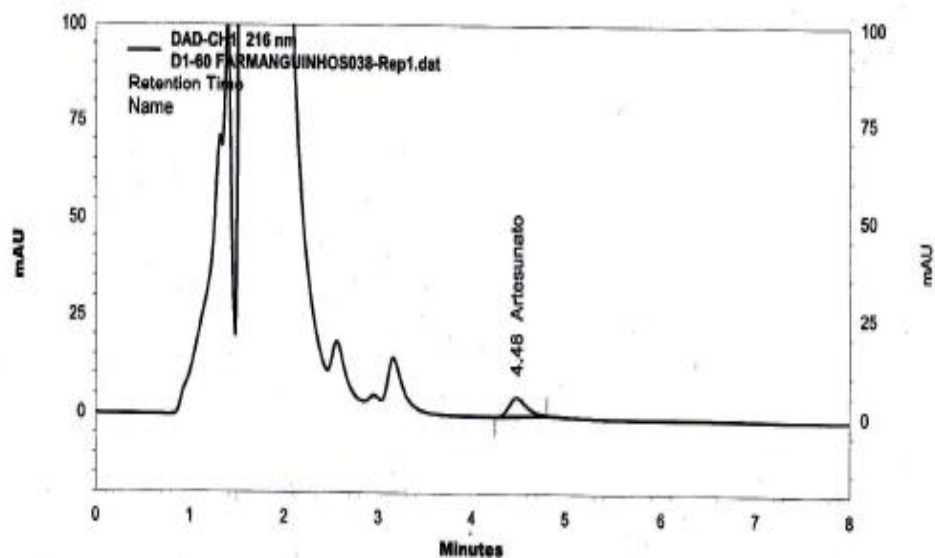


Figura No 35 Cromatograma de las tabletas de AS2 en pH 1,2

Analista : MGRANDE
 Equipo : LCL-35
 Method : C:\CNCC 23-04-2014\Bioequivalencia\Method\PDART02.met
 Secuencia: C:\CNCC 23-04-2014\Bioequivalencia\Sequence\PDART18.seq
 Data File: C:\CNCC 23-04-2014\Bioequivalencia\Data\PDART18\DI-60
 FARMANGUINHOS038-Rep1.dat
 Sample ID: DI-60 FARMANGUINHOS
 Vial: 38 Vol Iny: 90 uL
 Acquired: 21/01/2014 22:07:23 Analyzed: 27/01/2014 8:31:43

PERFIL DE DISOLUCION DE ARTESUNATO TABLETAS SEGUN OMS pH 1.2
 Cromatograma



DAD-CH1 216 nm Results				
Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)	Asymmetry
Artesunato	4.48	251366	2592	1.3

Figura No 36 Cromatograma de las tabletas de AS3 en pH 1,2

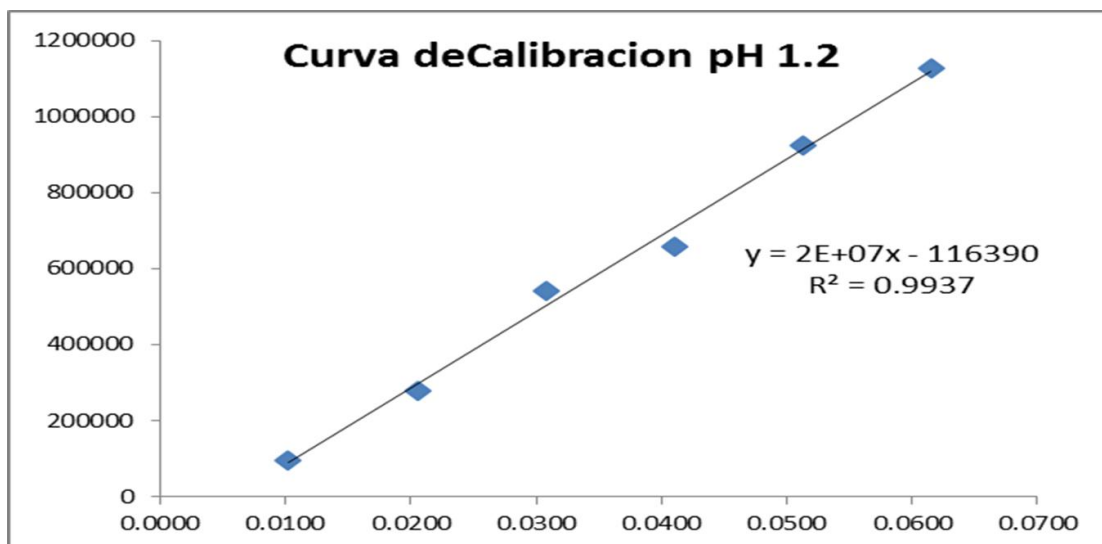


Figura No 37 - Curva de calibración en medio a pH 1,2 - Las concentraciones en los puntos señalados en el gráfico son a 20%; 40%; 60%; 80%; 100%; y 120%, que corresponden a 0,01003; 0,0205; 0,0308; 0,0410; 0,0513; 0,615 mg/mL respectivamente.

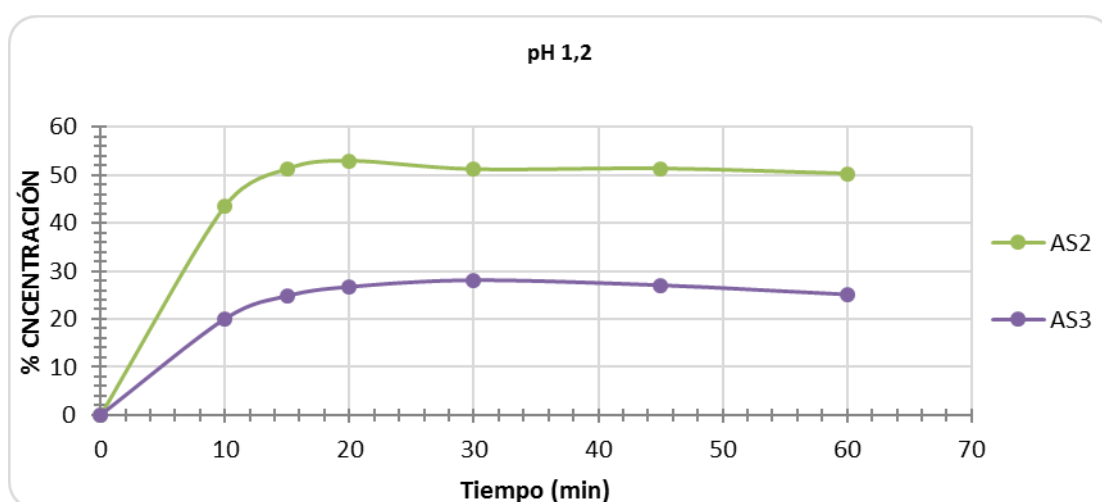


Figura No 38 Comportamiento farmacocinético en medio a pH 1,2 de las formulaciones de Artesunato tabletas AS2 y AS3.

Las tabletas correspondientes a AS1, no se disolvieron en medio a pH 1,2; Figura 34; pero si las de AS2 y AS3 como se evidencia en las Figura 35 y 36 respectivamente.

Por estos resultados obtenidos solo se presentan los resultados de AS2 y AS3, tal como se evidencia en la Figura 38.

Las tabletas de AS1 se colocaron en el medio de disolución a pH 1,2 bajo las mismas condiciones que los medios de disolución a pH 4,5 y pH 6,8 sin embargo, las tabletas estaban enteras, luego de los 60 minutos que dura todo el ensayo. Se tomaron alícuotas de cada uno de los vasos en los tiempos establecidos (10; 15; 20; 30; 45 y 60 min).

Resultados en los tres medios de disolución

Tabla No 5: Porcentajes obtenidos en los perfiles de disolución

Tiempo	pH 6,8 (%)			pH 4,5 (%)			pH 1,2 (%)		
	AS1	AS2	AS3	AS1	AS2	AS3	AS1	AS2	AS3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	63.55	97.16	91.45	51.88	63.22	42.24	0	43.50	20.00
15	72.06	93.64	91.49	68.79	74.35	57.97	0	51.20	24.72
20	70.95	89.11	92.52	78.41	76.05	65.59	0	52.87	26.61
30	68.73	83.20	87.91	77.63	74.46	71.20	0	51.14	27.98
45	62.63	77.14	88.98	87.26	71.30	70.93	0	51.28	26.94
60	57.39	72.68	86.09	80.61	62.95	68.89	0	50.22	25.02

6. DISCUSION

En este estudio se ha demostrado que todos los lotes analizados cumplen con las especificaciones de la farmacopea USP Non Standard en lo que corresponde a las pruebas críticas, que son las pruebas de control de calidad fisicoquímica, necesarias para demostrar la calidad de los medicamentos y que a la fecha, solo es lo que exige la reglamentación de Perú, mediante la Ley 29459 y sus reglamentos.

Adicionalmente, todos las muestras de los lotes estudiados, cumplen con los requisitos, que se exigen en las compras corporativas por subasta inversa, que realiza el Ministerio de Salud de Perú y que abastece a todos las entidades prestadoras de Salud del estado y que están incluidos los hospitales del mismo MINSA, de ESSALUD, de las fuerzas policiales, para la estrategia sanitaria en contra de la malaria.

Sin embargo es preciso que se realicen evaluaciones y análisis de los factores que están influyendo en el aumento de la farmacoresistencia a los medicamentos Antimaláricos.

Una estrategia utilizada para evaluar la calidad de un medicamento, especialmente los de administración oral, es verificar; a través de pruebas in vitro; el comportamiento de las tabletas en condiciones ácidas, o sea en condiciones que imitan el tracto gástrico del ser humano. De esta forma, las tabletas fueron diluidas en diferentes medios ácidos y como se puede ver en la Tabla No 3, las table-

tas de los lotes AS2 y AS3, en medio de disolución pH 6,8 a los 10 minutos se han disuelto más del 85%; 93.64% y 91.49% para AS2 y AS3 respectivamente.

En medio de disolución a pH 4,5; estos mismos lotes presentan cinéticas variada en los tres primeros periodos de muestreo, sin embargo, en los últimos tres tiempos de muestreo se asemejan.

Según los datos presentados en otros estudios; sobre el producto AS1; como el presentado en el estudio *“In vitro bioequivalence study of nine brands of Artesunate tablets marketed in Nigeria”*, de C.O. Esimonea, et al.; se evidencia que es un producto de buena calidad, lo que respaldaría los resultados obtenidos en el presente estudio.

Esto mismo también se evidencia en el estudio donde el producto AS1 fue comparado con tabletas de Artesunato procedentes de otros fabricantes (Bélgica, Kenia, la India, Suiza, entre otros) y los resultados fueron reportados en el artículo de Magnus A. Atemnkeng, et al⁴⁴. En el mencionado estudio el ensayo de contenido de Artesunato tabletas fue analizado por HPLC-UV según la Farmacopea Europea y el resultado que obtuvieron fue de 99% para las tabletas de Guillin (SINOPHARM), 101,2% para tabletas procedentes de Cosmos Ltd de Kenia. Sin embargo también encontraron tabletas con 88,5% procedentes GVS Labs de La India, que no cumplen con las especificaciones de la Farmacopea Europea; 95% - 105% del ingrediente activo.

En el estudio “*A pilot study on quality of artesunate and amodiaquine tablets used in the fishing community of Tema, Ghana*”. Andrews O Affum et al⁴⁵, también han incluido tabletas de la misma procedencia que AS1, fabricadas por Guillin Pharmaceutical Co Ltd, de China, usando la metodología de la Farmacopea Internacional (método compendial) y usando el protocolo de los Minilabs de Global Pharma Health Fund. Este último corresponde a métodos rápidos, pero la técnica señalada para confirmar la presencia del ingrediente activo de Artesunato, según la Farmacopea Internacional es por HPLC, utilizando la misma fase móvil (acetonitrilo y solución buffer pH 3), la misma columna C18 y otros parámetros similares a los que se han utilizado en el estudio que aquí se presenta.

La técnica usada para identificar y cuantificar el principio activo de Artesunato, es específica para este principio activo y en los Cromatogramas que se muestran no se observa ninguna interferencia, hay buena separación de los picos cromatográficos de Artesunato y Dihidroartemisinina (estándar interno). También se cumple con el requisito que para llevar a cabo la cinética de disolución la diferencia entre los porcentajes hallados del contenido del principio activo de los lotes en estudio, no debe ser mayor al 5%, y como se puede observar en la Tabla No 3: 98,8% ; 98,2% y 93,8% para AS1; AS2 y AS3 respectivamente.

En pH 4,5 se observa que AS1 alcanza a liberar un 78,41% a los 20 minutos. Entre AS2 y AS3 observamos mayor semejanza a partir de los 30 minutos. Las

alteraciones en los perfiles de disolución podría deberse una inadecuada formulación, lo que influye en la absorción rápida, además de eso la disolución menor va a provocar consecuencias en su absorción del medicamento en el tracto digestivo al ser administrado al paciente⁴⁷.

7. CONCLUSION

La calidad de los medicamentos que se utilizan en la estrategia sanitaria contra la malaria del Perú, son comparables a los usados en Brasil, y a los de Ghana en lo que respecta al control de calidad o sea las pruebas fisicoquímicas. Sin embargo no podemos decir lo mismo en relación a su comportamiento farmacocinético en todos los medios de disolución. Por lo que no son intercambiables, estos resultados ratifican lo señalado en el Informe 40 de la serie de reportes técnicos de la OMS, que para Artesunato multifuente, es necesario realizar un estudio *in vivo* para demostrar su intercambiabilidad con el medicamento innovador; nuevamente recalcando; debido a su baja solubilidad y baja permeabilidad, dos características importantes y determinantes en la absorción del principio activo para lograr la concentración necesaria y tener acción terapéutica esperada de esta forma evitar uno de los factores que pueden estar ocasionando la temida resistencia a los derivados de Artemisinina, además de aumentar el acceso al diagnóstico, a un adecuado tratamiento, ampliar la atención de salud primaria,

Es necesario que haya compromiso del gobierno y cooperación con los gobiernos fronterizos para una lucha frontal y coordinada en la toma de medidas y acciones, seguir las recomendaciones de OMS, con la eliminación gradual de las

monoterapias, aplicando el uso de terapias combinadas con los derivados de Artemisinina, tal como lo está haciendo Brasil. Así mismo se debe realizar estudios de vigilancia molecular continua, lo cual va a contribuir a una alerta temprana de la farmacoresistencia, estudios para identificar los marcadores moleculares para que sean usados como herramientas en la vigilancia de la resistencia a Artesunato en las regiones en riesgo y estudios terapéuticos con la finalidad de orientar las políticas y los cambios en las políticas que deben determinar los gobernantes.

Y como se mencionó en el marco teórico, actualmente en el Perú no se exige que los medicamentos multifuente presenten estudios de intercambiabilidad, por lo tanto el producto que maneja la estrategia sanitaria de malaria, cumple los requisitos que se exige actualmente, sin embargo se debe, trabajar de manera más coordinada entre todos los actores de las estrategias sanitarias; la autoridad nacional del medicamento (DIGEMID), el CNCC, los gremios de la industria farmacéutica, los colegios Farmacéutico y, Médico, la Sociedad Civil y otros más, a fin de evaluar y analizar los factores que están influyendo en el aumento de la resistencia en la malaria.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Informe de Perú de la Reunión anual 2010 Iniciativa Amazónica contra la Malaria (AMI). Ed. Amazónico de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA).
2. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el diagnóstico de malaria. Serie de Normas, Técnicas N° 39, Lima – 2003. Instituto Nacional de Salud.
3. Universal access to malaria diagnostic is testing an operational manual. World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Universal access to malaria diagnostic testing: an operational manual. 1. Malaria – diagnosis. 2. Antimalarials – therapeutic use. 3. Malaria – drug therapy. 4. Diagnostic tests, Routine – utilization. 5. Manuals. I. World Health Organization. ISBN 978 92 4 150209 2 (NLM classification: WC 750). 2011.
4. www.news-medical.net/.../Malaria-Diagnosis
5. Pruebas de diagnóstico rápidas para el diagnóstico del paludismo no complicado en países endémicos Autores Katharine Abba, Jonathan J Deeks, Piero Olliaro, Cho-Min Naing, Sally M Jackson, Yemisi Takwoingi, Sarah Donegan, Paul Garner,
6. Apresentação “Desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de Doenças Tropicais Negligenciadas”: Foco no tratamento da malária. Dra Mariana Conceição de Souza. Laboratório de Farmacologia Aplicada outubro 2012

7. Am. J. Trop. Med. Hyg., 77(Suppl 6), 2007, pp. 181–192 Copyright © 2007 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria. François Nosten and Nicholas J. White*. Shoklo Malaria Research Unit, Mae Sot, Thailand; Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand; Centre for Tropical Medicine and Vaccinology, Churchill Hospital, Oxford, United Kingdom.

8. Efficacy of Chloroquine and Mefloquine for the treatment of uncomplicated plasmodium Falciparum malaria on north coast of Peru. Wilmer Marquiño O., JOHN Macarthur, Lawrence M. Barat, Fernando E. Oblitas, Manuel Arrunátegui, Gino Garabito, Maritza L. Chafloque, Blanca Pardave, Sonia Gutierrez, Nancy Arrospedi, Carlos Carrillo, César Cabezas, and Trenton K. Ruebush II. Am. J. Trop. Med. Hyg., 68(1), 2003, pp. 120–123. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

9. Efficacy of Mefloquine and Mefloquine-Artesunate combination therapy for the treatment of uncomplicated plasmodium Falciparum malaria in the Amazon Basin of Peru. Wilmer Marquiño O., María, Huilca, Carlos Calampa, Eduardo Falconí, César Cabezas, Ruben Naupa and Trenton K. Ruebush II. Am J Trop Med Hyg May 2003 vol. 68 no. 5 608-612.

10. Resistance to Artemisinin of Malaria Parasites (Plasmodium falciparum) Infecting α -Thalassemic Erythrocytes In Vitro Competition in Drug Accumulation with Uninfected Erythrocytes. Sumalee Kamchonwongpaisan, * Ganigar Chandra-ngam, * Mitchell A. Avery, t and Yongyuth Yuthavong *

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand, and Department of Chemistry, University of North Dakota, Grand Forks, North Dakota 58202

11. Mefloquine pharmacokinetics and Mefloquine-Artesunate effectiveness in Peruvian patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. Julie Gutman, Michael Green, Salomon Durand, Ofelia Villalva Rojas, Babita Ganguly, Wilmer Marquiño Quezada, Gregory C Utz, Laurence Slutsker,¹ Trenton K Ruebush, II, and David J Bacon. *Malar J.* 2009 Apr 9; 8:58.
12. Artesunate A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of malaria. Barradell LB, Fitton A. Adis International Limited, Auckland, New Zealand. 1995 Oct; 50 (4):714-41.
13. Effect of artesunate-mefloquine fixed-dose combination in malaria transmission in Amazon basin communities. Santelli AC, Ribeiro I, Daher A, Boulos M, Marchesini PB, Dos Santos RL, Lucena MB, Magalhães I, Leon AP, Junger W, Ladislau JL. Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farman-guinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. *Malar J.* 2012 Aug 20; 11:286. doi: 10.1186/1475-2875-11-286
14. *Malar J.* 2012 Sep 11; 11:321. doi: 10.1186/1475-2875-11-321. Decreased prevalence of *Plasmodium falciparum* resistance markers to amodiaquine despite its wide scale use as ACT partner drug in Zanzibar. Fröberg G, Jörnham L, Morris U, Shakely D, Msellem MI, Gil JP, Björkman A, Mårtensson A.

15. Malaria Research Group, Department of Medicine Solna, Retziusvag 10, Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm, Sweden. *Malar J.* 2012 Jun 12; 11(1):195. [Epub ahead of print] Prevalence and risk factors of malaria in Ethiopia. Ayele DG, Zewotir TT, Mwambi HG.

16. Social economic factors and malaria transmission in Lower Moshi, Northern Tanzania. owassa A, Mazigo HD, Mahande AM, Mwang'onde BJ, Msangi S, Mahande MJ, Kimaro EE, Elisante E, Kweka EJ. Tanzania Wildlife Research Institute, P.O, Box 661, Arusha, Tanzania. asante.kweka@gmail.com.

17. www.accessmylibrary.com/coms2/summary. Unabmalaria.blogspot.com/2007/11/malar

18. Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77 (Suppl 6), 2007, pp. 181–192. Copyright © 2007 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. François Nosten and Nicholas J. White*. Shoklo Malaria Research Unit, Mae Sot, Thailand; Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand; Centre for Tropical Medicine and Vaccinology, Churchill Hospital, Oxford, United Kingdom

19. WHO. World Malaria Report 2010. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.

20. Schneider P, et al. (Sub) microscopic Plasmodium falciparum gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-

- pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Int J Parasitol.* 2006; 36(4):403–408. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.01.002.[PubMed] [Cross Ref]
21. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24(2):377–410. doi: 10.1128/CMR.00051-10. [PMC free article][PubMed] [Cross Ref]
 22. Artemisinin- based combination treatments for uncomplicated malaria. First published: July 8, 2009; this version published: 2009; Review content assessed as up-to-date: March 25, 2009. Plain language summary. A.D.A.M. Medical Encyclopedia. Malaria
 23. Quartan malaria; Falciparum malaria; Biduoterian fever; Blackwater fever; Tertian malaria; Plasmodium. Last reviewed: June 9, 2011.
 24. Newton P, Proux S, Green M, Smithuis F, Rozendaal J, Prakongpan S, Chotivanivich K, Mayxay M, Looareesuwan S, Farrar J, Noston F, White N. (2001) Fake artesunate in southeast Asia. *Lancet* 357, 1948-1950.
 25. Newton PN, Dondorp A, Green M, Mayxay M, White NJ (2003) Counterfeit artesunate antimalarials in SE Asia. *Lancet* 362, 169.
 26. World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fortieth Report. Geneva: WHO; 2006. WHO Technical Report Series 937

27. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (FDA-CDER). Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products – general considerations. Rockville, MD: CDERFDA; 2002. Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4964dft.pdf>

28. US non standard Pharmacopoeia,

29. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (FDA-CDER). Bioanalytical method validation. Rockville, MD: CDER-FDA; 2002. Disponible en: <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.pdf>

30. World Health Organization: Antimalarial drug combination therapy: Report of WHO technical consultation. WHO/CDS/RBM/200135 2001.

31. World Health Organization: The use of antimalarial drugs. Report of a WHO Informal Consultation. WHO/CDS/RBM/200133 2001.

32. Nosten F, White NJ: Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am J Trop MedHyg* 2007, 77:181-192.

33. Kuile FO, Nosten F, Thieren M, Luxemburger C, Edstein MD, Chongsuphajaisiddhi T, Phaipun L, Webster HK, White NJ: High-dose mefloquine in the treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. *J Infect Dis* 1992, 166:1393-1400.

34. Cardoso Bda S, Dourado HV, PinheiroMda C, Crescente JA, Amoras WW, Baena J, Saraty S: [An efficacy and tolerance study of oral artesunate alone and in combination with mefloquine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in an endemic area of Para, Brazil]. Rev Soc Bras Med Trop 1996, 29:251-257. PubMed Abstract

35. Magill AJ, Zegarra J, Garcia C, Marquino W, Ruebush TK 2nd: Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and mefloquine for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in the Amazon basin of Peru. Rev Soc Bras Med Trop 2004, 37:279-281.

36. Información para la IX Reunión Anual Himanshu Naik, Daryl J. Murry, L.E. Kirsch and Lawrence Fleckenstein. Development and validation of high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy assay for determination of artesunate and dihydroartemisinin in human plasma. College of Pharmacy, the University of Iowa City, IA 52242, USA.

37. Teja-Isavadharm P, Peggens JO, Brewer TG, WhiteNJ, Webster HK, Kyle DE. Plasmodium falciparum-based bioassay for measurement of artemisinin derivatives in plasma or serum. Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Faculty of tropical medicine.

38. Dt CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products). Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (1998).

39. Evolución de la malaria en la región Loreto. Juan Celis S., Roxana Montenegro, Alfredo Castillo, Elizabeth Che, Anibal Muñoz. Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Marcos, vol. 64, N°4 – 2003
40. El Proceso de adecuación y cambio en la política del tratamiento de la malaria por *Plasmodium falciparum* en el Perú. 1990-2001. Daniel Neyra¹, César Cabezas², Trenton K. Ruebush II³, 4
41. Shabana Ali,¹Muzammil H Najmi,¹Joel Tarning ^{2,3} and Niklas Lindergardh^{2,3}, Pharmacokinetics of Artemether and Dihydroartemisinin in healthy Pakistani male volunteers treated with artemether-lumefantrine. Malaria Journal 2010; 9: 275. Published online 2010 October 11. doi: 10.1186/1475-2875-9-275.
42. Victor S Pribluda et al. Implementation of basic quality control tests for malaria medicines in Amazon Basin countries: results for the 2005–2010 period. Malaria Journal 2012, 11:202 doi: 10.1186/1475-2875-11-202
43. Necesidad de vigilar la resistencia del *P. falciparum* al artesunato en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública conversión impresa ISSN 1726-4634. Rev. Perú. med. exp. Salud pública v.29 n.4 Lima oct./dic. 2012. Salomón Durand et al.
44. Magnus A. Atemnkeng, Katelijne De Cock and Jacqueline Plaizier-Vercammen, China Quality control of active ingredients in artemisinin-derivative antimalarials within Kenya and DR Congo. Tropical Medicine and International Health doi:10.1111/j.1365-3156.2006.01769.x

45. Samuel Lowor², Shiloh D Osae¹, Adomako Dickson¹, Benjamin A Gyan³ and Delali Tulasi¹, A pilot study on quality of Artesunate and amodiaquine tablets used in the fishing community of Tema, Ghana. Andrews O Affum^{1*}, *Malaria Journal* 2013, 12:220 doi:10.1186/1475-2875-12-220
46. C.O. Esimonea, F.B.C. Okoyeb, B.U. Onaha, C.S. Nworuc & E.O. Omejeb
In vitro bioequivalence study of nine brands of artesunate tablets marketed in Nigeria
47. Nehal Ibrahima, Hany Ibrahima, Jerome Dormoic, Sebastien Briolantc, Bruno Pradinesc, Alicia Morenoe, Dominique Maziere, Philippe Legrandh, Francoise Nepveua. Albumin-bound nanoparticles of practically water-insoluble antimalarial lead greatly enhance its efficacy. *Pharmaceutical Nanotechnology*, Elsevier. *International Journal of Pharmaceutics* 464 (2014) 214–224
48. Susan Wells, Graciela Diap, Jean-René Kiechel. The Story of Artesunate–Mefloquine (ASMQ), Innovative Partnerships in Drug Development Case Study. *Disclosures Malaria Journal*. *Malar J.* 2013;12(68)
49. QFB. Oscar Arturo Manzano Yescas y QFB. Marco Tulio Morales Delgado, Grupo Gylsa, S.A. de C.V. FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS TABLETAS. PARTE IV.