

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Letícia de Sá Fernandes Vallim da Silva

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE UM NOVO  
FÁRMACO CANDIDATO AO TRATAMENTO DA MALÁRIA**

Rio de Janeiro

2017

Letícia de Sá Fernandes Vallim da Silva

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE UM NOVO  
FÁRMACO CANDIDATO AO TRATAMENTO DA MALÁRIA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Fabio Coelho Amendoeira  
Dra. Laís Bastos da Fonseca

Rio de Janeiro

2017

## Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Silva, Letícia de Sá Fernandes Vallim da

Determinação de parâmetros farmacocinéticos de um novo fármaco candidato ao tratamento da malária. / Letícia de Sá Fernandes Vallim da Silva. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

177 f.: il.; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

Orientadores: Fabio Coelho Amendoeira, Laís Bastos da Fonseca

1. Malária - terapia. 2. Antimaláricos Malária - análise. 3. Antimaláricos Malária - farmacocinética. I. Título.

Determination of pharmacokinetic parameters of a new drug candidate for the treatment of malaria.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Letícia de Sá Fernandes Vallim da Silva

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE UM NOVO  
FÁRMACO CANDIDATO AO TRATAMENTO DA MALÁRIA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Bernardete Ferraz Spisso  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Dra. Núbia Boechat  
Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Sabrina Calil Elias  
Universidade Federal Fluminense

**ORIENTADORES**

---

Dr. Fábio Coelho Amendoeira  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Dra. Laís Bastos da Fonseca  
Fundação Oswaldo Cruz



## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e irmãos Barbara e Victinho por sempre me incentivarem e mostrarem que tudo é possível, pelo grande amor e afago de todos os dias. Aos meus avós pela grande preocupação comigo e por serem sempre minha maior torcida. Sem vocês todos eu nada seria.

À minha irmã, Mariana, que dividimos juntas sonhos, brigas (rs), mas também muito amor, e por estar sempre – da sua maneira - me apoiando nos dias difíceis. “Florescer”!

Ao meu namorado, Heitor, por me dar seu amor tão leve. Por ser meu companheiro, minha fortaleza, por acreditar muitas vezes mais em mim do que eu mesma. O mundo é pequeno demais para o que a gente ainda tem para viver! Não poderia esquecer a sua família que me acolhe e faz eu me sentir tão bem.

Ao meu orientador Fabio, por toda sua disponibilidade, confiança e seu grande humor que deixaram essa etapa muito mais leve.

À minha orientadora, Laís, por acreditar, apoiar e confiar em mim desde minha época como sua estagiária. Sem você, nada disso seria possível, sou eternamente grata.

Ao Douglas pela troca diária de conhecimentos, por me ensinar tanto e por ter me ajudado a fazer tudo isso dar certo. Essa vitória também é sua!

Ao Gabriel pela enorme disponibilidade e troca de conhecimentos ao longo do trabalho.

A todo mundo do SEFAR, principalmente ao pessoal do laboratório: Aline, João, Estephane, Thayane que dividiram comigo cada momento de frustração e alegria durante esses dois anos. Um agradecimento especial ao Diego pela ajuda e parceria no mestrado. Ao Leandro pelo apoio, ajuda e risadas. À Vivi e Karen por me ajudarem tanto em momentos difíceis, por me tranquilizarem e me deram tanto carinho.

À toda equipe do LABFAR e do biotério pelas grandes risadas, conversas e ajudas. Um agradecimento especial para Nath que se tornou uma grande amiga que o mestrado me deu e sem ela meus dias no biotério não seria tão fáceis e menos doloroso.

Ao apoio financeiro SEFAR e CAPES.

## RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a malária ainda permanece sendo um grande problema de saúde pública. Atualmente o tratamento mais recomendável é a combinação terapêutica com derivados de artemisinina (ACTs), sendo um dos fármacos mais utilizados a associação de artesunato + mefloquina (AS + MQ) produzida por Farmanguinhos/ Fiocruz. Em vista da melhoria e simplicidade do tratamento da doença, Farmanguinhos hoje desenvolve um sal híbrido, contendo artesunato e mefloquina, denominado MEFAS. Este estudo teve como principal objetivo desenvolver um método bioanalítico por CLAE-EM/EM para avaliar o perfil farmacocinético do MEFAS. O estudo foi realizado na etapa pré-clínica, no qual foram utilizados ratos *Wistar*, machos, com peso entre 230 a 330 g. A administração dos fármacos foi realizada pela técnica de gavagem em regime de dose única de 50 mg/kg de MEFAS e AS + MQ. A coleta de sangue foi feita em diferentes tempos para análises das três substâncias. O estudo foi dividido em três grupos: grupo controle, grupo MEFAS e o grupo AS + MQ. AS, DHA e MQ foram extraídos do plasma animal e essas amostras foram analisadas por CLAE-EM/EM com um método bioanalítico desenvolvido e validado de acordo com a legislação vigente no país. Os parâmetros farmacocinéticos para o artesunato e a dihidroartemisinina mostraram que no Grupo AS+MQ os valores da Área sob a Curva (ASC<sub>0-t</sub>) e a concentração máxima (C<sub>max</sub>) em relação ao grupo MEFAS foram significativamente maiores. Já para a MQ aconteceu o inverso. Com essas análises pode-se concluir que os dois grupos não apresentaram bioequivalência e que mais estudos talvez sejam necessários para avaliar a absorção do ativo MEFAS.

Palavras-chave: Malária. MEFAS. AS + MQ. CLAE-EM/EM. perfil farmacocinético.

## ABSTRACT

Malaria remains a major public health problem to WHO. Nowadays, the most recommended treatment is a combination therapy with artemisinin derivatives (ACTs), and the one of most used in Brazil is the artesunate and mefloquine (AS + MQ) produced by Farmanguinhos/ Fiocruz. In order to improve and simplify the treatment, Farmanguinhos develops a hybrid salt, containing artesunate and mefloquine, MEFAS. The main aim of this study was to develop a bioanalytical method by HPLC-MS/MS evaluate the pharmacokinetics (PK) profile of MEFAS. It was performed a pre-clinical study, in which male wistar rats weighing between 230 and 330 g were used. The drugs were administered in single doses of 50 mg/ kg MEFAS and AS + MQ by gavage. Blood samples were collected in different times for analysis of three compounds. The study was divided in three groups: control group, the MEFAS and the AS + MQ group. AS, DHA and MQ were extracted from animal plasma, and the samples were analyzed by a HPLC-MS/MS bioanalytical method developed and validated in accordance with current legislation. The pharmacokinetic parameters obtained for artesunate and dihydroartemisinin showed that the AS + MQ group had significantly greater area under curve (AUC<sub>0-t</sub>) and maximum concentration (C<sub>max</sub>) in relation to the MEFAS group. For MQ the reverse occurred, so it can be concluded that the two groups were not bioequivalent and that more studies may be necessary to evaluate the absorption of MEFAS.

Keywords: Malaria. MEFAS. AS + MQ. HPLC-MS/MS. Pharmacokinetics profile.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo biológico do parasito Plasmodium sp.....	18
Figura 2 - Mapa de risco da malária por município de infecção em 2013 .....	19
Figura 3 - Incidência de malária no mundo em 2013 .....	20
Figura 4 - Estrutura das moléculas amodiaquina, primaquina e cloroquina .....	22
Figura 5 - Estrutura molecular da dapsona, pirimetamina, mefloquina, halofantrina e lumefantrina.....	23
Figura 6 - Estrutura das moléculas artemisinina, artemeter, arteeter, artesunato, ácido arteliníco e dihidroartemisinina .....	24
Figura 7 - Comprimido a ser administrado no regime de dose fixa (à esquerda) e comprimidos do regime terapêutico de dose não-fixa (à direita) .....	32
Figura 8 - Rota sintética e a fórmula estrutural do MEFAS .....	35
Figura 9 - Espectro da transição de íons do artesunato em $m/z$ 402,0 > 267,0 .....	57
Figura 10 - Espectro da transição de íons da dihidroartemisinina em $m/z$ 302,2 > 163,2 .....	57
Figura 11 - Espectro da transição de íons da mefloquina em $m/z$ 379,0 > 321,2.....	58
Figura 12 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ na coluna SUNFIRE59	
Figura 13 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ na coluna ACE (100 x 3,0 mm).....	60
Figura 14 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ na coluna GEMINI (100 x 4,6 mm) .....	61
Figura 15 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ em uma fase móvel de 80% de acetonitrila e 20% de metanol .....	62
Figura 16 - Cromatograma de uma amostra LIQ em acetonitrila como solvente de extração .....	63
Figura 17 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ em acetato de etila como solvente de extração.....	64
Figura 18 - Cromatograma de íons totais da amostra de BPN.....	65
Figura 19 - Cromatograma de íons totais da amostra de LIQ .....	66
Figura 20 - Estrutura molecular da Carbamazepina.....	67
Figura 21 - Curva de calibração do TQI para o artesunato .....	68
Figura 22 - Curva de calibração do TQI para a dihidroartemisinina .....	68
Figura 23 - Curva de calibração do TQI para a mefloquina.....	68

Figura 24 - Curva de calibração do TEBCA para o artesunato .....	71
Figura 25 - Curva de calibração do TEBCA para a dihidroartemisinina .....	71
Figura 26 - Curva de calibração do TEBCA para a mefloquina.....	71
Figura 27 - Curva de calibração do TEBPP para o artesunato.....	74
Figura 28 - Curva de calibração do TEBPP para a dihidroartemisinina .....	74
Figura 29 - Curva de calibração do TEBPP para a mefloquina.....	74
Figura 30 - Curva de calibração do TEBCD para o artesunato .....	77
Figura 31 - Curva de calibração do TEBCD para a dihidroartemisinina .....	77
Figura 32 - Curva de calibração do TEBCD para a mefloquina.....	77
Figura 33 - Cromatogramas de íons totais do TER para o artesunato .....	85
Figura 34 - Cromatogramas de íons totais do TER para a dihidroartemisinina .....	86
Figura 35 - Cromatogramas de íons totais do TER para a mefloquina .....	87
Figura 36 - Cromatogramas de íons totais do TSE para o artesunato .....	89
Figura 37 - Cromatogramas de íons totais do TSE para a dihidroartemisinina .....	90
Figura 38 - Cromatogramas de íons totais do TSE para a mefloquina.....	91
Figura 39 - Cromatograma de íons totais do MEFAS presente na tesoura .....	95
Figura 41 - Curva de concentração plasmática média de DHA em função do tempo após administração oral de veículo, MEFAS e AS + MQ .....	98
Figura 40 - Curva de concentração plasmática média de AS em função do tempo após administração oral de veículo, MEFAS e AS + MQ. ....	98
Figura 42 - Curva de concentração plasmática média de MQ em função do tempo após administração oral de veículo, MEFAS e AS + MQ .....	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fármacos antimaláricos dirigidos contra os estágios de desenvolvimento do parasito .....	26
Tabela 2 - Mecanismos de ação dos principais antimaláricos .....	27
Tabela 3 - Parâmetros farmacocinéticos da mefloquina quando usada como quimioprofilaxia ou em tratamento da malária por via oral .....	29
Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos do artesunato e do seu metabolito ativo (DHA) por via oral .....	30
Tabela 5 - Métodos analíticos presentes na literatura sobre artesunato, dihidroartemisinina e mefloquina.....	37
Tabela 6 - Guia de preparo das soluções para o artesunato .....	45
Tabela 7 - Guia de preparo das soluções para a dihidroartemisinina.....	45
Tabela 8 - Guia de preparo das soluções para a mefloquina.....	46
Tabela 9 - Solventes de extração testados durante o desenvolvimento do método ..	47
Tabela 10 - Colunas cromatográficas testadas no desenvolvimento do método bioanalítico .....	48
Tabela 11 - Condições cromatográficas .....	49
Tabela 12 - Tempos de retenção do artesunato, dihidroartemisinina, mefloquina e carbamazepina.....	49
Tabela 13 - Parâmetros individuais dos íons monitorados .....	50
Tabela 14 - Resultados dos CQB's e CQA's do TQI para o artesunato.....	69
Tabela 15 - Resultados dos CQB's e CQA's do TQI para a dihidroartemisinina.....	69
Tabela 16 - Resultados dos CQB's e CQA's do TQI para a mefloquina.....	69
Tabela 17 - Resultados de CQB's e CQA's do TEBCA para o artesunato.....	72
Tabela 18 - Resultados de CQB's e CQA's do TEBCA para a dihidroartemisinina .....	72
Tabela 19 - Resultados de CQB's e CQA's do TEBCA para a mefloquina .....	72
Tabela 20 - Resultados de CQB's e CQA's do TEBPP para o artesunato .....	75
Tabela 21 - Resultados de CQB's e CQA's do TEBPP para a dihidroartemisinina .....	75
Tabela 22 - Resultados de CQB's e CQA's do TEBPP para a mefloquina .....	75
Tabela 23 - Resultados de CQB's e CQA's do TEBCD para o artesunato.....	78
Tabela 24 - Resultados de CQB's e CQA's do TEBCD para a dihidroartemisinina .....	78
Tabela 25 - Resultados de CQB's e CQA's do TEBCD para a mefloquina .....	78

Tabela 26 - Resultados do TEBSCA para o artesunato.....	79
Tabela 27 - Resultados do TEBSCA para a dihidroartemisinina .....	80
Tabela 28 - Resultados do TEBSCA para a mefloquina .....	80
Tabela 29 - Resultados do TEBSTA para o artesunato .....	81
Tabela 30 - Resultados do TEBSTA para a dihidroartemisinina .....	81
Tabela 31 - Resultados do TEBSTA para a mefloquina .....	82
Tabela 32 - Resultados do TPE para o artesunato .....	83
Tabela 33 - Resultados do TPE para a dihidroartemisinina .....	83
Tabela 34 - Resultados do TPE para a mefloquina .....	83
Tabela 35 - Resultado do Fator de Matriz Normalizado do TEM para o artesunato ..	92
Tabela 36 - Resultado do Fator de Matriz Normalizado do TEM para a dihidroartemisinina.....	92
Tabela 37 - Resultado do Fator de Matriz Normalizado do TEM para a mefloquina .	92
Tabela 38 - Resultado das concentrações plasmáticas para o Ensaio Piloto 01 .....	93
Tabela 39 - Resultado das concentrações plasmáticas para o Ensaio Piloto 02 .....	94
Tabela 40 - Resultado das concentrações plasmáticas para o Ensaio Piloto 03 para AS e DHA.....	96
Tabela 41 - Resultado das concentrações plasmáticas para o Ensaio Piloto 03 para MQ.....	96
Tabela 42 - Parâmetros farmacocinéticos do AS para os grupos controle, MEFAS e AS + MQ.....	99
Tabela 43 - Parâmetros farmacocinéticos do DHA para os grupos controle, MEFAS e AS + MQ.....	100
Tabela 44 - Parâmetros farmacocinéticos da MQ para os grupos controle, MEFAS e AS + MQ.....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å	Angstrom
ACN	Acetonitrila
ACT	Terapia combinada com derivados de artemisinina
AFO	Ácido fórmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Artesunato
ASC0-∞	Área Sob a Curva do tempo 0 até o infinito
ASC0-t	Área Sob a Curva do tempo 0 até o último tempo de coleta
BPN	Branco de Plasma Normal
BPZ	Branco de Plasma com padrão interno
°C	grau Celsius
CBZ	Carbamazepina
CCAL	Curva de calibração
CE	Energia de colisão
CEUA	Comitê de Ética o Uso de Animais
CI	<i>Clearance</i>
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massa sequencial
Cmáx.	Concentração máxima
CQ	Controle de Qualidade
CQA	Controle de Qualidade de alta concentração
CQB	Controle de Qualidade de baixa concentração
CQC	Controle de Qualidade de concentração intermediária
CQD	Controle de Qualidade de diluição
CQM	Controle de Qualidade de média concentração
Cp	Concentração plasmática
CV	Coeficiente de Variação
CXP	Potencial de saída
DHA	Dihidroartemisinina
DP	Potencial de desaglomeração
DPR	Desvio Padrão Relativo

EP	Potencial de entrada
ESI+	Eletrospray positivo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Fr	Biodisponibilidade relativa
G	grama
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Ke	Constante de eliminação
m/z	Relação massa/ carga
MEFAS	Artesunato de mefloquina
MeOH	Metanol
MQ	Mefloquina
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
Ms	milissegundo
Ng	nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI	Padrão Interno
PK	Farmacocinética
r	Coeficiente de Correlação Linear
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
rpm	Rotação por minuto
SME	Solução Mestre
STB	Solução de Trabalho
q.s	quantidade suficiente
T1/2 $\beta$	Tempo de meia vida de eliminação
TBME	Metil-t-butil-éter
TEBCA	Teste de Estabilidade de curta duração em plasma
TEBCD	Teste de estabilidade após Ciclos de congelamento e descongelamento
TEBPP	Teste de Estabilidade de Pós Processamento
TEBSCA	Teste de Estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise
TEBSTA	Teste de Estabilidade das soluções de trabalho armazenadas
TEM	Teste de Efeito Matriz
TER	Teste de Efeito Residual
Tmáx.	Tempo máximo para alcançar a concentração plasmática
TSE	Teste de Seletividade

TPE	Teste de Precisão e Exatidão
TQI	Teste de Quantificação Inicial
V	voltz
Vd	Volume de distribuição
v/v	volume por volume

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 CICLO BIOLÓGICO DO <i>PLASMODIUM</i> .....	17
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	19
1.3 DIAGNÓSTICOS DA MALÁRIA.....	20
1.4 TRATAMENTO DA MALÁRIA.....	21
1.4.1 Atividade dos antimaláricos.....	25
1.4.2 Cloridrato de mefloquina.....	27
1.4.3 Derivados de artemisinina: artesunato e dihidroartemisinina.....	29
1.4.4 Associação de artesunato e mefloquina.....	31
1.4.5 Artesunato de mefloquina (MEFAS).....	33
2 OBJETIVOS.....	39
2.1 OBJETIVO GERAL.....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS.....	40
3.1.1 Equipamentos.....	40
3.1.2 Utensílios.....	40
3.1.3 Para a análise e identificação das amostras.....	40
3.1.4 Padrões analíticos.....	40
3.1.5 Insumos Farmacêuticos Ativos e o MEFAS.....	41
3.1.6 Solventes, reagentes e soluções.....	41
3.2 ANIMAIS.....	41
3.2.1 Distribuição dos animais em grupos.....	42
3.3 DOSE E ESQUEMA DE ADMINISTRAÇÃO.....	42
3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS.....	43
3.5 COLETA DE BRANCO DE PLASMA NORMAL (BPN).....	43
3.6 EUTANÁSIA.....	44
3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	44
3.7.1 Preparo das Soluções Estoque e das Soluções de trabalho.....	44
3.7.2 Método de Extração Bioanalítico.....	47
3.7.3 Condições cromatográficas.....	48
3.7.4 Tempos de retenção dos fármacos.....	49
3.7.5 Condições do espectrômetro de massas.....	49
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	50
3.8.1 Teste de Quantificação Inicial (TQI).....	50

3.8.2 Estabilidade .....	50
3.8.3 Precisão e Exatidão .....	52
3.8.4 Efeito matriz .....	53
3.8.5 Seletividade (TSE) .....	53
3.8.6 Efeito residual (TER) .....	53
3.9 PERFIL FARMACOCINÉTICO .....	54
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS .....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO .....	56
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO .....	67
4.2.1 Teste de Quantificação Inicial (TQI) .....	67
4.2.2 Teste de Estabilidade de curta duração em plasma (TEBCA) .....	70
4.2.3 Teste de estabilidade pós-processamento (TEBPP) .....	73
4.2.4. Teste de Estabilidade de Congelamento e Descongelação (TEBCD) ..	76
4.2.5 Teste de estabilidade de Curta duração das Soluções de trabalho (TEBSCA) .....	79
4.2.6 Teste de Estabilidade de Longa Duração das Soluções de trabalho (TEBSTA) .....	81
4.2.7 Teste de Precisão e Exatidão (TPE) .....	82
4.2.8 Teste de Efeito Residual (TER) .....	84
4.2.9 Teste de Seletividade (TSE) .....	88
4.2.10 Teste de Efeito Matriz (TEM) .....	92
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO .....	93
4.4 PERFIL FARMACOCINÉTICO .....	97
5 CONCLUSÃO .....	105
REFERÊNCIAS .....	106
ANEXO I: CERTIFICADO PADRÃO MEFLOQUINA .....	111
ANEXO II: CERTIFICADO PADRÃO ARTESUNATO .....	112
ANEXO III: CERTIFICADO PADRÃO DIHIDROARTEMISININA .....	113
ANEXO IV: CERTIFICADO CARBAMAZEPINA .....	114
ANEXO V: CERTIFICADO PADRÃO ARTESUNATO .....	115

## 1 INTRODUÇÃO

A malária ou paludismo é uma doença infecciosa causada pelo parasito do gênero *Plasmodium*, tendo como sua principal fonte de transmissão ao homem a picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles sp.* previamente infectado com o parasito. No entanto, a transmissão da malária também pode ocorrer através do compartilhamento de seringas, transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos, ou até mesmo durante o período gestacional, no qual a mãe transmite para o feto (BRASIL, 2014).

A malária humana pode ser causada por cinco espécies do gênero de protozoário *Plasmodium*, são eles: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. No Brasil somente as espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* estão associadas à infecção em humanos, sendo a espécie *P. falciparum* a mais agressiva e a *P. vivax* a mais prevalente. A espécie *P. falciparum* é capaz de se reproduzir mais rápido que as outras, além de se multiplicar drasticamente na corrente sanguínea, destruindo em torno de 2 a 25 % dos glóbulos vermelhos, o que pode acarretar casos mais graves da doença (CUNICO et al., 2008; FIOCRUZ, 2013).

A infecção pelas diferentes espécies do gênero *Plasmodium* pode acarretar na manifestação de sintomas diversos, no entanto, os principais sintomas para todas as espécies são caracterizados por cefaleia intensa, cansaço, mal-estar, mialgia, náuseas, vômitos e anorexia, além de o indivíduo infectado apresentar quadros de calafrios e febre igual ou superior a 41°C (BRASIL, 2008; OMS, 2015). Em casos onde há uma ineficácia na qualidade do tratamento da malária ou até mesmo o tratamento tardio, a carga parasitária continua a se desenvolver, havendo a progressão para malária complicada/grave dentro de poucas horas (BRASIL, 2008; OMS, 2015). Dentre os sintomas da malária complicada estão: quadros de coma (malária cerebral), acidose metabólica, anemia grave, disfunção renal e pulmonar, hipoglicemia - e quando não tratada – a malária é fatal. Como toda a doença infecciosa a malária também possui seu grupo de risco, em que pertencem mulheres no 1º trimestre de gestação, idosos, crianças com peso menor que 5 kg, pacientes imunocomprometidos e turistas sem tratamento profilático (OMS, 2015).

## 1.1 CICLO BIOLÓGICO DO *PLASMODIUM*

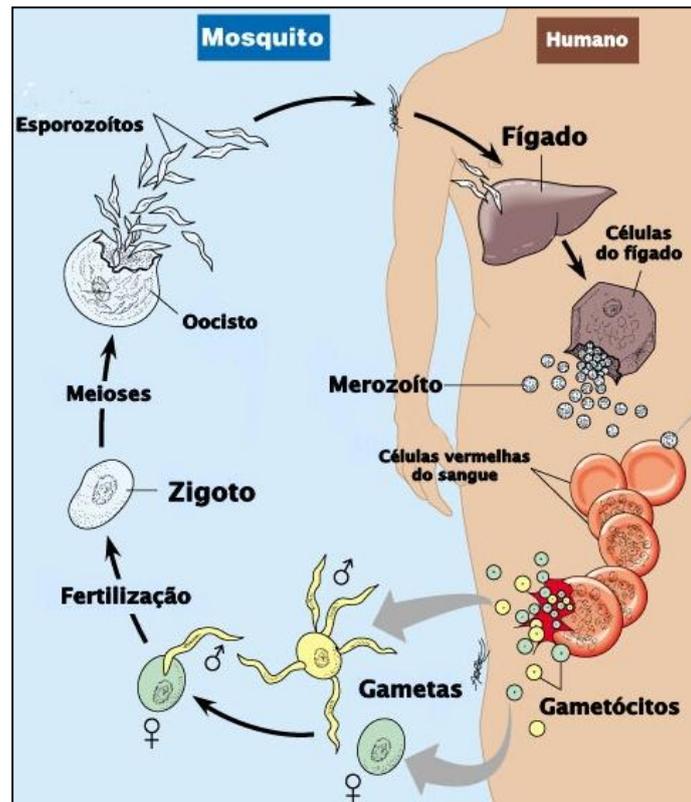
Após a picada do mosquito fêmea *Anopheles*, os esporozoítas são inoculados na corrente sanguínea do homem no momento do repasto sanguíneo do mosquito. Os esporozoítas migram rapidamente para o fígado, infectando os hepatócitos, onde passam pelo estágio pré-eritrocítico. Para todas as espécies de *Plasmodium* ocorre o desenvolvimento do esporozoíta para esquizontes tissulares e através da reprodução assexuada são produzidos milhares de merozoítos. O estágio tissular primário é assintomático, pois é adotada a forma exoeritrocítica e dependendo da espécie do plasmódio a infecção ocorre durante 5 a 15 dias. Cabe ressaltar que nas espécies *P. vivax* e *P. ovale* alguns esporozoítas - nos hepatócitos – são capazes de evoluir para uma forma latente denominada de hipnozoítos. Os hipnozoítos são responsáveis pela recidiva da doença, caracterizada como estágio exoeritrocítico (CUNICO et al., 2008; TIMOTHY et al., 2009).

Estes milhares de merozoítos ocasionam a ruptura dos hepatócitos, penetrando na circulação e invadindo os eritrócitos para perpetuação do ciclo, chamado de estágio eritrocítico. Nos glóbulos vermelhos, os merozoítos começam a se desenvolver para forma trofozoíta (forma móvel e anelar), estes crescem e dividem-se em novos merozoítos. Os novos merozoítos reproduzem-se assexuadamente no interior dos eritrócitos, que se rompem e originam novos merozoítos na corrente sanguínea, continuando a reprodução assexuada. Neste momento, os sintomas clínicos começam a se manifestar (CUNICO et al, 2008; TIMOTHY et al., 2009).

Dos merozoítos que infectam os eritrócitos, alguns se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, eles são aspirados por outro mosquito *Anopheles* durante seu repasto sanguíneo e continuam o seu desenvolvimento dentro do estômago do mosquito fêmea (BRASIL, 2006; TIMOTHY et al., 2009).

Os gametócitos masculinos fecundam os gametócitos femininos, dando origem ao ovo ou zigoto diploide que se transformam em oocisto. Esses oocistos migram para o meio do estômago do mosquito. Sucessivas divisões meióticas ocorrem, e os esporozoítos gerados migram para as glândulas salivares do mosquito, lugar no qual ficam alojados. Por fim, as fêmeas se tornam infectantes, ou seja, aptas a transmitirem a doença para outro indivíduo, recomeçando o ciclo (Figura 1) (BRASIL, 2006; FLANNERY et al., 2013).

Figura 1 - Ciclo biológico do parasito *Plasmodium sp.*



Fonte: (CDC, 2012)

Cada espécie do parasito possui uma durabilidade diferente em relação ao ciclo assexual até ruptura das hemácias: *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. vivax* possuem um ciclo de 48 horas, *P. malariae* tem o ciclo de 72 horas e o *P. knowlesi* tem o ciclo mais curto de 24 horas (OMS, 2015). Como já citado anteriormente, o parasito *P. falciparum* é a espécie que mais acomete os humanos, sendo a mais grave e de mais rigoroso controle. Embora essa espécie não possua o ciclo biológico mais curto, em seu ciclo reprodutivo, ele é capaz de gerar um número superior aos demais parasitos, chegando a aproximadamente 40.000 merozoítos ao passo que as outras espécies produzem por volta de 20.000 merozoítos (CUNICO et al., 2008; OMS, 2015).

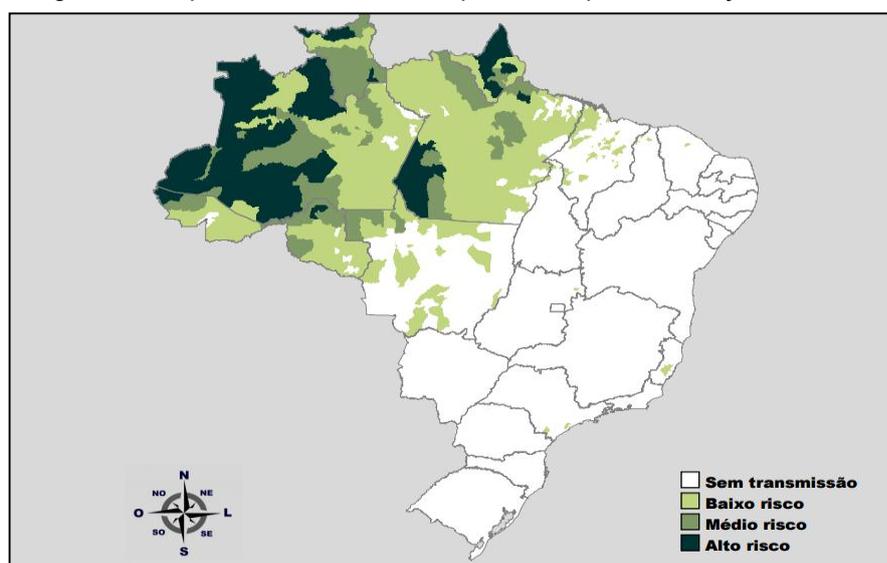
## 1.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a malária está entre as enfermidades caracterizadas como doença negligenciada, que tem por definição ser uma doença que prevalece em condições de pobreza e desigualdade social presentes em países subdesenvolvidos, sendo um alarmante problema de saúde pública. Segundo o Relatório Mundial sobre a Malária, publicado em 2013 e fornecido pela OMS, embora se tenha observado um progresso no combate a malária, o número de óbitos ainda continua expressivo (OMS, 2013).

As áreas endêmicas se distribuem geograficamente em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e Américas. Estima-se que mais de 40 % da população mundial está propensa a adquirir malária. É considerada uma doença tropical, tendo como maior foco o continente africano, onde apresenta os maiores índices de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças (OMS, 2008).

No Brasil os casos de malária estão concentrados na Região Amazônica, por ser a área endêmica da doença. A maioria dos casos notificados foram nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá e Roraima, conforme mostrado no mapa abaixo (Figura 2) (FIOCRUZ, 2013). Em 2014, de acordo com o Ministério da Saúde e o Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP – Malária) foram notificados 40.893 casos positivos da doença (BRASIL, 2014).

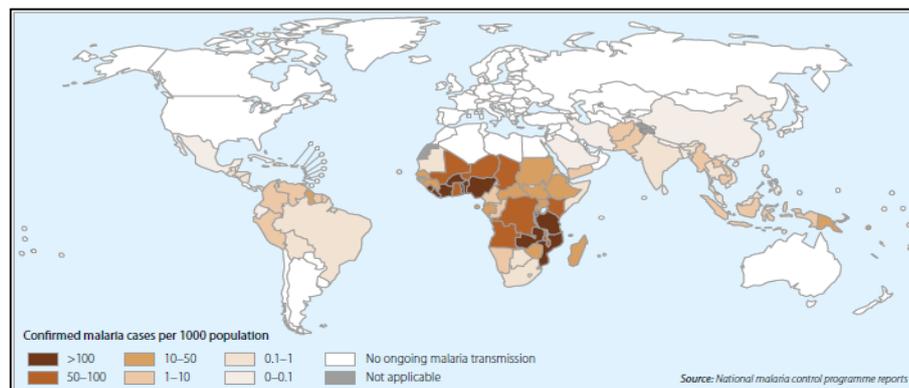
Figura 2 - Mapa de risco da malária por município de infecção em 2013



Fonte: (SIPAV - Malaria/ SVS)

De acordo com o último relatório gerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é estimado que 3,3 bilhões de pessoas em 97 países correm o risco de contraírem malária e desenvolverem a doença. Desses 3,3 bilhões de pessoas, 1,2 bilhões estão na área de alto risco (> 1 em 1000 chances de contraírem malária em um ano). No ano de 2013, foram relatados 584000 óbitos causados pela doença, sendo 90 % na região africana, acometendo inclusive crianças abaixo de cinco anos (Figura 3) (OMS, 2014).

Figura 3 - Incidência de malária no mundo em 2013



Fonte: (National malaria control programme reports apud OMS, 2014)

### 1.3 DIAGNÓSTICOS DA MALÁRIA

A malária não possui sintomas específicos e característicos da doença, seus sinais podem ser facilmente confundidos com outras enfermidades. Quando um indivíduo apresenta quadro de febre e vive em regiões onde a doença é endêmica, o ideal é procurar o atendimento médico adequado. Todos os pacientes com suspeita de malária precisam passar por testes parasitológicos, sendo por microscopia ou pelos testes rápidos imunocromatográficos para assim confirmar o quadro infeccioso (OMS, 2015).

O diagnóstico por microscopia por Gota Espessa<sup>1</sup> é uma técnica padrão-ouro na detecção e identificação dos parasitos da malária no sangue, além de conseguir identificar o estágio evolutivo do parasito no sangue. O método é relativamente rápido, demorando aproximadamente 60 minutos, e ainda pode ser armazenado por tempo indeterminado para que comparações futuras sejam realizadas (BRASIL, 2010).

Já os testes rápidos imunocromatográficos<sup>2</sup> são baseados na detecção de antígenos dos parasitos por anticorpos monoclonais, sendo revelados através do método imunocromatográfico. Esse teste é comercialmente disponível e revela o resultado mais rápido que o teste citado anteriormente, demorando apenas cerca de 15 a 20 minutos. No entanto, apresenta algumas desvantagens em relação à Gota Espessa, pois ele não consegue distinguir as espécies *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, não é capaz de mensurar o nível de parasitemia e não detecta infecções mistas, inclusive com o *P. falciparum* (BRASIL, 2010).

O diagnóstico precoce da doença e o seu tratamento imediato são estratégias fundamentais e eficazes para o combate da malária. A disponibilização de antimaláricos a custo acessível e aceitável para população de risco é uma das intervenções mais eficientes. Arelado a isso, o uso racional do medicamento é indispensável para o tratamento seguro, reduzindo o risco de agravo da doença e até mesmo o óbito, podendo contribuir até mesmo com a diminuição do desenvolvimento da resistência do *falciparum* as terapias (BRASIL, 2001).

#### 1.4 TRATAMENTO DA MALÁRIA

A quinina é um produto natural do tipo alcaloide, extraída a partir da casca da árvore *Cinchona calisaya*. Até o início do século XX foi a primeira e única alternativa no tratamento da malária, sendo amplamente utilizada por soldados durante a I Guerra Mundial (CUNICO et al., 2008; TIMOTHY et al., 2009).

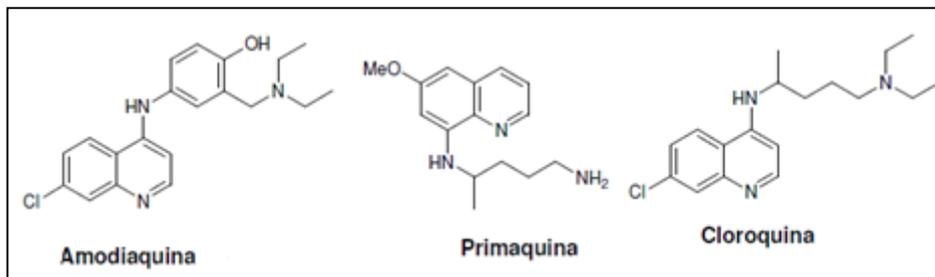
---

<sup>1</sup> Na Gota Espessa, o sangue é colhido por punção digital, colocado em uma lâmina e corado pelo método de Walker. Quando feito com reagentes de boa qualidade e equipe bem treinada, pode-se detectar até 5-10 parasitos por  $\mu\text{L}$  de sangue (BRASIL, 2010).

<sup>2</sup> No teste rápido imunocromatográfico, são disponibilizados kits que possuem um *cassette* (filamento) com antígeno dos parasitos e que são coloridos quando há a presença do *Plasmodium* no sangue do indivíduo. É um diagnóstico de fácil execução, porém de custo ainda elevado (BRASIL, 2010; OMS, 2015).

A partir de 1944, pesquisadores nos Estados Unidos começaram a desenvolver novos fármacos, devido à dificuldade na produção da quinina em larga escala. Em vista disso, surgiram os novos derivados quinolínicos, tais como: cloroquina, amodiaquina e primaquina (Figura 4). Essa classe de medicamentos induz a morte do *Plasmodium* através do bloqueio da polimerização de produtos tóxicos provenientes da degradação da hemoglobina, resultando na lise das células do parasito durante a etapa eritrocítica do ciclo biológico do *Plasmodium* (CUNICO et al., 2008; TIMOTHY et al., 2009).

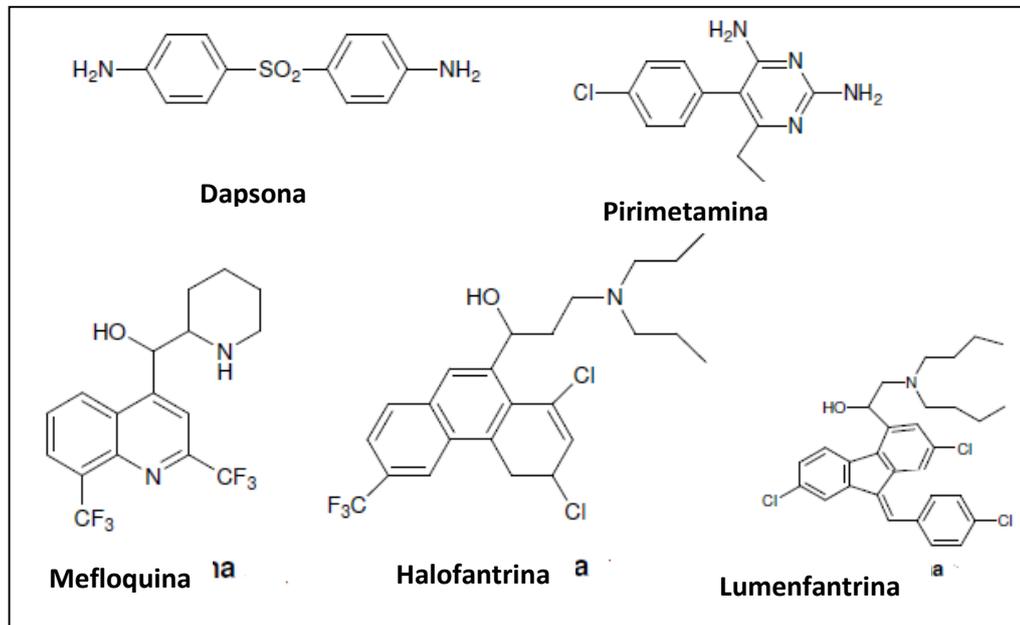
Figura 4 - Estrutura das moléculas amodiaquina, primaquina e cloroquina



Fonte: (CUNICO et al., 2008)

Até a metade do século XX, a cloroquina era o tratamento de primeira linha para os casos de malária não complicada causada pelas quatro espécies do parasito (TIMOTHY et al., 2009). A cloroquina teve grande importância e foi pioneira no tratamento da malária no continente africano. Durante cinquenta anos ela era a terapia de forma oral mais barata, segura e eficaz contra a doença (DUFFY et al., 2004). No entanto, com o passar do tempo o parasito começou a apresentar resistência à cloroquina, havendo como estratégia principal a modificação estrutural da molécula. Estudos de modificação da cloroquina levaram a descoberta de outros fármacos no final dos anos 60, tais como: lumefantrina, pirimetamina, dapsona, halofantrina e mefloquina (Figura 5), todos com ação de esquizotocida sanguíneo, na etapa eritrocítica do ciclo biológico do parasito, sendo utilizados contra cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (TIMOTHY et al., 2009).

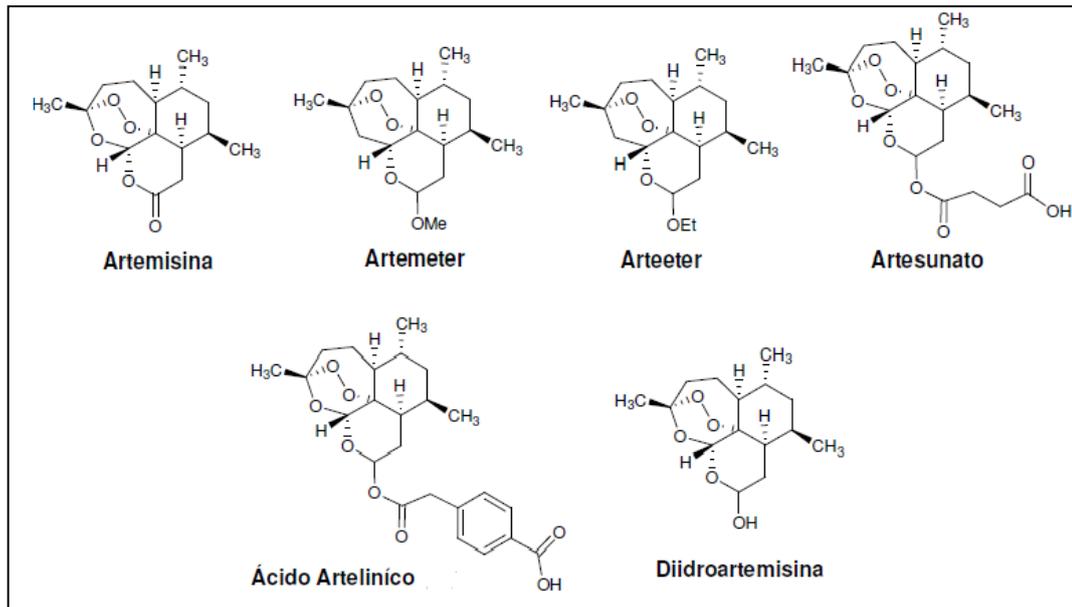
Figura 5 - Estrutura molecular da dapsona, pirimetamina, mefloquina, halofantrina e lumefantrina



Fonte: (CUNICO et al., 2008)

Em 1971, uma nova classe terapêutica começou a ser isolada por químicos chineses. A molécula era uma lactona sesquiterpênica com um grupo peróxido – a artemisinina. A artemisinina e seus derivados são antimaláricos extraídos da semente *Artemisia annua*, denominada de absinto doce, que há séculos têm sido usada na medicina chinesa na cura de quadros febris (Figura 6). Tanto artemisinina como os seus derivados têm como principal função a rápida redução da biomassa do parasito quando comparada a outras drogas (DUFFY et al., 2004). Entretanto, sua maior limitação é o fato de apresentar uma meia vida muito curta, por isso essa droga é associada a fármacos de meia vida mais longa, como por exemplo, mefloquina, cloroquina e lumefantrina, para atuarem de forma profilática (FLANNERY et al., 2013).

Figura 6 - Estrutura das moléculas artemisinina, artemeter, arteeter, artesunato, ácido artelinico e diidroartemisinina



Fonte: (CUNICO et al., 2008)

Após a OMS lançar o Guia de Tratamento da Malária em 2006, até os dias de hoje, a melhor alternativa para o tratamento da malária causada pelo *P. falciparum* tem sido a terapia combinada com derivados de artemisinina (ACTs). Os ACTs normalmente possuem alta eficácia e são muito bem tolerados, além de possuírem fácil adesão pelos pacientes. Essa combinação tem tido bastante êxito, pois vem contribuindo fortemente na redução da morbidade e mortalidade da doença em nível global (OMS, 2015; DUFFY et al., 2004).

Os ACTs atuam da seguinte maneira: a artemisinina e seus derivados reduzem a carga parasitária no estágio eritrocítico do ciclo do *Plasmodium*. Além disso, também atuam contra o estágio sexual dos parasitos (gametócitos), evitando a transmissão pelo mosquito e diminuindo o reservatório humano. Já os fármacos de atuação mais longa agem reduzindo a carga parasitária restante e desenvolvem a proteção contra a resistência dos derivados de artemisinina além de atuarem no período pós-tratamento como agente profilático (OMS, 2015).

Para o tratamento da malária não complicada causada pelo *P. falciparum* os cinco ACTs associados a outros antimaláricos mais recomendados são: artemeter + lumefantrina, artesunato + amodiaquina, artesunato + mefloquina, artesunato + sulfadoxina-pirimetamina e diidroartemisinina + piperaquina. Já no Brasil, a terapia

mais indicada em casos de malária não complicada causada pelo *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ou *P. knowlesi* é a primaquina ou os ACTs, principalmente quando as cepas são resistentes à cloroquina (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Cabe ressaltar que para cada combinação terapêutica existe uma dosagem indicada que está estritamente relacionada à idade e peso do paciente. A dose dos antimaláricos para melhor entendimento relacionam-se também com o perfil farmacocinético e com a farmacodinâmica de cada fármaco (OMS, 2015).

#### 1.4.1 Atividade dos antimaláricos

O ciclo biológico do *Plasmodium* é considerado um ciclo complexo devido ao fato de possuir diferentes estágios de replicação do parasito. Com isso, cada classe terapêutica atua em diferentes formas do *Plasmodium* e da doença.

A maioria dos fármacos são utilizados para o tratamento da forma aguda da doença. Os derivados de artemisinina, cloroquina, mefloquina, piremetamina e proguanil agem na forma eritrocítica do parasito, ou seja, atuam no momento em que o *Plasmodium* está alocado nas hemácias do indivíduo. Essa classe de medicamento evita a manifestação dos sintomas da doença, e nas infecções causadas pelo *P. falciparum* ou pelo *P. malariae* podem efetuar a cura total da doença, uma vez que essas duas espécies não possuem ciclo exoeritrocítico (GOODMAN & GILMAN, 2012; CUNICO et al., 2008).

As espécies *P. vivax* e *P. ovale* possuem o ciclo exoeritrocítico, no qual o parasito está na forma hipnozoíta, podendo se manifestar apenas meses depois. Para que não ocorra a recidiva da doença alguns fármacos atuam promovendo a cura radical da malária, sendo caracterizados como agentes esquizonticidas teciduais ou tissulares, agindo nos parasitos alocados nos hepatócitos. Alguns medicamentos que possuem essa atividade são a primaquina e tafenoquina (KATZUNG, 2010; RANG & DALE, 2004; CUNICO et al., 2008).

Fármacos que possuem atividade e meia vida de eliminação longa como lumefantrina, mefloquina e cloroquina podem ser utilizadas no tratamento profilático e são comumente indicados para turistas que vão a regiões onde a malária é endêmica. Esses profiláticos causais são capazes de destruir os parasitos nos hepatócitos, logo depois do ciclo pré-eritrocítico (GOODMAN & GILMAN, 2012; CUNICO et al., 2008). No entanto, para que a transmissão da malária seja controlada é necessário o uso de

fármacos com ação gametocida, ou seja, que destruam os parasitos em seu estágio sexual a fim de evitar o aumento do reservatório humano da doença. Dessa forma, as terapias mais indicadas são a primaquina, proguanil e pirimetamina. Na tabela 1 é possível observar qual antimalárico atua em determinado estágio do parasito (GOODMAN & GILMAN, 2012; CUNICO et al., 2008).

Tabela 1 - Fármacos antimaláricos dirigidos contra os estágios de desenvolvimento do parasito

<b>EFEITO DO FÁRMACO SOBRE A VIABILIDADE DO PARASITO</b>					
<b>Fármacos</b>	<b>Estágios Hepáticos</b>			<b>Estágios Sanguíneos</b>	
	<b>Esporozoítio</b>	<b>Primário</b>	<b>Hipnozoítio</b>	<b>Assexuado</b>	<b>Gametócito</b>
<b>Artemisinina</b>	-	-	-	+	+
<b>Cloroquina</b>	-	-	-	+	+/-
<b>Mefloquina</b>	-	-	-	+	-
<b>Quinina/ Quinidina</b>	-	-	-	+	+/-
<b>Pirimetamina</b>	-	-	-	+	-
<b>Sulfadoxina</b>	-	-	-	+	-
<b>Tetraciclina</b>	-	-	-	+	-
<b>Atovaquona/ Proguanila</b>	-	+	-	+	+/-
<b>Primaquina</b>	-	+	+	-	+

Legenda: -: Ausência de atividade; +/-: Atividade baixa ou moderada; +: Atividade importante.  
Fonte: (GOODMAN & GILMAN, 2012)

Muitos dos medicamentos já citados não possuem claramente uma atuação farmacodinâmica bem definida, mas diante de todas as pesquisas já realizadas algumas ações farmacológicas já têm sido elucidadas conforme tabela 2.

Tabela 2 - Mecanismos de ação dos principais antimaláricos

<b>Fármacos</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
<b>Cloroquina, primaquina, halofantrina, lumefantrina, mefloquina e derivados de artemisinina</b>	A maioria dos fármacos antimaláricos se aloca no vacúolo alimentar do parasito e atuam inibindo a enzima heme polimerase responsável pela produção da hemozoína. Fazendo com que o grupamento heme seja tóxico ao parasito.
<b>Proguanil, pirimetamina, sulfadoxina e dapsona</b>	Esses fármacos inibem as enzimas responsáveis pela biossíntese do ácido fólico (diidropteroato sintase e diidrofolato redutase), vitamina essencial para o metabolismo do parasito.
<b>Sulfonamidas, tetraciclina e doxiciclina</b>	Esses antibióticos atuam inibindo a síntese de proteínas indispensáveis para a realização da transcrição procariota e podem agir contra a mitocôndria do parasito.
<b>Atavaquona e Tafenoquina</b>	Alguns antimaláricos atuam competitivamente com as proteínas mitocondriais responsáveis pelo transporte de elétrons, interrompendo o processo de produção de ATP do pelo <i>Plasmodium</i> .

Fonte: (GOODMAN & GILMAN, 2012; CUNICO et al., 2008)

#### 1.4.2 Cloridrato de mefloquina

O cloridrato de mefloquina (MQ), ( $\alpha$ S)-rel- $\alpha$ -(2R)-2-piperidinil-2,8-bis-(trifluorometil)-4-quinolinametanol, é apresentado na forma de um pó cristalino, branco ou amarelado, apresentando polimorfismo. Sua massa molar na forma de cloridrato é de 414,77 g/mol, sendo pouco solúvel em água e facilmente solúvel em metanol, acetato de etila e etanol (FARMACOPEIA, 2010).

Desde 1985, a MQ está disponível para o tratamento da malária como uma quimioprevenção, a droga é um eficaz esquizotocida e atua contra os estágios sanguíneos de todas as espécies da malária (SCHLAGENHAUF et al., 2010).

Atualmente é usada na forma de mistura racêmica (50:50) de eritro-isômeros, e ultimamente todos os estudos clínicos têm adotado a droga nessa mistura (GEDITZ et al., 2014; SCHLAGENHAUF et al., 2010). Existem estudos recentes que demonstraram as atividades de cada um dos dois enantiômeros, o (-)-enantiômero está relacionado com os efeitos adversos do fármaco, já o (+)-enantiômero é o que possui a atividade antimalárica com poucas manifestações de efeitos adversos (GOODMAN & GILMAN, 2012).

A mefloquina possui uma boa adesão no tratamento da malária, pois é administrada oralmente uma vez por semana e possui acesso gratuito à população.

Bastante recomendada para viajantes que irão para locais endêmicos da doença, inclusive já foi utilizada por mais de 35 milhões de viajantes. Além disso, a mefloquina também pode ser recomendada para gestantes ou mulheres que ainda estão no período de amamentação e para crianças com peso superior a 5 kg (SCHLAGENHAUF et al., 2010).

Sua posologia para adultos é de aproximadamente 250 mg em dose única durante três dias de tratamento. Já para adultos que possuem peso corporal inferior a 45 kg e para crianças com peso superior a 5 kg recomenda-se a dose semanal de 5 mg de mefloquina base/kg (SCHLAGENHAUF et al., 2010).

Jullien e colaboradores (2014) realizaram estudos farmacocinéticos com a mefloquina, evidenciando sua longa meia vida de aproximadamente 14 dias tanto na administração profilática quanto para o tratamento da malária não complicada transmitida pelo *Plasmodium falciparum*.

Como mencionado anteriormente, a MQ tem um prolongado efeito esquizotocida sanguíneo altamente eficaz, e isso pode ser explicado pelo fato de sua longa meia vida de aproximadamente duas semanas. No entanto, até o momento a atividade não foi descrita contra os estágios hepáticos iniciais ou gametócitos maduros do *P. falciparum* e contra os hipnozoítos do *P. vivax* e *P. ovale* (GOODMAN & GILMAN, 2012).

A ação farmacológica da MQ ainda não está claramente elucidada, mas sabe-se que ela atua na inibição da hemozoína, tornando o grupamento heme tóxico ao parasito (OMS, 2015).

Quando administrada por via oral apresenta boa tolerabilidade em doses profiláticas e divididas ao longo dos dias de tratamento. Sua longa ação pode trazer alguns efeitos indesejáveis como náuseas, vômitos, intensas dores de cabeça, distúrbios no sono e problemas gastrintestinais (GOODMAN & GILMAN, 2012).

A MQ possui uma farmacocinética diferenciada, em pacientes com malária ela atinge uma concentração plasmática mais elevada e é eliminada mais rapidamente do que em voluntários sadios. Entretanto, não apresenta diferenças significativas em relação a crianças e adultos (OMS, 2015).

Ela é amplamente distribuída pelo corpo onde aproximadamente 98 % se liga às proteínas plasmáticas. Como a grande maioria dos fármacos, ela é metabolizada no fígado através da enzima CYP3A4, gerando metabólitos inativos. A excreção de seus metabólitos é mais comumente realizada pela via fecal e uma pequena porção

da mefloquina (~ 10 %) é excretada pela urina (GOODMAN & GILMAN, 2012; OMS, 2015).

Na tabela 3 é apresentada a diferença dos parâmetros farmacocinéticos entre indivíduos já portadores de malária e indivíduos que fazem uso do medicamento como medida profilática. A dose utilizada nos dois regimes é de 400 mg/dia para indivíduos acima de 30 kg, sendo administrada quando em combinação com derivados de artemisinina durante três dias seguidos. Já para turistas que fazem administração profilática, a mefloquina é administrada somente uma vez por semana durante duas semanas antes da viagem até quatro semanas depois (OMS, 2015).

Tabela 3 - Parâmetros farmacocinéticos da mefloquina quando usada como quimioprofilaxia ou em tratamento da malária por via oral

Parâmetros	Quimioprofilaxia	Tratamento
<b>C<sub>max</sub>. (ng/mL)</b>	722-2259	1000-3279
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	4,5-31	15-72
<b>T<sub>1/2</sub> (dias)</b>	1,03-19,1	8,1-15,2
<b>AUC 0-∞ (µg/mL.dias)</b>	15,6-48,0	12,8-63,6
<b>CL/f (L/h por kg)</b>	0,016-0,095	0,016-0,174

Fonte: (OMS, 2015)

#### 1.4.3 Derivados de artemisinina: artesunato e dihidroartemisinina

O artesunato (AS), é um éster 1-[(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-decaidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12H-pirano[4,3-j]-1-2benzodioxepina-10-ílico] do ácido butanodióico, apresentado na forma de pó fino, cristalino, branco ou quase branco de massa molar de 384,42 g/mol (FARMACOPEIA, 2010).

O AS atua como um pró-fármaco no qual possui uma excelente solubilidade principalmente em água e está disponível nas formas de administração oral, intravenosa, intramuscular e retal (TIMOTHY et al., 2009; OMS, 2015). Sua farmacocinética já foi testada no estudo de Balint (2001) onde o artesunato se mostrou rapidamente absorvido e com meia vida de eliminação de aproximadamente uma hora.

Devido à característica de pró-fármaco, o artesunato é rapidamente hidrolisado e convertido para dihidroartemisinina (DHA) através do processo de biotransformação com atuação da enzima CYP2A6 (OLLIARO et al., 2010; OMS, 2015).

A dihidroartemisinina é o maior metabólito ativo gerado a partir dos derivados de artemisinina, conferindo uma potente atividade antimalárica comprovada em estudos *in vitro* e *in vivo* (XING et al., 2007).

Os derivados de artemisinina são normalmente aconselhados para o tratamento da malária grave por *P. falciparum* e também muito eficaz contra os estágios eritrocíticos assexuados do *P. vivax* (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente elucidado, porém sabe-se que ela é bastante potente e possui rápida ação na redução do parasito logo após sua administração, devido à interação do grupamento heme com os radicais livres que fazem a alquilação e oxidação das proteínas, destruindo as membranas e microorganelas do parasito no estágio eritrocítico. Além disso, todos os derivados da artemisinina possuem um ótimo quadro de resolução febril (BALINT, 2001; GOODMAN & GILMAN, 2012).

A dihidroartemisinina confere maior ação farmacológica que o artesunato quando administrado por via oral, estando aproximadamente 93 % ligada às proteínas plasmáticas. Sua metabolização é realizada no fígado e no intestino, sendo excretada pela urina (OMS, 2015).

Os parâmetros farmacocinéticos do artesunato e da dihidroartemisinina referentes a via oral de administração do artesunato, em uma dose de 200 mg/ dia para indivíduos com peso corpóreo acima de 30 kg encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos do artesunato e do seu metabólito ativo (DHA) por via oral

<b>Parâmetros</b>	<b>Artesunato</b>	<b>Dihidroartemisinnina</b>
<b>Cmax. (ng/mL)</b>	34-451	900-2043
<b>Tmax (min)</b>	30-84	54-120
<b>T1/2 (dias)</b>	0,113-0,419	1,217-3,745
<b>AUC 0-∞ (µg/mL.dias)</b>	54	48-150
<b>CL/f (L/h por kg)</b>	0,61-15,4	0,63-1,66

Fonte: (OMS, 2015)

#### 1.4.4 Associação de artesunato e mefloquina

O grande desafio para o tratamento da malária é a resistência do parasito as multidrogas disponíveis para terapia, por essa razão a combinação de antimaláricos é a melhor alternativa para o aumento da eficácia terapêutica (KREMSNER & KRISHNA, 2004).

No ano de 2006, a OMS lançou a primeira edição do guia para o tratamento da malária não complicada transmitida pelas cepas do *Plasmodium*. O tratamento de primeira-linha escolhido é a combinação de dois ou mais antimaláricos com mecanismos de ação e parâmetros farmacocinéticos distintos. O padrão ouro de tratamento é a combinação terapêutica com artemisinina (ACTs) – ou seus derivados - que possuem alta e rápida eficácia combinado com antimaláricos de eliminação mais lenta (exemplo: amodiaquina, primaquina e mefloquina) (OLLIARO et al., 2010).

Desde 1996 o tratamento combinado de artesunato e mefloquina tem sido adotado com grande sucesso nos países do sudoeste asiático e no Brasil com estudos realizados em áreas endêmicas (tais como: o Mianmar, Tailândia e a região amazônica), tendo como tratamento a combinação em dose não fixa. Os indivíduos receberam oralmente durante três dias 8 mg/kg/dia de mefloquina e 4 mg/kg/dia de artesunato, apresentando uma eficácia de aproximadamente 95 % (ASHLEY et al., 2006). Tal regime foi considerado altamente seguro, bem tolerado e eficaz (KREMSNER & KRISHNA, 2004; ASHLEY et al., 2006).

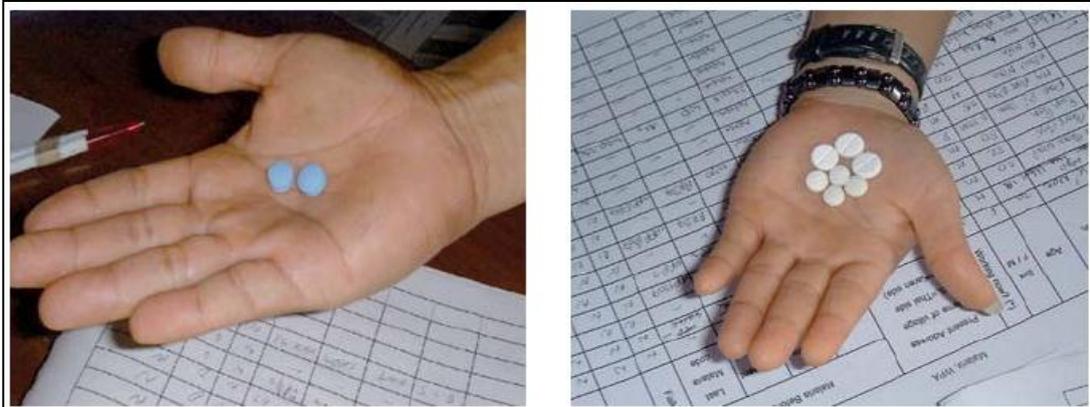
Com o objetivo de simplificar os regimes de tratamento e melhorar ainda mais a aderência dos pacientes, foi desenvolvida uma coformulação de dose fixa combinada<sup>3</sup> de artesunato e mefloquina, através de um projeto colaborativo coordenado pela Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas (DNDi) e o Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos (indústria de medicamentos da Fundação Oswaldo Cruz) (OLLIARO et al., 2010).

O artesunato + mefloquina em associação ASMQ começou a ser disponibilizado para outras áreas endêmicas de malária na América Latina e no Sudoeste asiático durante o final do ano de 2008 e 2009 (DNDi, 2012). Seu registro foi concedido pela ANVISA no mesmo ano de sua distribuição em 2008, e já possui registro em demais países do sudoeste asiático, tais como: Índia, Malásia, Tanzânia, Vietnã, e em 2015 foi aprovado pelo órgão regulador da Tailândia e Camboja (DNDi, 2015).

De acordo com o guia para tratamento da malária fornecido pela OMS em 2006, a formulação do ASMQ respeitou a posologia recomendada pela OMS para as terapias combinadas, no qual o esquema de dosagem estipulado é de 4 mg/kg/dia de artesunato e 8 mg/kg/dia de mefloquina durante três dias de tratamento (Olliaro et al., 2010).

Visando a praticidade, conveniência e melhor adesão ao tratamento, as combinações de dose fixa<sup>3</sup>, como é o caso do ASMQ, são mais simples de serem administradas ao paciente quando comparado ao esquema de doses separadas, devido a quantidade de comprimidos a ser ingerido (Figura 7). Tal facilidade é explicada pelo fato dos dois fármacos presentes no comprimido de ASMQ serem seguramente administrados ao mesmo tempo e em corretas proporções de dosagem, sendo sua prescrição de acordo com a faixa etária e peso do paciente (DNDi, 2012).

Figura 7 - Comprimido a ser administrado no regime de dose fixa (à esquerda) e comprimidos do regime terapêutico de dose não-fixa (à direita)



Fonte: (DNDi, 2012)

Em 2006 foi realizado um estudo comparativo entre a combinação de artesunato e mefloquina no regime de doses separadas com os comprimidos de ASMQ em pacientes com malária não complicada, a fim de observar a eficácia e segurança do regime de dose fixa combinada. Os resultados mostraram que os

---

<sup>3</sup> De acordo com a terceira edição do Guia de tratamento da malária, dose fixa combinada é a combinação de dois fármacos com ação antimalárica que são formulados juntos no mesmo comprimido (OMS, 2015).

comprimidos de dose fixa combinada apresentaram ótima eficácia no qual corresponderam as mesmas drogas administradas no regime de doses separadas. A combinação ainda mostrou-se ser segura com perfis de toxicidade semelhantes aos das drogas separadas, além de não terem apresentado evidências clinicamente significativas de toxicidade hematológica e bioquímica (ASHLEY et al., 2006).

Smithuis e colaboradores (2010) compararam a eficácia do ASMQ com os outros quatro regimes de tratamento ACT e com o regime de dose separada de artesunato e mefloquina. O ASMQ obteve resultados satisfatórios no que diz respeito à cura da malária não complicada transmitida por *P. falciparum* e *P. vivax*, além de apresentar menor recorrência da doença. Com os resultados obtidos no estudo mencionado, o ASMQ é considerado o tratamento de melhor adesão e mais eficaz quando comparado aos outros regimes de dose fixa e ao de dose separada de AS e MQ.

#### 1.4.5 Artesunato de mefloquina (MEFAS)

Diversas estratégias estão sendo utilizadas para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas e pesquisas têm sido feitas para melhorar as moléculas já existentes no tratamento contra a resistência adquirida pelas cepas do plasmódio (FLANNERY et al., 2013).

O grande desafio hoje no desenvolvimento de novas terapias para malária é a união de duas drogas em um só medicamento denominado de molécula híbrida. Isto se faz indispensável na seleção de dois insumos farmacêuticos ativos com ações farmacológicas distintas que possuam sinergismo terapêutico sem que um interfira na absorção, distribuição e segurança do outro (TIMOTHY et al., 2009).

Em vista de todos os desafios mencionados acima, o Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos vem desenvolvendo a síntese de um novo sal híbrido contendo duas funcionalidades antimaláricas: o anel quinolínico da mefloquina e um anel endoperóxido proveniente do artesunato. Estudos já realizados demonstram o sucesso da atividade farmacológica deste novo sal (VAROTTI et al., 2008). A rota sintética do artesunato de mefloquina encontra-se esquematizada na figura 8.

O artesunato de mefloquina (MEFAS) tem como principal propósito ser um antimalárico de alta eficácia, curta meia-vida e com baixos níveis de toxicidade. A toxicidade do MEFAS foi previamente testada, sendo três vezes menor do que a

combinação de artesunato e mefloquina em dose fixa (ASMQ) e cinco vezes menor que a mefloquina (VAROTTI et al., 2008).

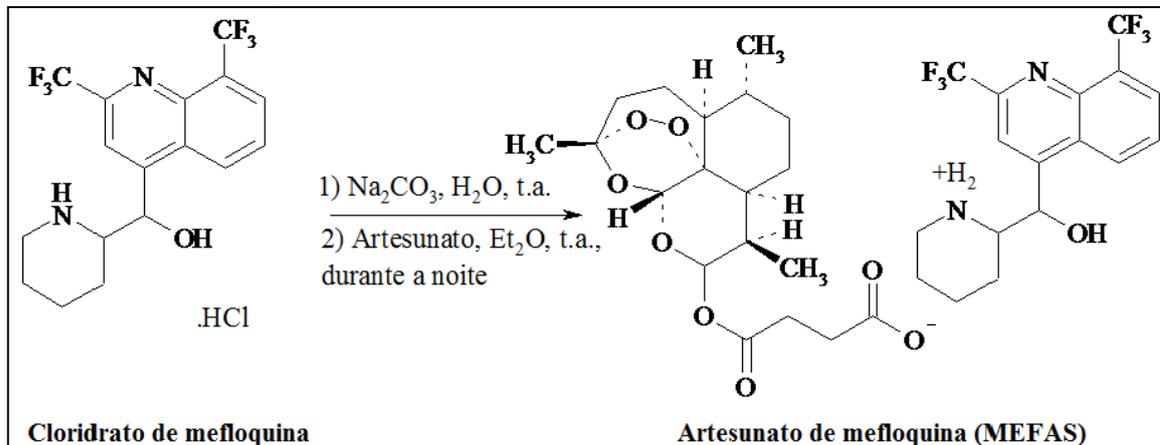
O MEFAS em doses de 10 mg/kg/dia administrados em camundongos foi capaz de reduzir a carga parasitária de *Plasmodium berghei* além de manter os animais vivos até o final do experimento. Ao passo que os camundongos tratados somente com mefloquina ou com artesunato + mefloquina nas doses de 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia respectivamente, não conseguiram sobreviver até o trigésimo dia de tratamento (VAROTTI et al., 2008).

Recentemente, um estudo realizado por Coutinho e colaboradores (2016) mostrou que o MEFAS pode ser bastante eficaz na inibição do desenvolvimento de gametócitos tanto masculino quanto feminino do *P. falciparum*. Tal resultado merece relevância, pois atualmente só a primaquina é capaz de atuar inibindo o desenvolvimento dos gametócitos maduros do plasmódio. Além disso, o custo de sua produção é reduzido por possuir somente um processo de purificação para que seja alcançado o seu padrão farmacêutico. Em vista disso, o medicamento pode ser inserido no mercado com preço acessível para que a população menos favorecida possa usufruir do tratamento (VAROTTI et al., 2008).

Por ser uma molécula na forma de sal, acredita-se que em contato com água e fluidos corporais, como por exemplo, o plasma, o MEFAS é dissociado dando origem a mefloquina e artesunato livres. Sua alta eficácia é intensificada pelo fato do artesunato sofrer rapidamente o processo de metabolização hepática, gerando um metabolito ativo *in vivo*, a dihidroartemisinina (DHA) (NAIK et al., 2005).

O MEFAS é um grande candidato a fármaco inovador para o tratamento da malária, pois ele contém dois ativos que já são utilizados separadamente e em associação de dose fixa. Diante disso, pode-se diminuir a toxicidade associada à mefloquina, pelo fato de possuir uma dose menor do que a administrada no comprimido de dose fixa (VAROTTI et al., 2008).

Figura 8 - Rota sintética e a fórmula estrutural do MEFAS



Fonte: (VAROTTI et al., 2008)

Uma etapa importante e não excludente no desenvolvimento e planejamento de um candidato a fármaco é a etapa não clínica. Nesta etapa são realizados ensaios *in vivo*, tendo como finalidade principal a investigação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas em animais (NUNES, 2015).

Modelos animais são largamente utilizados para realização de estudos de farmacocinética durante a investigação do novo fármaco. Rotineiramente animais roedores são os escolhidos para determinação da biodisponibilidade<sup>4</sup> oral e das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolização e eliminação), pois além de serem mamíferos também possuem ciclo de vida menor quando comparado a humanos, o que permite o crescimento de uma grande quantidade de animais em um curto espaço de tempo, sendo úteis para realização de testes piloto de farmacocinética e fornecendo resultados com maior rapidez (SINGH, 2006).

Apesar de alguns estudos apresentarem divergências quanto à absorção do fármaco e seu metabolismo em roedores e humanos, o uso de modelos experimentais em roedores é uma ferramenta muito útil para predizer problemas que podem vir a ocorrer com a absorção do fármaco, metabolismo e parâmetros farmacocinéticos, e podem sim apresentar resultados fidedignos utilizados para uma projeção da farmacocinética em humanos (HURST et al., 2007; NUNES, 2015).

<sup>4</sup> Segundo o manual de Biodisponibilidade e Bioequivalência fornecido pela ANVISA em 2002, biodisponibilidade é a taxa e a extensão na qual a molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação da droga. A biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do fármaco em sangue total, plasma ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo (ANVISA, 2002).

Em relação à condução de estudos de biodisponibilidade, bioequivalência e determinação de parâmetros farmacocinéticos, faz-se imprescindível o desenvolvimento de um método bioanalítico capaz de fornecer confiabilidade nos resultados gerados. Compreende-se como método bioanalítico, aquele método capaz de determinar quantitativamente os fármacos presentes em uma matriz biológica (ANVISA, 2012).

A quantificação dos analitos é feita por métodos cromatográficos capazes de apresentar sensibilidade, seletividade, especificidade, precisão e exatidão para cada substância analisada afim de que erros sejam minimizados. No Brasil os parâmetros seguidos para a condução da validação do método bioanalítico são regidos pela RDC Nº 27 de 17 de maio de 2012, criada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA.

Na literatura são encontrados variados métodos bioanalíticos já desenvolvidos para o artesunato, dihidroartemisinina e mefloquina. Alguns como o Xing e colaboradores (2007) e Li e colaboradores (2015) foram fundamentais na elaboração de um método inédito para análise das amostras, contendo o MEFAS no que se diz respeito ao tipo de fase móvel, quantidade e tipo de matriz biológica a ser analisado e método cromatográfico utilizado.

Na tabela 5 é possível observar as principais características dos métodos bioanalíticos encontrados no levantamento bibliográfico.

Tabela 5 - Métodos analíticos presentes na literatura sobre artesunato, dihidroartemisinina e mefloquina

Técnica utilizada	Fármacos analisados	Procedimento de extração	Matriz biológica / volume de matriz biológica	Fase móvel	Aplicação do estudo	Autor
CLAE-EM/EM	Artesunato; Dihidroartemisinina.	Extração de fase sólida	Plasma humano; 500µL	H <sub>2</sub> O + Ácido acético (0,1%) / MeOH/ ACN (38:46,5:15,5 v/v)	Desenvolvimento do método para aplicação em estudo de farmacocinética	Naik et al., 2005.
CLAE-DE (ARS e DHA); CLAE-UV (MFQ).	Artesunato; Dihidroartemisinina; Mefloquina.	Extração de fase sólida	Plasma humano; 1000µL	ACN/ H <sub>2</sub> O + Ácido acético (0,05M) com pH 5,2 ajustado com NaOH 0,1M (42:58)	Desenvolvimento do método para aplicação em estudo de farmacocinética	Lai et al., 2007.
CLAE-EM/EM	Dihidroartemisinina	Extração líquido-líquido	Plasma de rato; 100µL	ACN/ H <sub>2</sub> O + acetato de amônio 10mM com 0,1% de AFO (85:15 v/v)	Desenvolvimento do método para aplicação em estudo de farmacocinética	Xing et al., 2007.
CLAE-EM/EM;	Mefloquina.	Extração líquido-líquido	100µL	H <sub>2</sub> O + 10 mM HClO <sub>4</sub> / EtOH (90/10 v/v)	Desenvolvimento do método para aplicação em estudo de farmacocinética	Magalhães et al., 2008.
CLAE-EM/EM	Artesunato; Dihidroartemisinina	Extração de fase sólida	Plasma humano; 50µL	H <sub>2</sub> O + formiato de amônio 10 mM/ ACN + 0,1% de AFO (gradiente)	Desenvolvimento do método para aplicação em estudo de farmacocinética	Geditz et al., 2014.
CLAE-EM/EM	Artesunato; Amodiaquina	Extração de fase sólida	Plasma humano; 100µL	H <sub>2</sub> O + 0,1% de acetato de amônia/ MeOH (10:90 v/v)	Desenvolvimento do método para aplicação em estudo de farmacocinética	Makula et al., 2015.
CLAE-DAD	Artesunato; Sulfadoxina; Pirimetamina ; Mefloquina; Lumefantrina	Extração líquido-líquido	Plasma humano; 230µL	Tampão de ortofosfato dipotássio/ ACN/ MeOH (20:38:42 v/v)	Desenvolvimento do método para aplicação em estudo de farmacocinética	Mannemala et al., 2015.
CLAE-EM/EM	Artesunato; Dihidroartemisinina.	Extração líquido-líquido	Plasma de ovelha; 100µL	MeOH/ H <sub>2</sub> O (60:40 v/v)	Desenvolvimento do método para aplicação em estudo de farmacocinética	Li et al., 2015.
CLAE-EM/EM	Arteméter; Dihidroartemisinina.	Extração líquido-líquido	Plasma humano; 50µL	H <sub>2</sub> O + formiato de amônia 2mM/ MeOH (15:85 v/v)	Estudo de farmacocinética	Yadav et al., 2015.

Por fim, o principal objetivo desse estudo foi criar um modelo experimental animal que possa prever a biodisponibilidade do MEFAS como uma nova entidade química e, se possível, comparar a biodisponibilidade do MEFAS com a associação dos Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs) de artesunato e mefloquina, ambos já utilizados no tratamento da malária.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a farmacocinética do novo produto (MEFAS), através de testes pré-clínicos e a biodisponibilidade relativa, obedecendo às normas vigentes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver um método bioanalítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial para a determinação simultânea e quantificação dos constituintes presentes no sal MEFAS: mefloquina, artesunato e seu metabólito ativo, dihidroartemisinina, em plasma de rato;
- ✓ Validar o método bioanalítico desenvolvido em plasma de rato de acordo com a RDC N° 27 de 17 de maio de 2012;
- ✓ Conduzir estudo de farmacocinética em ratos a fim de estipular os parâmetros farmacocinéticos do MEFAS;
- ✓ Comparar a farmacocinética do sal MEFAS frente aos Insumos farmacêuticos ativos (IFAs) de Artesunato e Mefloquina (AS + MQ), dentro dos preceitos da bioequivalência.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS

#### 3.1.1 Equipamentos

Durante a condução do estudo foram utilizados os seguintes equipamentos: agitador do tipo vórtex para microtubos (Labnet<sup>®</sup>), micro centrífuga refrigerada (Thermo<sup>®</sup>), micro centrífuga refrigerada (Hettich<sup>®</sup>), evaporador sob fluxo de N<sub>2</sub> (TECHNE<sup>®</sup>), balança analítica eletrônica (SHIMADZU<sup>®</sup>), ultrafreezer -70 °C (SANYO<sup>®</sup>).

#### 3.1.2 Utensílios

Para a condução do estudo foram utilizados os seguintes materiais: microtubos de 2,0 mL (Eppendorf<sup>®</sup>), microtubos de 200 µL (Eppendorf<sup>®</sup>), pipetas automáticas P200 µL e P1000 µL (GILSON<sup>®</sup>), ponteiros para pipetas P200 µL e P1000 µL (Microbac<sup>®</sup>), contensor de acrílico para ratos (fabricação própria), cânula de gavagem para ratos, seringas hipodérmicas descartáveis de 1 mL e 5 mL (SR<sup>®</sup>) e agulhas hipodérmicas descartáveis (NIPRO<sup>®</sup>).

#### 3.1.3 Para a análise e identificação das amostras

Os equipamentos e componentes utilizados para a análise e identificação das amostras foram: espectrômetro de massas API 4000 (ABSCIEX<sup>®</sup>), *Software* (ABSCIEX<sup>®</sup>), cromatógrafo líquido de alta eficiência (NEXERA XR - SHIMADZU<sup>®</sup>), coluna analítica C18 100 x 4,6 mm, 5 µm (PHENOMENEX<sup>®</sup>), injetor automático CT *Analysis* (HTS-PAL<sup>®</sup>).

#### 3.1.4 Padrões analíticos

As substâncias químicas de referência utilizadas na validação bioanalítica e na análise farmacocinética foram: Cloridrato de mefloquina (Farmacopeia Europeia/ LOTE: 2.0), Artesunato (USP/ LOTE: F1L256), Dihidroartemisinina (SIGMA ALDRICH/

LOTE: SLBG8320V) e Carbamazepina (INCQS/ LOTE: 2038). Os certificados de todos os padrões utilizados estão em anexo (Anexo I, Anexo II, Anexo III e Anexo IV).

### 3.1.5 Insumos Farmacêuticos Ativos e o MEFAS

O MEFAS (LOTE: 004/15) foi sintetizado pelo grupo de síntese orgânica do Instituto de Tecnologia em Fármacos/ Farmanguinhos, e posteriormente fornecido para a realização do projeto. Para a administração animal foram utilizados também Cloridrato de Mefloquina (Farmanguinhos/Lote: 67275) e Artesunato SQR (INCQS/Lote:1085).

### 3.1.6 Solventes, reagentes e soluções

Os reagentes, solventes e soluções utilizadas no projeto foram: acetonitrila (ACN) grau HPLC (J.T. BAKER®), metanol (MeOH) grau HPLC (J.T. BAKER®), ácido fórmico 99% P.A (J.T. BAKER®), água tipo I (Milli-Q), acetato de etila (TEDIA®), metil-t-butil-éter (TBME) grau HPLC (TEDIA®), heparina sódica 5.000 U. L/ mL (Blau®), tiopental (Cristália®) e óleo de girassol (LISA®).

## 3.2 ANIMAIS

Os estudos foram realizados em ratos da linhagem *Wistar* machos adultos entre 14 a 17 semanas, pesando entre 230 a 330 g, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz. Todos os testes experimentais que exigiam a manipulação dos ratos estiveram de acordo com os princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ, através do protocolo N° P-49/ 13-3.

Os ratos foram mantidos no biotério do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), tendo livre acesso à água e ração, sendo mantidos em um ambiente climatizado com temperatura controlada de aproximadamente 25°C e com ciclo alternado entre claro-escuro a cada 12 horas. Antes da manipulação os animais foram mantidos em jejum de 12 horas com livre acesso a água imediatamente

antes da administração dos medicamentos. Os animais permaneceram em jejum durante todo o período de coleta sanguínea.

### 3.2.1 Distribuição dos animais em grupos

Os animais foram distribuídos em três grupos da seguinte forma:

- (i) Grupo controle – animais que só receberam o veículo, o óleo de girassol (n = 5);
- (ii) Grupo de tratamento com o MEFAS (n=12);
- (iii) Grupo de tratamento com AS + MQ (n=12).

### 3.3 DOSE E ESQUEMA DE ADMINISTRAÇÃO

A administração foi feita via oral pela técnica de gavagem, de acordo com o estipulado por cada grupo. Os animais do grupo controle receberam somente o veículo, o óleo de girassol e o volume administrado foi em relação ao peso de cada animal, para uma dose de 1 mL/ kg.

Os animais do grupo MEFAS receberam uma dose única de 50 mg/ Kg, suspenso em 1 mL do veículo. Já os animais do grupo da associação do artesunato e mefloquina (AS+MQ) também receberam uma dose única de 50 mg/ Kg, sendo 25 mg/ Kg de artesunato e os outros 25 mg/ kg de mefloquina. O volume administrado foi em relação ao peso de cada animal.

As manipulações dos medicamentos foram feitas da seguinte forma; tanto o MEFAS quanto o AS+MQ foram pesados e transferidos para um gral – previamente limpo e seco – em seguida, foi adicionado o volume de óleo de girassol. Para cada 50 mg do insumo farmacêutico, 1 mL de óleo era adicionado. O conteúdo presente no gral foi macerado até formação de uma suspensão. A dose para cada animal foi ajustada por uma seringa descartável de 1 mL, em seguida a cânula de gavagem foi acoplada para imediata administração aos animais.

### 3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

No dia da realização da coleta sanguínea, os animais foram pesados a fim de se ajustar o esquema de doses do medicamento. A primeira coleta sanguínea foi feita antes da administração do medicamento, sendo este o tempo de 0 minutos. Após isso, administrou-se o medicamento por via oral através da técnica de gavagem.

Uma leve incisão na ponta da cauda do animal foi feita com uma tesoura cirúrgica, e as amostras de sangue coletadas (120  $\mu$ L) com o auxílio de uma pipeta com ponteiros descartáveis e devidamente heparinizadas, nos tempos: 10; 15; 20; 30; 45; 60; 240; 360; 420 minutos, e a partir do dia seguinte da gavagem, nos tempos de 24; 32; 48; 56; 72; 96 e 168 horas. No final de cada dia de coleta, a reposição do volume coletado foi feita com administração de água filtrada, indispensável para manter a volemia dos ratos.

Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 rpm a 4 °C por 10 minutos para obtenção da amostra de plasma (~ 60  $\mu$ L). Em seguida transferiu-se o plasma para outro microtubo que foi armazenado em um *ultrafreezer* a -70 °C até a realização da etapa analítica.

### 3.5 COLETA DE BRANCO DE PLASMA NORMAL (BPN)

Para a condução dos ensaios de validação bioanalítica e para as análises de farmacocinética, foi necessário o uso de plasma branco, que é a matriz limpa – sem a contaminação dos analitos do estudo.

Dessa forma, cerca de dez animais foram sacrificados com uma overdose de tiopental, sendo a coleta sanguínea feita por punção intracardíaca. Foram coletados cerca de 10 mL de sangue de cada animal em um tubo do tipo falcon contendo 1 mL de heparina sódica 5.000 U. L/ mL. Em seguida, o material foi centrifugado durante 10 minutos por 7000 rpm. O plasma obtido foi transferido para microtubos e posteriormente armazenado no *ultrafreezer* a – 70 °C até análise do material.

### 3.6 EUTANÁSIA

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados através da câmara de gás carbônico (CO<sub>2</sub>). As carcaças foram armazenadas no refrigerador, dentro de sacos plásticos de risco biológico e posteriormente recolhidas pela equipe do biotério do INCQS para incineração.

### 3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

O método bioanalítico foi executado no Serviço de Equivalência e Farmacocinética (SEFAR/ FIOCRUZ) e recebeu uma codificação, denominada como 70. MEFAS07-11PQ.24 com o objetivo de facilitar a rastreabilidade documental da pesquisa.

Mediante uma pesquisa bibliográfica efetuada anteriormente, o desenvolvimento do método bioanalítico foi referendado e prosseguiu de forma satisfatória para realização do estudo.

#### 3.7.1 Preparo das Soluções Estoque e das Soluções de trabalho

Os padrões analíticos utilizados para o preparo das soluções estoque (SME) foram Cloridrato de mefloquina, artesunato e dihidroartemisinina. Após a pesagem individual, a massa foi transferida para balões volumétricos de 5 mL. Em cada balão foi adicionado uma quantidade q.s de metanol grau HPLC/Espectro, seguida de uma agitação vigorosa no agitador tipo vortex até completa dissolução do padrão. O volume foi completado com metanol grau HPLC/Espectro até a marca de referência do balão volumétrico, sendo obtidas soluções estoque de concentrações equivalentes a 1 mg/mL (1.000.000 ng/mL). Logo após o preparo das soluções estoque foram preparadas soluções de trabalho (STB) a partir de sucessivas diluições em água tipo I/ Metanol (80:20, v/v), até preparação das soluções da curva de calibração conforme apresentado nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Guia de preparo das soluções para o artesunato

<b>Preparo das soluções estoque e de trabalho para o Artesunato (ng/ mL)</b>				
<b>Solução de trabalho - STB</b>	<b>Concentração da STB (ng/ mL)</b>	<b>Volume preparado (mL)</b>	<b>Volume pipetado (mL)</b>	<b>STB a ser utilizada na preparação</b>
<b>SME - ARS</b>	1.000.000	2	-----	Padrão
<b>STB12</b>	10.000	10	0,100	SME - ARS
<b>STB11</b>	1.000	10	1,000	STB12
<b>STB10</b>	100	10	1,000	STB11
<b>STB09 (CQD)</b>	400	10	0,400	STB12
<b>STB08 (LSQ)</b>	250	10	0,250	STB12
<b>STB07 (CQA)</b>	200	10	0,200	STB12
<b>STB06 (CQM)</b>	100	10	0,100	STB12
<b>STB05</b>	50	10	0,500	STB11
<b>STB04 (CQC)</b>	25	10	0,250	STB11
<b>STB03</b>	5	10	0,500	STB10
<b>STB02 (CQB)</b>	2,50	10	0,250	STB10
<b>STB01 (LIQ)</b>	1,25	10	0,125	STB10

Fonte: (próprio autor).

Tabela 7 - Guia de preparo das soluções para a dihidroartemisinina

<b>Preparo de Soluções mestre e de trabalho para a Dihidroartemisinina (ng/ mL)</b>				
<b>Solução de trabalho - STB</b>	<b>Concentração da STB (ng/ mL)</b>	<b>Volume preparado (mL)</b>	<b>Volume pipetado (mL)</b>	<b>STB a ser utilizada na preparação</b>
<b>SME - ARS</b>	1.000.000	2	-----	Padrão
<b>STB12</b>	10.000	10	0,100	SME - ARS
<b>STB11</b>	1.000	10	1,000	STB12
<b>STB10</b>	100	10	1,000	STB11
<b>STB09 (CQD)</b>	500	10	0,500	STB12
<b>STB08 (LSQ)</b>	325	10	0,325	STB12
<b>STB07 (CQA)</b>	250	10	0,250	STB12
<b>STB06 (CQM)</b>	125	10	0,125	STB12
<b>STB05</b>	75	10	0,750	STB11
<b>STB04 (CQC)</b>	37,50	10	0,375	STB11
<b>STB03</b>	25	10	0,250	STB11
<b>STB02 (CQB)</b>	12,50	10	0,125	STB11
<b>STB01 (LIQ)</b>	5	10	0,500	STB10

Fonte: (próprio autor).

Tabela 8 - Guia de preparo das soluções para a mefloquina

<b>Preparo de Soluções mestre e de trabalho para a Mefloquina (ng/ mL)</b>				
<b>Solução de trabalho - STB</b>	<b>Concentração da STB (ng/ mL)</b>	<b>Volume preparado (mL)</b>	<b>Volume pipetado (mL)</b>	<b>STB a ser utilizada na preparação</b>
<b>SME - ARS</b>	1.000.000	2	-----	Padrão
<b>STB12</b>	10.000	10	0,100	SME - ARS
<b>STB11</b>	1.000	10	1,000	STB12
<b>STB10</b>	100	10	1,000	STB11
<b>STB09 (CQD)</b>	800	10	0,800	STB12
<b>STB08 (LSQ)</b>	500	10	0,500	STB12
<b>STB07 (CQA)</b>	400	10	0,400	STB12
<b>STB06 (CQM)</b>	200	10	0,200	STB12
<b>STB05</b>	100	10	0,100	STB12
<b>STB04 (CQC)</b>	50	10	0,500	STB11
<b>STB03</b>	25	10	0,250	STB11
<b>STB02 (CQB)</b>	12,50	10	0,125	STB11
<b>STB01 (LIQ)</b>	5	10	0,500	STB10

Fonte: (próprio autor).

A Carbamazepina foi escolhida como padrão interno para as análises e o preparo de sua solução estoque foi similar ao preparo das soluções dos outros analitos do estudo. O certificado do padrão encontra-se no Anexo V.

Após a pesagem de carbamazepina, a massa foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL e dissolvida em metanol, avolumando-se até a aferição do balão, obtendo-se uma concentração de 1 mg/mL (1.000.000 ng/mL).

A solução estoque de padrão interno foi diluída em uma solução de Água tipo I/ Metanol (80:20, v/v) até a concentração final de 2.000 ng/mL para utilização no preparo das amostras.

### 3.7.2 Método de Extração Bioanalítico

Durante o desenvolvimento do método bioanalítico, diversos solventes de extração em diferentes proporções foram testados (tabela 9).

Tabela 9 - Solventes de extração testados durante o desenvolvimento do método

Tipo de Solvente	Proporção utilizada	Tipo de método de extração
Metanol (MeOH)	100%	Extração por precipitação de proteínas
Acetonitrila (ACN)	100%	
MeOH/ ACN	50%/ 50%	
Acetato de etila	100%	Extração líquido-líquido
Acetato de etila/ Hexano	80%/ 20%	
Terc-butil-metil éter (TBME)	100%	
TBME/ Acetato de etila	70%/ 30%	

Fonte: (próprio autor).

Após a escolha do solvente de extração, o protocolo de extração do AS, DHA, MQ e CBZ no plasma do animal foi executado da seguinte maneira: em um microtubo de 2 mL foram adicionados 25  $\mu$ L de plasma e 50  $\mu$ L da solução de trabalho de padrão interno (Carbamazepina - 2.000 ng/mL). Em seguida 100  $\mu$ L de uma solução de acetato de amônio 1 mol/L foram adicionados às amostras. Após a agitação durante 30 segundos no vórtex, adicionou-se 1500  $\mu$ L da solução de terc metil butil éter (TBME)/ acetato de etila (70:30, v/v).

As amostras então sofreram uma agitação vigorosa durante 10 minutos no vórtex e foram centrifugadas a 14440 rpm a -10 °C. Após a centrifugação, 1000  $\mu$ L da fase orgânica (sobrenadante) foram transferidas para outros microtubos de polipropileno, e colocados sob fluxo de nitrogênio para evaporação das amostras. Por fim, todas as amostras foram resuspendidas com 200  $\mu$ L de fase móvel (acetonitrila:metanol (80:20, v/v) / água tipo I + ácido fórmico 0,2 % - 70:30, v/v), em seguida agitou-se por 30 segundos novamente no vórtex. Foram transferidos para o vial com *insert* de vidro os 200  $\mu$ L da amostra, sendo 20  $\mu$ L injetados e analisados no CLAE-EM/EM.

A preparação da curva de calibração, dos controles de qualidade e brancos de plasma com e sem padrão interno seguiram o método acima descrito, porém foram

acrescidos aos 25  $\mu$ L de plasma branco 50  $\mu$ L de solução de trabalho contendo os analitos em estudo (ARS, DHA e MFQ).

### 3.7.3 Condições cromatográficas

O método cromatográfico também foi desenvolvido com base na pesquisa literária, a fim de se encontrar a melhor forma de análise das três substâncias simultaneamente. O método utilizado por CLAE-EM/EM foi com ionização positiva, sendo utilizado o modo de MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas).

Algumas colunas cromatográficas também foram testadas no momento do desenvolvimento do método e são encontradas na tabela 10.

Tabela 10 - Colunas cromatográficas testadas no desenvolvimento do método bioanalítico

Coluna cromatográfica	Especificações	Tamanho de partícula	Tipo de empacotamento	Tamanho de poro
OMNISPHER	C18 150 x 4,6 mm	5 $\mu$ m	Partículas esféricas - <i>endcapping</i>	100 Å
ACE	C8 150 x 4,6 mm			200 Å
ACE	C8 100 x 3,0 mm			100 Å
ACE	C8 100 X 4,6 mm			90 Å
SUNFIRE	C18 50 X 4,6 mm			110 Å
Pursuit	C18 150 x 3,0 mm			
GEMINI-NX	C18 100 X 4,6 mm			

Fonte: (próprio autor).

As condições cromatográficas que melhor se adequaram aos três analitos foram empregadas nas análises e estão discriminadas na tabela 11.

Tabela 11 - Condições cromatográficas

<b>Modelo (CLAE/EM-EM)</b>	API 4000 LC/MS/MS System
<b>Coluna analítica</b>	GEMINI-NX® (5µ C18 100 X 4,6 MM)
<b>Tempo de corrida</b>	4 minutos
<b>Fluxo</b>	0,800 mL/ min
<b>Pressão do sistema</b>	42 – 49 bar
<b>Temperatura do autosampler</b>	10 °C
<b>Temperatura do forno de coluna</b>	40 °C
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Fase A</b>	H2O tipo I + AFO 0,2 %
<b>Fase B</b>	ACN/ MeOH (80:20, v/v)
<b>Fase móvel</b>	Fase A/ Fase B (30:70, v/v)

Fonte: (próprio autor).

#### 3.7.4 Tempos de retenção dos fármacos

Os tempos de retenção dos analitos AS, DHA, MQ e do padrão interno CBZ estão detalhados na tabela 12.

Tabela 12 - Tempos de retenção do artesunato, dihidroartemisinina, mefloquina e carbamazepina

<b>Substância</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
Artesunato	2,68
Dihidroartemisinina	2,43
Mefloquina	0,92
Carbamazepina	1,68

Fonte: (próprio autor)

#### 3.7.5 Condições do espectrômetro de massas

O equipamento foi utilizado em modo *eletrospray* positivo (ESI). Para cada analito foi selecionado um par de íon precursor/ produto através do modo de MRM, como também seus parâmetros individuais, tais como: potencial de desagregação (DP), energia de colisão (CE), potencial da célula de saída (CXP) e tempo de varredura dos compostos. Os íons com resposta mais intensa e suas respectivas condições utilizadas no equipamento são informadas na tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros individuais dos íons monitorados

<b>Substâncias</b>	<b>Ion precursor (m/ z)</b>	<b>Ion produto (m/ z)</b>	<b>DP (V)</b>	<b>CE (V)</b>	<b>CXP (V)</b>	<b>Scan (ms)</b>
<b>Artesunato (ARS)</b>	402,300	267,000	31	13	10	350
<b>Dihidroartemisinina (DHA)</b>	302,200	163,100	46	19	10	350
<b>Mefloquina (MFQ)</b>	379,200	321,00	91	43	10	350
<b>Carbamazepina (CBZ)</b>	237,100	194,000	71	29	6	250

Fonte: (próprio autor).

### 3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Após o desenvolvimento e otimização do método, foi realizada a validação bioanalítica conforme as diretrizes da ANVISA presentes na RDC N°. 27, de 17 de maio de 2012, sendo realizados todos os ensaios preconizados por tal resolução.

#### 3.8.1 Teste de Quantificação Inicial (TQI)

As amostras nesse teste foram quantificadas para que os ensaios de estabilidade pudessem ser realizados. Foram preparados junto à curva de calibração (em duplicata), oito amostras de CQB e oito amostras de CQA em plasma. As amostras foram preparadas de acordo com o método de extração já mencionado, processadas e analisadas de acordo com a metodologia já explicitada.

#### 3.8.2 Estabilidade

Foram realizados testes de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade de pós-processamento e de longa duração das amostras, além de terem sido realizados também teste de estabilidade para as soluções de trabalho.

### *3.8.2.1 Teste de Estabilidade de Curta duração de soluções de trabalho (TEBSCA)*

Para o TEBSCA, foram preparadas soluções e mantidas à temperatura ambiente durante seu repouso na bancada até o término do preparo das soluções recém-preparadas para serem comparadas.

### *3.8.2.2 Teste de Estabilidade de Longa duração de soluções de trabalho (TEBSTA)*

Neste ensaio as mesmas soluções que foram utilizadas no TEBSCA foram preparadas e armazenadas no ultrafreezer -70 °C. O período de estabilidade e a validade foram estipulados pelo tempo decorrido entre o preparo das soluções em estabilidade armazenadas até o término do preparo das soluções recém preparadas, que para este estudo ocorreu após a conclusão de todos os demais testes da validação bioanalítica.

A avaliação das soluções em estabilidade com as soluções recém preparadas obedeceu aos mesmo critérios que o teste TEBSCA.

### *3.8.2.3 Teste de Estabilidade de curta duração em plasma (TEBCA)*

Foram preparadas oito amostras de CQB e de CQA e todas permaneceram na bancada à temperatura ambiente com base no período de adição das soluções de trabalho dos controles de qualidade no plasma até o momento da adição do padrão. Após esse período de estabilidade dos controles, foi preparada a curva de calibração em duplicata, duas amostras de branco de plasma sem adição de padrão interno e duas amostras de branco de plasma com adição de padrão interno. Essas amostras foram analisadas junto às amostras da estabilidade. Um fato importante é adição do padrão interno e do solvente de extração. Os mesmos solventes foram adicionados às amostras de estabilidade no momento do preparo da curva calibração, assegurando que todas as amostras sofreram as mesmas condições.

#### 3.8.2.4 Teste de Estabilidade de pós-processamento (TEBPP)

No TEBPP foram preparadas amostras de controle de qualidade de baixa e alta concentração, deixadas em repouso no *rack* do injetor do cromatógrafo durante 66 horas e 35 minutos. Após esse período foram preparadas duas amostras de branco de plasma sem padrão interno, duas amostras de branco de plasma com padrão interno, juntamente com a curva de calibração em duplicata, sendo injetadas junto com as amostras já presentes no *rack*, garantindo que todas as amostras foram submetidas às mesmas condições.

#### 3.8.2.5 Teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (TEBCD)

Para este ensaio 16 amostras de plasma foram fortificadas com as soluções de trabalho dos controles de qualidade de baixa e alta concentração e foram submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento, ou seja, foram congeladas no mesmo *ultrafreezer* onde são armazenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 12 horas e descongeladas à temperatura ambiente do laboratório, aproximadamente  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o término do último ciclo de descongelamento, essas amostras sofreram o processo de extração junto com as amostras recém-preparadas de branco de plasma com e sem padrão interno, juntamente com a curva de calibração em duplicata, e injetadas no mesmo momento.

A estabilidade dessas amostras foi determinada pelo tempo decorrido entre o início do primeiro ciclo de congelamento até o final do último ciclo de descongelamento. O critério de aceitação para esse teste foi definido pelo desvio dos controles sendo iguais ou menores que 15%.

#### 3.8.3 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método bioanalítico foi determinada através de intra e intercorridas analíticas para cada um dos compostos em análise. Juntamente com a curva de calibração, amostras de controle de qualidade de alta (CQA), controle de qualidade de média (CQM), controle de qualidade de baixa (CQB) concentração e o limite inferior de quantificação (LIQ) foram preparadas, onde a precisão e exatidão foram analisadas no mesmo dia (intracorrída). Já para a análise de precisão e exatidão

intercorridas, as mesmas amostras já citadas tiveram que ser preparadas em três dias distintos.

#### 3.8.4 Efeito matriz

O efeito matriz foi determinado a fim de se avaliar possíveis interferências geradas pelas substâncias que constituem a matriz biológica. No caso desse estudo o plasma de animal foi a matriz a ser utilizada, podendo provocar a diminuição ou ampliação na resposta dos compostos em análise. Para esta análise, oito fontes distintas de plasma foram utilizadas, sendo quatro fontes de plasma normal, duas fontes de plasma coletado de animal em jejum e duas fontes hemolisadas.

Para cada amostra analisada foi obtido um fator de matriz normalizado (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{razão da área do analito/ área do padrão interno (matriz)}}{\text{razão da área do analito/área do padrão interno (solução)}}$$

Para que o teste de efeito matriz fosse aceito foi necessário que o coeficiente de variação dos FMNs fosse superior a 15 %.

#### 3.8.5 Seletividade (TSE)

No TSE foram analisadas seis fontes distintas, quatro amostras normais, uma amostra lipêmica, uma amostra hemolisada e uma amostra LIQ, para avaliar o tempo de retenção do analito e do padrão interno no teste. O teste comparou o LIQ com os brancos das fontes distintas e sua aprovação é confirmada com os picos dos interferentes próximos ao tempo de retenção dos analitos, sendo inferiores a 20 % da área do LIQ e inferiores a 5 % para a área do padrão interno.

#### 3.8.6 Efeito residual (TER)

Nesse teste foram realizadas injeções de uma amostra de plasma branco antes e depois da injeção de amostras do limite inferior e superior de quantificação, em plasma. Caso houvesse o aparecimento de picos perto do tempo de retenção dos

compostos em análise os resultados obtidos deveriam ser inferiores a 20 % da resposta do LIQ e a 5 % da resposta do padrão interno.

### 3.9 PERFIL FARMACOCINÉTICO

Os parâmetros farmacocinéticos das amostras dos animais dos grupos MEFAS e AS+MQ foram calculados através do *software Phoenix WinNolin* versão 6.3 (*Pharmasight*®, USA) e baseado na análise não-compartimental.

Os parâmetros farmacocinéticos determinados foram:

- (i)  $C_{máx.}$  (concentração máxima) e  $T_{máx.}$  (tempo em que ocorre o  $C_{máx.}$ ) – são calculados pela análise da curva de concentração do analito *versus* tempo;
- (ii)  $ASC_{0-t}$  (área sob a curva de zero até a última concentração quantificável – calculada pelo método dos trapezóides;
- (iii)  $ASC_{0-\infty}$  (área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito) – calculada a partir de  $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + Ct/Ke$ ;
- (iv)  $C_t$  (última concentração determinada experimentalmente);
- (v)  $Ke$  (constante de eliminação) – calculada através da regressão linear das três últimas concentrações mensuráveis da curva;
- (vi)  $T_{1/2\beta}$  (tempo de meia vida de eliminação) –  $T_{1/2\beta} = 0,63/ Ke$ .

### 3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS

Toda a estatística descritiva do projeto foi calculada através do *software Phoenix WinNolin* versão 6.3 (*Pharmasight*®, USA). Em relação à análise de pontos discrepantes entre os animais envolvidos no estudo, foram utilizados os testes de Dixon, de Grubbs e Chauvenet.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As doenças negligenciadas acometem mais de um bilhão de pessoas, ou seja, um sexto da população mundial (BRASIL, 2010). Atrelado a isso, observa-se que a tecnologia empregada no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de tais enfermidades não são prioridade para as indústrias farmacêuticas, pois a população acometida geralmente é de baixa renda e esses tratamentos não possuem perspectiva de retorno lucrativo (BRASIL, 2010).

Devido a esse entrave, em 2006 foi lançado no Brasil o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas. Tal programa é do Ministério da Saúde, através da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), e conta com a parceria do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), tendo como principal finalidade a execução de pesquisas financiadas para o combate a essas doenças e melhoria das condições de vida da população (BRASIL, 2010).

A Política Nacional de Medicamentos do Ministério da Saúde, estritamente alinhada com os preceitos do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, dispõe de ações a fim de promover melhores condições de saúde para população, prezando acima de tudo pela qualidade, segurança e eficácia do medicamento, além de promover o uso racional e acesso de todos aos fármacos considerados essenciais (BRASIL, 2001).

Associado ao fato de que a malária é um grande problema de saúde pública, se fez indispensável que o MEFAS, por ser um fármaco promissor e ainda em aprimoramento, fosse submetido a testes de modelo animal que pudessem conferir um melhor entendimento do panorama farmacocinético inicial em mamíferos. Tal fato assegura que o novo candidato a fármaco não falhe na fase de testes clínicos.

Além disso, o desenvolvimento e aplicação do método bioanalítico se faz fundamental para que no futuro, testes de biodisponibilidade e bioequivalência em humanos sejam realizados, atrelado ao monitoramento de adesão e eficácia do tratamento para o posterior registro do medicamento.

Um dos principais objetivos deste projeto consistia em desenvolver uma metodologia bioanalítica que fosse capaz de identificar e quantificar os analitos presentes no sal MEFAS, utilizando um único método de extração e análise cromatográfica.

#### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

O método de CLAE-EM/EM tem como grande vantagem ser bastante seletivo, sensível e específico na identificação de substâncias pela relação massa/ carga ( $m/z$ ). Para que isso ocorra, a detecção dos íons é realizada pelo monitoramento de reação múltipla (MRM), que monitora a transição dos íons através do modo de eletrospray positivo (ESI<sup>+</sup>) (CIOLA, 2006).

Li e colaboradores (2015) e Geditz e colaboradores (2014) conseguiram monitorar as transições de artesunato e dihidroartemisinina através dos íons  $m/z$  407,2 > 261,10 e  $m/z$  307,2 > 163,0  $m/z$ , respectivamente. Hodel e colaboradores (2009) monitoraram as transições  $m/z$  221,0 > 163,0 tanto para o artesunato quanto para a dihidroartemisinina.

No entanto, o método proposto neste projeto seguiu os parâmetros de transição iguais aos de Makula e colaboradores (2015) e de Nogueira (2013), no qual a detecção dos íons de artesunato e dihidroartemisinina estão na faixa de transição de  $m/z$  402,30 > 267,03 para o artesunato e de  $m/z$  302,20 > 163,0 para a dihidroartemisinina.

Para que fossem monitorados os íons mais abundantes e estáveis do artesunato e da dihidroartemisinina foi imprescindível a presença de amônia, quer seja nas amostras quer seja na fase móvel. Ambos analitos fazem aduto de amônio ([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>), sendo assim 384 g/ mol são provenientes da massa molar do artesunato e 18 g/ mol provenientes do íon amônio presentes na amostra preparada, de acordo com a figura 9. Na dihidroartemisinina, 284 g/ mol são provenientes de sua massa molar e os 18 g/mol provenientes do íon amônio, conforme mostrado a figura 10 (MAKULA et al., 2015; LI et al., 2015; GEDITZ et al., 2014; NOGUEIRA, 2013).

Figura 9 - Espectro da transição de íons do artesunato em  $m/z$  402,0 > 267,0

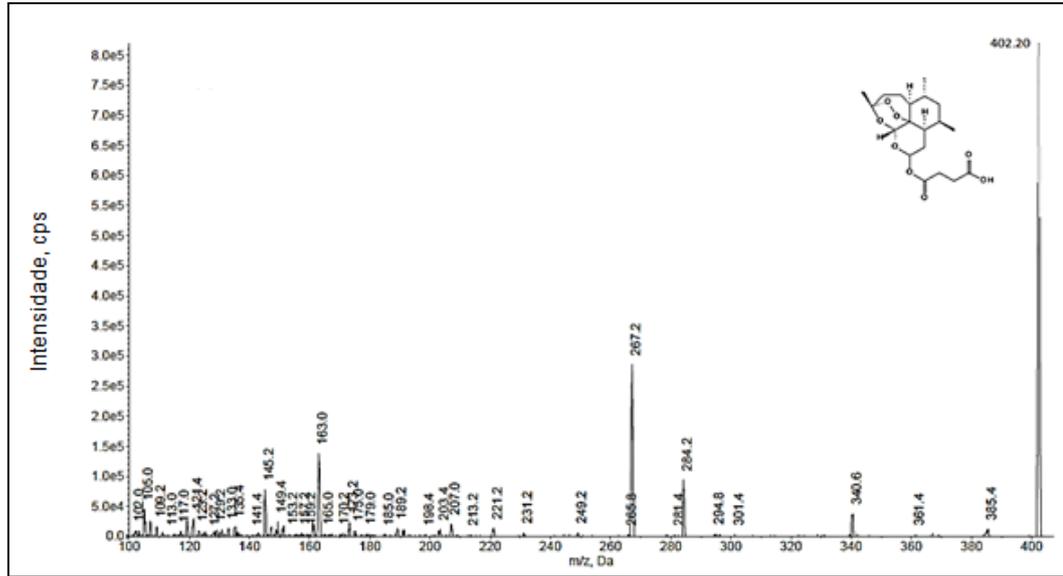
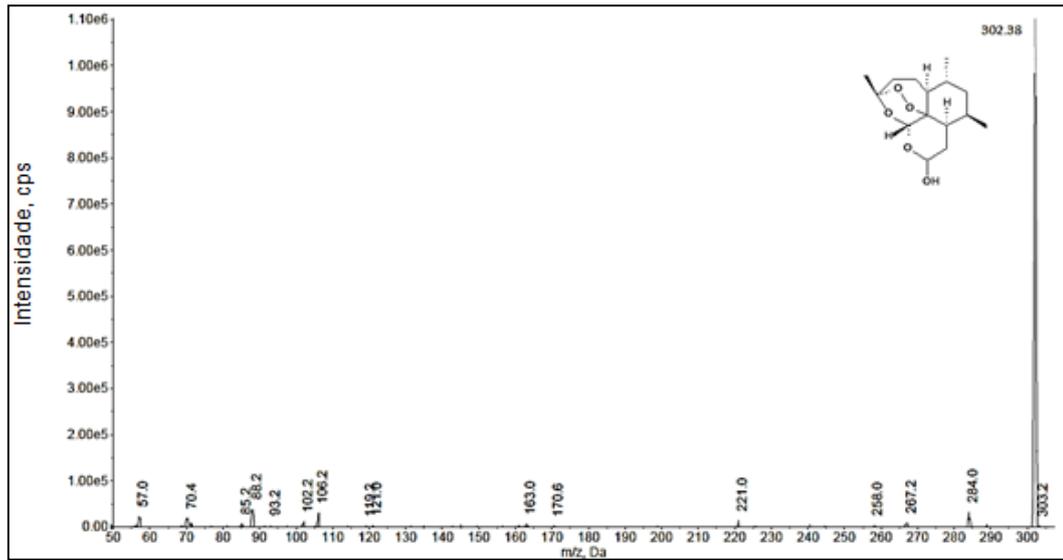
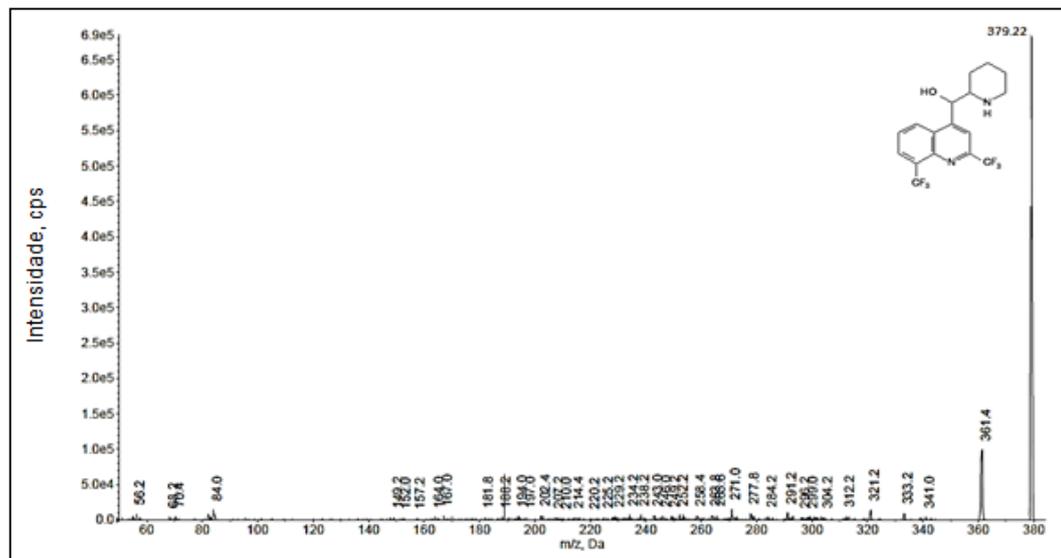


Figura 10 - Espectro da transição de íons da dihidroartemisinina em  $m/z$  302,2 > 163,2



A formação de adutos, incluindo os de amônio depende da afinidade iônica e da estrutura molecular do composto, bem como das condições utilizadas como solventes e pH (MAKULA et al., 2015). A Mefloquina não precisou se combinar com a amônia, seu íon mais estável e abundante foi na faixa de transição de  $m/z$  379,32 > 321,00, mostrado na figura 11.

Figura 11 - Espectro da transição de íons da mefloquina em  $m/z$  379,0 > 321,2



Após estabelecida a transição iônica que seria trabalhada, o desenvolvimento de um método cromatográfico e de extração foram essenciais na criação de um método eficiente e inédito para o projeto.

As condições cromatográficas, como tipo de coluna analítica e o tipo de fase móvel foram cruciais para se obter uma excelente resolução, sensibilidade e curto tempo de corrida.

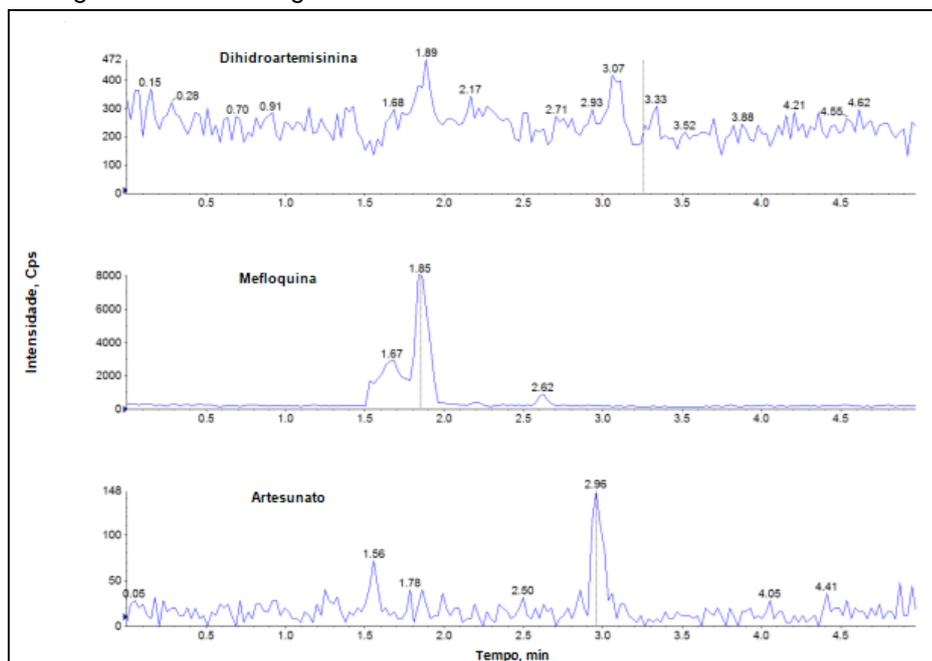
A fim de se ter melhor simetria e forma de pico, melhor separação dos analitos de possíveis interferentes que aparecem juntos na cromatografia, de uma melhor sensibilidade e sinal foram testadas as seguintes colunas cromatográficas: OMNISPHER (C18 5 $\mu$ m 150 x 4,6 mm), ACE (C8 150 x 4,6 mm), (C8 100 x 3,0 mm) e (C8 100 x 4,6 mm), Sunfire (C18 50 X 4,6 mm), Pursuit (C18 150 x 3,0 mm) e GEMINI-NX<sup>®</sup> (5 $\mu$ m C18 100 X 4,6 mm).

As colunas testadas possuíam em seu empacotamento partículas esféricas, o que confere maior uniformidade na distribuição das partículas e conseqüentemente maior eficiência em seus resultados, pois permite maior acessibilidade do analito aos sítios ativos da coluna. Além disso, colunas com tamanho de partículas menores, normalmente possuem partículas de poro menores o que se torna bastante positivo uma vez que diminui o alargamento dos picos e aumenta a eficiência das respostas (CIOLA, 2006).

As colunas OMNISPHER e Pursuit embora tenham apresentado uma simetria e forma de pico satisfatórias para o artesunato e para a dihidroartemisinina, mostraram sinais de intensidade muito baixas para os três analitos, além da mefloquina ter apresentado pico bipartido e uma cauda em seu final. A formação de cauda para a mefloquina no caso dessas colunas pode ser devido à presença de muitos sítios ativos nas colunas o que fez com que a molécula ficasse retida por mais tempo (CIOLA, 2006).

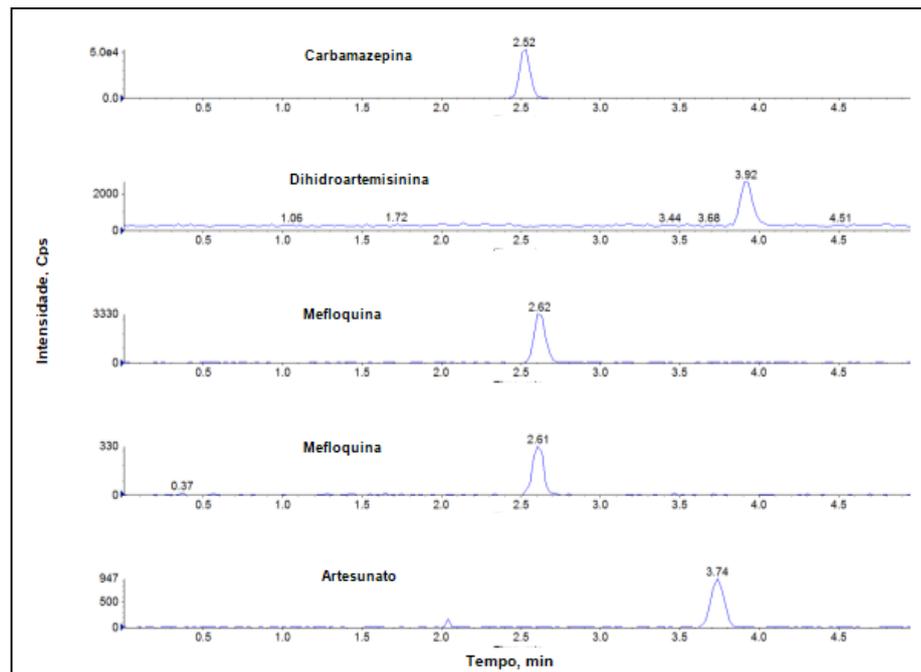
A coluna Sunfire foi a que obteve a pior resposta dentre as colunas testadas. Além de a dihidroartemisinina não ter obtido resposta, o artesunato apresentou um sinal muito baixo e a mefloquina apresentou um interferente bem próximo ao seu pico, como mostrado na figura 12. Com isso, a mesma também foi descartada do desenvolvimento do método.

Figura 12 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ na coluna



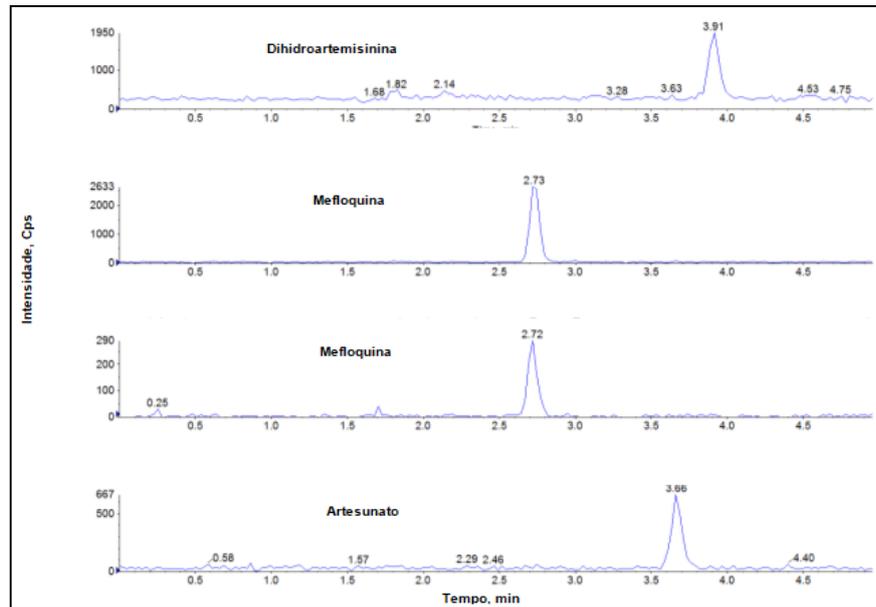
Entre os três tipos de coluna da marca ACE a que melhor se enquadrou no desenvolvimento do método foi a coluna de menor comprimento e diâmetro (100 x 3,0 mm), ela conseguiu melhorar a forma do pico da mefloquina e apresentar sinais altos para o artesunato e a dihidroartemisinina (figura 13).

Figura 13 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ na coluna ACE (100 x 3,0 mm)



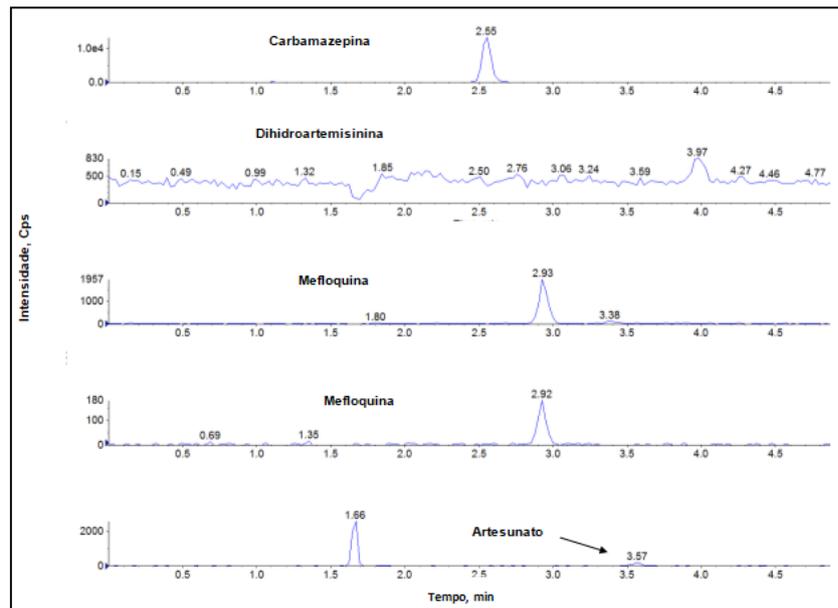
No entanto, a coluna escolhida para a análise das amostras foi a GEMINI, a mesma utilizada por Mannemala e colaboradores (2015) em seu estudo de desenvolvimento e validação bioanalítica para cinco antimaláricos. A coluna GEMINI apresentou ótimos picos para os três analitos, com excelente simetria e formato, além de apresentar respostas com sinais satisfatórios até para os Limites de Quantificação Iniciais (LIQs) e com um tempo de corrida analítica de 4 minutos, como mostrado na figura 14. A excelente resposta obtida nessa coluna pode ser atribuída pela sua eficiência devido ao número de pratos teóricos da fase estacionária (expresso pelo equilíbrio dos solutos com a fase estacionária e a fase móvel) (CIOLA, 2006).

Figura 14 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ na coluna GEMINI (100 x 4,6 mm)



Em relação à fase móvel a ser utilizada, foram testados inúmeros tipos de composição das fases A e B. Em relação à fase A (fase aquosa), alguns aditivos como ácido fórmico, ácido acético e acetato de amônio foram testados. Já para fase B (fase orgânica) a proporção dos solventes acetonitrila e metanol foram avaliados. Conforme o cromatograma da figura 15 pode-se observar que a acetonitrila em proporções maiores que o metanol suprimia os sinais tanto do artesunato quanto da dihidroartemisinina, e que dessa forma, era necessário o aumento da proporção de metanol na fase orgânica.

Figura 15 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ em uma fase móvel de 80% de acetonitrila e 20% de metanol



Por fim, os melhores resultados alcançados em termos de sinal, simetria e forma dos picos e curto tempo de retenção foi a seguinte composição de fase móvel: Fase A – H<sub>2</sub>O + ácido fórmico 0,2 % e Fase B – ACN/ MeOH (80:20) (30:70 – v/v), no modo isocrático.

Em termos de eluição o que se pode observar foi que a mefloquina por ser uma molécula de caráter mais polar que o artesunato e a dihidroartemisinina teve maior interação com a fase móvel (predominantemente polar) em relação à fase estacionária (coluna predominantemente apolar), o que explica seu tempo de retenção ter sido em 0,92 minutos. Os outros dois compostos por terem um caráter um pouco mais apolar interagiram mais com a coluna analítica, o que explica os tempos de retenção mais tardios.

Uma vez que as condições cromatográficas foram concluídas, foi-se otimizando o processo de extração de amostras. Muitos dos trabalhos como os de Makula e colaboradores (2015), Geditz e colaboradores (2014), Lai e colaboradores (2007) e Naik e colaboradores (2005) utilizaram como método a extração por fase sólida.

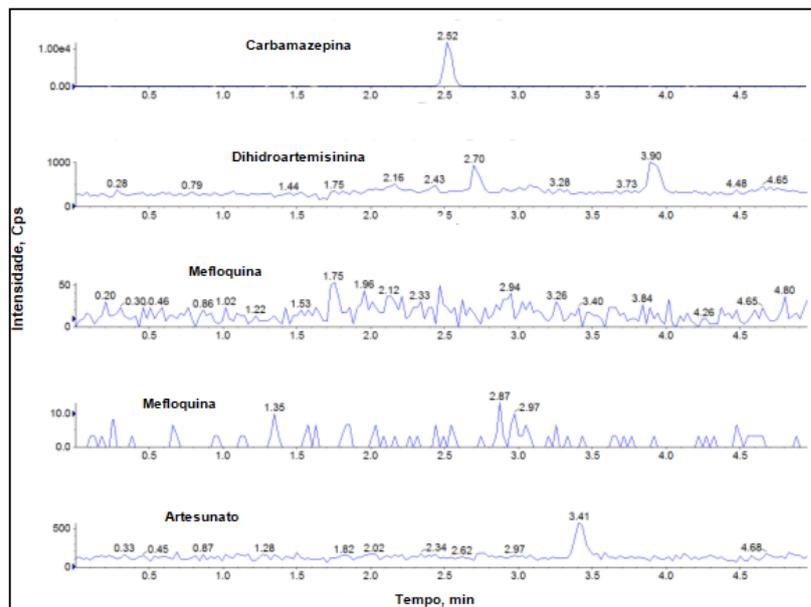
No entanto, mesmo esta técnica sendo a mais popular, tendo ótimos resultados quanto à recuperação dos analitos e apresentando extratos mais limpos, existe uma certa inviabilidade para a dinâmica desse projeto, pois além do alto custo dos

cartuchos utilizados no processo de fase sólida, seria necessário um volume maior de plasma de animal, pois há sempre uma perda de material por ficar retida no cartucho.

Por essa razão, os métodos testados foram o de precipitação de proteínas e o de extração líquido-líquido. Com relação ao método de precipitação de proteínas foram testados como solventes de extração metanol e acetonitrila em variadas proporções, porém a mefloquina não apresentou uma boa recuperação, obtendo um sinal cromatográfico muito baixo. Essa intercorrência pode ser devido a mefloquina estar ligada cerca de 98 % das proteínas plasmáticas, o que torna difícil a inibição da ligação fármaco-proteína em alguns casos (MAGALHÃES et al., 2008).

Além disso, a escolha do método de precipitação por proteínas foi descartada por apresentar uma supressão dos íons maior do que os outros dois métodos de extração, pois apresentam extratos impuros devido à falha nas remoções de alguns compostos presentes no plasma, como: lipídeos, fosfolípidos e ácidos graxos conforme relatos na literatura, conforme mostrado na figura 16 (MAKULA et al., 2015).

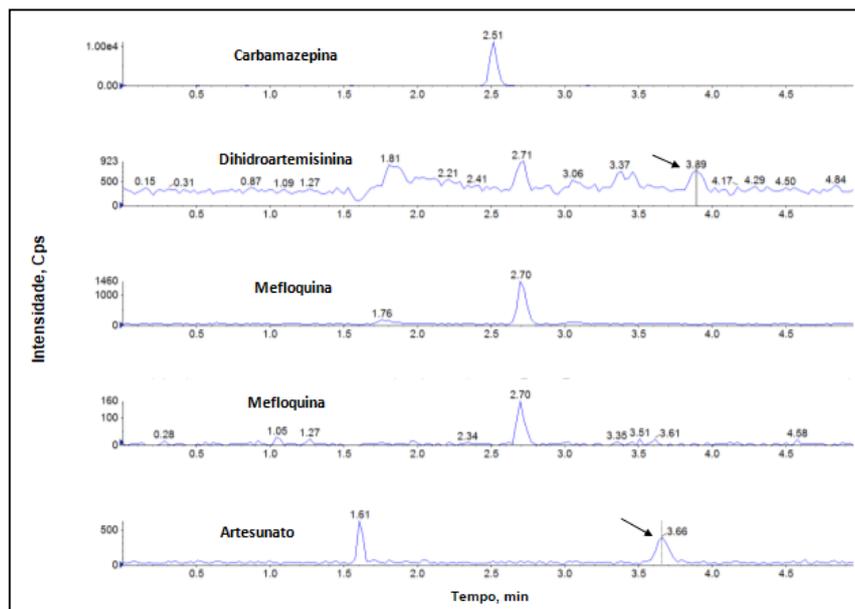
Figura 16 - Cromatograma de uma amostra LIQ em acetonitrila como solvente de extração



A extração líquido-líquido foi a melhor opção para otimização do processo de extração das amostras, uma vez que é um método pelo qual o laboratório possui expertise, considerado simples, menos custoso e não demorado.

Foram testados alguns solventes de extração indicados na literatura, um deles foi o acetato de etila também utilizado por Li e colaboradores (2015) e Yadav e colaboradores (2015). O acetato de etila mostrou-se ser um bom solvente de extração, tendo recuperações boas para o artesunato e mefloquina, porém observou-se que o cromatograma do DHA apresentou bastantes interferentes em sua linha de base e muito próximos ao pico do analito, o que poderia dificultar a quantificação do mesmo, conforme observado na figura 17.

Figura 17 - Cromatograma de íons totais de uma amostra LIQ em acetato de etila como solvente de extração



Outra combinação de solventes testado por Yadav e colaboradores (2015) foi o acetato de etila/ hexano (80:20 – v/v), onde a recuperação também foi bastante satisfatória, porém continuou apresentando muitos interferentes agarrados ao pico do DHA.

Em alguns trabalhos como os de Magalhães e colaboradores (2008) e o de Xing e colaboradores (2007) foram utilizados alguns tipos de éter como o dietil-éter e

o dihexil-éter, respectivamente, para os três analitos do estudo. Diante disso, e pela disponibilidade imediata de terc-butil-metil éter (TBME), algumas amostras foram extraídas com esse solvente em combinação com o acetato de etila de etila. A combinação de TBME/ acetato de etila (70:30 – v/v) foi a melhor escolha dentre as testadas, pois além de apresentar a melhor recuperação e resposta para os três analitos, as linhas de base ficaram mais limpas e conseguiu separar os interferentes que estavam próximos ao pico do DHA, podendo ser quantificado sem nenhum problema.

O método cromatográfico também desenvolvido permitiu que os cromatogramas de todos os analitos apresentassem boa resolução e separação dos picos em um tempo total de corrida de 4 minutos. As figuras abaixo são exemplos de uma amostra de BPN e LIQ extraídas em plasma do animal, evidenciando a boa resposta do método (figuras 18 e 19)

Figura 18 - Cromatograma de íons totais da amostra de BPN

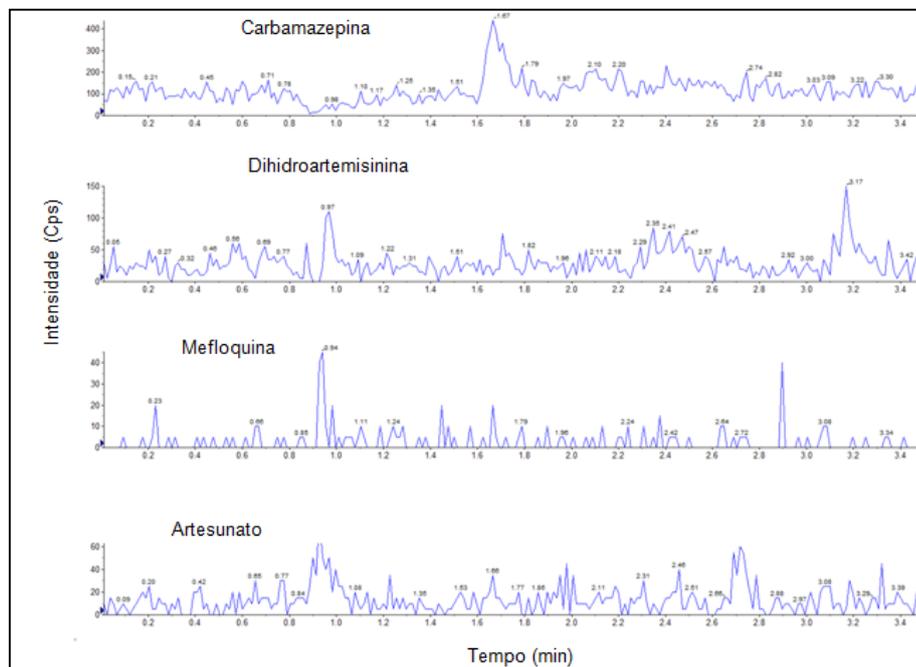
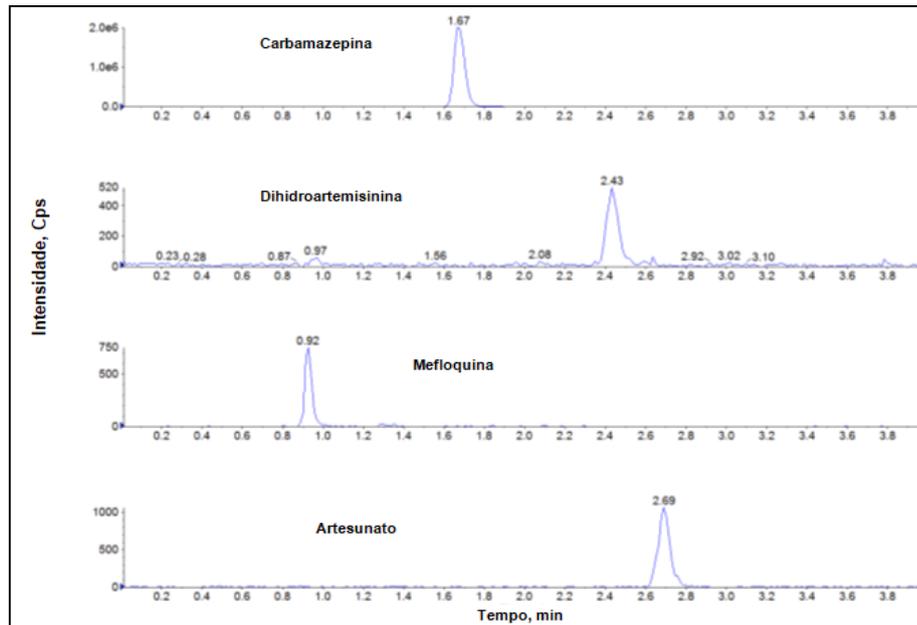


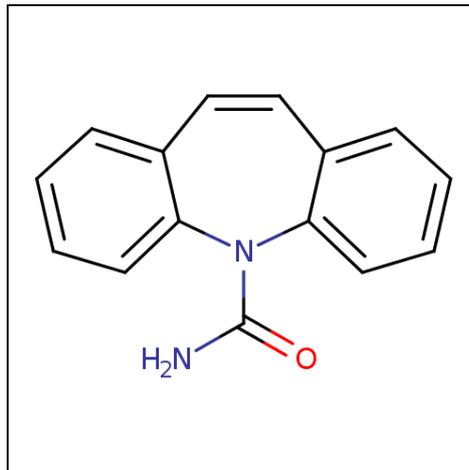
Figura 19 - Cromatograma de íons totais da amostra de LIQ



Outro fator importante a ser levado em consideração no desenvolvimento do método bioanalítico foi a escolha do padrão interno. O padrão interno tem como objetivo corrigir possíveis erros ocorridos durante o processo de extração da amostra. Sua escolha bem sucedida é de extrema relevância no alcance de uma boa recuperação dos analitos, reduzindo os problemas de efeito matriz e garantindo bons resultados as análises.

A carbamazepina foi escolhida como o padrão interno do estudo, pois além de ser uma substância de fácil acesso no laboratório, sua estrutura molecular permite ser extraída por inúmeros métodos de extração. A estrutura da carbamazepina pode ser observada na figura 20.

Figura 20 - Estrutura molecular da Carbamazepina



Fonte: (Drugbank.com)

## 4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

A validação do método bioanalítico deve ser sempre executada anteriormente a um estudo de farmacocinética, pois não só garante a confiabilidade dos resultados a serem analisados, como também garante que o método está de acordo com as exigências analíticas parametrizadas pela legislação vigente. Todo o processo de validação obedeceu às diretrizes da RDC 27 de 2012/ANVISA que trata da validação de métodos bioanalíticos, sendo todos os ensaios realizados com os critérios legais e de qualidade.

### 4.2.1 Teste de Quantificação Inicial (TQI)

As curvas de calibração para os três compostos no teste de quantificação inicial não apresentaram nenhum nível de calibração fora da curva, tendo coeficiente satisfatório com regressão linear ponderada ( $1/x^2$ ), sendo assim aprovadas dentro dos critérios de avaliação (figuras 21, 22 e 23). Em relação aos controles de qualidade de baixa e alta concentração (CQB e CQA) foram aprovados dentro da faixa de aceitação de 85 a 115 % de exatidão (tabelas 14, 15 e 16).

Figura 21 - Curva de calibração do TQI para o artesunato

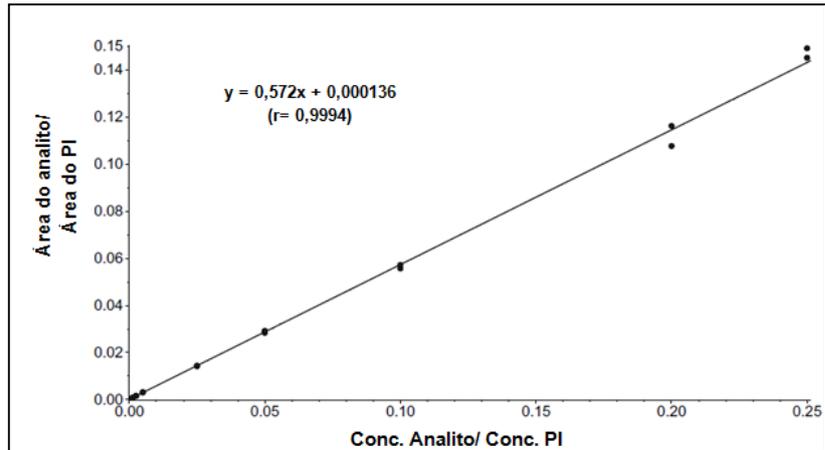


Figura 22 - Curva de calibração do TQI para a dihidroartemisinina

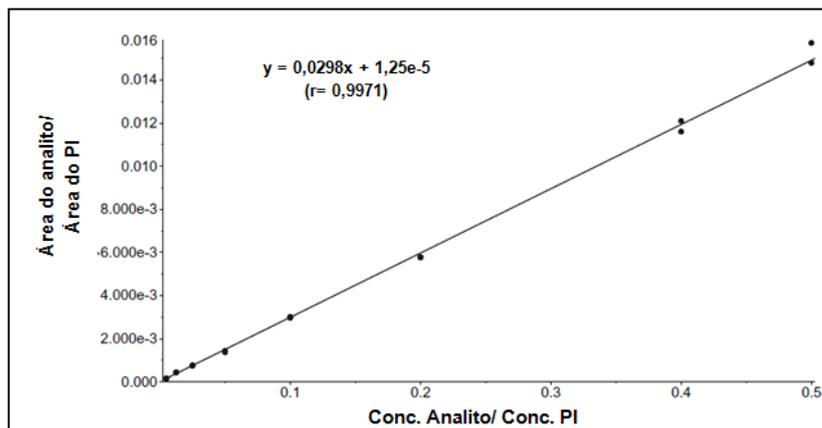


Figura 23 - Curva de calibração do TQI para a mefloquina

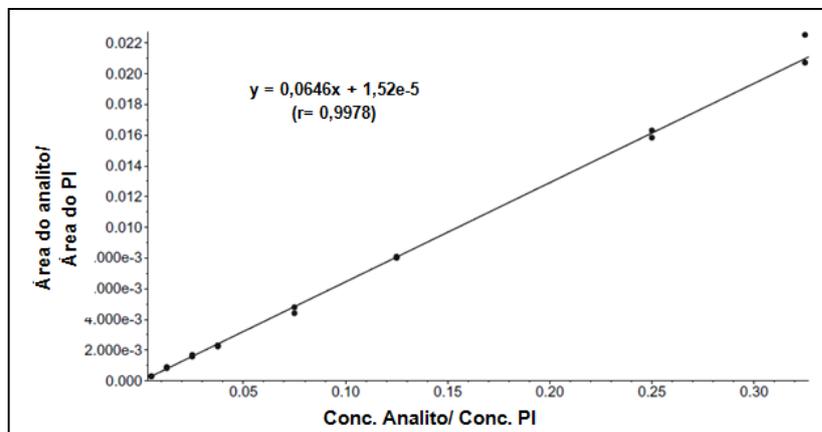


Tabela 14 - Resultados dos CQBs e CQAs do TQI para o artesunato

<b>TQI - Artesunato</b>					
<b>CQs (amostras do TQI)</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b>	5,00	5,66	7,53	113,29	13,29
<b>CQA</b>	400,00	416,13	8,35	104,03	4,03

Tabela 15 - Resultados dos CQBs e CQAs do TQI para a dihidroartemisinina

<b>TQI - Dihidroartemisinina</b>					
<b>CQs (amostras do TQI)</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b>	25,00	26,86	14,61	107,42	7,42
<b>CQA</b>	500,00	503,77	8,13	100,75	0,75

Tabela 16 - Resultados dos CQBs e CQAs do TQI para a mefloquina

<b>TQI - Mefloquina</b>					
<b>CQs (amostras do TQI)</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b>	25,00	28,31	6,41	113,26	13,26
<b>CQA</b>	800,00	746,48	6,57	93,31	-6,69

#### 4.2.2 Teste de Estabilidade de curta duração em plasma (TEBCA)

As curvas de calibração dos três compostos no teste de estabilidade de curta duração em plasma não apresentaram nenhum nível de calibração fora da curva e tendo um coeficiente satisfatório, sendo assim aprovada dentro dos critérios de avaliação (figuras 24, 25 e 26).

Em relação aos controles de qualidade de baixa e alta concentração (CQB e CQA), todos os oito controles de cada nível foram aprovados dentro da faixa de aceitação de 85 a 115 % de exatidão (tabelas 17, 18 e 19).

Figura 24 - Curva de calibração do TEBCA para o artesunato

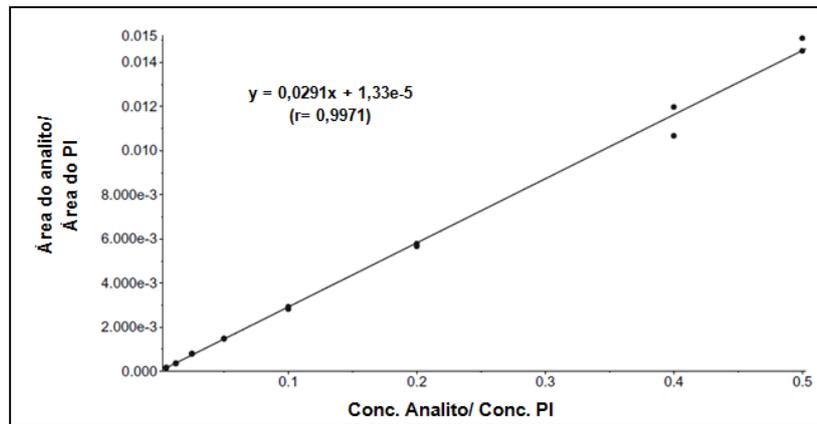


Figura 25 - Curva de calibração do TEBCA para a dihidroartemisinina

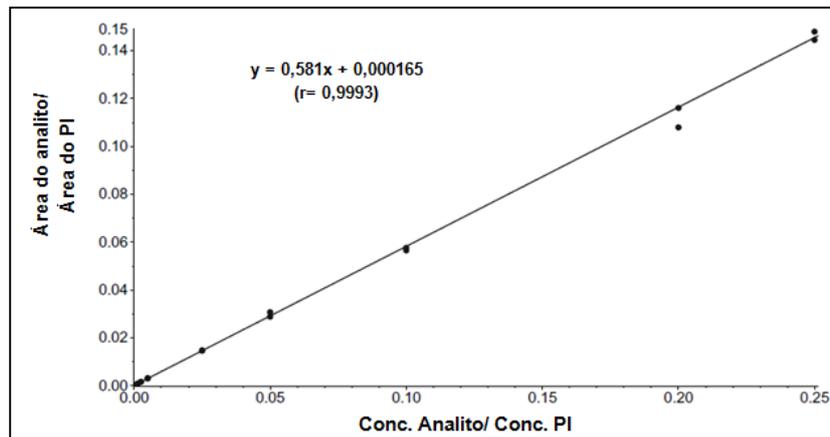


Figura 26 - Curva de calibração do TEBCA para a mefloquina

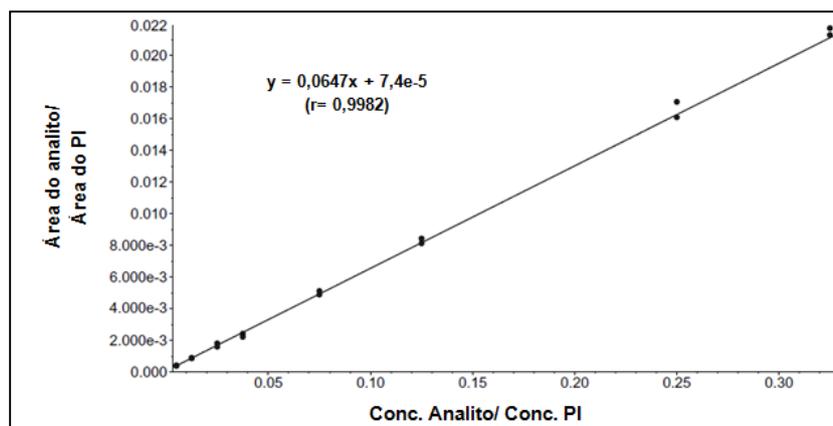


Tabela 17 - Resultados de CQB e CQAs do TEBCA para o artesunato

<b>CQs</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b>					
<b>Amostras após 04:22 horas</b>	5,00	4,53	7,27	90,65	-9,35
<b>CQA</b>					
<b>Amostras após 04:22 horas</b>	400,00	398,67	2,74	99,67	-0,33

Tabela 18 - Resultados de CQB e CQAs do TEBCA para a dihidroartemisinina

<b>CQs</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b>					
<b>Amostras após 04:22 horas</b>	25,00	21,83	8,29	87,32	-12,68
<b>CQA</b>					
<b>Amostras após 04:22 horas</b>	500,00	486,76	3,02	97,35	-2,65

Tabela 19 - Resultados de CQB e CQAs do TEBCA para a mefloquina

<b>CQs</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b>					
<b>Amostras após 04:22 horas</b>	25,00	26,37	9,15	105,47	5,47
<b>CQA</b>					
<b>Amostras após 04:22 horas</b>	800,00	800,65	3,64	100,08	0,08

#### 4.2.3 Teste de estabilidade pós-processamento (TEBPP)

As curvas de calibração dos três analitos para o teste de estabilidade de pós-processamento não apresentaram nenhum nível de calibração fora da curva, e tendo um coeficiente satisfatório, sendo assim aprovada dentro dos critérios de avaliação (figuras 27, 28 e 29).

Em relação aos controles de qualidade de baixa e alta concentração (CQB e CQA), todos os oito controles de cada nível foram aprovados dentro da faixa de aceitação de 85 a 115 % de exatidão (tabelas 20, 21 e 22).

Figura 27 - Curva de calibração do TEBPP para o artesunato

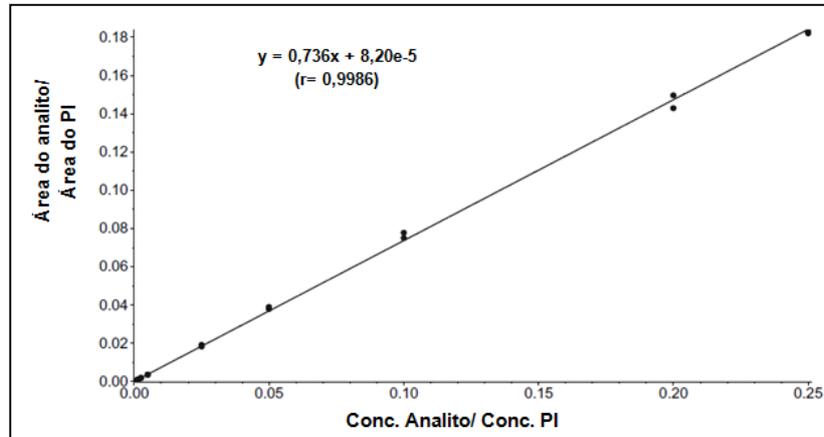


Figura 28 - Curva de calibração do TEBPP para a dihidroartemisinina

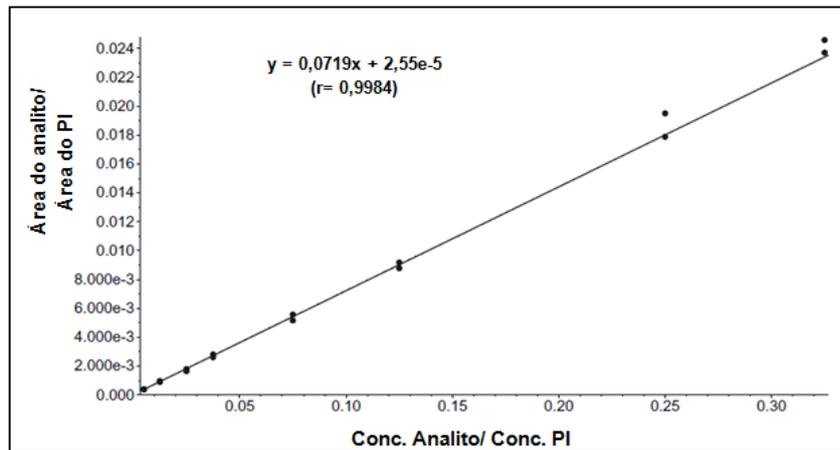


Figura 29 - Curva de calibração do TEBPP para a mefloquina

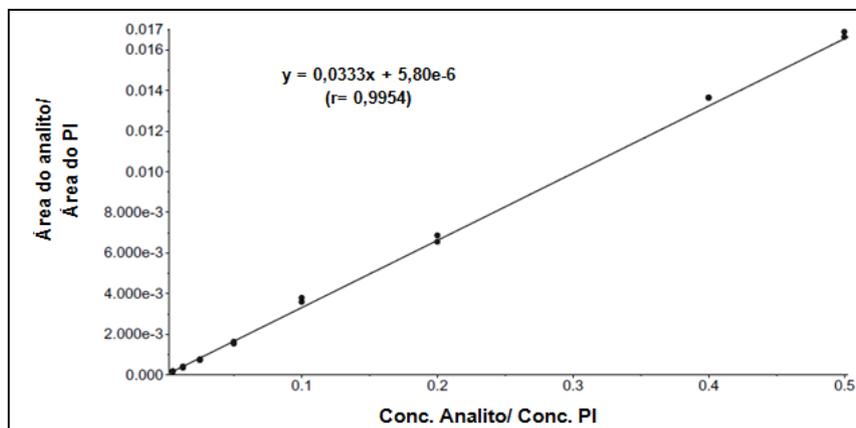


Tabela 20 - Resultados de CQB e CQAs do TEBPP para o artesunato

<b>CQs</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b>					
<b>Amostras após 66:35 horas</b>	5,00	4,94	2,72	98,79	-1,21
<b>CQA</b>					
<b>Amostras após 66:35 horas</b>	400,00	408,88	1,06	102,22	2,22

Tabela 21 - Resultados de CQB e CQAs do TEBPP para a dihidroartemisinina

<b>CQs</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b>					
<b>Amostras após 66:35 horas</b>	25,00	23,38	8,43	93,51	-6,49
<b>CQA</b>					
<b>Amostras após 66:35 horas</b>	500,00	513,44	2,01	102,69	2,69

Tabela 22 - Resultados de CQB e CQAs do TEBPP para a mefloquina

<b>CQs</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b>					
<b>Amostras após 66:35 horas</b>	25,00	23,79	8,29	95,16	-4,84
<b>CQA</b>					
<b>Amostras após 66:35 horas</b>	800,00	881,04	2,30	110,13	10,13

#### 4.2.4. Teste de Estabilidade de Congelamento e Descongelamento (TEBCD)

As curvas de calibração dos três compostos no teste de estabilidade de congelamento e descongelamento não apresentaram nenhum nível de calibração fora da curva e tendo um coeficiente satisfatório, sendo assim aprovada dentro dos critérios de avaliação (figuras 30, 31 e 32).

Em relação aos controles de qualidade de baixa e alta concentração (CQB e CQA), todos os oito controles de cada nível foram aprovados dentro da faixa de aceitação de 85 a 115 % de exatidão (tabelas 23, 24 e 25).

Figura 30 - Curva de calibração do TEBCD para o artesunato

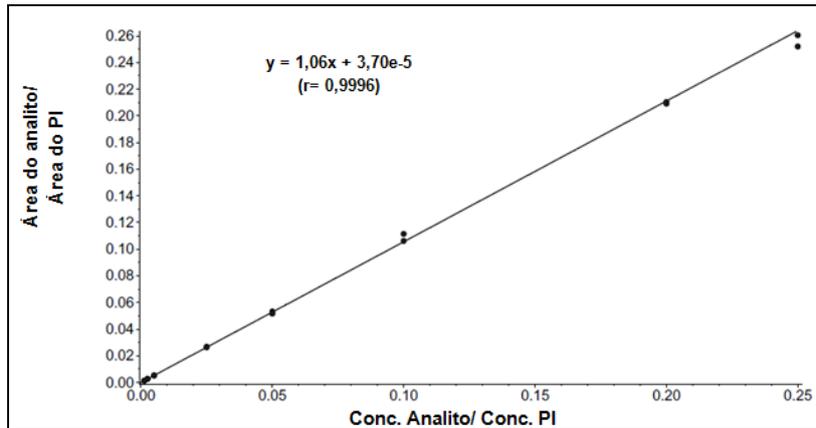


Figura 31 - Curva de calibração do TEBCD para a dihidroartemisinina

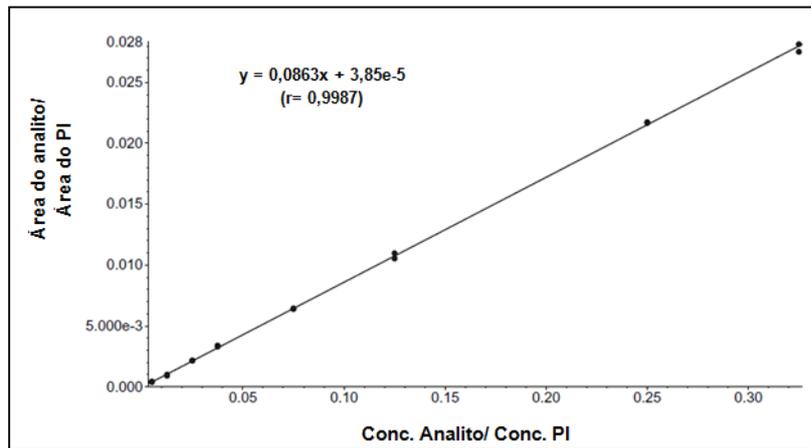


Figura 32 - Curva de calibração do TEBCD para a mefloquina

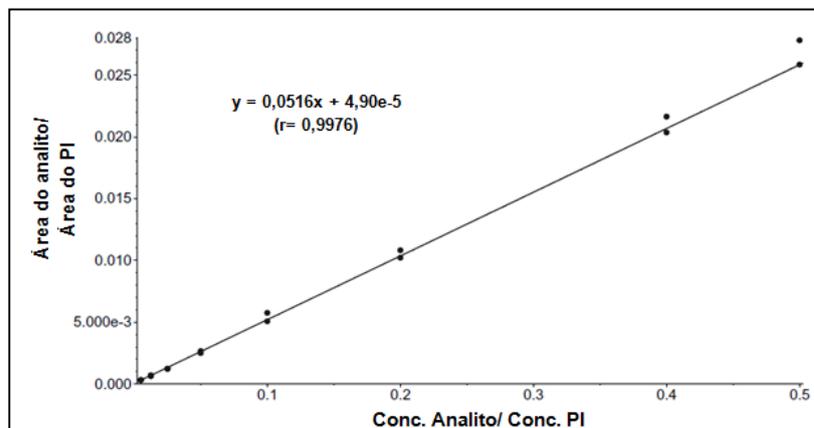


Tabela 23 - Resultados de CQB e CQAs do TEBCD para o artesunato

<b>CQs</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b> <b>Amostras após 03 ciclos CD</b>	5,00	5,06	3,72	101,28	1,28
<b>CQA</b> <b>Amostras após 03 ciclos CD</b>	400,00	401,28	1,46	100,32	0,32

Tabela 24 - Resultados de CQB e CQAs do TEBCD para a dihidroartemisinina

<b>CQs</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b> <b>Amostras após 03 ciclos CD</b>	25,00	23,40	7,44	93,60	-6,40
<b>CQA</b> <b>Amostras após 03 ciclos CD</b>	500,00	498,16	1,76	99,63	-0,37

Tabela 25 - Resultados de CQB e CQAs do TEBCD para a mefloquina

<b>CQs</b>	<b>Conc. nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/ mL) n= 8</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>CQB</b> <b>Amostras após 03 ciclos CD</b>	25,00	23,79	4,88	95,16	-4,84
<b>CQA</b> <b>Amostras após 03 ciclos CD</b>	800,00	848,63	5,19	106,08	6,08

O conjunto de testes realizados na avaliação da estabilidade em matriz biológica garantiu que as amostras de plasma permaneceram integras mesmo passando por períodos de congelamento/ descongelamento e por um período longo na bancada antes de serem processadas e analisadas. Isso pôde endossar a estabilidade das amostras durante a coleta sanguínea dos animais e seu armazenamento.

#### 4.2.5 Teste de estabilidade de Curta duração das Soluções de trabalho (TEBSCA)

Os resultados obtidos para o teste de estabilidade das soluções após 30 horas e 30 minutos na bancada são apresentados nas tabelas 26, 27 e 28, constatando que as soluções são estáveis através do desvio inferior a 10% em relação à média das concentrações obtidas para o valor nominal.

Tabela 26 - Resultados do TEBSCA para o artesunato

Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise	Valores de área do Analito e do Padrão Interno - Artesunato				EPR (%)
	Soluções de trabalho recém-preparadas (TSRP)		Soluções após 30h:30min (TEBSCA)		
Código das amostras	Média	CV (%)	Média	CV (%)	
<b>STB01</b>	11031,08	6,83	11807,53	7,51	7,04
<b>SME</b>	1849974,63	2,30	1837913,53	4,75	-0,65
<b>STB-IS</b>	8575403,44	2,57	8361564,92	3,22	-2,49
<b>SME-IS</b>	410777223,52	1,58	40731371,72	3,01	-0,84

Tabela 27 - Resultados do TEBSCA para a dihidroartemisinina

Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise	Valores de área do Analito e do Padrão Interno - Dihidroartemisinina				EPR (%)
	Soluções de trabalho recém-preparadas (TSRP)		Soluções após 30h:30min (TEBSCA)		
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	
<b>STB01</b>	2806,28	12,40	2915,65	6,37	3,90
<b>SME</b>	155983,27	4,59	151138,27	5,46	-3,11
<b>STB-IS</b>	8575403,44	2,57	8361564,92	3,22	-2,49
<b>SME-IS</b>	41077223,52	1,58	40731371,72	3,01	-0,84

Tabela 28 - Resultados do TEBSCA para a mefloquina

Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise	Valores de área do Analito e do Padrão Interno - Mefloquina				EPR (%)
	Soluções de trabalho recém-preparadas (TSRP)		Soluções após 30h:30min (TEBSCA)		
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	
<b>STB01</b>	2119,94	9,40	2069,20	5,59	-2,39
<b>SME</b>	168248,49	3,68	170316,75	4,78	1,23
<b>STB-IS</b>	8575403,44	2,57	8361564,92	3,22	-2,49
<b>SME-IS</b>	41077223,52	1,58	40731371,72	3,01	-0,84

#### 4.2.6 Teste de Estabilidade de Longa Duração das Soluções de trabalho (TEBSTA)

Os resultados obtidos para o teste de estabilidade das soluções armazenadas no ultrafreezer de -70 °C após 375 horas e 30 minutos são apresentados nas tabelas 29, 30 e 31, constatados que as soluções são estáveis através do desvio inferior a 10% em relação à média das concentrações obtidas para o valor nominal.

Tabela 29 - Resultados do TEBSTA para o artesunato

Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise	Valores de área do Analito e do Padrão Interno - Artesunato				EPR (%)
	Soluções de trabalho recém-preparadas (TSRP)		Soluções após 375h:30min (TEBSTA)		
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	
<b>STB01</b>	6180,02	7,55	6099,38	5,12	-1,30
<b>SME</b>	5230611,04	3,60	4931741,92	1,82	-5,71
<b>STB-IS</b>	6840407,32	3,56	6601209,04	3,66	-3,50
<b>SME-IS</b>	34853213,30	2,58	34275401,04	1,32	-1,66

Tabela 30 - Resultados do TEBSTA para a dihidroartemisinina

Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise	Valores de área do Analito e do Padrão Interno - Dihidroartemisinina				EPR (%)
	Soluções de trabalho recém-preparadas (TSRP)		Soluções após 375h:30min (TEBSTA)		
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	
<b>STB01</b>	2303,84	7,68	2483,84	9,61	7,81
<b>SME</b>	695589,09	4,45	652638,17	2,63	-6,17
<b>STB-IS</b>	6840407,32	3,56	6601209,04	3,66	-3,50
<b>SME-IS</b>	34853213,30	2,58	34275401,04	1,32	-1,66

Tabela 31 - Resultados do TEBSTA para a mefloquina

Teste de estabilidade das soluções de trabalho sob condições de análise	Valores de área do Analito e do Padrão Interno - Mefloquina				EPR (%)
	Soluções de trabalho recém-preparadas (TSRP)		Soluções após 375h:30min (TEBSTA)		
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	
<b>STB01</b>	1912,05	8,65	1903,91	8,39	-0,43
<b>SME</b>	855705,40	5,86	794118,64	1,57	-7,20
<b>STB-IS</b>	6840407,32	3,56	6601209,04	3,66	-3,50
<b>SME-IS</b>	34853213,30	2,58	34275401,04	1,32	-1,66

Com relação aos testes de estabilidade das soluções de trabalho, o teste de curta duração teve como objetivo mostrar que as soluções de trabalho eram estáveis e que não havia nenhum tipo de degradação dos analitos, caso as mesmas fossem deixadas em temperatura ambiente. Vale também ressaltar a importância do ensaio de longa duração, no qual assegurou a integridade do conjunto de soluções, garantindo que as análises das amostras pudessem ser realizadas durante 16 dias.

#### 4.2.7 Teste de Precisão e Exatidão (TPE)

Foram realizados em três dias o teste de precisão e exatidão. Em todos os testes as curvas de calibração foram preparadas em duplicata, não se perdendo nenhum nível de calibração para os três analitos, estando dentro dos critérios de aceitação.

Em todos os dias de TPE, os controles de qualidade LIQs, CQBs, CQMs, CQAs e CQDs apresentaram precisão satisfatória, obtendo-se um CV dentro da faixa de 20 % para o LIQ e para os demais dentro de 15 %.

O método também foi considerado exato, pois os desvios (D%) dos controles de qualidade também foram inferiores a 15 % em relação ao valor nominal de cada concentração, exceto para o LIQ em que o desvio aceito foi de 20 %.

As médias de todos os controles de qualidade para os três dias de ensaio estão apresentadas nas tabelas 32, 33 e 34.

Tabela 32 - Resultados do TPE para o artesunato

ARS	Concentração média dos Controles de Qualidade (ng/mL) Artesunato				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
TPE 1	2,68	5,39	204,26	455,53	457,43
TPE 2	2,52	5,03	199,34	388,04	385,20
TPE 3	2,29	4,88	198,01	373,28	377,15
Média	2,50	5,10	200,54	405,62	406,59
Precisão (%)	7,85	5,14	1,64	10,81	10,87
Exatidão (%)	99,87	102,00	100,27	101,40	101,65
Desvio (%)	-0,13	2,00	0,27	1,40	1,65

Tabela 33 - Resultados do TPE para a dihidroartemisinina

DHA	Concentração média dos Controles de Qualidade (ng/mL) Dihidroartemisinina				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
TPE 1	10,36	27,47	254,77	563,24	570,86
TPE 2	9,39	21,98	235,48	488,65	475,75
TPE 3	10,02	23,61	271,10	557,73	573,31
Média	9,92	24,35	253,78	536,24	540,11
Precisão (%)	4,96	11,58	7,03	7,75	10,32
Exatidão (%)	99,23	97,41	101,51	107,31	108,02
Desvio (%)	-0,77	-2,59	1,51	9,14	8,02

Tabela 34 - Resultados do TPE para a mefloquina

MFQ	Concentração média dos Controles de Qualidade (ng/mL) Mefloquina				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
TPE 1	10,70	25,54	452,12	841,25	707,98
TPE 2	10,70	23,61	414,40	880,91	796,71
TPE 3	11,07	27,11	400,59	779,59	811,18
Média	10,82	25,42	422,37	833,92	771,96
Precisão (%)	1,97	6,90	6,32	6,12	7,24
Exatidão (%)	108,23	101,68	105,59	104,24	96,49
Desvio (%)	8,23	1,68	5,59	4,24	-3,51

#### 4.2.8 Teste de Efeito Residual (TER)

No teste de efeito residual as amostras foram injetadas na ordem BPN, LIQ, LSQ, e duas amostras finais de BPN.

Após observar os cromatogramas de íons totais (intensidade *versus* tempo) pode-se assegurar que o sistema de lavagem foi eficaz, não havendo contaminação para as amostras seguintes, o chamado *carry over*, conforme apresentado nas figuras 33, 34 e 35.

Figura 33 - Cromatogramas de íons totais do TER para o artesunato

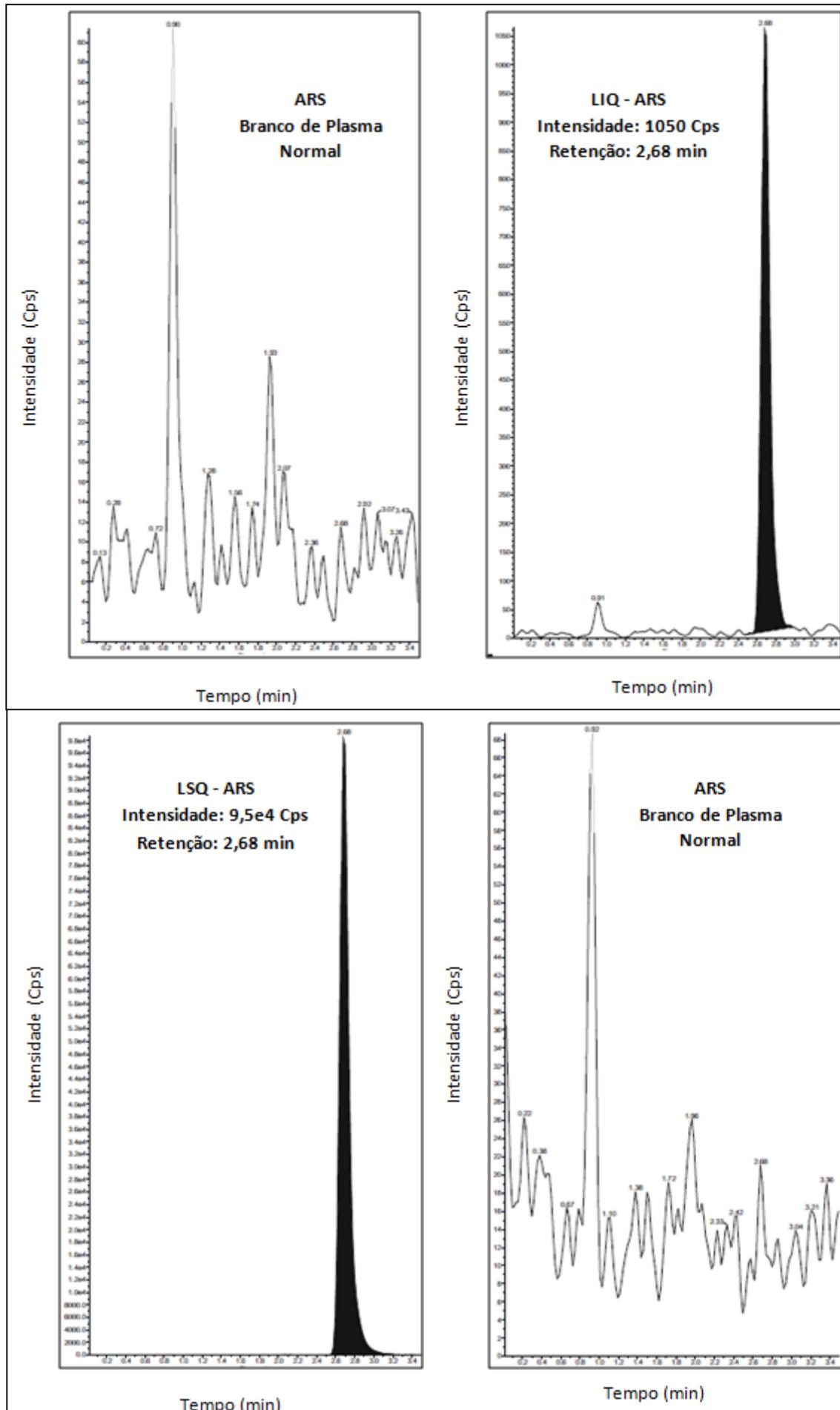


Figura 34 - Cromatogramas de íons totais do TER para a dihidroartemisinina

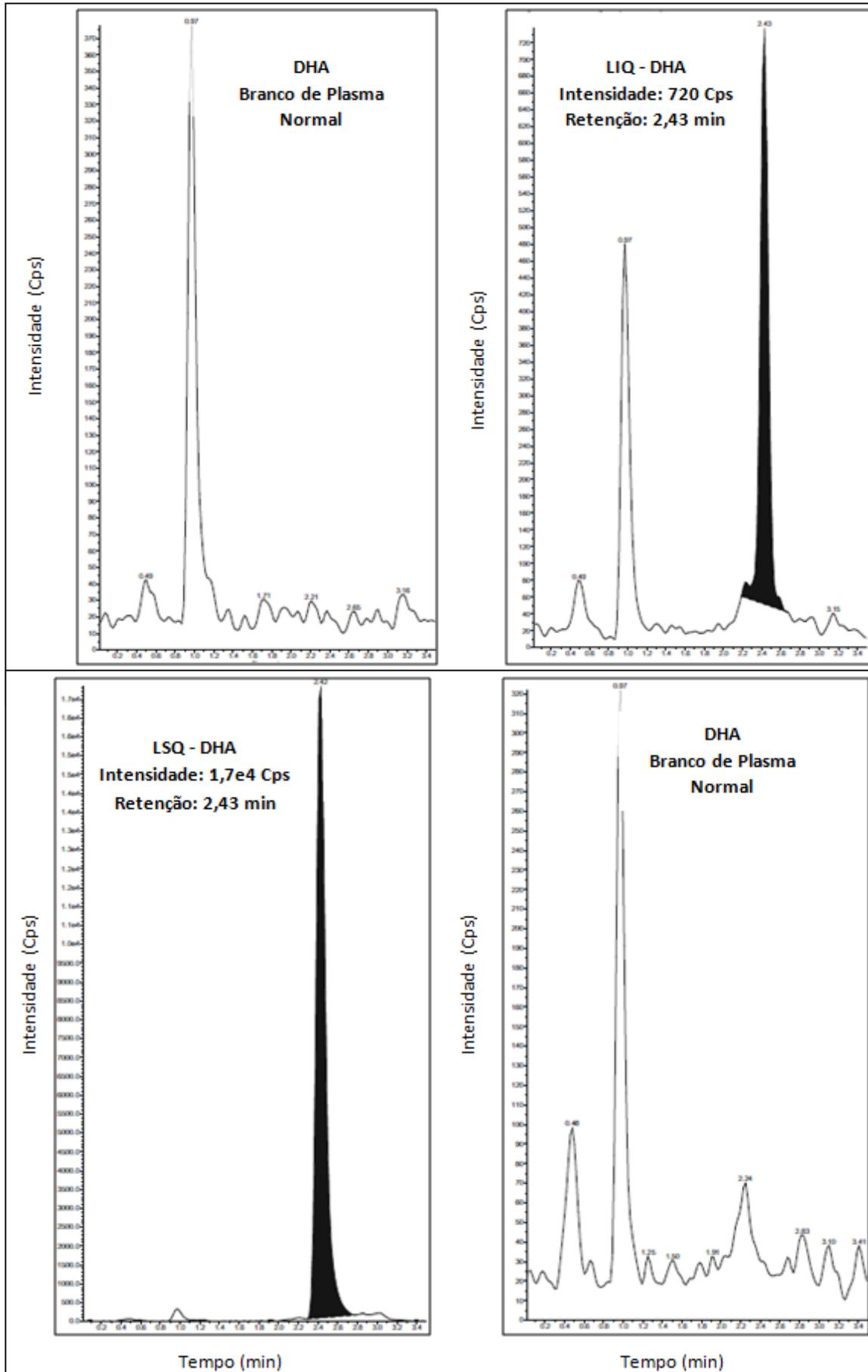
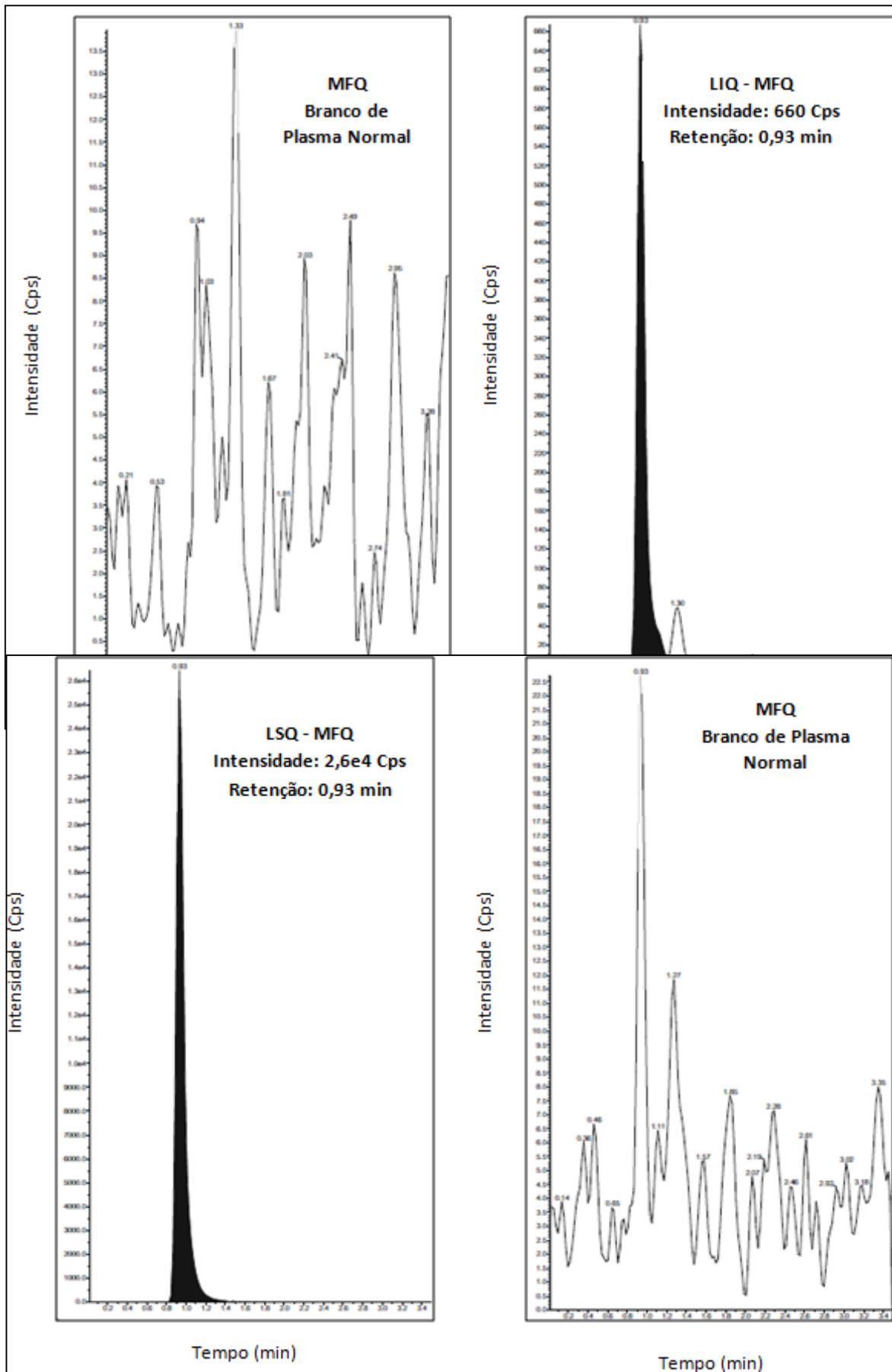


Figura 35 - Cromatogramas de íons totais do TER para a mefloquina



#### 4.2.9 Teste de Seletividade (TSE)

Para os três analitos, o teste de seletividade não apresentou contaminação ou interferências em nenhuma das amostras brancas (BPN) para os plasmas normais, lipêmico e hemolisado. Também foi possível quantificar o LIQ no plasma do tipo normal, conforme apresentado nas figuras 36, 37 e 38.

Figura 36 - Cromatogramas de íons totais do TSE para o artesunato

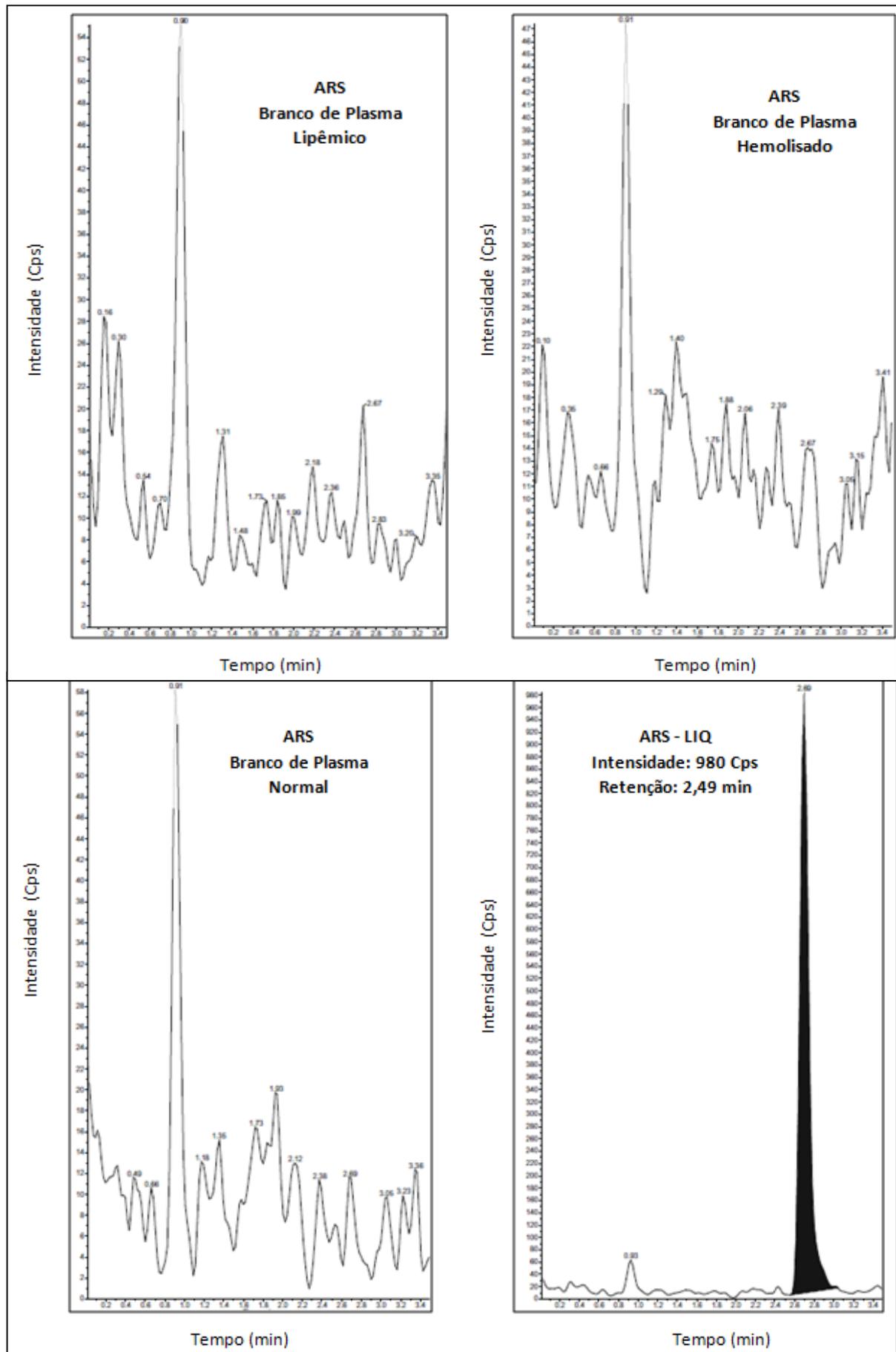


Figura 37 - Cromatogramas de íons totais do TSE para a dihidroartemisinina

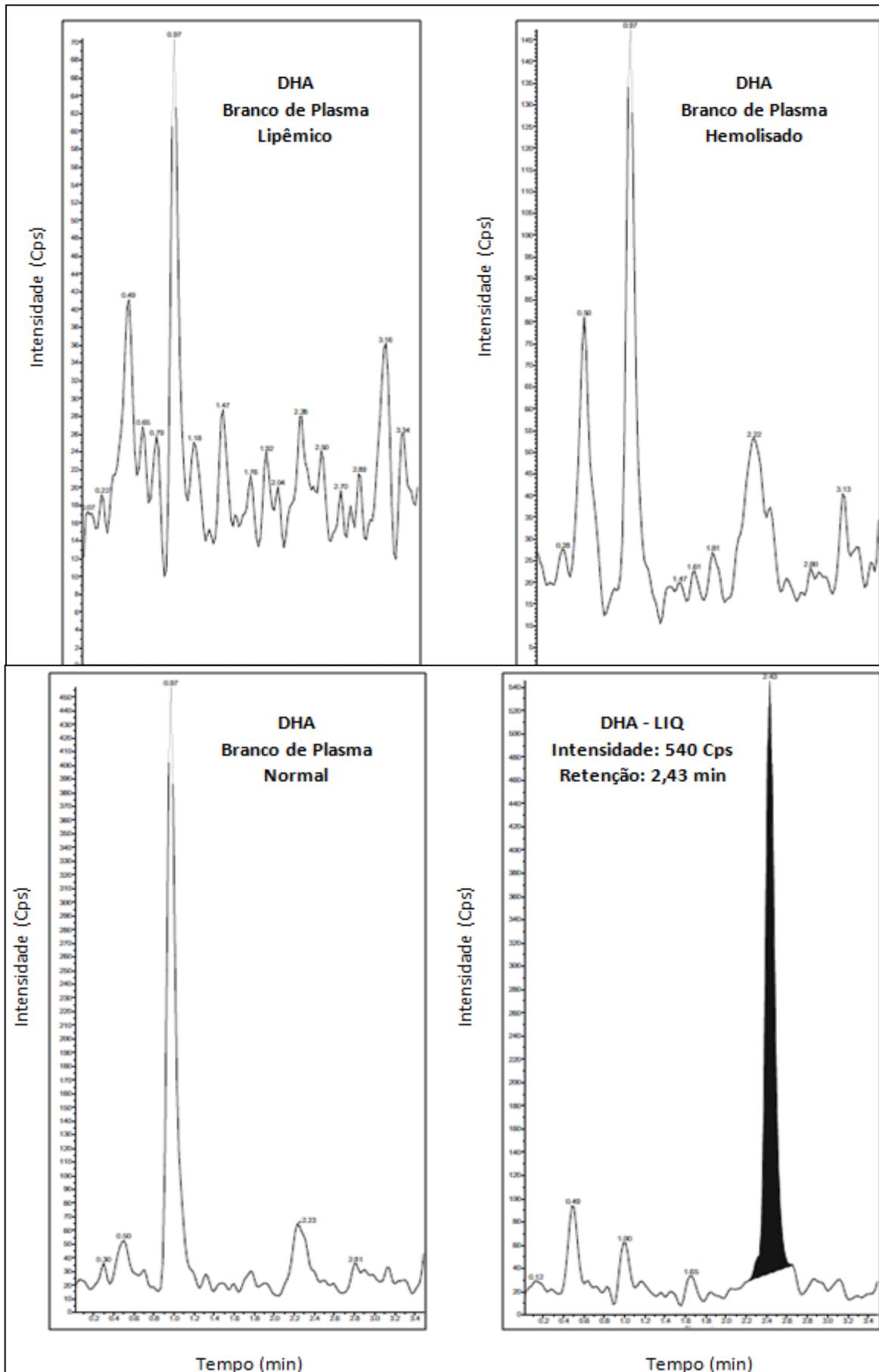
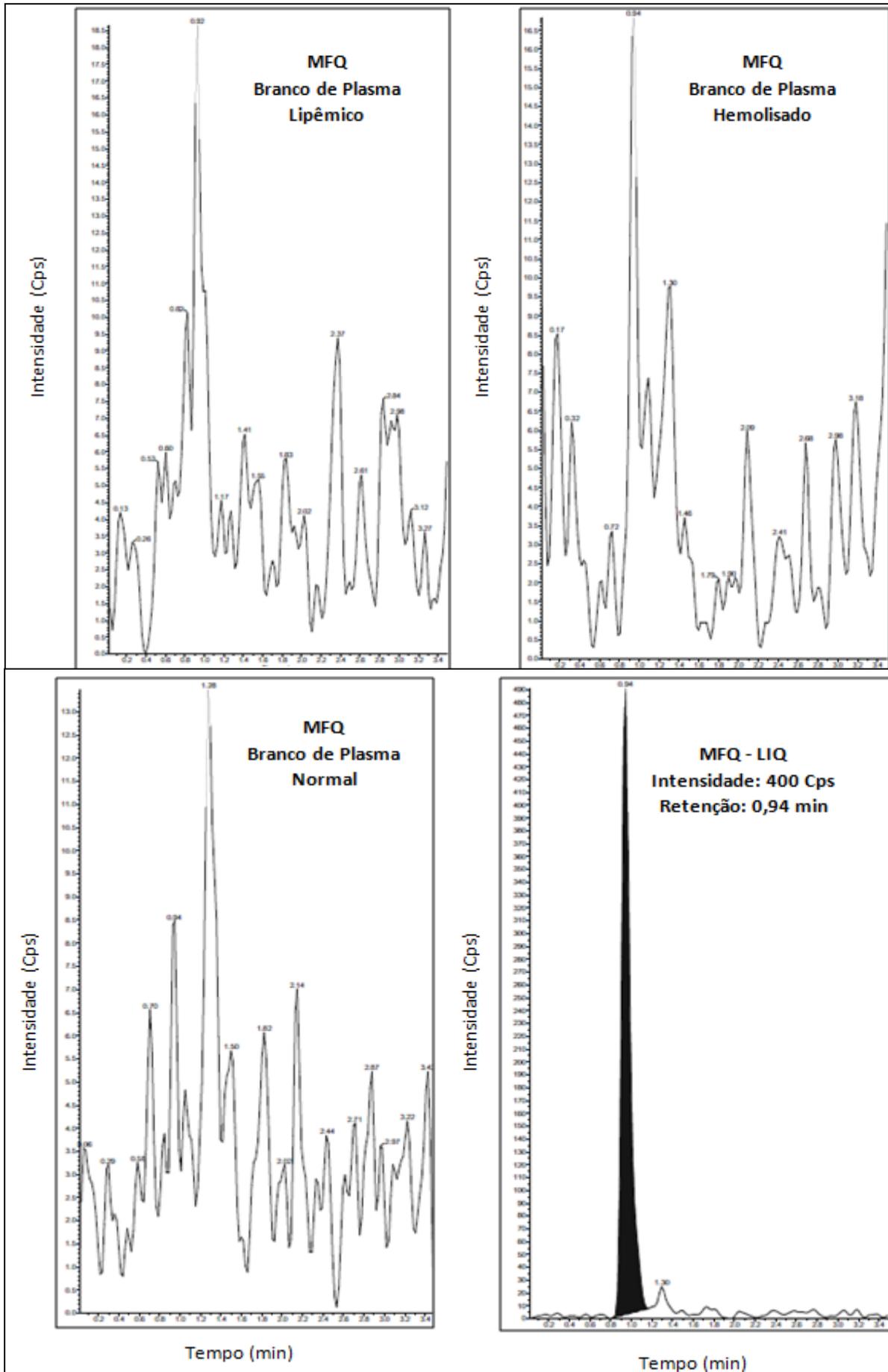


Figura 38 - Cromatogramas de íons totais do TSE para a mefloquina



#### 4.2.10 Teste de Efeito Matriz (TEM)

O teste de efeito matriz foi realizado a partir das amostras de CQB e CQAs extraídas em plasma e em solução, comprovando que a matriz (plasma) escolhida para o estudo não interfere na recuperação dos três analitos. Tal resultado é ratificado pelo coeficiente de variação dos valores de fator de matriz normalizado (FMN) ser abaixo de 15% (tabelas 35, 36 e 37).

Tabela 35 - Resultado do Fator de Matriz Normalizado do TEM para o artesunato

<b>TEM - Artesunato</b>			
<b>Controles de Qualidade</b>	<b>Concentração nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média FMN</b>	<b>CV (%) FMN</b>
<b>CQB</b>	5,00	0,80	9,77
<b>CQA</b>	400,00		

Tabela 36 - Resultado do Fator de Matriz Normalizado do TEM para a dihidroartemisinina

<b>TEM - Dihidroartemisinina</b>			
<b>Controles de Qualidade</b>	<b>Concentração nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média FMN</b>	<b>CV (%) FMN</b>
<b>CQB</b>	25,00	1,11	8,45
<b>CQA</b>	500,00		

Tabela 37 - Resultado do Fator de Matriz Normalizado do TEM para a mefloquina

<b>TEM - Mefloquina</b>			
<b>Controles de Qualidade</b>	<b>Concentração nominal (ng/ mL)</b>	<b>Média FMN</b>	<b>CV (%) FMN</b>
<b>CQB</b>	25,00	0,90	14,62
<b>CQA</b>	800,00		

Com o término da validação, pode-se constatar que toda a metodologia desenvolvida foi robusta, estando em conformidade com os critérios legais estabelecidos pela ANVISA. Portanto, o estudo está adequado aos parâmetros de caráter oficial de controle de qualidade ou de um futuro registro.

### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO

Para a definição dos tempos de coleta foi realizado um primeiro estudo piloto com dois animais, que receberam uma dose de 10 mg/ mL de MEFAS. Os tempos de coleta para esse primeiro ensaio foram: 0 (pré-dose), 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 240 min e 360 min.

As médias das concentrações plasmáticas obtidas estão apresentadas na tabela 38.

Tabela 38 - Resultado das concentrações plasmáticas para o Ensaio Piloto 01

<b>Piloto 01_MEFAS (10 mg/ mL)</b>			
<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentração plasmática_AS (ng/mL) n=2</b>	<b>Concentração plasmática_DHA (ng/mL) n=2</b>	<b>Concentração plasmática_MQ (ng/mL) n=2</b>
Pre-dose	0,00	0,00	0,00
5	1,04	0,00	2,52
10	2,52	1,81	2,79
15	5,38	2,12	4,43
30	1,35	2,33	12,22
45	2,61	1,47	20,54
60	0,79	1,25	27,43
120	127,80	49,90	181,11
240	0,32	0,98	70,22
360	0,22	0,87	102,57

As concentrações tanto do artesunato quanto da dihidroartemisinina mostraram-se muito baixas, indicado a necessidade de aumento na dose administrada à obtenção de um perfil farmacocinético mais consistente.

No tempo de 360 minutos, a concentração da mefloquina ainda estava alta em relação aos outros pontos de coleta, indicando a necessidade de obtenção de mais pontos após esse período.

Tendo em vista os resultados do estudo piloto que indicou a necessidade de ajustes no desenho proposto, um segundo teste piloto foi conduzido, agora com seis animais de pesos entre 300 a 350 gramas. Neste ensaio, a dose de MEFAS foi aumentada para 50 mg/ kg e os tempos de coletas estabelecidos foram ampliados até 48 horas (2880 minutos).

As médias das concentrações plasmáticas obtidas no Piloto 02 estão apresentadas na tabela 39.

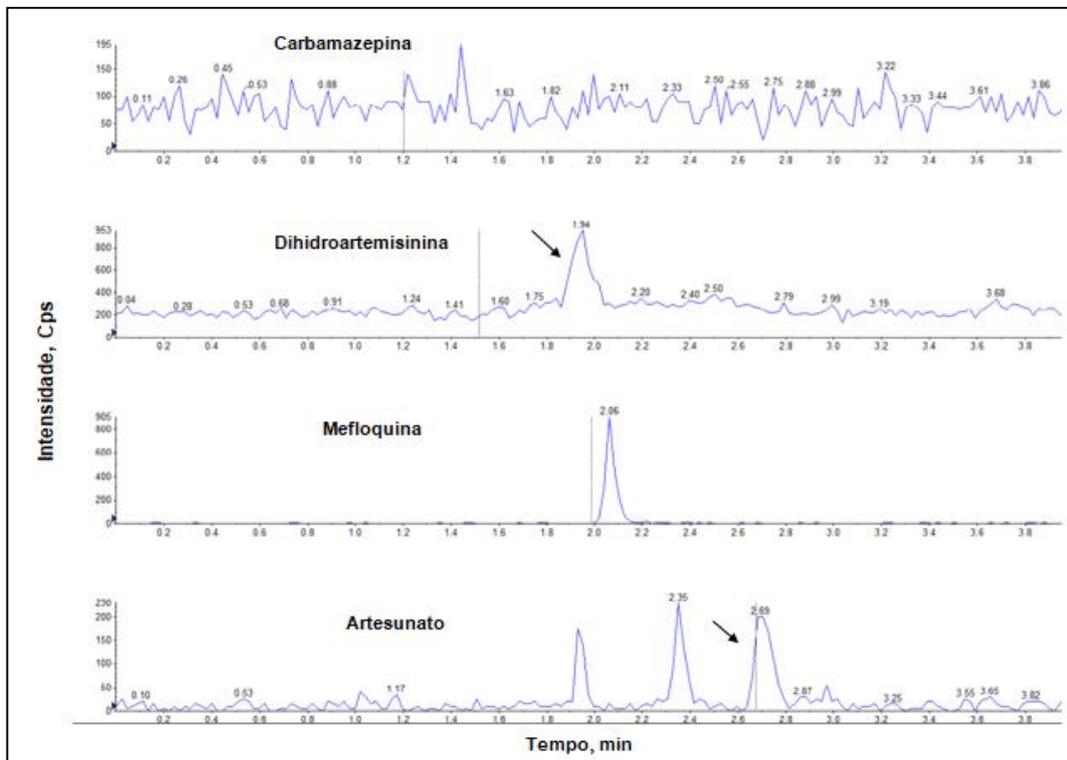
Tabela 39 - Resultado das concentrações plasmáticas para o Ensaio Piloto 02

<b>Piloto 02_MEFAS (50 mg/ mL)</b>			
<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentração plasmática_AS (ng/mL) n=6</b>	<b>Concentração plasmática_DHA (ng/mL) n=6</b>	<b>Concentração plasmática_MQ (ng/mL) n=6</b>
Pre-dose	3,41	4,07	16,65
5	22,56	64,19	85,15
10	23,68	67,52	89,96
15	168,86	237,54	536,31
30	11,11	69,07	87,53
45	114,06	48,53	119,67
60	8,96	30,64	122,48
120	99,49	77,70	494,20
240	10,32	38,57	203,43
360	25,37	26,10	272,77
1440 (24 horas)	0,61	0,00	430,28
2880 (48 horas)	2,93	2,02	736,49

A partir dos resultados obtidos, observou-se que para todos os analitos houve contaminação no ponto zero, em que se esperava a ausência de concentração visto que este tempo de coleta foi antes da administração do fármaco. Todavia, por mais que os pontos de coletas estivessem contaminados, os resultados foram essenciais para predizer que os tempos de coleta deveriam ser estendidos para mais dias, e que a dose de 50 mg/ kg foi bastante viável para construção do perfil farmacocinético para o MEFAS.

Além dos resultados obtidos no Piloto 02, foi realizado um rastreamento do que poderia estar contaminando as amostras durante o experimento. Materiais como a tesoura (utilizada na incisão da cauda do animal), agulha de gavagem, heparina e pipetas passaram por análise e foram testados no CLAE-EM/EM para identificar algum nível de contaminação. Dentre os utensílios investigados, observou-se que a tesoura utilizada na coleta continha contaminação com os analitos presentes no MEFAS (figura 39).

Figura 39 - Cromatograma de íons totais do MEFAS presente na tesoura



As contaminações foram observadas nos seguintes tempos de retenção: DHA: 1,94 minutos, MQ: 2,06 minutos e AS: 2,69 minutos.

O problema da contaminação somente foi resolvido após a criação de um método de lavagem para tesoura que consistia na limpeza com a fase móvel do estudo por meio de um banho ultrassônico durante 20 minutos.

Com base na literatura e ensaios pilotos anteriores foram definidos pontos de coleta iguais para o artesunato e dihidroartemisinina, porém os tempos de coleta foram ampliados até 72 horas para a mefloquina devido à sua longa meia vida de eliminação. Dessa maneira, para conseguir mapear os pontos de coleta, o estudo piloto foi dividido em dois braços, onde no primeiro grupo três ratos foram utilizados para coleta focando nos pontos do artesunato e da dihidroartemisinina. No segundo grupo também foram utilizados três ratos, mas dessa vez os pontos de coleta foram focados somente para a mefloquina.

Nas tabelas 40 e 41 são apresentados os resultados do terceiro e último piloto.

Tabela 40 - Resultado das concentrações plasmáticas para o Ensaio Piloto 03 para AS e DHA

<b>Piloto 03_MEFAS (50 mg/ kg) AS e DHA</b>		
<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentração plasmática_ARS (ng/mL) n=3</b>	<b>Concentração plasmática_DHA (ng/mL) n=3</b>
Pre-dose	0,00	0,00
15	5,67	7,34
30	9,51	12,84
45	6,69	12,09
60	4,26	9,73
90	5,38	9,18
120	4,91	10,16
240	2,08	2,98
360	0,00	1,55
480	0,00	0,00
1440 (24 horas)	0,00	0,00

Tabela 41 - Resultado das concentrações plasmáticas para o Ensaio Piloto 03 para MQ

<b>Piloto 03_MEFAS (50 mg/ mL) MQ</b>	
<b>Tempo (hora)</b>	<b>Concentração plasmática_MQ (ng/mL) n=3</b>
Pre-dose	0,00
1	37,35
4	152,23
8	150,95
24	271,60
32	279,60
48	287,47
56	156,27
72	116,91

Os resultados obtidos após a realização do terceiro estudo piloto permitiram o estabelecimento mais adequado dos pontos de coleta e de desenho a serem implementados no estudo. Os estudos pilotos permitiram o mapeamento de cada analito, visto que se evidenciou a existência de perfis farmacocinéticos bastante distintos e a necessidade de mudança no desenho proposto.

Na coleta para o artesunato e a dihidroartemisinina percebeu-se a necessidade de incluir pontos com horários mais próximos no início da coleta. Como suas respostas em relação à concentração ainda foram baixas, a opção encontrada foi dobrar a quantidade de administração do sal.

Em relação à mefloquina, pode-se concluir que ainda houve a necessidade de estender os tempos de coleta, pois no tempo de 72 horas o fármaco ainda se apresenta em concentração elevada no organismo do animal.

Sendo assim, após todas as conclusões obtidas nos três estudos pilotos foram estabelecidos os tempo de coleta da seguinte maneira: 0 (pré-dose); 10; 15; 20; 30; 45; 60; 240; 360; 420 minutos, e a partir do dia seguinte da gavagem, nos tempos de 24; 32; 48; 56; 72; 96 e 168 horas (uma semana pós gavagem).

Uma vantagem do método de coleta e de extração do presente estudo em relação aos demais foi a quantidade de plasma animal utilizado (volume de apenas 25  $\mu$ L por amostra). Esse é um ponto bastante positivo, uma vez que o animal tende a sofrer uma menor perturbação de homeostasia, promovida por hipovolemia, comprometendo em menor grau sua integridade, o que garante resultados mais confiáveis. Em animais de pequeno porte como roedores, o volume máximo a ser retirado de sangue em um estudo de dose única com coleta durante 24 horas é de 20 % em relação ao volume de sangue total do animal, considerando um volume médio de 64 mL/kg para ratos (DIEHL, et al., 2001; STORPIRTIS, et al., 2011). Dessa forma, as coletas sanguíneas dos dez primeiros pontos foram permitidas sem que o animal sofresse algum tipo de perturbação, uma vez que o volume de sangue coletado nas primeiras 24 horas de experimento foi de aproximadamente 1,20 mL.

#### 4.4 PERFIL FARMACOCINÉTICO

Os parâmetros farmacocinéticos de cada animal presente nos grupos controle, MEFAS AS + MQ foram calculados individualmente, analisados e submetidos aos testes estatísticos de Dixon, Grubbs e Chauvenet para avaliar a presença de *outliers*. Foram descartados do estudo um animal do grupo AS + MQ para o AS, dois animais do grupo AS + MQ e um animal do grupo MEFAS para DHA. Nenhum animal foi desconsiderado para a MQ.

Os resultados apresentados nas figuras 40, 41 e 42 comprovam que o AS DHA e MQ tanto provenientes do grupo MEFAS quanto do tratamento com AS + MQ foram absorvidos no trato gastrointestinal dos ratos. E como era esperado, o grupo controle que só recebeu o veículo não apresentou nenhum fármaco.

Figura 41 - Curva de concentração plasmática média de AS em função do tempo após administração oral de veículo, MEFAS e AS + MQ.

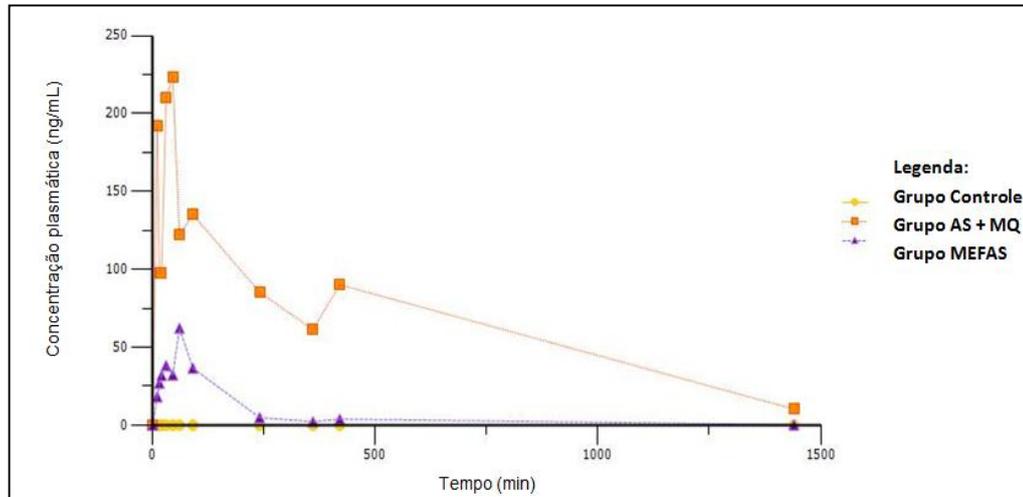


Figura 40 - Curva de concentração plasmática média de DHA em função do tempo após administração oral de veículo, MEFAS e AS + MQ.

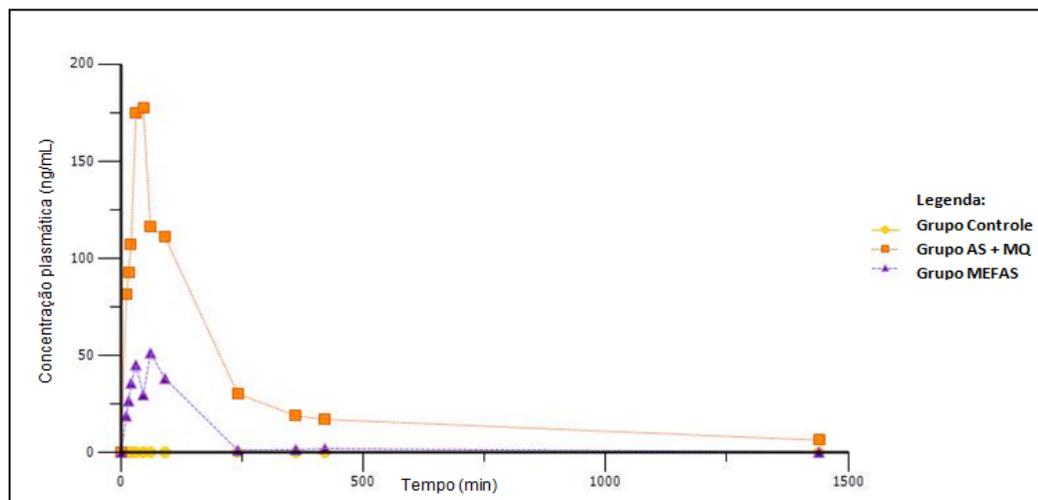
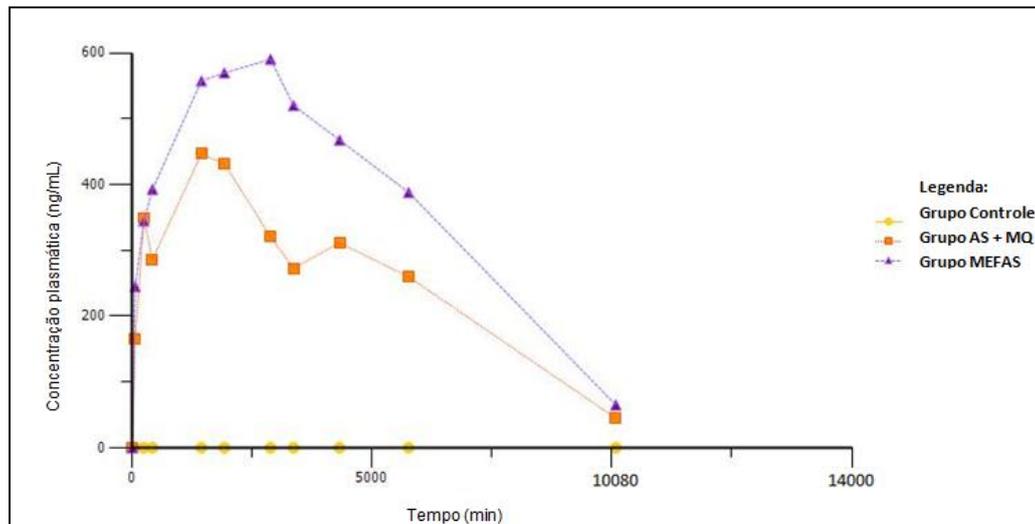


Figura 42 - Curva de concentração plasmática média de MQ em função do tempo após administração oral de veículo, MEFAS e AS + MQ



A concentração plasmática de artesunato no Grupo AS + MQ foi aproximadamente 5 vezes maior que a concentração plasmática do mesmo fármaco no grupo MEFAS. O mesmo ocorreu para os valores de Área Sob a Curva ( $ASC_{0-t}$ ) do tempo 0 a 1440 min (24 horas) e Área Sob a Curva do tempo zero ao infinito ( $ASC_{0-\infty}$ ).

Já para a MQ a concentração plasmática do grupo MEFAS foi um pouco maior em relação ao grupo de esquema de doses em separado. Conseqüentemente, a biodisponibilidade expressa pelos valores de ASC também foram maiores para o grupo MEFAS.

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para os três grupos do estudo estão apresentados nas tabelas 42, 43 e 44.

Tabela 42 - Parâmetros farmacocinéticos do AS para os grupos controle, MEFAS e AS + MQ

Perfil farmacocinético do Artesunato						
Grupo	C <sub>máx</sub> (ng/mL)	T <sub>máx</sub> (min)	ASC <sub>0-t</sub> (ng.min/L)	ASC <sub>0-∞</sub> (ng.min/L)	Ke (L/min)	T <sub>1/2β</sub> (min)
<b>Controle</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>MEFAS</b>	83,78 ±59,89	41,36 ±23,35	6891,58 ± 6050,12	--	--	--
<b>AS + MQ</b>	392,08 ±154,75	45,83 ±22,84	59742,59 ± 22489,34	--	--	--

Tabela 43 - Parâmetros farmacocinéticos do DHA para os grupos controle, MEFAS e AS + MQ

Perfil farmacocinético da Dihidroartemisinina						
Grupo	Cmáx (ng/mL)	Tmáx (min)	ASC0-t (ng.min/L)	ASC0-∞ (ng.min/L)	Ke (L/min)	T1/2β (min)
Controle	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
MEFAS	82,11 ±52,11	45,45 ±22,63	4228,62 ±3420,84	6694,58 ±5736,22	0,0160 ±0,0089	63,79 ±55,11
AS + MQ	242,72 ±146,37	47,50 ±26,06	27289,31 ±14322,50	37976,07 ±15914,78	0,0065 ±0,0036	236,65 ±338,69

Tabela 44 - Parâmetros farmacocinéticos da MQ para os grupos controle, MEFAS e AS + MQ

Perfil farmacocinético da Mefloquina						
Grupo	Cmáx (ng/mL)	Tmáx (min)	ASC0-t (ng.min/L)	ASC0-∞ (ng.min/L)	Ke (L/min)	T1/2β (min)
Controle	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
MEFAS	760,68 ±252,62	2880 ±1545,24	3753816,52 ±1381395,67	3790865,81 ±1456748,35	0,0003 ±0,0000	2090,04 ±1000,58
AS + MQ	610,58 ±253,02	2300 ±1609,83	2530305,05 ±1480608,59	2289532,92 ±910896,31	0,0003 ±0,0000	1922,32 ±351,24

Devido à grande variação das concentrações plasmáticas dos últimos pontos de coleta do artesunato nos grupos MEFAS e AS + MQ, não foi possível uma determinação adequada para a constante de eliminação (Ke), sendo assim os parâmetros derivados do mesmo como ASC<sub>0-∞</sub> e T<sub>1/2 β</sub> não puderam ser calculados.

Com relação ao tempo para atingir o Cmáx. do AS, DHA e MQ não houve diferença nos resultados para os dois grupos em comparação, o que sugere que o composto MEFAS não tem absorção retardada em relação aos compostos do grupo AS + MQ.

Após ser realizado o estudo de farmacocinética nos roedores, pôde-se observar que tanto o grupo que recebeu o composto MEFAS quanto o grupo AS + MQ apresentaram rápida absorção dos fármacos através do trato gastrointestinal. Embora o perfil farmacocinético do grupo a qual foi administrado o MEFAS tenha apresentado resultados bastante satisfatórios, houve uma nítida diferença nas concentrações plasmáticas para os três fármacos em estudo, quando comparadas com as concentrações obtidas para o grupo AS + MQ.

A quantidade de fármaco que chega à circulação é expressa pelo valor de ASC, através do gráfico de concentração plasmática versus tempo. A biodisponibilidade relativa (Fr) dos compostos do grupo MEFAS em relação ao grupo AS + MQ, foi calculada com base na equação a seguir.

$$Fr = (ASC_{MEFAS} / ASC_{AS+MQ}) \times (Dose_{AS+MQ} / Dose_{MEFAS})$$

$$\text{Para o artesunato: } Fr_{AS} = (6891,58/59742,59) \times (25/25)$$

$$Fr_{AS} = 0,1154 \text{ ou } 11,54 \%$$

$$\text{Para a dihidroartemisinina: } Fr_{DHA} = (4228,62/27289,31) \times (25/25)$$

$$Fr_{DHA} = 0,1550 \text{ ou } 15,50 \%$$

$$\text{Para mefloquina: } Fr_{MQ} = (3753816,52/2530305,05) \times (25/25)$$

$$Fr_{MQ} = 1,48 \text{ ou } 148 \%$$

Tendo em vista os resultados da biodisponibilidade relativa, pode-se observar que para o AS do MEFAS foi apresentada uma biodisponibilidade de apenas 11,54 % em comparação ao AS presente na associação AS + MQ. O DHA também apresentou uma biodisponibilidade inferior, sendo somente 15,50 % em relação ao grupo comparador. A MQ presente no MEFAS proporcionou uma biodisponibilidade de 148 %, sendo maior do que a do grupo comparativo.

A biodisponibilidade depende dos valores de área sob curva ( $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{0-\infty}$ ),  $C_{m\acute{a}x}$  e  $T_{m\acute{a}x}$ , e representa a exposição do organismo ao composto em relação ao tempo (STORPIRTIS, *et al.*, 2011). Tendo em vista essa definição, foi analisado que o grupo AS + MQ teve uma biodisponibilidade significativamente maior tanto para o artesunato quanto para dihidroartemisinina em comparação ao grupo MEFAS. Para a mefloquina ocorreu o inverso, houve uma absorção consideravelmente maior no grupo MEFAS do que no grupo AS + MQ.

Os resultados para o  $T_{m\acute{a}x}$  do artesunato e do DHA para o grupo MEFAS e o grupo AS + MQ foram próximos. O esperado era que seu tempo máximo do DHA fosse maior do que o do seu pró-fármaco. Uma possível explicação para esse resultado do grupo MEFAS é que na análise de teor do MEFAS realizado no SEFAR foi constatada a presença de uma pequena percentagem de DHA no sal (dados não mostrados) que provavelmente proporcionaram sua absorção junto com a absorção do artesunato.

No estudo realizado por Olliaro e colaboradores (2010) foi constatado que os derivados de artemisinina possuem sua eficácia terapêutica associada à curta meia vida de eliminação, ao passo que a mefloquina no tratamento tem como relevância a extensão de sua absorção. Tais características podem ser observadas no presente estudo quando os perfis farmacocinéticos de artesunato e dihidroartemisinina são comparados com a mefloquina tanto no grupo MEFAS quanto no grupo AS + MQ, pois o artesunato e a dihidroartemisinina apresentaram concentrações plasmáticas, tempos máximos e tempos de meia vida de eliminação muito inferiores aos da mefloquina. Em relação à extensão da absorção da mefloquina, isso pode ser explicado devido a sua extensa circulação entero-hepática e por isso seus níveis plasmáticos sejam tão superiores quando comparados com os outros dois compostos (GOODMAN & GILMAN, 2012).

A grande diferença das concentrações plasmáticas máximas e dos valores de ASC para os três ativos nos dois grupos estudados excluiu qualquer possibilidade de bioequivalência.

Olliaro e colaboradores (2010) realizaram um estudo comparativo de biodisponibilidade entre artesunato e mefloquina administrados separadamente e ambos em associação de comprimidos em dose fixa. Os resultados apresentados em seu trabalho foram semelhantes com o estudo em questão, pois tanto artesunato quanto dihidroartemisinina e mefloquina apresentaram parâmetros farmacocinéticos consideravelmente distintos, comprovando que as duas formulações não eram bioequivalentes.

Diante dos parâmetros farmacocinéticos dos grupos MEFAS e AS + MQ não serem equivalentes e apresentarem resultados distintos, algumas hipóteses para tal acontecimento foram levantadas.

Ainda não foi realizado um estudo de formulação para o MEFAS, tendo somente como objeto de estudo o seu IFA, por conta disso, para que a comparação farmacocinética fosse realizada de forma fidedigna, optou-se por trabalhar somente com os IFAs de artesunato e mefloquina no grupo AS + MQ, excluindo qualquer tipo de ação de excipientes no processo de absorção dos fármacos. Sabe-se que excipientes utilizados em formas farmacêuticas orais sólidas podem exercer influência na biodisponibilidade dos fármacos, uma vez que podem alterar a velocidade e a extensão de absorção (PESSANHA et al., 2012).

Durante a coleta sanguínea a ingestão de água para os animais normalmente é liberada após duas horas da administração do fármaco. No entanto, quando o composto apresenta características hidrofóbicas e é solubilizado ou suspenso em veículo não aquoso, a ingestão de água pode causar precipitação do fármaco no trato gastrointestinal, reduzindo assim sua extensão de absorção (STORPIRTIS et al., 2011).

Essa hipótese torna-se oportuna uma vez que o MEFAS por não apresentar solubilidade em água precisou de uma suspensão em base oleosa e que a ingestão de água não tivesse sido liberada aos animais após duas horas de experimento.

Cabe ressaltar, que os outros dois grupos (controle e AS + MQ) também foram submetidos aos mesmos processos. Outra hipótese a ser levantada é que a base oleosa pode ter dificultado a dissociação das moléculas de artesunato e de mefloquina presentes no MEFAS, prejudicando a dissolução de artesunato e conseqüentemente sua absorção e absorção da dihidroartemisinina no organismo dos animais. O mesmo não foi observado no grupo AS + MQ, pois os fármacos nesse grupo já se encontravam em sua forma livre não havendo problemas quanto à dissociação e nem quanto à dissolução.

Arelado a isso, outro fator não excludente é o processo de síntese do MEFAS no momento da ligação da molécula de mefloquina com o artesunato. Embora tenham sido realizados testes prévios de teor (dados não mostrados), indicando a presença das duas moléculas e sua dissociação em meio aquoso. Algum processo *in-vivo* pode estar ocorrendo para que sua farmacocinética seja diferente em relação aos ativos administrados em doses separadas. A baixa absorção de artesunato e de dihidroartemisinina provenientes do MEFAS também pode estar ocorrendo devido ao limitado tempo de trânsito do fármaco no trato gastrointestinal, por ser um composto com característica hidrofóbica sua velocidade de dissolução pode ser limitada o que inviabiliza sua completa dissolução e absorção (TOZER & ROWLAND, 2009).

Uma maneira de melhorar a dissolução do MEFAS seria desenvolver uma formulação capaz de liberar o fármaco lentamente no estômago, aumentando o tempo de dissolução do sal antes de entrar na porção intestinal, favorecendo assim o aumento de sua biodisponibilidade. Além disso, faz-se necessário ensaios de perfil de dissolução a fim de identificar qual é o melhor pH e sítio de absorção do fármaco (TOZER & ROWLAND, 2009).

Embora a biodisponibilidade relativa do artesunato e da dihidroartemisinina presentes no novo composto tenham sido de apenas 11,54 % e 15,50 %,

respectivamente, não se pode atestar que o MEFAS não é eficaz ao tratamento da malária, sendo inferior à associação dos fármacos em separado. Existem testes de eficácia *in vivo* constatando que o novo fármaco possui maior eficiência na redução dos parasitos circulantes no sangue além de uma elevada taxa de sobrevivência dos animais após tratamento, sendo somente equiparado ao grupo que recebeu apenas mefloquina (VAROTTI et al., 2008). Esses resultados corroboram a biodisponibilidade relativa obtida para mefloquina no grupo MEFAS, uma vez que seu valor foi de 148 %, levantando a hipótese de que a mefloquina seja o composto ativo de maior relevância terapêutica presente no sal e até mesmo no esquema de comprimidos de dose fixa combinada de ASMQ, pois o esquema de dose é de 100 mg de artesunato e 220 mg de mefloquina.

Em vista disso, é fundamental um estudo farmacocinético em modelo humano, para uma melhor predição da farmacocinética. Vale ressaltar que a condução de estudos pré-clínicos podem não ser preditivos em relação à eficácia do metabolismo dos fármacos em organismo humano, não só pela diferença das espécies, mas também pelo ajuste de doses (STORPIRTIS et al., 2011).

## 5 CONCLUSÃO

Os objetivos deste projeto foram atingidos com êxito uma vez que foi desenvolvido um método bioanalítico inédito para a quantificação simultânea dos três ativos presentes no novo antimalárico através da técnica de CLAE-EM/EM.

O desenvolvimento de um método bioanalítico e cromatográfico preciso e robusto permitiu que a validação bioanalítica fosse conduzida de forma adequada, respeitando as diretrizes da ANVISA presentes na RDC Nº 27 de 17 de maio de 2012.

Além disso, pôde-se conduzir um estudo pré-clínico capaz de fornecer parâmetros farmacocinéticos bem definidos para os três compostos presentes no sal MEFAS e comparar seu perfil farmacocinético com o perfil dos fármacos artesunato e mefloquina em associação, já indicados como tratamento para malária.

Entretanto, ainda é necessário que seja desenvolvida uma formulação para o novo fármaco capaz de aprimorar sua farmacocinética e que mais estudos pré-clínicos e até mesmo em humanos sejam realizados para melhor compreender o mecanismo de absorção do MEFAS.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de boas práticas em biodisponibilidade e bioequivalência. Volume I. Brasil, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC N° 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasil, 2012.

ASHLEY, A.E.; LWIN, M.K.; MCGREADY, R.; SIMON, W.H.; PHAIPHUN, L.; PROUX, S.; WANGSEANG, N.; TAYLOR, W.; STEPNIIEWSKA, K.; NAWAMANEERAT, W.; THWAI, L.K.; BAREND, M.; LEOWATTANA, W.; OLLIARO, P.; SINGHASIVANON, P.; WHITE, J.N.; NOSTEN, F. An open label randomized comparison of mefloquine-artesunate as separate tablets vs. a new co-formulated combination for the treatment of uncomplicated multidrug-resistant falciparum malaria in Thailand. *Tropical Medicine and International Health*. v. 11. n. 11, p. 1653-1660, 2006.

BALINT, A.G. Artemisinin and its derivatives an important new class of antimalarial agents. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 90, p. 261-265, 2001.

BRASIL. Portal da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – DATASUS, 2014. Disponível em: <<http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&server=srvbipdf03&project=DMMalaria&uid=convitado&pwd=datasus&hiddensections=header,path,dockTop,dockLeft,footer>>. Acesso em 03 de junho de 2015.

BRASIL. Portal da Saúde – SUS. Ministério da Saúde, Brasília, março de 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11342-descricao-da-doenca>>. Acesso em 20 de outubro de 2016.

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

BRASIL. Caderno de atenção básica, Vigilância em saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose. *Ministério da Saúde*, Brasília, 2008. 2ª Edição. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cab\\_n21\\_vigilancia\\_saude\\_2ed\\_p1.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cab_n21_vigilancia_saude_2ed_p1.pdf)> Acesso em 20 de outubro de 2016.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Medicamentos, Brasília, maio de 2001. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_medicamentos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_medicamentos.pdf)>. Acesso em 20 de outubro de 2016.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho. Terceira edição. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

COUTINHO, J.P.; ALMELA, M.J.; BLANCO, C.M.; HERREROS, E.; SÁ, P.M.; BOECHAT, N.; KRETTLI, A.U. Transmissio blocking potential PF MEFAS, a hybrid compound derived from artesunate and mefloquine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016.

CUNICO, W.; CARVALHO, A.S.; GOMES, R.B.C.; MARQUES, H.G. Fármacos antimalariais – história e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmácia*. n. 89. p. 49-55, 2008.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases initiative. Disponível em: <<http://www.dndi.org/treatments/asmq/product-profile.html>>. Acesso em 23 de agosto de 2015.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases initiative. ASMQ Press Pack, 2012. Disponível em: <[http://www.dndi.org/images/pdf/ASMQ-PressPack\\_ENG\\_Final\\_revised\\_reduced.pdf](http://www.dndi.org/images/pdf/ASMQ-PressPack_ENG_Final_revised_reduced.pdf)>. Acesso em 15 de setembro de 2016.

DUFFY, E.P.; MUTABINGWA, K.T. Drug combinations for malaria: time to ACT. *THE LANCET*. v. 363, 2004.

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

FIOCRUZ. Agência FIOCRUZ de notícias, Rio de Janeiro, setembro de 2013. Disponível em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/mal%C3%A1ria>>. Acesso em 20 de outubro de 2014.

FLANNERY, L.E.; CHATTERJEE, K.A.; WINZELER, A.E.. Antimalarial drug Discovery – approaches and progress towards new medicines. *Nature Reviews*. v. 11, p. 849-862, 2013.

GEDITZ, M.C.K.; HEINKELE, G.; AHMED, A.; KREMSNER, P.G.; KERB, R.; SCHWAB, M.; HOFMAN, U. LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of artesunate and its metabolites dihydroartemisinin and dihydroartemisinin glucuronide in human plasma. *Analytical Bioanalysis Chemistry*. n. 406, p. 4299-4308, 2014.

GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. Décima segunda edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HURST, S.; LOI, M.C.; BRODFUEHRER, J.; KATTAN, E.A. Impact of physiological, physicochemical and biopharmaceutical factors in absorption and metabolism

mechanisms on the drug oral bioavailability of rats and humans. *Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology*. n. 3. v. 4. p. 469-489, 2007.

JULLIEN, V.; VALECHA, N.; SRIVASTAVA, B.; SHARMA, B.; KIECHEL, J.R. Population pharmacokinetics of mefloquine, administered as fixed-dose combination of artesunate-mefloquine in Indian patients for the treatment of acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria Journal*. n.13, 2014.

KREMSNER, G.P.; KRISHNA, S. Antimalarial combinations. *THE LANCET*. v. 364, 2004.

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

LI, B.; ZHANG, J.; ZHOU, X.Z.; LI, J.Y.; YANG, Y.J.; WEI, X.J.; NIU, J.R.; LIU, X.W., LI, J.S.; ZHANG, J.Y. Determination and pharmacokinetic studies of artesunate and its metabolite in sheep plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. v.997, p. 146-153, 2015.

LINDEGARDH, N.; DONDORP, A.M.; SINGHASIVANON, P.; WHITE, N.J.; DAY, N.P.J. Validation and application of a liquid chromatographic-mass spectrometric method for determination of artesunate in pharmaceutical samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. n. 45, p. 149-153, 2007.

MAGALHÃES, I.R.S.; BONATO, P.S. Liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the enantioselective analysis of mefloquine in plasma samples. n. 48, p. 929-936, 2008.

MAKULA, A.; MADDELA, R.; PILLI, N.A.R.; RAVI, V.B.; ADIREDDY, V. Simultaneous determination of artesunate and amodiaquine in human plasma using LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v. 7, n. 12, 2015.

MANNEMALA, S.S.; NAGARAJAN, J.S.K. Development and validation of a generic liquid chromatographic method for the simultaneous determination of five commonly used antimalarial drugs; Application to pharmaceutical formulations and human plasma. *Journal of Separation Science*. n. 38, p. 1521-1528, 2015.

NAIK, H.; MURRY, D.J.; KIRSCH, L.E.; FLECKENSTEIN, L. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy assay for determination of artesunate and dihydroartemisinin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. n. 816, p. 233-242, 2005.

NOGUEIRA, F.H.A. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação dos antimaláricos artesunate e mefloquina. 2013. 172 f. Tese

(Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

NUNES, I.K.C. A importância do estudo do metabolismo nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos. *Revista Virtual de Química*. v. 7. n. 7. p. 649-662, 2015.

OLLIARO, P.; RAMANATHAN, S.; VAILLANT, M.; REUTER, E.S.; EVANS, M.A.; KRUDSOOD, S.; LOOAREESUWAN, S.; KIECHEL, J.R.; TAYOR, R.J.W.;

NAVARATNAM, V. Pharmacokinetics and comparative bioavailability of artesunate and mefloquine administered separately or as a fixed combination product to healthy volunteers and patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. v. 2, p. 59-66, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Guidelines for the treatment of malaria – third edition 2015. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/> > Acesso em 15 de setembro de 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The World Malaria Report 2014. Disponível em: < [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/)> Acesso em 15 de setembro de 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *The World Malaria Report*, 2013. Disponível em: < [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013/report/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/)> Acesso em 15 de setembro de 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *The World Malaria Report 2008*. Disponível em: < <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/>>. Acesso em 15 de setembro de 2016.

PESSANHA, A.F.; ROLIM, L.A.; PEIXOTO, M.S.; SILVA, R.M.F.; NETO, P.J.R. Influência dos excipientes multifuncionais no desempenho dos fármacos em formas farmacêuticas. *Brazilian Journal of Pharmacy*. n. 93, p. 136-145, 2012.

SCHLAGENHAUF, P.; ADAMCOVA, M.; REGEF, L.; SCHAERER, T.M.; RHEIN, H. The position of mefloquine as a 21st century malaria chemoprophylaxis. *Malaria Journal*. p. 357-371, 2010.

SINGH, S.S. Preclinical pharmacokinetics: An approach towards safer and efficacious drugs. *Current Drug Metabolism*. n. 7. p. 165-182, 2006.

SMITHUIS, F.; KYAW, K.M.; PHE, O.; WIN, T.; AUNG, P.P.; PHYO, P.A.; NAING, L.A.; NYO, Y.M.; MYINT, Z.H.N.; IMWONG, M.; ASHLEY, E.; JLEE, S.; WHITE, N. Effectiveness of five artemisinin combination regimens with or without primaquina in uncomplicated *falciparum* malaria: an open-label randomized trial. *THE LANCET*. v. 10. p. 673-681, 2010.

STORPIRTIS, S.; GAI, M.N.; CAMPOS, D.R.; GONÇALVES, J.E. Farmacocinética Básica e Aplicada. Primeira edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.  
TIMOTHY, N.C.W.; ALONSO, L.P.; GUTTERIDGE, E.W. New medicines to improve contro and contribute to the eradication of malaria. *Nature Reviews*. v.8, p. 879-891, 2009

TOZER, T.N.; ROWLAND, M. Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica. Primeira edição. Porto Alegre. Artmed: 2009.

YADAV, S.S.; SHAH, J.V.; SHAH, P.A.; PATEL, P.; PATEL, M.C.; SHRIVASTAV, P.S. Simultaneous Quantification of artemether and its active metabolite dihydroartemisinin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Science – Q*. v.3, 2015.

VAROTTI, F.P.; BOTELHO, A.C.C.; ANDRADE, A.A.; DE PAULA, R.C.; FAGUNDES, E.M.S.; VALVERDE, A.; MAYER, L.M.U.; MENDONÇA, J.S.; SOUZA, M.V.V.; BOECHAT, N.; KRETTLI, A.U. Synthesis, Antimalarial Activity, and Intramolecular Targets of MEFAS, a New Hybrid Compound Derived from Mefloquine and Artesunate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. n. 11. v. 52, p. 3868-3874, 2008.

XING, J.; YAN, H.; WANG, R.; ZHANG, L.; ZHANG, S. Liquid chromatography – tandem mass spectrometry assay for the quantification of  $\beta$ -dihydroartemisinin in rat plasma. *Journal of Chromatography b*. v. 852, p. 202-207, 2007.

ANEXO I: CERTIFICADO PADRÃO MEFLOQUINA



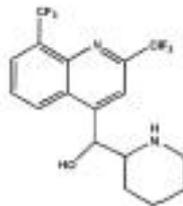
U.S. Pharmacopeia  
The Standard of Quality™

# USP Certificate

---

## Mefloquine Hydrochloride

LOT FIJ249



**Molecular Formula**  
**C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>F<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O · HCl**

**Molecular Weight**  
**414.77**

**CAS Number**  
**51773-92-3**

---

**LABEL TEXT**

Lot No.: FIJ249

**USP REFERENCE STANDARD**

**MEFLOQUINE HYDROCHLORIDE 500 mg**

Warning: Harmful if inhaled. Harmful if swallowed. Causes serious eye irritation.

See safety. For quantitative applications, use a value of 2.00 mg of mefloquine hydrochloride per mg of material on the scale basis. Keep container tightly closed. Protect from light.

USP, 2801 Terrell Park, Rockville, MD • 1-800-451-0800  
Call for 1125500 Material Safety Information  
[www.usp.com/usp\\_nfp/usp\\_monographs](http://www.usp.com/usp_nfp/usp_monographs)

Do not use if you notice any changes in appearance or color. Do not use if you notice any changes in odor or taste. Do not use if you notice any changes in texture or consistency. Do not use if you notice any changes in the container or packaging.

Use only cotton or a well-ventilated area. Avoid breathing dust. Use fresh air after handling. Use suitable protection. If swallowed, call a poison center (800) 762-4661. If you feel unwell, rinse mouth. If inhaled, remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a poison center (800) 762-4661. If in eyes, flush immediately with water for several minutes. Remove contact lenses. If contact continues, do not continue using. If you have any doubts, get medical advice instantly. Dispose of contents and container as instructed on the label.

---

*Jeri L. Joth*

*QA Director*

Page 1 of 2

1-Jul-14

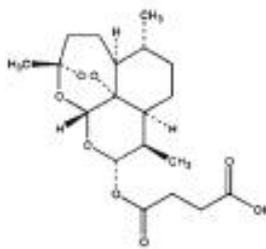
ANEXO II: CERTIFICADO PADRÃO ARTESUNATO



U.S. Pharmacopeia  
The Standard of Quality™

# USP Certificate

**Artesunate**  
**LOT FIL256**



**Molecular Formula**

**C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>**

**Molecular Weight**

**384.42**

**CAS Number**

**88495-63-0**

**LABEL TEXT**

**USP REFERENCE STANDARD**  
**ARTESUNATE 200 mg**



Warning: Harmful if swallowed. Suspected of damaging fertility or the unborn child.

Do not dry. For quantitative applications, use a value of 3.887 mg of artesunate per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light. Store in a refrigerator.

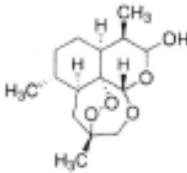
USP 13821 Timberlake Place, Rockville, MD, +1(301)881-0888  
CAT No. 194350 Material info in China  
**Intentionally over labeled for USP compliance**

For use with USP Reference Standard for Artesunate, USP  
see USP General Chapter <232> for details. © 2015 USP  
All rights reserved. USP is a registered trademark of the United States Pharmacopeial Convention, Inc.

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wash thoroughly after handling. Wear protective gloves/protective clothing/protective footwear. If swallowed: Call a poison center/doctor if you feel unwell. Please notify if respiratory concerned. Use medical observation. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

*Jeri L. Joth*  
Quality Assurance

## ANEXO III: CERTIFICADO PADRÃO DIHIDROARTEMISININA

SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup>		sigmaaldrich.com	
		3850 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA	
		Website: <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>	
		Email USA: <a href="mailto:techserv@sigmaaldrich.com">techserv@sigmaaldrich.com</a>	
		Outside USA: <a href="mailto:eurotechserv@sigmaaldrich.com">eurotechserv@sigmaaldrich.com</a>	
<b>Certificate of Analysis</b>			
Product Name: Dihydroartemisinin - mixture of $\alpha$ and $\beta$ isomers			
Product Number:	DT439		
Batch Number:	SLBG8320V		
Brand:	FLUKA		
MDL Number:	MFCDD0274495		
Formula:	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>		
Formula Weight:	284.35 g/mol		
Storage Temperature:	Store at 2 - 8 °C		
Quality Release Date:	05 JUN 2013		
Test	Specification	Result	
Appearance (Color)	White	White	
Appearance (Form)	Powder	Powder	
Solubility (Color)	Colorless	Colorless	
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear	
10 mg/mL, Acetone			
Proton NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms	
Purity (TLC)	> 97 %	100 %	
			
Rodney Berbeck, Manager Analytical Services St. Louis, Missouri US			
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at <a href="http://Sigma-Aldrich.com">Sigma-Aldrich.com</a> . For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.			
Version Number: 1	Page 1 of 1		

## ANEXO IV: CERTIFICADO CARBAMAZEPINA

	Ministério da Saúde <b>FIOCRUZ</b> Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
<b><i>CERTIFICADO</i></b>		
<b>SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA DA FARMACOPEIA BRASILEIRA <i>SQRFB</i></b>		
<b>carbamazepina</b>		
Lote 2038		
<b>Descrição:</b> pó cristalino branco.		
<b>Teor:</b> 99,7%, calculado em relação à substância tal qual, determinado por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.		
<b>Armazenamento:</b> conservar o frasco bem fechado, protegido da luz e em refrigerador (em temperatura entre 2°C e 8°C).		
	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	

## ANEXO V: CERTIFICADO PADRÃO ARTESUNATO

	Ministério da Saúde <b>FIOCRUZ</b> Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
<b>INFORME TÉCNICO</b>		
SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA		
<b>Artesunato</b>		
lote 1085		
<p><b>Descrição:</b> pó fino, cristalino, branco ou quase branco.</p>		
<p><b>Uso pretendido:</b> a Substância Química de Referência da Farmacopeia Brasileira artesunato se destina exclusivamente ao uso em ensaios analíticos descritos conforme a monografia, e não deve ser utilizada para consumo humano ou animal. Os riscos e eventuais consequências pelo uso inadequado desta substância são de responsabilidade do usuário.</p>		
<p><b>Condições de manipulação e armazenamento:</b> não dessecar antes do uso. Manter o frasco bem fechado, protegido da luz e na temperatura entre 2 °C e 8 °C.</p>		
<p><b>Teor: 99,1%,</b> calculado em relação à substância tal qual, determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).</p>		
<p><b>Período de validade:</b> não é estabelecida uma validade à Substância Química de Referência artesunato, lote 1085, porque a mesma será monitorada a intervalos apropriados. Verificar, antes do uso, se o lote da substância é o corrente na página <a href="http://www.incqs.fiocruz.br">http://www.incqs.fiocruz.br</a></p>		
	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	
<small>A Substância Química de Referência artesunato, lote 1085, foi estabelecida pela Farmacopeia Brasileira e oficializada pela Resolução ADC nº 54/ANVISA de 08-Dic-2015.</small>		
Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil Tel (21) 3865-6151 Fax (21) 2290-0915		<a href="http://www.incqs.fiocruz.br">www.incqs.fiocruz.br</a>