

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

Ricardo Luiz do Nascimento Maranhão

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA CONTROLE DE  
QUALIDADE DE COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA DE LIBERAÇÃO  
IMEDIATA DA ASSOCIAÇÃO ARTEMÉTER/LUMEFANTRINA**

Rio de Janeiro

2023

Ricardo Luiz do Nascimento Maranhão

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA CONTROLE DE  
QUALIDADE DE COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA DE LIBERAÇÃO  
IMEDIATA DA ASSOCIAÇÃO ARTEMÉTER/LUMEFANTRINA

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora: Dra. Mychelle Alves Monteiro

Preceptora: Patrícia Condé de Lima

Rio de Janeiro

2023

## Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Maranho, Ricardo Luiz do Nascimento

Desenvolvimento de método de dissolução para controle de qualidade de comprimidos de dose fixa combinada de liberação imediata da associação arteméter/lumefantrina. / Ricardo Luiz do Nascimento Maranhão. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2023.

92 f. : fig. ; graf. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2023.

Tutora: Mychelle Alves Monteiro.

Preceptora: Patrícia Condé de Lima.

1. Vigilância Sanitária. 2. CLAE-UV. 3. Dissolução. 4. Arteméter.  
5. Lumefantrina. I. Título.

**Development of dissolution method for quality control of artemether/lumefantrine immediate release fixed dose tablets.**

Ricardo Luiz do Nascimento Maranhão

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA CONTROLE DE  
QUALIDADE DE COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA DE LIBERAÇÃO  
IMEDIATA DA ASSOCIAÇÃO ARTEMÉTER/LUMEFANTRINA

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: 13/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Silvana do Couto Jacob  
FIOCRUZ/INCQS

Dra. Livia Deris Prado  
FIOCRUZ/Farmanguinhos

Dra. Soraya de Mendonça Ochs  
FIOCRUZ/INCQS

Dra. Mychelle Alves Monteiro - Tutora  
FIOCRUZ/INCQS

MSc. Patrícia Condé de Lima - Preceptora  
FIOCRUZ/INCQS

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dalvir e Maria, por terem acreditado nesta etapa da minha vida mais do que eu mesmo acreditei que era possível de alcançar.

Ao meu companheiro, Felipe, mesmo quilômetros de distância e momentos difíceis de saudade, todos os dias era você a primeira pessoa com quem eu queria compartilhar os meus sentimentos e essa força me trouxe até aqui.

À minha tutora, Mychelle Alves, pelos puxões de orelha e conversas despretensiosas no laboratório, você será sempre um exemplo de chefia e, principalmente, de pessoa.

À minha preceptora e *segunda-mãe*, Patrícia Condé, desde o primeiro dia de residência me levou pela mão e me guiou, literalmente, pelo novo mundo que era o Rio de Janeiro, obrigado por todo o apoio, risadas, ensinamentos profissionais, de vida e financeiros.

À Sthefany, apesar da adição tardia na equipe do laboratório, desde sempre uma grande amiga e exemplo, obrigado pelas aulas de veganismo e política e por acreditar no meu potencial.

Aos colegas de laboratório, Anna Sophia, Dani, Manu e Matheus, por terem sido grandes amigos e imensas companhias na época em que tudo era novo e desbravávamos a química analítica no laboratório.

Ao restante da Sala 113 - Bianca, Thiago, Soraya, Carol Ribeiro, Carol Volpe, Dani Rachidi, Beatriz, Laís, Rebeca, Patrícia Machado, Tadeu e Guilherme – pelos momentos de risadas e aprendizado contínuo.

Aos amigos Hugo e Claudia por dividirem a residência – literal e figurativamente.

Ao INCQS por dar esta oportunidade única e incrível.

Ao Ministério da Saúde pela bolsa e pela amostra.

Ao SUS, por permitir que um trabalho tão importante como a vigilância sanitária impacte (positivamente) a vida de milhões de brasileiros.

Ao Rio de Janeiro, que apesar de todos os pesares, me ensinou muito.

## RESUMO

A malária é uma doença parasitária causada pelos protozoários do gênero *Plasmodium* spp. que atingiu 241 milhões de pessoas e causou 627 mil mortes no mundo todo em 2020, com mais de 95% de casos e óbitos sendo registrados na região da África Subsaariana. A pessoa acometida pode apresentar desde sintomas leves, como febres, calafrios e mal-estar geral, até injúrias renais, problemas de coagulação e vir a óbito. Para evitar as complicações da doença, é necessário um diagnóstico rápido para identificar a espécie do parasita e guiar o tratamento medicamentoso. Contudo, outra preocupação surge no contexto da malária: a existência de medicamentos falsificados ou subpadronizados que dificultam a cura e acarretam mortes evitáveis e perdas econômicas de milhões de dólares ao ano. Assim, o controle de qualidade destes medicamentos, papel chave da vigilância sanitária, é imprescindível para garantir a procedência dos produtos disponibilizados e utilizados nos diferentes programas de atenção a malária. A associação entre arteméter e lumefantrina, utilizada como primeira linha de tratamento nas infecções pela espécie mais letal, *Plasmodium falciparum*, apresenta monografia oficial apenas na Farmacopeia Internacional, porém, o ensaio de dissolução, importante teste de performance da formulação do comprimido, não é descrita. Dessa maneira, este trabalho buscou desenvolver um método de dissolução simultânea para o arteméter e lumefantrina a fim de aprimorar o controle de qualidade do produto. O trabalho foi dividido em duas etapas: desenvolvimento do método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrofotometria no ultravioleta, pela avaliação de diferentes fases móveis, colunas cromatográficas, fluxos e comprimentos de onda; e desenvolvimento da etapa da dissolução, com avaliação de diferentes meios de dissolução e agitação. Ao final, os melhores resultados foram obtidos em meio de pH 1,2 contendo 1% de polissorbato 80 (p/v) com aparato pás sob agitação de 75 rpm para a dissolução, e fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 3,4, eluição por gradiente, fluxo de 1,0 mL/min, detecção em 210 nm, coluna C18 (*Symmetry*®, 250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) e corrida de 25 minutos no método de análise. Nessas condições, estimou-se que pelo menos 80% do arteméter e 70% de lumefantrina estivessem dissolvidos no meio, em 60 e 90 minutos de ensaio, respectivamente. As perspectivas futuras envolvem a validação do método, a avaliação do seu poder discriminativo e a

aplicabilidade em diferentes produtos de diferentes fabricantes para a sua inclusão em compêndios oficiais.

Palavras-chave: Malária. Vigilância Sanitária. Medicamentos. Dissolução. Arteméter. Lumefantrina. CLAE-UV.

## ABSTRACT

Malaria is a disease caused by parasite from the *Plasmodium* spp. Genus affecting 241 million people and causing 627 000 deaths worldwide in 2020, more than 95% of cases and deaths occurring in Sub-saharan Africa. The symptoms vary from mild ones, such as fevers, shaking chills and general malaise, to kidney injuries, coagulation problems and eventually it leads to death. To reduce complications of the disease, it is required a fast diagnostic to identify the parasite species and to guide the pharmaceutical treatment. However, there is another major concern in malaria context: the existence of falsified and substandard medicines that hamper cure and causes preventable deaths and economic losses reaching millions of dollars per year. Thus, quality control of such products, key role of sanitary surveillance, is essential to guarantee the origin of these medicines offered and used by various malaria control programs. The association of artemether and lumefantrine, first-line treatment for infections by the deadliest parasite species, *Plasmodium falciparum*, is a matter of subject on official monographs only in the International Pharmacopoeia, but dissolution procedures, an important assay for tablet formulation performance, are missing. So, the aim of this work was to develop a simultaneous dissolution procedure for artemether and lumefantrine to improve the product's quality control. It is divided in two steps: development of a quantification method by high efficiency liquid chromatography with spectrophotometric detection in the ultraviolet region, testing different mobile phases, chromatographic columns, flow rates and wavelengths; and development of the dissolution step, testing different mediums and agitation speed. The best results were obtained in pH 1.2 with 1.0% polysorbate 80 (w/v) medium using paddle method at 75 rpm for the dissolution step, and mobile phase composed by acetonitrile and pH 3.4 phosphate buffer, gradient elution, flow rate of 1.0 mL/min, detection at 210 nm, C18 column (Symmetry®, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm particle size) and 25 minutes runtime. Under these conditions, it was estimated that at least 80% of artemether and 70% of lumefantrine were dissolved in the dissolution medium, after 60 and 90 minutes, respectively. Future plans are the method validation, evaluating its discriminative power and its applicability on different products by different manufacturers, so it can be included in official pharmacopoeias.

Keywords: Malaria. Sanitary Surveillance. Medicines. Dissolution. Artemether.  
Lumefantrine. HPLC-UV.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico da malária (em inglês).....	17
Figura 2 - Distribuição mundial da malária: a) casos estimados em 2020; b) mortes estimadas em 2020 .....	19
Figura 3 – Estrutura química do arteméter.....	23
Figura 4 - Estrutura química da lumefantrina.....	23
Figura 5 - Mecanismo proposto para alquilação do heme pelo arteméter (em inglês) .....	25
Figura 6 – Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:triethylamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,0 mL/min, com foco no pico do arteméter.....	47
Figura 7 - Cromatograma obtido em coluna LiChrosorb®, FM composta por ACN:triethylamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,0 mL/min, com foco no pico da lumefantrina.....	48
Figura 8 - Cromatograma obtido em coluna ACE C18, FM composta por ACN:triethylamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,0 mL/min .....	49
Figura 9 - Comparação de cromatogramas em coluna ACE C18, com FM composta por ACN:ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,0 mL/min .....	50
Figura 10 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:triethylamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min .....	51
Figura 11 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min.....	52
Figura 12 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (60:40 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min.....	52
Figura 13 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:tampão fosfato (55:45 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min .....	53
Figura 14 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:tampão fosfato (75:25 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min .....	54
Figura 15 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:tampão fosfato (70:30 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min .....	54
Figura 16 - Comparação dos cromatogramas de amostra em diferentes comprimentos de onda (210, 216 e 218 nm).....	60
Figura 17 - Espectros UV/visível de soluções de P80 em diferentes concentrações	62

Figura 18 - Cromatogramas obtidos em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:tampão fosfato em modo gradiente (Gradiente 1), fluxo de 1,0 mL/min .....	63
Figura 19 - Comparação de injeções do Gradiente 4 em dois dias diferentes .....	64
Figura 20 - Cromatogramas de três injeções do Gradiente 1, obtidas em coluna Symmetry®, fluxo de 1,0 mL/min, em uma mesma sequência .....	65
Figura 21 - Cromatogramas de três injeções do Gradiente 2, obtidas em coluna Symmetry®, fluxo de 1,0 mL/min, em uma mesma sequência .....	65
Figura 22 - Cromatogramas de três injeções do Gradiente 4, obtidas em coluna Symmetry®, fluxo de 1,0 mL/min, em uma mesma sequência .....	65
Figura 23 - Cromatogramas de três injeções do Gradiente 5, obtidas em coluna Symmetry®, fluxo de 1,0 mL/min, em uma mesma sequência .....	66
Figura 24 - Cromatograma no Gradiente 7, obtido em coluna Symmetry(®), fluxo de 1,0 mL/min.....	67
Figura 25 - Cromatograma no Gradiente 9, obtido em coluna Symmetry(®), fluxo de 1,0 mL/min.....	67
Figura 26 - Cromatograma no Gradiente 11, obtido em coluna Symmetry(®), fluxo de 1,0 mL/min.....	68
Figura 27 - Perfil de dissolução de arteméter e lumefantrina em meio de dissolução pH 1,2 + 1% de P80 (p/v), pás, 75 rpm .....	72
Figura 28 - Perfil de dissolução de arteméter e lumefantrina em meio de dissolução pH 1,2 + 0,1% de P80 (p/v), pás, 75 rpm .....	72
Figura 29 - Perfil de dissolução de arteméter e lumefantrina em meio de dissolução pH 1,2 + 0,25% de P80 (p/v), pás, 75 rpm .....	73
Figura 30 - Perfil de dissolução de arteméter em meio de dissolução pH 1,2 + 0,5% de P80 (p/v) e pH 1,2 + 1,0% de P80 (p/v), pás, 100 rpm.....	74
Figura 31 - Perfil de dissolução de lumefantrina em meio de dissolução pH 1,2 + 0,5% de P80 (p/v) e pH 1,2 + 1,0% de P80 (p/v), pás, 100 rpm.....	75
Figura 32 - Comparação dos cromatogramas para a) meios de dissolução pH 1,2 + 0,5% P80 (p/v) e pH 1,2 + 1,0% P80 (p/v); b) amostra dissolvida nos meios de dissolução pH 1,2 + 0,5% P80 (p/v) e pH 1,2 + 1,0% P80 (p/v), pás, 100 rpm .....	77
Figura 33 - Comparação dos cromatogramas para os meios pH 4,5 + 1,0% de P80 (p/v) e pH 4,5 + 1,0% de LSS (p/v), picos 1-4 representam a lumefantrina .....	78
Figura 34 - Comparação dos cromatogramas para os meios pH 6,8 + 1,0% de P80 (p/v) e pH 6,8 + 1,0% de LSS (p/v), picos 1-3 representam a lumefantrina.....	78

Figura 35 - Comparação dos cromatogramas obtidos nos meios pH 1,2 + 1,0% de P80 (p/v), pH 4,5 + 1,0% de P80 (p/v) e pH 6,8 + 1,0% de P80 (p/v) .....	79
Figura 36 - Comparação dos cromatogramas diferentes meios: a) 1,0% de P80 (p/v) nos pH 1,2, 4,5 e 6,8; b) 1,0% de LSS (p/v) nos pH 4,5 e 6,8.....	80

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Propriedades físico-químicas do arteméter e da lumefantrina .....	23
Quadro 2 - Presença de monografias referentes a artemeter e lumefantrina em diferentes farmacopeias .....	28
Quadro 3 - Parâmetros e condições testadas no desenvolvimento da etapa de quantificação.....	37
Quadro 4 - Condições para avaliação dos perfis de dissolução em cada meio .....	411
Quadro 5 - Condições cromatográficas para quantificação de arteméter e lumefantrina em diferentes trabalhos e na Farmacopeia Internacional .....	46
Quadro 6 - Condição final do gradiente do método cromatográfico desenvolvido ....	69
Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método de quantificação para o arteméter.....	55
Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método de quantificação para a lumefantrina .....	56
Tabela 3 - Valores médios de área e tempo de retenção para o arteméter e lumefantrina em diferentes comprimentos de onda.....	61
Tabela 4 - Resultados obtidos nos testes de perfil de dissolução, em cada condição, considerando a porcentagem de fármaco dissolvida em cada tempo de coleta.....	76

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
%v/v	Volume por volume por cento
±	Mais ou menos
ACN	Acetonitrila
ACT	<i>Artemisinin-based Combination Therapy</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ART	Arteméter
°C	Graus Celsius
C18	Sílica ligada a grupos octadecilsilano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ED	Edição
FM	Fase móvel
FC	Fator de cauda
g	Gramas(s)
g/mol	Gramas(s) por mol
HCl	Ácido clorídrico
IFA	Insumo(s) Farmacêutico(s) Ativo(s)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<i>k</i>	Fator de retenção cromatográfico
Kg	Quilograma(s)
Kgf/cm <sup>2</sup>	Quilograma-força por centímetro quadrado
LogP	Coeficiente de partição
LSS	Laurilsulfato de sódio
LUM	Lumefantrina
mg	Miligramas(s)
mg/mL	Miligramas(s) por mL
mL	Mililitro(s)
mL/min	Mililitro(s) por minuto
mV	Milivolt(s)
min	Minuto(s)
mm	Milímetro(s)

N	Normal
Nº	Número
nm	Nanômetro(s)
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação ácida
p/v	Peso por volume
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparim</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
P80	Polissorbato 80
PT	Pratos teóricos
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
rpm	Rotações por minuto
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
TR	Tempo de retenção
USP	Farmacopeia Americana
US\$	Dólar americano
UV	Ultravioleta
µg/mL	Micrograma(s) por mL
µm	Micrômetro(s)
µL	Microlitro(s)
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1</b>	<b>Malária</b> .....	16
<b>1.2</b>	<b>Tratamentos antimaláricos</b> .....	21
1.2.1	Combinação de artemeter e lumefantrina .....	211
1.2.1.1	<i>Características físico-químicas dos princípios ativos</i> .....	22
1.2.1.2	<i>Farmacocinética</i> .....	22
1.2.1.3	<i>Farmacodinâmica</i> .....	24
<b>1.3</b>	<b>Controle de qualidade de medicamentos</b> .....	25
1.3.1	Falsificação de medicamentos antimaláricos .....	25
1.3.2	Vigilância sanitária de medicamentos .....	26
1.3.3	Controle de qualidade de comprimidos de artemeter-lumefantrina .....	27
1.3.4	Ensaio de dissolução .....	28
1.3.4.1	<i>Dissolução de comprimidos de artemeter + lumefantrina</i> .....	30
<b>1.4</b>	<b>Justificativa do trabalho</b> .....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	33
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	33
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	34
<b>3.1</b>	<b>Amostragem</b> .....	34
<b>3.2</b>	<b>Equipamentos, materiais e reagentes</b> .....	34
3.2.1	Equipamentos .....	34
3.2.2	Materiais e reagentes .....	35
3.2.3	Substâncias Químicas de Referência .....	35
<b>3.3</b>	<b>Desenvolvimento da etapa de quantificação</b> .....	36
3.3.1	Soluções e reagentes .....	37
3.3.1.1	<i>Preparo da solução padrão de arteméter e lumefantrina</i> .....	37
<u>3.3.1.1.1</u>	<u>Preparo do íon par reagente</u> .....	38
3.3.1.2	<i>Preparo da solução padrão de arteméter</i> .....	38
3.3.1.3	<i>Preparo das soluções amostra</i> .....	38
3.3.1.4	<i>Preparo da solução de trietialmina 0,5% (v/v) para fase móvel</i> .....	39
3.3.1.5	<i>Preparo da solução de ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) para fase móvel</i> .....	39

3.3.1.6	<i>Preparo da solução tampão fosfato de potássio para fase móvel</i> .....	39
<b>3.4</b>	<b>Desenvolvimento da etapa de dissolução</b> .....	39
3.4.1	Avaliação da solubilidade dos princípios ativos .....	40
3.4.2	Curvas de dissolução .....	40
3.4.3	Soluções utilizadas no desenvolvimento da dissolução .....	42
3.4.3.1	<i>Preparo dos meios contendo tampão pH 1,2</i> .....	42
<u>3.4.3.1.1</u>	<u>Preparo da solução de cloreto de potássio 0,2 mol/L</u> .....	42
<u>3.4.3.1.2</u>	<u>Preparo da solução de ácido clorídrico 0,2 mol/L</u> .....	42
3.4.3.2	<i>Preparo dos meios contendo tampão pH 4,5</i> .....	43
<u>3.4.3.2.1</u>	<u>Preparo da solução de hidróxido de sódio 25% (p/v)</u> .....	43
3.4.3.3	<i>Preparo dos meios contendo tampão pH 6,8</i> .....	43
<u>3.4.3.3.1</u>	<u>Preparo da solução de fosfato de potássio 0,2 mol/L</u> .....	43
<u>3.4.3.3.2</u>	<u>Preparo da solução de fosfato de sódio 0,2 mol/L</u> .....	43
<u>3.4.3.3.3</u>	<u>Preparo da solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L</u> .....	43
<b>3.5</b>	<b>Critérios de aceitação</b> .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
4.1	Otimização do método de quantificação .....	45
4.2	Desenvolvimento da etapa de dissolução .....	69
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	82
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		83
<b>APÊNDICE A - MEIOS DE DISSOLUÇÃO AVALIADOS ANTERIORMENTE NA LITERATURA COM A SOLUBILIDADE MÉDIA ESTIMADA EM µg/mL</b> .....		89
<b>APÊNDICE B - CONDIÇÕES GRADIENTES AVALIADOS NO TRABALHO</b> .....		91

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Malária

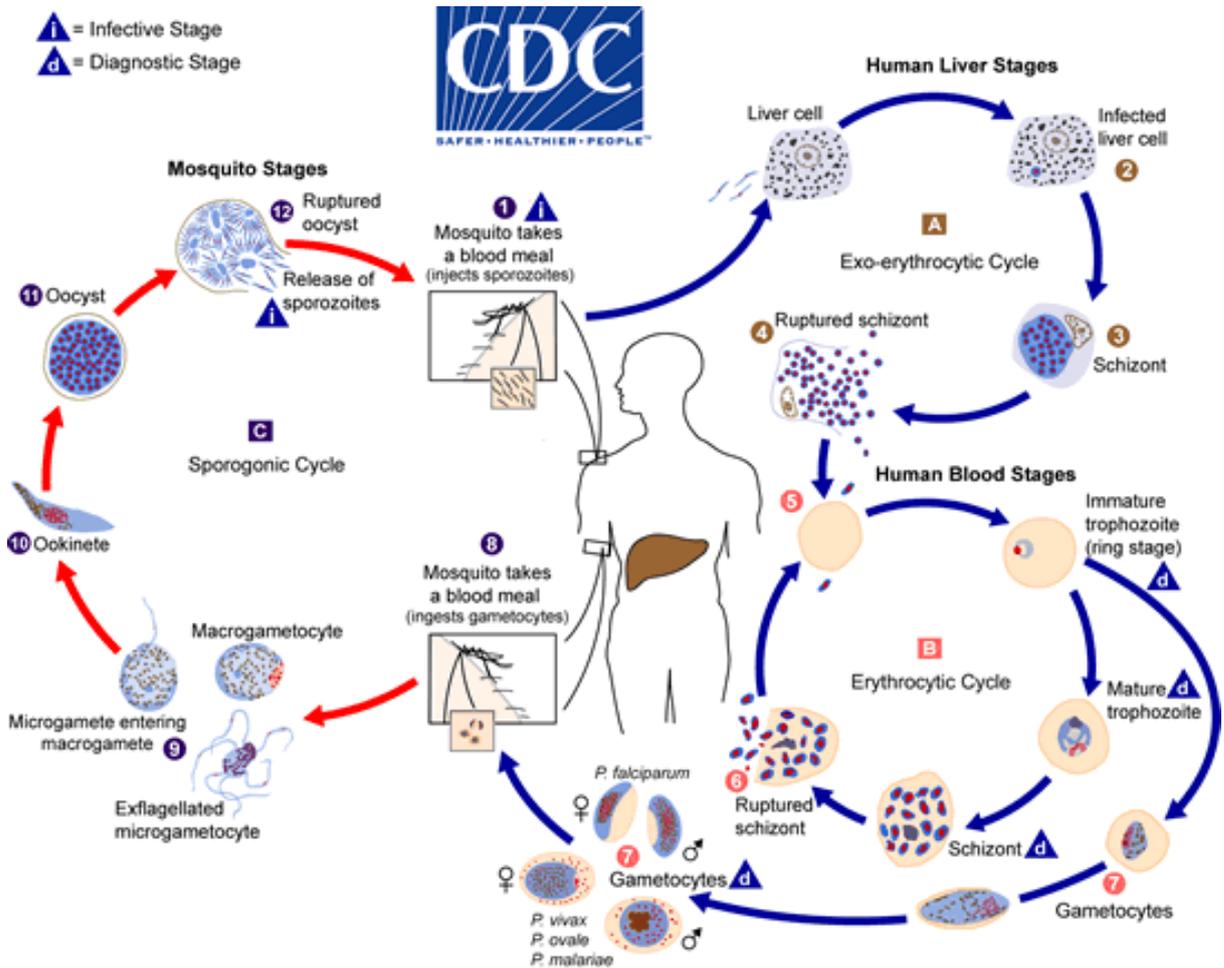
A malária é uma doença parasitária causada pelos protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitida através das picadas de fêmeas do mosquito *Anopheles* infectadas quando estas fazem a colheita de sangue para sua alimentação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022a).

Embora existam dezenas de espécies de *Plasmodium*, apenas cinco são capazes de infectar humanos (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2022a). O *P. falciparum* é o parasita mais letal e o mais prevalente no continente africano, enquanto o *P. vivax* é encontrado em outros países fora da África Subsaariana (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022a).

O ciclo do parasita é complexo e está esquematizado na Figura 1. A infecção tem início quando um mosquito contaminado injeta esporozoítos do parasita, que migram da derme para o fígado. Nos hepatócitos, se multiplicam e caem na corrente sanguínea, onde os agora chamados merozoítos invadem as hemácias e passam por um novo ciclo de multiplicação. O eritrócito, após alguns dias, se rompe, liberando novos merozoítos que vão infectar novas hemácias e assim o ciclo continua. Alguns parasitos se diferenciam nessa etapa, tornando-se indivíduos sexualmente distintos em fêmeas e machos; esses gametócitos são infectantes para o mosquito e são ingeridos pelo *Anopheles*. No hospedeiro intermediário, o parasita passa por novas diferenciações e quando esse mosquito realiza a próxima colheita de sangue, o ciclo se inicia em um novo hospedeiro humano. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O desenvolvimento do parasita nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para *P. falciparum* e *P. vivax*, e para esta espécie, alguns parasitos entram em um estado de latência – os hipnozoítos -, e são responsáveis pela recaída da doença “geralmente dentro dos seis primeiros meses após o tratamento, mesmo sem nova picada do mosquito ou ida do indivíduo à área endêmica” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021, p. 18).

Figura 1 - Ciclo biológico da malária (em inglês)



Fonte: CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2022a.

Os sintomas são observados na fase sanguínea e geralmente aparecem em cerca de 10 dias depois da picada do mosquito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022a). Quando o parasita se desenvolve no interior da hemácia, vários produtos do metabolismo são produzidos, como o pigmento hemozoína, e se acumulam na célula infectada; com o seu rompimento, as toxinas e pigmentos são lançados na corrente sanguínea, estimulando uma resposta imunológica exacerbada que gera a febre e os outros sintomas fisiopatológicos da malária (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2022b). Essa resposta cíclica se repete a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

As manifestações clínicas da malária são divididas em não complicadas e complicadas e “o quadro clínico da malária depende da espécie do parasito, da

quantidade de parasitos circulantes (parasitemia), do tempo de doença e do nível de imunidade adquirida pelo paciente” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021, p. 19).

A crise aguda da malária é caracterizada por episódios de calafrio, febre e sudorese, numa duração de 6 a 12 horas com uma temperatura igual ou superior a 40 °C. Geralmente cefaleia, dores musculares, náuseas e vômitos são observados em conjunto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

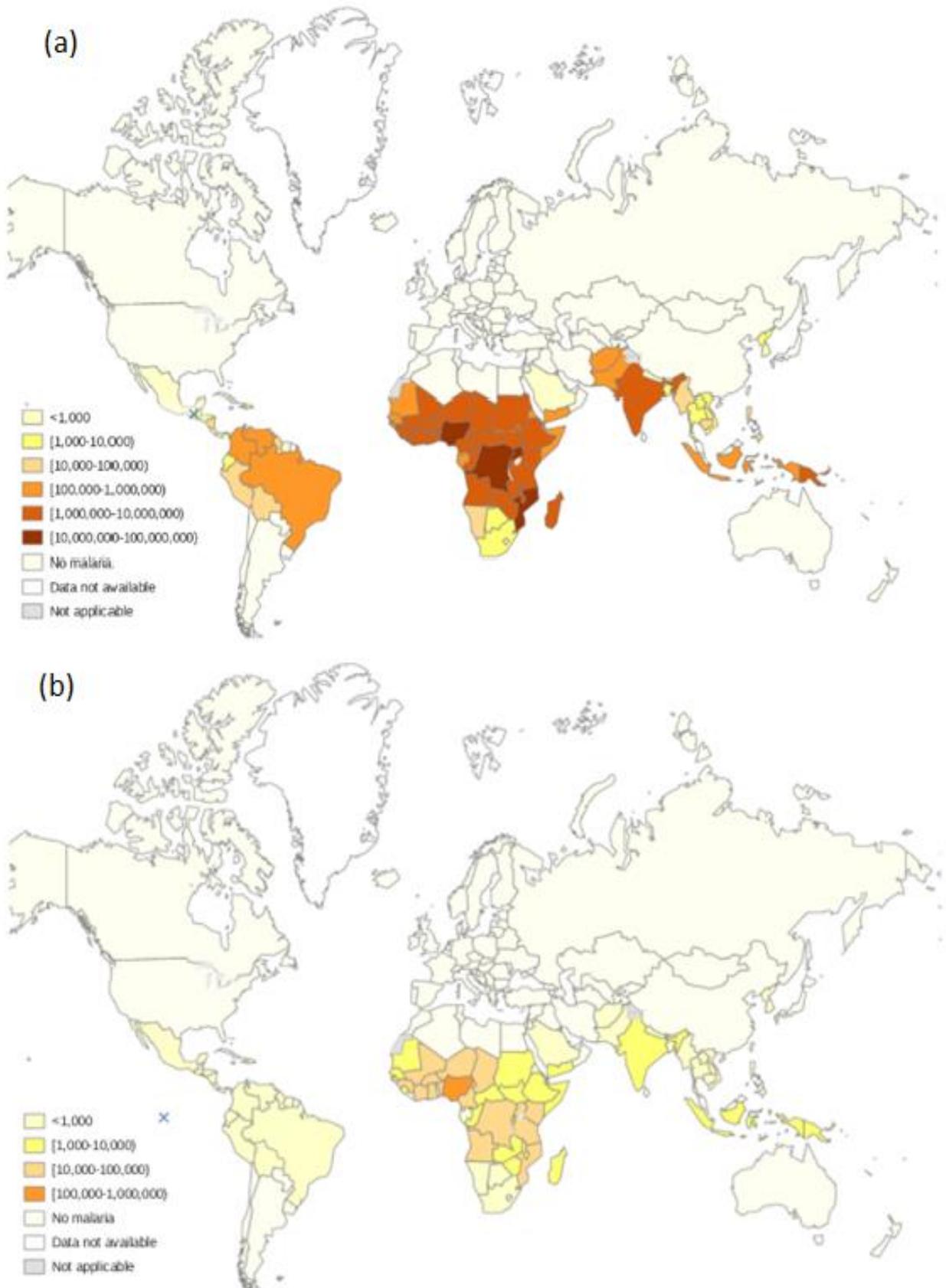
As manifestações mais graves envolvem sinais e sintomas como dor abdominal intensa – associada com a ruptura do baço por *P. vivax* -, icterícia, distúrbios de coagulação, hemoglobinúria (hemoglobina na urina) e anemia, falta de ar por síndrome do estresse respiratório agudo, injúrias renais, extremidades azuladas, acidose metabólica, convulsões e desorientação (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2022b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Considerando que tais sintomas e sinais não são específicos, podendo ser confundidos com outras doenças febris como dengue, Chikungunya, zika vírus, febre amarela, gripes e infecções urinárias, o Ministério da Saúde (2021) recomenda que o diagnóstico diferencial seja baseado com a confirmação laboratorial, auxiliando na decisão do tratamento.

O diagnóstico confirmatório da malária se baseia no método microscópico, que permite a observação dos parasitos no sangue, e até mesmo a diferenciação das espécies e ciclos evolutivos do agente etiológico. Em condições de campo, pode-se utilizar testes diagnósticos rápidos, que tem como princípio a imunocromatografia e permitem diagnósticos entre 15 e 20 minutos. Apesar de mais rápidos e de fácil execução, os testes rápidos não são capazes de avaliar o nível de parasitemia (ao contrário do método microscópico) e não são recomendados para acompanhamento clínico do paciente, já que o seu resultado não diferencia parasitos viáveis (que podem invadir hemácias e serem observados em uma extensão sanguínea) de parasitos não viáveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Os indicadores epidemiológicos da malária demonstram uma incidência de 59 casos por 1000 indivíduos sob risco e uma taxa de mortalidade de 15,3 mortes por 100 mil indivíduos sob risco e em 2020, as estimativas giravam em torno dos 241 milhões de casos e 627 mil mortes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021). A Figura 2 retrata a distribuição geográfica mundial da malária.

Figura 2 - Distribuição mundial da malária: a) casos estimados em 2020; b) mortes estimadas em 2020



Fonte: Adaptado de ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022b.

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2021), grande parte da carga da doença é proveniente de países com moderada a alta transmissão na África Subsaariana: dos 85 países nos quais a malária é endêmica, 29 deles eram responsáveis por 96% dos casos e mortes, e 80% das mortes na região foram de crianças abaixo dos 5 anos de idade. Mais da metade dos casos se concentram na

Fonte: adaptado de ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022b.

Nigéria, República Democrática do Congo, Uganda, Moçambique e Angola. A mortalidade por malária nestes países, mais os registros oriundos da República Unida da Tanzânia – o segundo país com mais mortes pela doença -, representam quase 60% das notificações de óbito.

A situação nas Américas é extremamente menor: 653 mil casos e 409 mortes foram registrados em 2020; tomando em conta as notificações para a África, esses valores são cerca de 35 vezes menores e mais de 1400 vezes menores, respectivamente.

Segundos dados do Ministério da Saúde do Brasil, foram notificados 145 mil casos da doença, tornando o país o segundo com maior incidência na região (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021). Quase a totalidade da transmissão ocorre na região amazônica, onde a situação se desdobra com 80% do total dos casos se concentrando em 33 municípios, embora casos e mortes tenham sido notificados em outras regiões. Cerca de 1% das notificações ocorrem na região extra-amazônica, mas apesar disso, há uma maior preocupação por atraso no diagnóstico e no tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

O controle dos casos e mortalidade por malária, no Brasil, é de responsabilidade do Programa Nacional de Controle da Malária, do Ministério da Saúde, que traz como meta a eliminação da doença no país até 2035, e enquanto as metas adotadas pela OMS para 2020 não foram atingidas em sua maior parte na África, a organização visualiza reduções em ambos os indicadores, apesar de haver um longo caminho para a erradicação da malária na região (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021).

## 1.2 Tratamentos antimaláricos

De acordo com a definição da espécie de *Plasmodium*, o tratamento da malária se baseia em três pontos chave: interrupção da fase sanguínea; destruição dos hipnozoítos; e interrupção do desenvolvimento de gametócitos, impedindo a transmissão. Dessa maneira, em infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, que apresentam formas latentes, a terapia se baseia em cloroquina para as formas circulantes, e os derivados de 8-aminoquinolina contra os hipnozoítos, como a primaquina no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Embora existam dezenas de classes terapêuticas, nenhuma é capaz de matar a forma esporozoíto, de maneira que só é possível tratar a infecção após o ciclo eritrocitário, e nenhum fármaco sozinho é eficaz contra todos os estágios hepáticos e intraeritrocíticos, fazendo com que a associação entre fármacos seja necessária (VINETZ *et al.*, 2012).

Dessa forma, a terapia combinada dos derivados de artemisinina (do inglês *Artemisinin-based Combination Therapy, ACT*) é tida como primeira linha de tratamento para infecções não complicadas por *P. falciparum*; mas uma vez observados os sinais e sintomas de malária complicada, a recomendação passa a ser o derivado de artemisinina por via intravenosa até a estabilização do paciente para então administrar o ACT por via oral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022c).

Os ACT são prescritos em um regime posológico que considera um papel inibidor maior dos componentes de artemisinina, permitindo que a atividade do princípio ativo combinado seja efetivo e haja menor resistência contra ambos pelo parasita (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022c). Os regimes ACT atuais incluem artemeter-lumefantrina, artesunato-mefloquina, artesunato-amodiaquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina e dihidroartemisinina-piperaquina (VINETZ *et al.*, 2012).

### 1.2.1 Combinação de artemeter e lumefantrina

A associação artemeter-lumefantrina é indicada para os casos em que há resistência parasitária à cloroquina (NOVARTIS, 2013; VINETZ *et al.*, 2012). As doses posológicas são determinadas de acordo com a idade e peso do paciente,

com crianças menores de 6 meses e 5 quilogramas (kg) recebendo um comprimido por vez, até adultos com 120 kg, aos quais se administram quatro comprimidos por vez, e o esquema terapêutico considera um ciclo de três dias, com duas administrações ao dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Os comprimidos em geral se apresentam na dose de 20 mg de artemeter e 120 mg de lumefantrina, embora haja apresentações com 80 mg/480 mg; há sempre uma proporção fixa de 1:6 dos dois fármacos (NOVARTIS, 2013).

#### *1.2.1.1 Características físico-químicas dos princípios ativos*

O artemeter é um derivado metil éster semissintético da artemisinina, caracterizado por um endoperóxido de uma lactona sesquiterpênica (VINETZ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2019). O fármaco é oriundo da planta *Artemisia annua*, conhecida como absinto doce ou *qing hao*. O conhecimento das propriedades da planta remonta da Medicina Tradicional Chinesa há mais de 2000 anos (VINETZ *et al.*, 2012), mas é a partir da década de 1970 que os estudos contemporâneos se voltam para a droga, liderados pela cientista chinesa Tu Youyou (WANG *et al.*, 2019).

A lumefantrina é um composto aril amino álcool, e é a função alcoólica a possível responsável pelos efeitos terapêuticos. Além disso, a presença da hidroxila cria um centro quiral e forma dois enantiômeros: (+)-lumefantrina e (-)-lumefantrina; que possuem a mesma potência e, portanto, permitem o uso da mistura racêmica (VERBEKEN *et al.*, 2011; VINETZ *et al.*, 2012). As propriedades físico-químicas principais dos dois compostos estão descritas no Quadro 1 e as estruturas químicas representadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

#### *1.2.1.2 Farmacocinética*

O artemeter é absorvido rapidamente, atingindo o seu pico plasmático em 2 horas com uma alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas. Após um considerável metabolismo de primeira passagem, é metabolizado no composto ativo dihidroartemisinina pela enzima CYP3A4.

A eliminação também ocorre rapidamente, dando um tempo de meia-vida para os dois compostos de cerca de 2 horas; por isso se faz necessária a

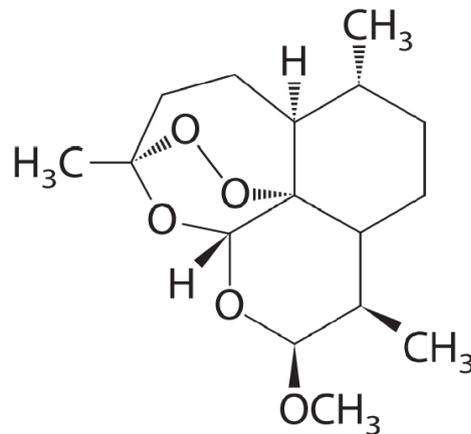
Quadro 1 - Propriedades físico-químicas do arteméter e da lumefantrina

Propriedade	Artemeter	Lumefantrina
Fórmula e peso molecular (g/mol)	$C_{16}H_{26}O_5$ ; 298,38 <sup>a</sup>	$C_{30}H_{32}Cl_3NO$ ; 528,90 <sup>b</sup>
Características físicas	Pó fino, cristalino e branco <sup>a</sup>	Pó cristalino e amarelo <sup>b</sup>
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em álcool etílico absoluto <sup>a</sup>	Praticamente insolúvel em água, solúvel em diclorometano, pouco solúvel em metanol <sup>b</sup>
Constante ácida (pKa)	-	8,73 e 13,49 <sup>c</sup>
Coeficiente de partição (LogP)	3,53 <sup>c</sup>	9,19 <sup>c</sup>

Fonte: O autor (2023).

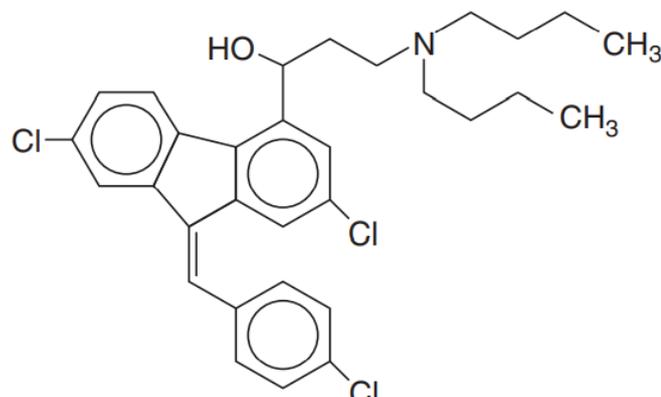
Legenda: aFARMACOPEIA, 2019a; bORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020a; cBELEW *et al.*, 2020.

Figura 3 – Estrutura química do arteméter



Fonte: Adaptado de VINETZ *et al.*, 2012.

Figura 4 – Estrutura química da lumefantrina



Fonte: Adaptado de VINETZ *et al.*, 2012.

associação com um fármaco parceiro de maior permanência que assegure a manutenção da atividade antimalárica e facilite a adesão terapêutica (NOVARTIS, 2013; VINETZ *et al.*, 2012). A lumefantrina passa a ser absorvida após um período de duas horas, atingindo sua concentração plasmática máxima em até 8 horas. Em quase sua totalidade é distribuída ligada às proteínas plasmáticas, garantindo um amplo volume de distribuição. O processo de biotransformação em humanos é baixo, o que pode justificar o seu longo tempo de meia-vida que pode chegar há mais de cinco dias (NOVARTIS, 2013; VINETZ *et al.*, 2012).

### 1.2.1.3 Farmacodinâmica

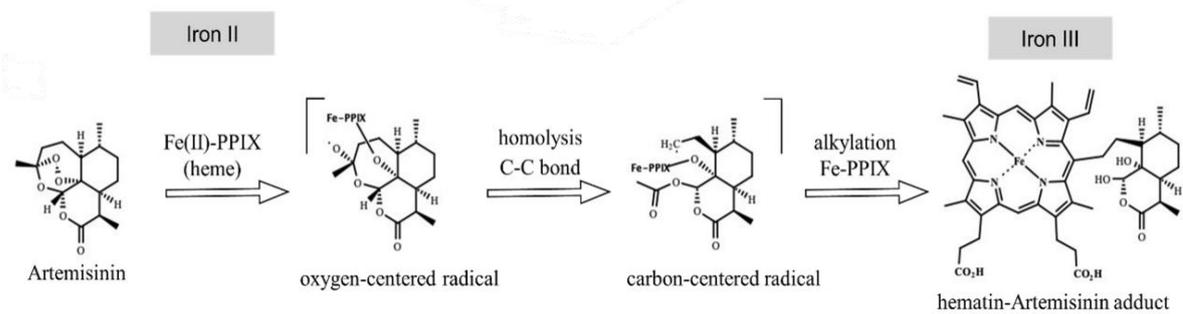
A hemoglobina humana é composta por uma parte proteica (a *globina*) e um complexo molecular que abriga íons de ferro, os quais ligam o oxigênio e o dióxido de carbono da respiração (o *heme*) (VANDERESSE *et al.*, 2016).

No processo de degradação da globina, há a liberação dos grupos heme com íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e, se não estabilizados, estes produtos podem formar espécies reativas de oxigênio que acarretam peroxidação lipídica e desestabilização de membranas biológicas (VANDERESSE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019). A detoxificação ocorre com a oxidação do ferro II a ferro III, formando o composto hematina; em seguida, duas unidades de hematina fazem uma ligação cruzada e formam um dímero, que dá início ao processo de bio-cristalização - uma espécie de polimerização - até o pigmento não tóxico hemozoína (QUADROS *et al.*, 2022; VANDERESSE *et al.*, 2016).

Os mecanismos de ação atribuídos aos princípios ativos não são totalmente evidenciados, mas atribui-se ao artemeter uma ativação pela clivagem da ponte peróxido pelo íon ferroso do heme. Os oxigênios expostos, então, desencadeiam processos de alquilação (Figura 5) e impedem a estabilização em hemozoína; outro mecanismo proposto considera a produção de radicais livres que degradam proteínas e outras biomoléculas nas células parasitadas (VINETZ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2019).

A lumefantrina tem um mecanismo de ação semelhante, formando adutos com a hematina e impedindo a formação de hemozoína (NOVARTIS, 2013; VERBEKEN *et al.*, 2011).

Figura 5 - Mecanismo proposto para alquilação do heme pelo arteméter (em inglês)



Fonte: Adaptado de QUADROS *et al.*, 2022.

### 1.3 Controle de qualidade de medicamentos

#### 1.3.1 Falsificação de medicamentos antimaláricos

Segundo a OMS (2021), entre 2010 e 2020, cerca de 2,4 bilhões de tratamentos de ACT foram vendidos para o setor público em países endêmicos. Quase toda a distribuição ocorreu na África Subsaariana, concentrada principalmente em seis países: Uganda, República Democrática do Congo, Nigéria, Moçambique, Burkina Faso e Quênia.

Infelizmente também, a maior parte dos medicamentos distribuídos na África não atende aos padrões de qualidade. A OMS reconhece a existência de produtos *subpadronizados*, aqueles que possuem autorização e não atingem os padrões de qualidade e as suas especificações; *medicamentos sem licença* que não possuem autorização das agências reguladoras; e *falsificados*, que deliberadamente alteram sua identidade, composição ou fonte (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017a).

O uso de medicamentos fora da especificação pode levar a altas taxas de falha terapêutica e auxiliar no desenvolvimento de parasitas resistentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022c), além de ocasionar óbitos evitáveis e perdas econômicas em países que já são subdesenvolvidos ou em desenvolvimento.

Diversos estudos descrevem o impacto desse cenário: entre 2001 e 2016, houve um incremento de 8,9% nas mortes em casos tratados na África Subsaariana (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017a). Jackson e colaboradores (2020) construíram uma simulação na qual eliminando todos os antimaláricos falsificados

na Zâmbia, US\$ 8,5 milhões seriam economizados e 213 crianças seriam salvas por ano; para Beargie e colaboradores (2019), o impacto econômico direto com a presença de tais produtos na Nigéria seria estimado em US\$ 892 milhões por ano, afetando até 13000 crianças; na Uganda, Evans e colaboradores (2019) consideram que melhorar a qualidade dos antimaláricos reduziria as mortes em 8,7%, enquanto tratamentos ACT dentro dos padrões diminuiriam o impacto econômico em 71,3%; fornecer tratamento padronizado no Congo resultaria em quedas de mais de 40% no impacto econômico e óbitos (OZAWA *et al.*, 2019).

A distribuição real de antimaláricos falsificados e subpadronizados – estimada em 20% - não é totalmente conhecida porque os dados são heterogêneos, dependendo fortemente de que haja relatos das agências reguladoras nacionais. Os dados atuais são influenciados largamente pelo fato do maior comprador de antimaláricos, o Fundo Global de Combate a AIDS, Tuberculose e Malária, avaliar rotineiramente a qualidade dos produtos disponíveis no mercado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017b).

### 1.3.2 Vigilância sanitária de medicamentos

A atuação do Fundo Global demonstra como uma busca ativa, através da vigilância pós-mercado, se mostra como uma importante tática para entender a prevalência de produtos fora de especificação, com análises laboratoriais sendo utilizadas para avaliar quais produtos são falsificados ou não, e os possíveis riscos aos quais os pacientes estão expostos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017a; REBIERE *et al.*, 2017).

No Brasil, esse papel de prevenção, diminuição e eliminação dos riscos à saúde cabem à vigilância sanitária. As diversas ações de vigilância sanitária são coordenadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), instância federal máxima do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), mas são distribuídas também para os estados e municípios, com divisão das competências (BRASIL, 1990). Entre as atividades previstas na legislação, há o controle e fiscalização dos produtos.

O controle de qualidade em saúde é tido como um conjunto de medidas destinadas a verificar se tecnologias de saúde atendem aos padrões definidos,

satisfazendo às normas sanitárias, permitindo a correção de desvios (BRASIL, 1976; PORTELA, 2012).

O termo “controle” se refere a diversas intervenções realizadas pela vigilância sanitária para a fiscalização de produtos de interesse da saúde: desde a regulamentação, ao registro, às inspeções, até o monitoramento e controle laboratorial (SILVA, 2012).

As análises laboratoriais devem se ater a legislação, baseando-se principalmente em compêndios oficiais – as farmacopeias, que definem “as exigências mínimas de qualidade, autenticidade e pureza de insumos farmacêuticos, de medicamentos e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária” (FARMACOPEIA, 2019b). Nelas, as monografias estabelecem os ensaios mínimos estipulados para um produto, as metodologias e os critérios de aceitação para o fármaco e forma farmacêutica (SILVA, 2012)

Nesse contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), subordinado tecnicamente à Anvisa, atua no controle de qualidade de produtos “executando ações analíticas laboratoriais e desenvolvendo, adequando ou implantando metodologias analíticas para verificação da qualidade de produtos de saúde” (INCQS, 2022).

### 1.3.3 Controle de qualidade de comprimidos de artemeter-lumefantrina

Dentre os possíveis ensaios físico-químicos que podem ser realizados em um comprimido, estão: determinação de peso, resistência mecânica através de friabilidade e dureza, desintegração, dissolução e uniformidade de doses unitárias, além dos ensaios de identificação e doseamento de princípios ativos e/ou substâncias relacionadas (FARMACOPEIA, 2019b).

Contudo, as farmacopeias, de uma maneira geral, não apresentam os critérios de qualidade para o arteméter e a lumefantrina. O Quadro 2 resume quais monografias estão presentes nos principais compêndios. É possível observar que a Farmacopeia Internacional é a referência que engloba mais monografias relevantes ao ACT, e a única com critérios específicos para comprimidos da associação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020b).

Os comprimidos dos antimaláricos estão satisfatórios ao cumprirem os requisitos gerais para comprimidos preconizados na monografia, com identificação

positiva de ambos os princípios ativos e cujas concentrações estejam entre 90,0% e 110,0% do valor declarado no rótulo; também é possível analisar as substâncias relacionadas A, B (arteminol), C e D ( $\alpha$ -arteméter) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020b).

Quadro 2 - Presença de monografias referentes a artemeter e lumefantrina em diferentes farmacopeias

Compêndio	Monografia
Farmacopeia Brasileira 6ª ED.	Matéria-prima Artemeter
	Artemeter, solução injetável
Farmacopeia Internacional 10ª ED	Matéria-prima Artemeter
	Matéria-prima Lumefantrina
	Artemeter, solução injetável
	Artemeter-Lumefantrina, pó para suspensão oral
Artemeter-Lumefantrina, comprimidos	
Farmacopeia Europeia 6ª e 8ª ED	-
Farmacopeia Britânica 2017, 2019 e 2020	-
Farmacopeia Americana, a partir da USP 37	Matéria-prima Lumefantrina
Farmacopeia Japonesa	-
Farmacopeia Chinesa 2015	Matéria-prima Arteméter Matéria-prima Lumefantrina Arteméter, cápsulas

Fonte: O autor (2023). Legenda: “-“ = informação não encontrada.

#### 1.3.4 Ensaio de dissolução

A dissolução em si é um processo de liberação do insumo farmacêutico ativo de sua forma farmacêutica, tornando-o disponível para absorção. Esse processo requer duas etapas: a liberação do fármaco pela desintegração do comprimido, seguida pela solubilização das partículas da substância ativa no meio líquido (ANVISA, 2021; BROWN *et al.*, 2004).

O ensaio de dissolução determina a quantidade de fármaco que solubiliza *in vitro*, permitindo avaliar o desempenho da formulação, a consistência da produção,

prever a biodisponibilidade dos princípios ativos e avaliar impactos da estabilidade do medicamento ou alterações farmacotécnicas ou do processo – estimando o seu efeito terapêutico (ANVISA, 2021; FARMACOPEIA, 2019b). Para Brown e colaboradores (2004), o ensaio deve ser discriminativo, isto é, ser sensível a mudanças nas características físicas do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), na proporção de excipientes e ativo, ou até mesmo efeitos do armazenamento. Para tal, o método deve ser adequado quanto a composição, pH e volume do meio de dissolução e tipo e velocidade de rotação do aparato (RIVELLI, 2016).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, um aparelho de dissolução é composto por três componentes: as cubas de vidro boro silicato que comportam o meio de dissolução; as hastes de aço inoxidável para realizar a agitação do meio e que encaixam os aparatos 1 (cestas) ou 2 (pás); e um motor que possibilita o ajuste da velocidade de rotação. Além disso, “as cubas são imersas em banho de água termostaticado, de material transparente e tamanho adequado, em que a temperatura seja mantida a  $(37 \pm 0,5)$  °C durante a execução do teste” (FARMACOPEIA, 2019b).

Os aparatos mais utilizados são as cestas (Método 1) e pás (Método 2). O procedimento geral consiste em adicionar o volume estabelecido na monografia de meio de dissolução, mantendo-o a 37 °C. Para o Método 1, adicionar o comprimido dentro da cesta seca; no método 2, colocar a amostra diretamente na cuba. A agitação deve ser iniciada imediatamente, na rotação pré-fixada. Transcorrido o intervalo de tempo descrito na monografia, alíquotas são retiradas e filtradas imediatamente. Após isso, a amostra pode ou não ser diluída e é quantificada; o resultado é expresso em porcentagem da dose declarada que foi liberada e dissolvida, respeitando um valor mínimo denominado *Valor Q* (FARMACOPEIA, 2019b).

Neste trabalho, entende-se como ensaio de dissolução, ou método de dissolução, um procedimento global composto pelas etapas de dissolução (considerada como o preparo de amostra) e a etapa de quantificação analítica (THE UNITED, 2021).

O "Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares" - nº 14/2018, da Anvisa, traz que deve-se primeiramente considerar os métodos disponibilizados em compêndios oficiais. Caso eles não sejam adequados para o produto em questão ou não exista um método oficial, como é o caso para a

associação de arteméter e lumefantrina, parte-se, então, para o desenvolvimento de um método interno. Tal desenvolvimento considera uma série de etapas e deve resultar em um método discriminativo, isto é, que seja capaz de "identificar variações que possam comprometer o desempenho de uma formulação definida, ou seja, do produto a ser comercializado" (ANVISA, 2021, p. 5).

#### 1.3.4.1 Dissolução de comprimidos de artemeter + lumefantrina

Em nenhuma monografia há descrição de uma metodologia para avaliar a dissolução do produto. Na literatura científica, três trabalhos trouxeram diferentes alternativas para essa questão.

Em 2011, Umapathi, Ayyappan e Darlin Quine desenvolveram um método para dissolução simultânea dos dois princípios ativos, utilizando um meio constituído por uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,005 mol/L com adição de *Myrj 52* (2% p/v), aparato 2 a 100 rpm. As amostras foram retiradas após 120 minutos e quantificadas através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV); a fase estacionária era uma coluna *Symmetry*®, da Waters, C18, de dimensões 250 mm x 4,6 mm, e a fase móvel foi preparada na proporção de 80:20 de acetonitrila (ACN) e solução tretilamina 0,5% (v/v). A detecção foi feita na região do ultravioleta (UV), no comprimento de onda 216 nm para ambas as substâncias.

Anos depois, Rivelli (2016) fornecia duas opções de método, um para cada princípio ativo. As melhores condições para o arteméter foram pás a 100 rpm em um meio contendo tampão pH 6,80 com laurilsulfato de sódio (LSS), e para a lumefantrina, pás a 100 rpm, no meio de pH 1,2 com 1% de polissorbatos 80 (P80). A quantificação feita por CLAE-UV, utilizava uma coluna C18 (250 mm x 4,0 mm) nos comprimentos de onda de 210 nm para o arteméter e 390 nm para a lumefantrina. No entanto, como o intuito da autora não era desenvolver uma metodologia voltada para um controle de qualidade farmacopeico, ela não indicou os valores de Q e tempo de coleta.

Considerando as metodologias dos autores anteriores, Belew e colaboradores (2020) indicaram uma metodologia única novamente, utilizando uma solução de 0,025 N de HCl com 1% (p/v) de *Myrj 52*, sob agitação de pás a 100 rpm. A quantificação foi feita por CLAE-UV, utilizando uma coluna Halo-RP-Amida (50 mm x

4,6 mm, partícula de 2,7  $\mu\text{m}$ ), fase móvel composta por acetonitrila:tampão fosfato (58:42, %v/v), e os comprimentos de onda de 210 nm e 335 nm para arteméter e lumefantrina, respectivamente. Após 60 minutos de dissolução, espera-se um  $Q \geq 80\%$ .

Os três autores divergem em diversos pontos. A etapa inicial de desenvolvimento de um teste de dissolução é a avaliação da solubilidade dos princípios ativos em diferentes meios – os resultados para cada autor e os meios utilizados podem ser vistos no Apêndice A. O método oficial para essa avaliação deve ser a agitação orbital em frasco, realizada apenas por Rivelli (2016) e Belew e colaboradores (2020); assim, os valores discrepantes entre estes trabalhos e a solubilidade determinada por Umapathi, Ayyappan e Darlin Quine (2011) são justificáveis. Porém, os outros dois autores utilizaram a mesma metodologia e, para alguns meios, obtiveram resultados totalmente distintos – por exemplo, no meio pH 6,8 + 1% LSS, Rivelli (2016) quantificou 3068  $\mu\text{g/mL}$  de artemeter, enquanto o outro grupo encontrou apenas 5  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 1.4 Justificativa do trabalho

Medicamentos falsificados são uma realidade no contexto da malária, encontrados em uma alta prevalência na África, mas presentes em todos os países do mundo, inclusive no Brasil. Um tratamento antimalárico de má qualidade pode acarretar falha terapêutica, danos à saúde para além da doença e impedir a cura, causando óbitos evitáveis, gastos desnecessários e facilitando o surgimento de parasitas resistentes que podem pôr em risco o arsenal medicamentoso.

Dessa maneira, um controle completo dos produtos, com a maior quantidade de ensaios possível é importante para atestar a qualidade do tratamento e diminuir os riscos associados aos medicamentos de baixa qualidade. Quantificar os princípios ativos e avaliar a uniformidade do conteúdo não é suficiente pois isso não garante a eficácia, visto que para um fármaco apresentar seu efeito terapêutico, ele necessita ser liberado da forma farmacêutica, tornando-se disponível para ser absorvido. Esse parâmetro é avaliado pelo ensaio de dissolução.

Como os trabalhos presentes na literatura apresentam divergências metodológicas, ou fazem uso de materiais e reagentes menos comuns (como o surfactante *Myrj 52* e a coluna Halo-RP-amida), há a necessidade do

desenvolvimento de um método de dissolução de arteméter e lumefantrina que se encaixe na rotina e realidade dos laboratórios de saúde pública.

O estabelecimento de um ensaio de dissolução simples, robusto e reprodutível para os antimaláricos pode resultar em procedimentos internos do próprio INCQS ou ainda ser incluído em monografias completas em farmacopeias. Assim, encerra-se a lacuna atualmente presente nos compêndios oficiais, podendo servir como base para o INCQS ofertar o serviço para países parceiros em programas de monitoramento, permitindo uma atuação chave da vigilância sanitária na prevenção dos danos à saúde advindos do uso de produtos inadequados.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Desenvolver um método de dissolução simultânea para o comprimido de dose fixa combinada de artemeter (20 mg) + lumefantrina (120 mg).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Otimizar um método cromatográfico com detecção espectrofotométrica para a quantificação dos princípios ativos artemeter e lumefantrina;
- Avaliar o perfil de dissolução do artemeter e da lumefantrina em diferentes meios de dissolução;
- Definir as condições adequadas para a dissolução simultânea de artemeter e lumefantrina;
- Estimar as porcentagens de fármaco dissolvida (valor Q) e tempo de coleta para artemeter e lumefantrina.

### 3 METODOLOGIA

A metodologia neste trabalho dividiu-se em duas etapas: 1) desenvolvimento do procedimento de quantificação e 2) desenvolvimento do procedimento de dissolução. Todos os experimentos foram realizados no Setor de Medicamentos do Departamento de Química do INCQS.

#### 3.1 Amostragem

A amostra utilizada nos estudos preliminares e na validação do método foi doada pelo Ministério da Saúde, a pedido de Farmanguinhos. O medicamento consistia em comprimidos da associação arteméter e lumefantrina, nas concentrações de 20 mg e 120 mg, respectivamente. O produto encontrava-se na validade e o comprimido foi caracterizado quanto aos ensaios de aspecto, peso médio e teor.

Análises fiscais foram realizadas em outras 10 amostras. Os produtos eram produzidos por 7 fabricantes diferentes, foram coletadas e enviadas ao INCQS por Moçambique para avaliação de aspecto, peso médio, identificação, teor, desintegração, uniformidade de conteúdo, encaminhadas com parte de um edital de prestação de serviços de controle de qualidade.

#### 3.2 Equipamentos, materiais e reagentes

##### 3.2.1 Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Shimadzu, composto por degaseificador DGU-14A, válvula para gradiente quaternário FCV-10ALvp, bomba LC-10ADvp, injetor automático SIL-20A, detector UV-VIS SPD-10Avp, controlador SCL-10Avp, software *Labsolutions®*;
- Destilador de água, fabricante Biopar, modelo BD10L;
- Banho ultrassônico, fabricante Branson, modelo 8510;
- Banho ultrassônico, fabricante Branson, modelo 2510;
- Sistema de purificação de água Milli-Q Integral 10;
- Balança microanalítica, fabricante Mettler Toledo, modelo XPR26DR;

- Balança semi-microanalítica, fabricante Mettler Toledo, modelo AG285;
- Balança semianalítica, fabricante Bel Engineering, modelo MARK3100;
- Bomba para vácuo, fabricante Biomec, modelo ECO-260-LAB/BC/Q;
- Medidor de pH, fabricante Mettler Toledo, modelo SevenExcellence;
- Aparelho de dissolução, fabricante Hanson Research, modelo SR8 Plus.

### 3.2.2 Materiais e reagentes

- Coluna cromatográfica *Lichrocart*®, *LiChrosorb*® RP-18, 250 mm x 4,0 mm, partículas de 5 µm, fabricante Supelco, lote 438219;
- Coluna cromatográfica *Symmetry*®, C18, 250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm, fabricante Waters, lote 0240392591;
- Coluna cromatográfica *Symmetry*®, C18, 250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm, fabricante Waters, lote 0250302741;
- Coluna cromatográfica *Lichrospher*®, RP-18, 250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm, fabricante Phenomenex, código 090958401;
- Coluna cromatográfica *ACE*, C18, 250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm, código V07-1155;
- Os reagentes utilizados eram grau para análise: ácido clorídrico, ácido trifluoroacético, cloreto de potássio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio monobásico monoidratado, hidróxido de sódio, lauril sulfato de sódio, polissorbato 80, propanol, trietilamina;
- Acetonitrila grau CLAE;
- Filtro para seringa marca Analítica, tipo PVDF, 25 mm de diâmetro, 0,45 µm;

### 3.2.3 Substâncias Químicas de Referência

- Material de Referência Certificado de Arteméter, fabricante Sigma-Aldrich, lote LRAC8127, código PHR3423-200MG;
- Material de Referência Certificado de Lumefantrina, fabricante Sigma-Aldrich, lote LRAC2238, código PHR2186-500MG.

### 3.3 Desenvolvimento da etapa de quantificação

A primeira etapa do trabalho avaliou a reprodutibilidade de métodos disponíveis na literatura para a quantificação de arteméter e lumefantrina, no Setor de Medicamentos do INCQS.

Pesquisou-se na base de dados *Scopus* trabalhos que fizessem referência aos princípios ativos e à técnica de CLAE. A partir dessa busca, foram encontradas cinco diferentes referências e, com base nelas, foram testadas colunas cromatográficas de fabricantes diferentes, com dimensões de 250 mm x 4,6 mm e partículas de 5 µm compactadas com octadecilsilano (C18), que fossem equivalentes ou correspondessem aos métodos dos trabalhos encontrados. A equivalência foi obtida através da base de dados intitulada *USP Column Equivalency Application*, produzida pela Farmacopeia Americana.

Avaliou-se o perfil cromatográfico de soluções padrão de arteméter e lumefantrina, solução padrão de arteméter e amostras em diferentes constituições de fase móvel: ACN:trietilamina 0,5% (80:20, %v/v), pH 3,00; ACN:ácido trifluoroacético 0,05% (80:20, %v/v), pH 2,35; ACN:tampão fosfato em diferentes proporções, pH 3,40, todas em condição isocrática inicialmente. Também foi verificada a resposta dos analitos em diferentes comprimentos de onda: entre 210 e 218 nm para o arteméter e lumefantrina, e 380 e 390 nm apenas para a lumefantrina. Um resumo descritivo pode ser observado no Quadro 3.

Os critérios utilizados para a definição de um método adequado para o intuito da análise foram: (1) manter o fator de cauda (ou assimetria) dos princípios ativos menores do que 3; (2) manter o fator de retenção entre 1 e 10; (3) manter valores de pratos teóricos maiores do que 1000; (4) manter a resolução entre os picos de interesse maior do que 1,5; (5) manter a resolução dos picos de interesse para outros picos do solvente/meio maiores do que 1,5; (6) resultar em tempos de retenção maiores do que o volume morto e menores do que 20 minutos.

A condição cromatográfica selecionada foi utilizada nos testes de desenvolvimento do procedimento de dissolução. Conforme o meio de dissolução foi aprimorado, foi necessário otimizar os parâmetros da corrida cromatográfica para separar o pico do arteméter de possíveis interferências de excipientes que eluíam na mesma região. Portanto, avaliou-se a necessidade e aplicabilidade de um modo gradiente; os métodos gradientes testados podem ser vistos no Apêndice B.

Quadro 3 – Parâmetros e condições testadas no desenvolvimento da etapa de quantificação

PARÂMETRO	CONDIÇÃO TESTADA
Coluna cromatográfica (C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	<i>Lichrosorb®</i>
	<i>Symmetry®</i>
	<i>Lichrospher®</i>
	<i>ACE C18®</i>
Solvente aquoso da fase móvel	Trietilamina 0,5% (v/v), pH 3,00
	Ácido trifluoroacético 0,05% (v/v), pH 2,35
	Fosfato de potássio pH 3,40
Comprimentos de onda (detecção)	ART: entre 210 e 218 nm
	LUM: 210-218, 380 e 390 nm

Fonte: O autor (2023).

### 3.3.1 Soluções e reagentes

#### 3.3.1.1 Preparo da solução padrão de arteméter e lumefantrina

A solução padrão utilizada foi preparada de acordo com a monografia oficial, brevemente: pesou-se cerca de 20 mg de arteméter e 120 mg de lumefantrina para balão de 100 mL, adicionando um volume de solvente (íon par reagente: água: propanol: acetonitrila (20:6:20:54, %v/v)) e levando a solução a banho ultrassônico por 20 minutos. Passado o tempo, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, avolumou-se com o mesmo solvente e filtrou-se por filtro PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros volumes do filtrado. A concentração final das substâncias nesta solução, portanto, era de 0,2 mg/mL para o arteméter e 1,2 mg/mL para a lumefantrina.

A partir dessa solução, foi preparada uma segunda solução nas concentrações de 0,02 mg/mL para arteméter e 0,12 mg/mL para lumefantrina, considerando estes valores como a concentração de trabalho teórica da dissolução,

através da diluição na proporção 1:10: 200 µL da solução foram transferidos para um microtubo contendo 1800 µL de ACN e misturou-se em vórtex.

#### 3.3.1.1.1 Preparo do íon par reagente

Cerca de 5,65 g de hexanosulfonato de sódio e 2,75 g de fosfato monobásico de sódio foram dissolvidos em água. O pH da solução foi ajustado para  $2,3 \pm 0,05$  usando ácido fosfórico. Avolumou-se para 1000 mL com água ultrapurificada e filtrou-se por filtro de PVDF 0,45 µm.

#### 3.3.1.2 *Preparo da solução padrão de arteméter*

A solução padrão de arteméter foi preparada seguindo a monografia da Farmacopeia Chinesa: cerca de 2 mg foram pesados e transferidos para balão de 10 mL, adicionou-se um volume de ACN e dissolveu-se o padrão sob banho ultrassônico. Após isso, avolumou-se com ACN.

A partir dessa solução, foi preparada uma segunda solução na concentração de 0,02 mg/mL através da diluição na proporção 1:10: 200 µL da solução foram transferidos para um microtubo contendo 1800 µL de ACN e misturou-se em vórtex.

#### 3.3.1.3 *Preparo das soluções amostra*

As amostras iniciais foram preparadas de acordo com a monografia oficial. Os comprimidos foram pesados e definiu-se o peso médio. Quantidade de pó equivalente a 20 mg de arteméter e 120 mg de lumefantrina foi pesada para balão de 100 mL. Um volume de solvente (íon par reagente:água:propanol:acetonitrila (20:6:20:54, %v/v)) foi adicionado e levou-se para banho ultrassônico por 20 minutos. Passado o tempo, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, avolumou-se com o mesmo solvente e filtrou-se por filtro de PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros volumes do filtrado. O íon par reagente foi preparado conforme o item 3.3.1.1.1.

As amostras utilizadas nos ensaios preliminares da dissolução (item 3.4.2) foram preparadas da seguinte forma: 900 mL de meio de dissolução era preparado e avolumado para béquer e a ele era adicionado um comprimido. Após cerca de duas horas, sob agitação em mesa magnética, um volume de 10 mL era coletado com o

auxílio de seringa de vidro, filtrado por filtro de PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros mililitros e transferindo uma porção para um vial.

As amostras utilizadas nos testes de perfil de dissolução (item 3.4.2) eram preparadas de maneira semelhante. Cerca de 900 mL de meio de dissolução eram preparados e avolumados para cada cuba e a cada uma, após equilíbrio térmico de  $37 \pm 0,5$  °C, um comprimido era adicionado. Em diferentes tempos, um volume de 5 mL era coletado com o auxílio de seringa de vidro, filtrado por filtro de PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros mililitros e transferindo uma porção para um vial.

#### *3.3.1.4 Preparo da solução de trietilamina 0,5% (v/v) para fase móvel*

O tampão foi preparado através da diluição de 5 mL de trietilamina para 1000 mL de água ultrapurificada. O pH foi ajustado para  $3,00 \pm 0,05$  usando ácido o-fosfórico. A solução foi filtrada por filtro PVDF 0,45 µm e degaseificada por banho ultrassônico.

#### *3.3.1.5 Preparo da solução de ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) para fase móvel*

O tampão foi preparado através da diluição de 0,5 mL de ácido trifluoroacético para 1000 mL de água ultrapurificada. O pH foi ajustado para  $2,35 \pm 0,05$  usando ácido o-fosfórico. A solução foi filtrada por filtro PVDF 0,45 µm e degaseificada por banho ultrassônico.

#### *3.3.1.6 Preparo da solução tampão fosfato de potássio para fase móvel*

Pesou-se cerca de 2,72 g de fosfato de potássio monobásico e dissolveu-se em 1000 mL de água. O pH foi ajustado para  $3,40 \pm 0,05$  com ácido o-fosfórico. A solução foi filtrada por filtro PVDF 0,45 µm e degaseificada por banho ultrassônico.

### **3.4 Desenvolvimento da etapa de dissolução**

O desenvolvimento da etapa de dissolução se baseou no Capítulo 1092 da Farmacopeia Americana e o Guia nº 14/2018, da Anvisa.

### 3.4.1 Avaliação da solubilidade dos princípios ativos

Para a escolha do meio de dissolução ideal, é necessário determinar as características físico-químicas dos princípios ativos; a principal informação é a solubilidade das substâncias. A solubilidade é avaliada através da determinação de concentração de saturação do fármaco em diferentes meios a 37 °C pelo método da agitação orbital em frasco.

Neste método, um excesso da substância é adicionado a diferentes meios na faixa do pH fisiológico – 1,2 a 7,2 -, podendo incluir surfactantes, e o frasco é mantido sob agitação, de 24 a 48 horas, em velocidade e temperatura controladas, até que a solubilidade de equilíbrio seja atingida.

Rivelli (2016) determinou a solubilidade do arteméter e da lumefantrina pelo método da agitação orbital em meios constituídos por: água, água + 1% de LSS, água + 1% de P80; tampão pH 1,2, tampão pH 1,2 + 1% de LSS, tampão pH 1,2 + 1% de P80; tampão pH 4,5, tampão pH 4,5 + 1% de LSS, tampão pH 4,5 + 1% de P80; tampão pH 6,8, tampão pH 6,8 + 1% de LSS, tampão pH 6,8 + 1% de P80; tampão pH 7,2, tampão pH 7,2 + 1% de LSS, tampão pH 7,2 + 1% de P80. Os resultados obtidos podem ser observados no Apêndice A.

Como o Setor de Medicamentos do INCQS não apresentava capacidade técnica para desenvolver o teste conforme o método indicado, estes resultados foram utilizados neste trabalho para a escolha teórica dos meios a serem testados na etapa de avaliação das curvas de dissolução. Optou-se por estudar os meios de pH 1,2, 4,5 e 6,8 contendo 1% (p/v) de LSS e P80.

### 3.4.2 Curvas de dissolução

A avaliação da dissolução dos princípios ativos foi feita nos meios selecionados conforme o item 3.4.1, no volume de 900 mL e com o Aparato 2 (pás).

Para cada meio, foi realizado um teste preliminar que buscava avaliar a aplicabilidade do mesmo ao ensaio de dissolução: em um béquer contendo 900 mL de cada meio, um comprimido do medicamento foi adicionado e a solução foi mantida sob agitação em placa magnética, a temperatura ambiente. Após cerca de duas horas, uma alíquota foi coletada, filtrada por filtro PVDF 0,45 µm e analisada por CLAE-UV.

Nos meios nos quais o perfil da corrida cromatográfica apresentou picos característicos para a lumefantrina e arteméter, isto é, tempo de retenção correspondente aos de cada fármaco, de acordo com a concentração de cada analito, foi dado prosseguimento para a análise do perfil de dissolução.

As condições específicas de cada ensaio de perfil de dissolução estão descritas no Quadro 4. Os resultados preliminares foram insatisfatórios nos meios de pH 4,5 e 6,8, com qualquer surfactante, e o meio de pH 1,2 com 1% de LSS apresentou instabilidade devido a incompatibilidades dos reagentes, assim, os perfis de dissolução foram realizados somente no meio de pH 1,2 contendo P80.

Quadro 4 - Condições para avaliação dos perfis de dissolução dos princípios ativos em cada meio

Meio	Velocidade do Aparato 2	Tempos de coleta
Tampão pH 1,2 + 1,0% P80	75 rpm	5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos
Tampão pH 1,2 + 0,1% P80	75 rpm	3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos
Tampão pH 1,2 + 0,25% P80	75 rpm	3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos
Tampão pH 1,2 + 0,5% P80	75 rpm	3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos
Tampão pH 1,2 + 1,0% P80	100 rpm	5, 10, 15, 22, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos
Tampão pH 1,2 + 0,5% P80	100 rpm	5, 10, 15, 22, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos

Fonte: O autor (2023).

Todos os perfis foram realizados com pelo menos duas cubas, à temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C e em nenhum deles o meio foi degaseificado, devido a presença dos surfactantes. Após o equilíbrio térmico, um comprimido foi adicionado a cada cuba e realizada a coleta de 5 mL, nos tempos de coleta especificados, manualmente com o

auxílio de seringas e sem reposição de meio. As amostras foram filtradas por filtro PVDF 0,45 µm e analisadas por CLAE-UV.

Inicialmente, testou-se cada meio com a concentração de 1% de cada surfactante. Após a avaliação das curvas obtidas, os perfis mais adequados foram repetidos com diminuição gradativa da concentração para identificar a menor concentração possível do componente.

Por fim, após a avaliação das curvas de dissolução, o meio que apresentou a maior porcentagem de fármaco dissolvido para ambos os princípios ativos foi selecionado.

### 3.4.3 Soluções utilizadas no desenvolvimento da dissolução

#### 3.4.3.1 *Preparo dos meios contendo tampão pH 1,2*

O tampão foi preparado pela mistura de 250 mL de cloreto de potássio 0,2 mol/L, 425 mL de ácido clorídrico 0,2 mol/L, a quantidade correspondente do surfactante e quantidade suficiente (qsp) para 1000 mL de água destilada. Se necessário, o pH foi ajustado para  $1,2 \pm 0,5$  com ácido o-fosfórico. Para o preparo do meio de concentração de 1%, 0,5%, 0,25% e 0,1% de polissorbato 80 foram pesados 10 g, 5 g, 2,5 g e 1 g, respectivamente. Para o preparo do meio de concentração de 1% de laurilsulfato de sódio, foram pesados 10 g do reagente.

##### 3.4.3.1.1 Preparo da solução de cloreto de potássio 0,2 mol/L

Foram pesados cerca de 14,91 g de cloreto de potássio e dissolveu-se em 1000 mL de água destilada.

##### 3.4.3.1.2 Preparo da solução de ácido clorídrico 0,2 mol/L

Em um recipiente contendo um volume de água, foram adicionados cerca de 16,4 mL de ácido clorídrico comercial e completou-se o volume de 1000 mL com água destilada.

### 3.4.3.2 *Preparo dos meios contendo tampão pH 4,5*

O tampão foi preparado pela diluição de 2,8 mL de ácido acético glacial e qsp 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para  $4,5 \pm 0,05$  com uma solução de hidróxido de sódio 25% (p/v).

#### 3.4.3.2.1 Preparo da solução de hidróxido de sódio 25% (p/v)

Cerca de 25 g de hidróxido de sódio foram pesados e dissolvidos em 100 mL de água destilada.

### 3.4.3.3 *Preparo dos meios contendo tampão pH 6,8*

O tampão dos dois meios foi preparado pela mistura de 250 mL de uma solução de fosfato 0,2 mol/L, 112 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L, 10 g de surfactante e qsp 1000 mL de água destilada. Se necessário, o pH foi ajustado para  $6,8 \pm 0,5$ . Para o LSS, utilizou-se uma solução de fosfato de sódio 0,2 mol/L, enquanto para o P80, foi utilizada uma solução de fosfato de potássio 0,2 mol/L.

#### 3.4.3.3.1 Preparo da solução de fosfato de potássio 0,2 mol/L

Pesou-se cerca de 27,22 g de fosfato de potássio monobásico e dissolveu-se em 1000 mL de água destilada.

#### 3.4.3.3.2 Preparo da solução de fosfato de sódio 0,2 mol/L

Pesou-se cerca de 27,6 g de fosfato de sódio monobásico monoidratado e dissolveu-se em 1000 mL de água destilada.

#### 3.4.3.3.3 Preparo da solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L

Pesou-se cerca de 8 g de hidróxido de sódio e dissolveu-se em 1000 mL de água destilada.

### 3.5 Critérios de aceitação

O tempo de coleta e a quantidade de princípio ativo dissolvida devem ser discriminativos. Após essa definição, os critérios de aceitação do método final de dissolução foram baseados na Farmacopeia Brasileira.

O ensaio de dissolução é um método em 3 estágios. O primeiro estágio, denominado *E1*, é realizado com seis unidades e cada uma deve apresentar resultado maior ou igual a  $Q + 5\%$ .

Se esse critério não é atendido, realiza-se um novo estágio – o *E2* – com mais seis unidades. A média das 12 unidades deve ser igual ou maior que  $Q$ , mas nenhuma unidade deve apresentar resultado inferior a  $Q - 15\%$ . Em caso insatisfatório, deve seguir-se ao terceiro estágio (*E3*) com um novo teste usando mais 12 unidades, e a média das 24 unidades deve ser igual ou maior do que  $Q$ , sendo que no máximo duas unidades poderão ter  $Q - 15\%$ , mas nenhuma unidade poderá apresentar menos que  $Q - 25\%$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização do método de quantificação

Atualmente, a única metodologia oficial para a quantificação dos princípios ativos arteméter e lumefantrina em comprimidos em uma mesma corrida analítica é encontrada na Farmacopeia Internacional (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020b). A metodologia foi aplicada no laboratório do Setor de Medicamentos em análises fiscais de medicamentos antimaláricos, e pode-se perceber diversas questões que impediam o seu uso neste trabalho. Portanto, a primeira etapa consistiu na pesquisa de referências bibliográficas que corroborassem a metodologia oficial e justificassem o uso das condições cromatográficas propostas por ele.

A pesquisa na base de dados científica retornou cinco trabalhos: Umaphathi, Ayyappan e Darlin Quine (2011); Rivelli (2016); Venkata Rao e Rambabu (2017); Belew e colaboradores (2020); Habib e colaboradores, (2020). As principais informações sobre as diferentes metodologias estão sintetizadas no Quadro 5.

Como o uso de fase reversa é comum nos trabalhos dos outros autores, principalmente com a utilização de fases baseadas em C18, no presente trabalho todos os testes foram realizados com colunas C18.

A Farmacopeia Internacional faz uso de um tampão de par reagente em sua fase móvel, preparado a partir da mistura de hexanosulfonato de sódio com fosfato monobásico de sódio em água. O seu uso configura uma cromatografia por par iônico, na qual o tampão age como uma "ponte" entre a cadeia apolar da coluna cromatográfica e o analito no seu estado ionizado (e conseqüentemente mais polar); sem essa ponte, o analito não seria retido na coluna (SHIMADZU, 2022).

Com isso, surge uma série de questões que fazem com que haja maior atenção do analista e que foram observadas, em maior ou menor grau, nas análises do laboratório: controle preciso da temperatura da coluna, tempo de equilíbrio da coluna longo, formato do pico "ruim" por razões desconhecidas (RUFINO, 2022a). Em nenhum dos outros trabalhos, porém, há menção do uso de hexanosulfonato e os resultados reportados apresentavam bons parâmetros cromatográficos. Assim, logo de início optou-se por evitar o uso deste tampão.

Quadro 5 - Condições cromatográficas para quantificação de arteméter e lumefantrina em diferentes trabalhos e na Farmacopeia Internacional

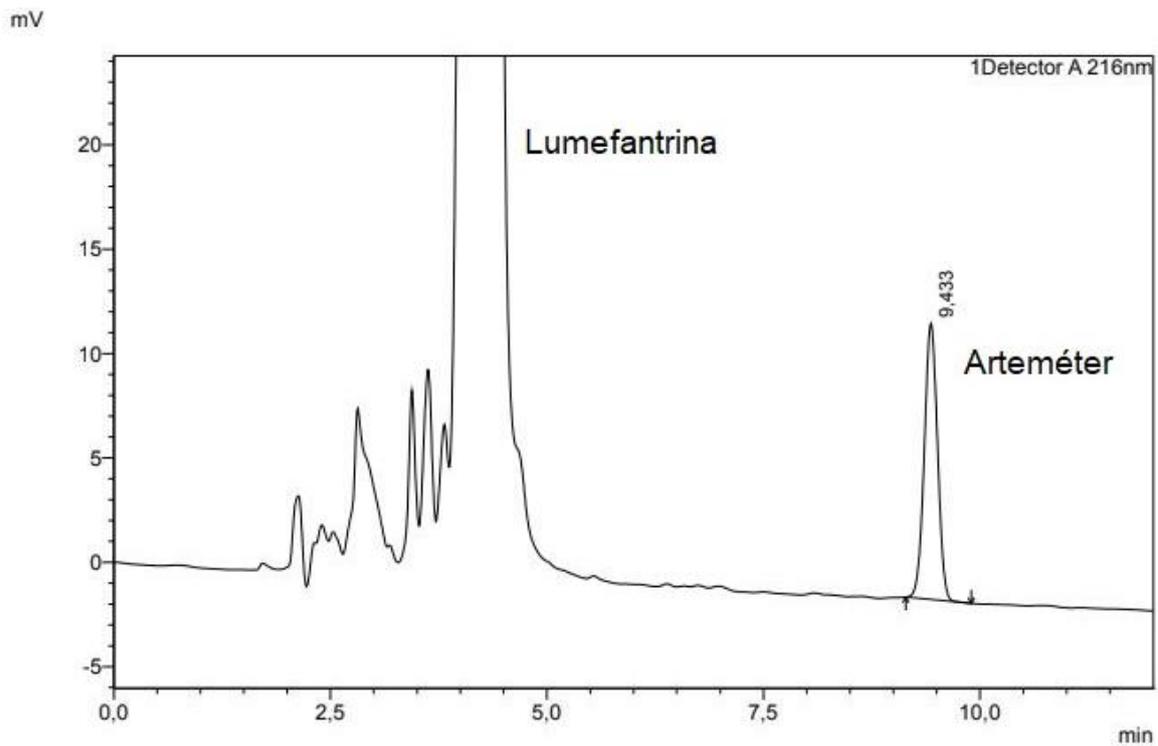
Trabalho	Coluna	Forno (°C)	Fluxo (mL/min)	Tempo de corrida
1	Symmetry C18 250 mm x 4,6mm, 5 µm	-	1,0	10 min
2	LiChrospher C18 250 mm x 4,0 mm 5 µm	40	1,2	12 min
3	Hypersil C18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	Amb.	1,0	6 min
4	Mediterrania Sea 18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	Amb.	1,0	10 min
5	Halo-RP-Amida 50 mm x 4,6 mm, 2,7 µm	30	1,0	12 min
6	C18, 150 mm x 3,9 mm, 5 µm	-	1,3	55 min
Trabalho	Fase móvel	pH	Comprimento de onda	Tempo de retenção
1	ACN:triethylamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v)	3,00	ART: 216 nm LUM: 216 nm	ART: 8,03 min LUM: 5,34 min
2	ACN:triethylamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v)	3,00	ART: 210 nm LUM: 390 nm	ART: 3,3 min LUM: 5,7 min
3	ACN:tampão fosfato de potássio monobásico (55:45 %v/v)	3,50	ART: 218 nm LUM: 218 nm	ART: 2,21 min LUM: 3,73 min
4	ACN:trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20 %v/v)	2,35	ART: 210 nm LUM: 286 nm	ART: 5,8 min LUM: 7,3 min
5	ACN:tampão fosfato de potássio 0,001 mol/L (52:48 %v/v)	3,00	ART: 210 nm LUM: 335 nm	-
6	FM A = ACN:tampão (30:70 %v/v) FM B = ACN:tampão (70:30 %v/v)	2,30	ART: 210 nm LUM: 380 nm	ART: 19 min LUM: 34 min

Fonte: O autor (2023), Legenda: Amb. = temperatura ambiente; “-” = informação não encontrada; ART = Arteméter; LUM = Lumefantrina. Trabalhos: 1 = Umapathi, Ayyappan e Darlin Quine (2011); 2 = Rivelli (2016); 3 = Venkata Rao e Rambabu (2017); 4 = Habib *et al.* (2020); 5 = Belew *et al.* (2020); 6 = Farmacopeia Internacional.

O primeiro teste reproduziu as condições cromatográficas propostas por Umapathi, Ayyappan e Darlin Quine (2011) utilizando uma coluna com as mesmas especificações, a mesma composição de FM e fluxo relatados.

A primeira observação realizada foi que, na ausência do hexanosulfonato de sódio na fase móvel, a lumefantrina era menos retida na coluna cromatográfica e apresentava tempos de retenção menores, enquanto o arteméter eluia por volta de 9,5 minutos (Figura 6). Contudo, o fator de retenção ( $k$ ) estava ligeiramente abaixo de 1 para a lumefantrina, indicando uma inadequada retenção do analito, já que o ideal é o valor de  $k$  estar entre 1 e 10 (RUFINO, 2022b).

Figura 6 – Cromatograma obtido em coluna *Symmetry*®, FM composta por ACN:trietilamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,0 mL/min, com foco no pico do arteméter



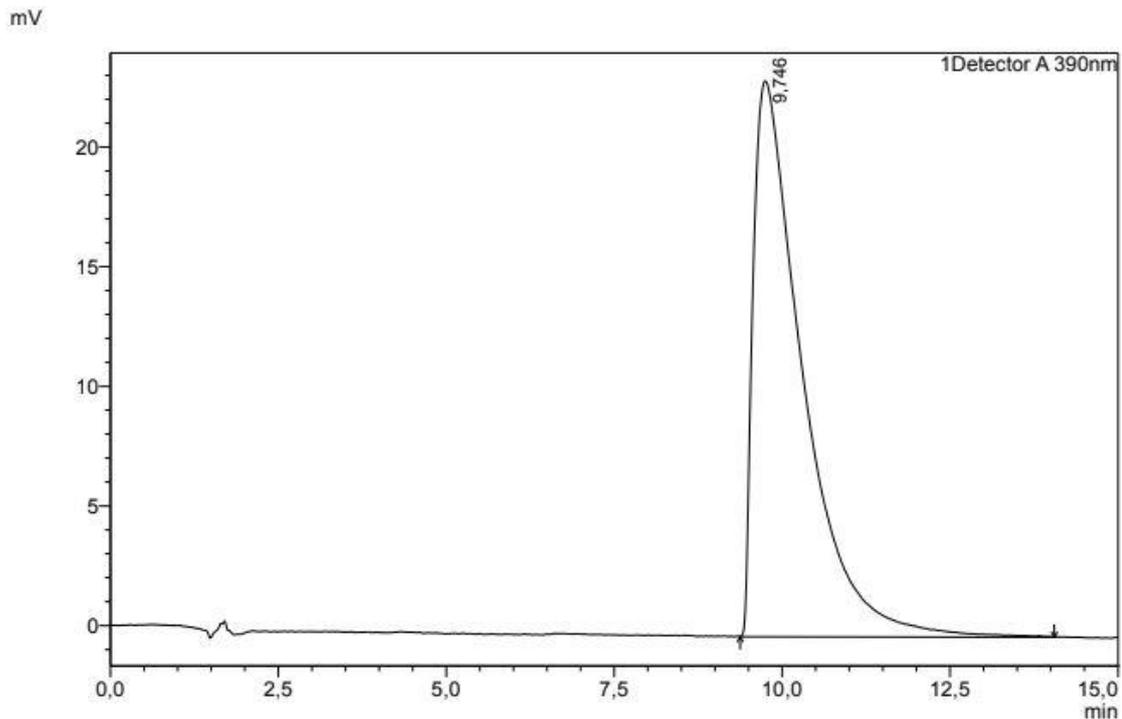
Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 216 nm.

Foi avaliado se a mudança da marca da coluna de *Symmetry*® para *LiChrosorb*®, mantendo as outras condições cromatográficas, poderia melhorar a retenção da lumefantrina. Os picos do arteméter e lumefantrina eluem em uma forma inversa. O pico da lumefantrina saía alargado e apresentava um fator de cauda alto (Figura 7). Assim, o fluxo foi ajustado para 1,2 mL/min para avaliar se

com um fluxo maior o formato do pico melhoraria, porém o fator de cauda calculado era ainda maior que 3.

Figura 7 - Cromatograma obtido em coluna *LiChrosorb®*, FM composta por ACN:triethylamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,0 mL/min, com foco no pico da lumefantrina



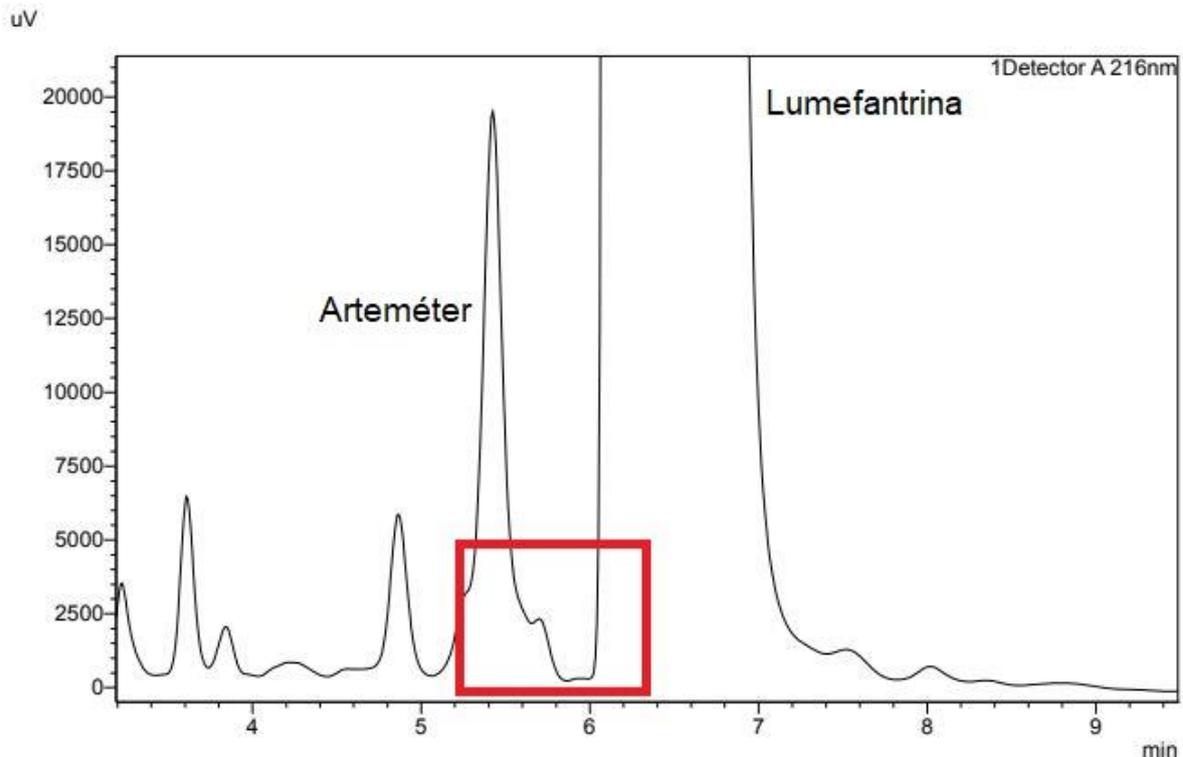
Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 390 nm neste cromatograma, por conta da concentração de trabalho da lumefantrina (1,2 mg/mL). Arteméter não é detectado nesse comprimento de onda e, portanto, está ausente no cromatograma.

Essa "inversão" de picos foi observada novamente com a corrida cromatográfica em uma coluna *ACE C18*, mas outros desafios surgiram. A corrida com a amostra preparada no diluente da monografia oficial apresenta sobreposição do arteméter com um pico menor e não identificado (Figura 8, no destaque).

Tal sobreposição não é observada em injeções de padrão de arteméter, indicando uma possível interferência de algum excipiente. A hipótese de o pico ser referente a alguma degradação foi descartada quando a injeção de uma amostra recém-preparada apresentou o mesmo comportamento. As corridas nessa coluna apresentavam sempre uma resolução menor entre os picos de interesse (comparando com os testes anteriores), ainda que fosse possível obter uma separação maior do que 1,5.

Figura 8 - Cromatograma obtido em coluna ACE C18, FM composta por ACN:triethylamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,0 mL/min



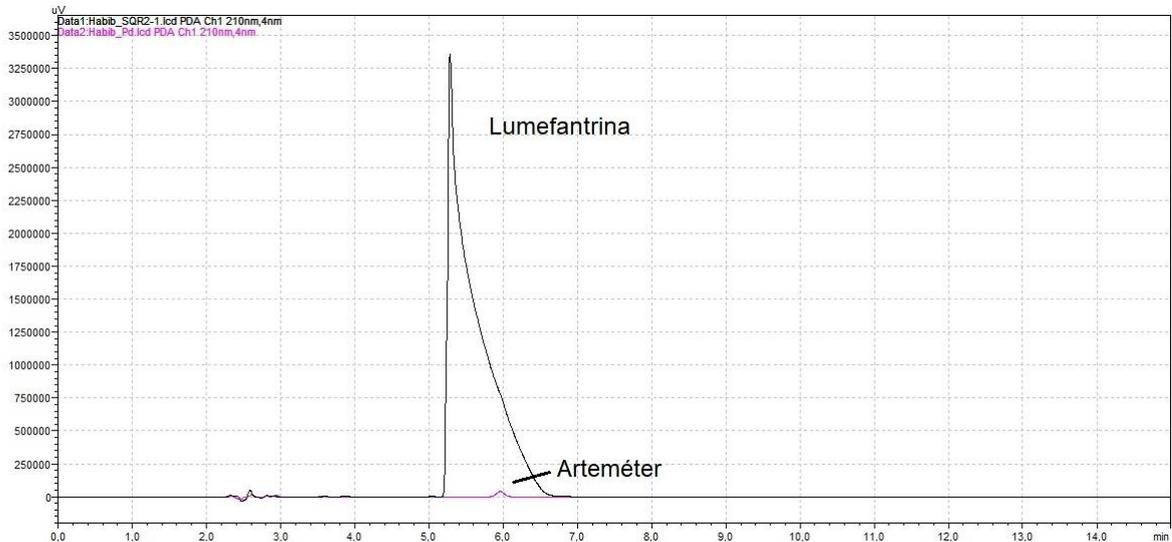
Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 216 nm.

O próximo teste consistiu em aplicar as condições propostas no trabalho de Rivelli (2016). A constituição de fase móvel era semelhante a já empregada, de forma que somente foi necessário utilizar uma nova coluna cromatográfica, da marca *LiChrospher®*, e ajustar o fluxo. Nessas condições, o pico do arteméter não apresenta muitas mudanças do que visto anteriormente, enquanto o pico da lumefantrina apresenta fator de cauda maior do que 3 e baixos pratos teóricos.

Quanto ao método desenvolvido por Habib e colaboradores (2020), o laboratório não possuía uma coluna com as descrições dadas ou uma coluna que fosse equivalente. Dessa maneira, optou-se por testar apenas a composição da fase móvel (ACN:ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20 %v/v)). Na coluna *ACE C18*, a corrida da amostra preparada conforme o método oficial apresentava apenas um pico característico para a lumefantrina, mas com um fator de cauda de quase 8. A injeção de padrão de arteméter evidenciava que o pico do analito coeluiu com o outro composto (Figura 9).

Figura 9 - Comparação de cromatogramas em coluna ACE C18, com FM composta por ACN:ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,0 mL/min



Fonte: O autor (2023).

Legenda: linha preta = cromatograma de injeção de padrão de arteméter e lumefantrina; linha rosa = cromatograma de injeção de padrão de arteméter.

Nota: detecção feita em 210 nm para ambas as corridas.

Até esta etapa, a amostra utilizada apresentava concentração de trabalho conforme o método oficial para o ensaio de doseamento, com concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$  e 1200  $\mu\text{g/mL}$  para o arteméter e lumefantrina, respectivamente. Considerando que os analitos no ensaio de dissolução apresentam uma concentração de trabalho menor (22,2  $\mu\text{g/mL}$  e 133,3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), decidiu-se avaliar a aplicabilidade dos métodos em amostras diluídas.

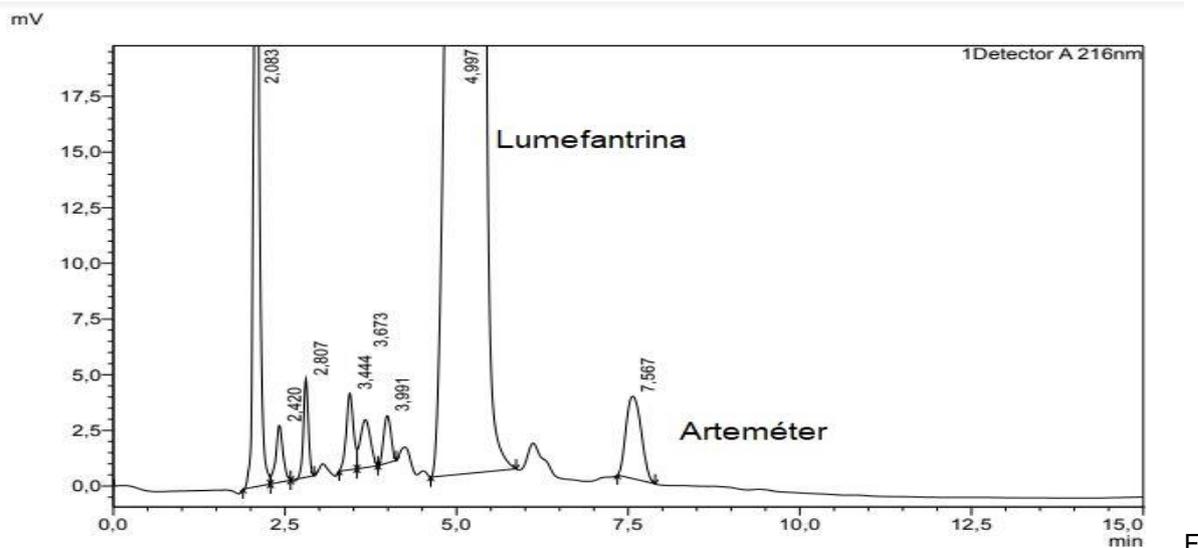
Com essa diluição, era esperado testar o método cromatográfico quanto a sensibilidade frente aos picos menores do arteméter, além de permitir que o método apresentasse apenas um comprimento de onda de detecção. Na concentração do doseamento, a lumefantrina era observada nos comprimentos de onda mais baixos, utilizados para a detecção do arteméter, mas geralmente estourada ou muito perto da resposta máxima do detector. Por esse motivo alguns trabalhos indicam a detecção da lumefantrina nos comprimentos de 286 nm, 335 nm, 380 nm e 390 nm. Essa resposta excessiva não seria observada em amostras mais diluídas, e seria possível utilizar um comprimento de onda menor para a detecção simultânea dos ativos.

Repetiu-se o teste com a coluna *LiChrospher*®, conforme o método proposto por Rivelli (2016). Os pratos teóricos se mantiveram baixos, enquanto o fator de cauda ficou em torno de 2,3 para a lumefantrina, e percebeu-se que apesar de baixa, a resposta analítica para o arteméter se destacava da linha de base. No entanto, a pressão do sistema era mais alta do que a observada em outras colunas, por volta de 230 kgf/cm<sup>2</sup> (em torno de 3271 psi).

A partir das amostras diluídas, repetiu-se o teste na coluna *Symmetry*®, em fluxo de 1,2 mL/min, comparando a resposta cromatográfica entre os tampões de trietilamina 0,5% (v/v), ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) e fosfato de potássio monobásico como porção aquosa da FM. Para as três condições cromatográficas, foi utilizada o comprimento de onda de 216 nm para a detecção simultânea dos princípios ativos.

Para ACN:trietilamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v) como FM, a amostra diluída apresentava um pico em torno de 7,6 minutos para o arteméter e 5 minutos para a lumefantrina (Figura 10). Observa-se pelo cromatograma que a corrida nessa condição os picos ficam mais próximos, com todos saindo entre a janela de 1,5 a 8 minutos.

Figura 10 - Cromatograma obtido em coluna *Symmetry*®, FM composta por ACN:trietilamina 0,5% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min



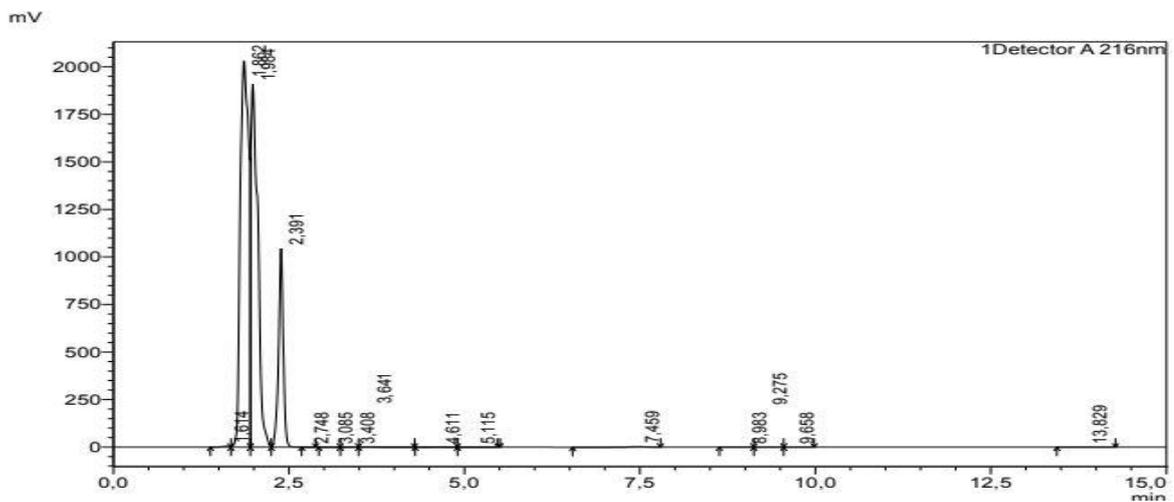
Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 216 nm.

Na fase móvel contendo ACN:ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20 %v/v), um pico com resposta significativa era detectado logo no começo da corrida,

juntamente com os primeiros picos após o volume morto (Figura 11). Supõe-se que a proporção de acetonitrila diminuía a retenção da lumefantrina e por isso avaliou-se a diminuição da proporção do solvente na FM para a proporção 60:40. Porém, essa alteração não teve o efeito desejado, pois os picos acabaram mais arrastados, sem definição, como pode ser observado na Figura 12.

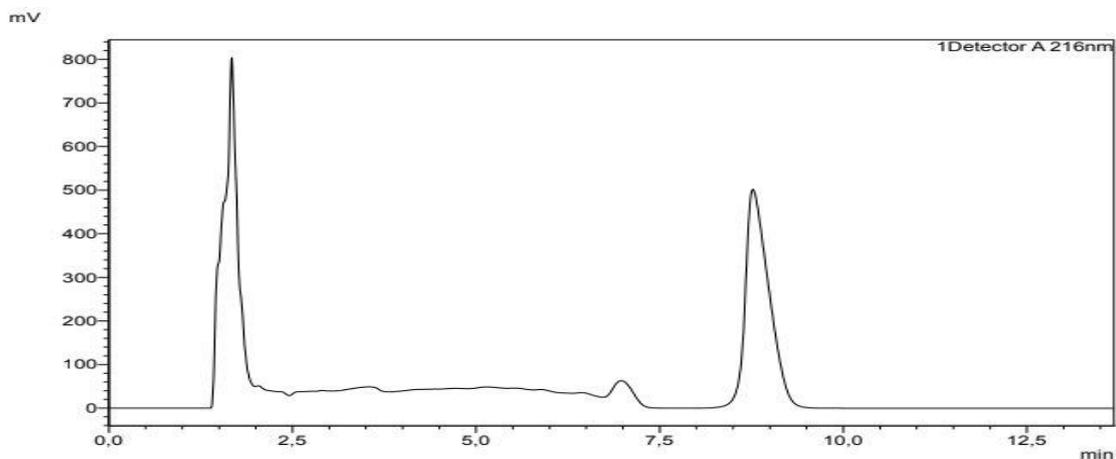
Figura 31 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (80:20 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min



Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 216 nm.

Figura 12 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:ácido trifluoroacético 0,05% (v/v) (60:40 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min

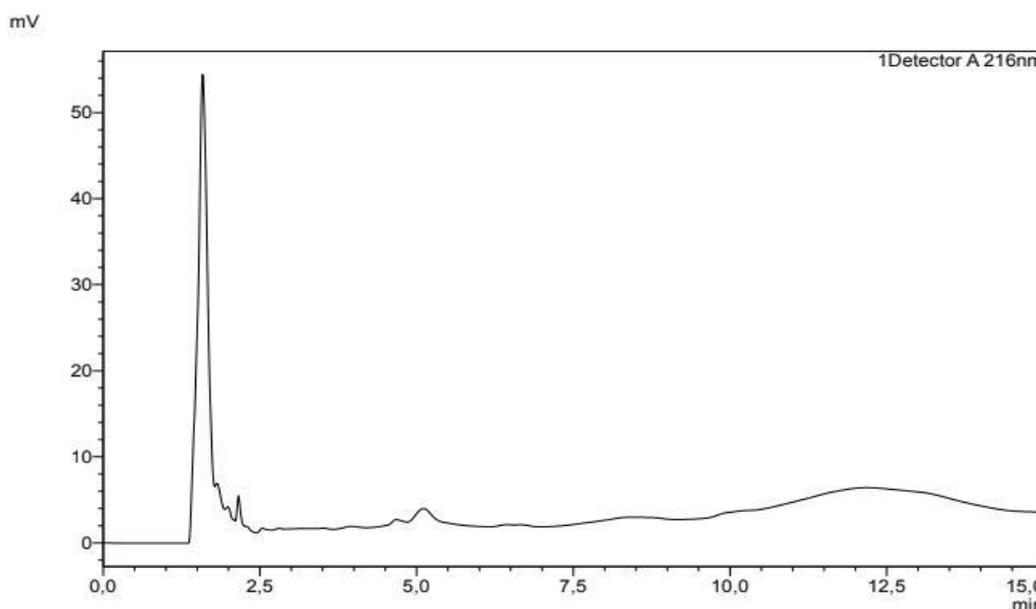


Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 216 nm.

Proseguiu-se com a avaliação do tampão fosfato. Os dois trabalhos que o utilizam, apresentam proporções diferentes de 48 partes ou 45 partes. Primeiramente testou-se ACN:tampão (55:45 %v/v), mas os picos não saíram dentro de uma corrida de 15 minutos (Figura 13), como ocorria com outras condições cromatográficas.

Figura 43 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:tampão fosfato (55:45 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min



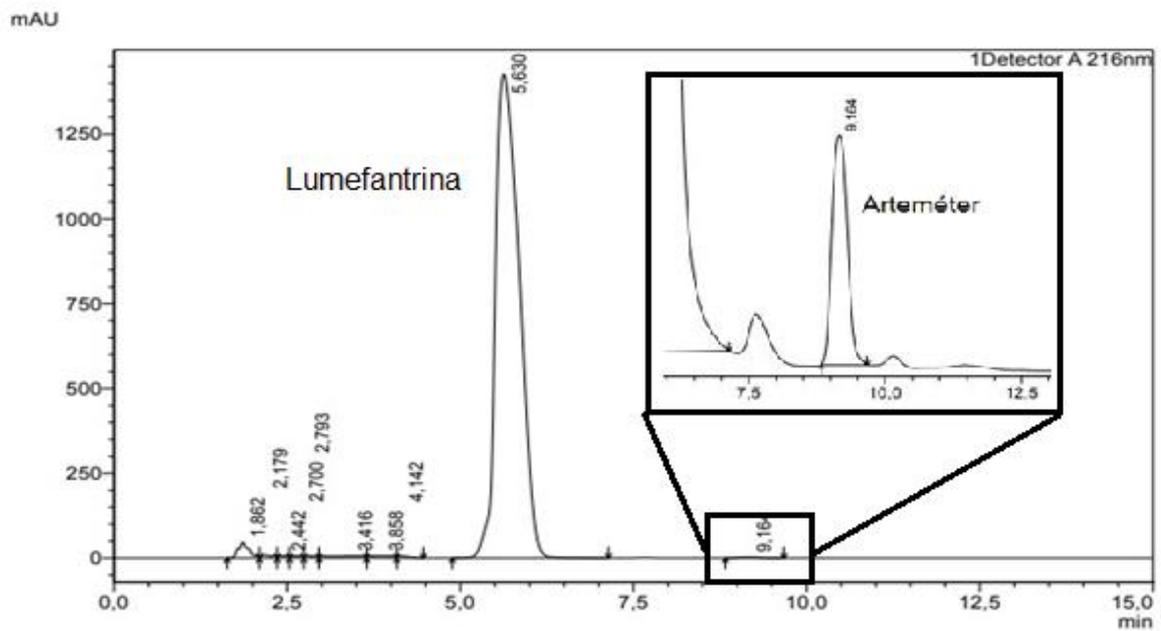
Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 216 nm.

Então, foram testadas também as proporções de 75:25 (%v/v) e 70:30 (%v/v); os cromatogramas podem ser avaliados nas Figuras 14 e 15, respectivamente. Percebe-se que uma menor proporção de ACN aumenta o tempo de retenção (o que já era esperado), alterando de maneira positiva os pratos teóricos e o  $k$  dos analitos, mas influenciando negativamente na assimetria para a lumefantrina – que passou de 1,3 para 2,5.

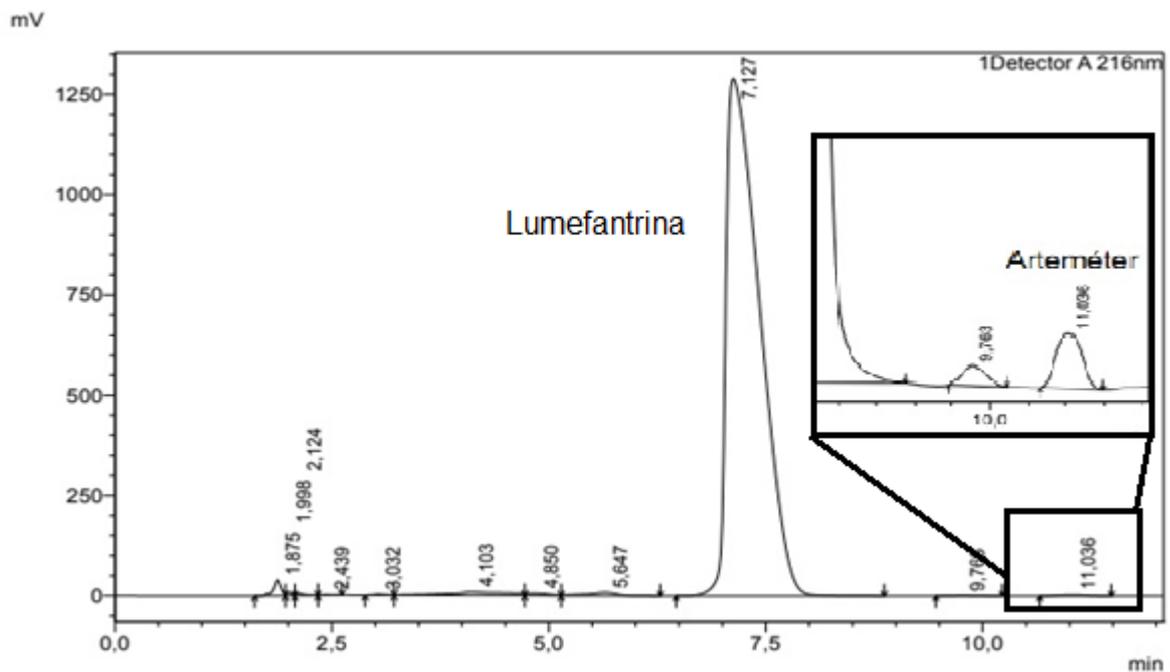
Uma condição intermediária foi avaliada para confirmar as mudanças nos parâmetros. Com a proporção de 72:28 (%v/v), os pratos teóricos e o  $k$  ficam adequados, mas o fator de cauda se repete acima de 2 para a lumefantrina. O teste foi feito em amostras diluídas em tampão fosfato e analisados sob fluxo de 1,0 mL/min e 1,2 mL/min e notou-se que esta alteração levou ao aumento dos pratos teóricos para os dois analitos.

Figura 14 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:tampão fosfato (75:25 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min



Fonte: O autor (2023).  
Nota: detecção realizada em 216 nm.

Figura 55 - Cromatograma obtido em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:tampão fosfato (70:30 %v/v), fluxo de 1,2 mL/min



Fonte: O autor (2023). Nota: detecção realizada em 216 nm.

Para confirmar a proporção dos solventes na fase móvel, foi realizado um novo teste de composição, comparando os mesmos parâmetros para a proporção

72:28 (%v/v) e 75:25 (%v/v) de ACN:tampão fosfato. Apesar de o fator de cauda ter aumentado e os pratos teóricos terem diminuído para o arteméter, a proporção de 75:25 (%v/v) influenciou positivamente nos critérios para a lumefantrina.

Durante o desenvolvimento inicial do método, apesar de todas as colunas testadas serem do tipo C18, notou-se que o perfil cromatográfico não era reproduzível entre elas, havendo discrepâncias nos valores de fator de retenção (k), fator de cauda (FC), tempo de retenção (TR) e pratos teóricos (PT). As Tabelas 1 e 2 trazem uma síntese do resultado destes parâmetros em cada teste para o arteméter e para a lumefantrina, respectivamente.

Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método de quantificação para o arteméter

ATIVO	COLUNA	FM	FLUXO (mL/min)	TR (min)	TF	PT	k
	LiChrosorb	ACN:Triet. (80:20 %v/v)	1	-	-	-	-
			1,2	5,9	1,4	4623	1,7
	ACE C18	ACN:Triet. (80:20 %v/v)	1	5,4	1,1	10338	1,5
			1	-	-	-	-
	LiChrospher	ACN:Triet. (80:20 %v/v)	1	7,5	1,0	3837	2,8
			1,2	6,0	1,0	10088	3,3
ART	Symmetry	ACN:Triet. (80:20 %v/v)	1	9,4	1,0	17143	3,3
			1,2	7,6	1,1	5000	2,6
	Symmetry	ACN:ácido trifluoroacético (80:20 %v/v)	1,2	7,5	1,1	5579	3,6
			1,2	-	-	-	-
	Symmetry	ACN:tampão fosfato (70:30 %v/v)	1,2	11,0	1,0	5725	4,8
			1	11,7	1,0	19478	-
	Symmetry	ACN:tampão fosfato (72:28 %v/v)	1,2	10,3	1,0	17996	-
			1	10,7	1,2	14522	-
	Symmetry	ACN:tampão fosfato (75:25 %v/v)	1	10,7	1,2	14522	-
			1,2	9,2	1,1	5400	3,9

Fonte: o Autor (2023).

Legenda: FM = fase móvel; TR = tempo de retenção; TF = fator de cauda; PT = pratos teóricos; k = fator de retenção; "-" = informação não disponível; Triet = trietilamina; ART = arteméter.

Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método de quantificação para a lumefantrina

ATIVO	COLUNA	FM	FLUXO (mL/min)	TR (min)	TF	PT	k	
LUM	Lichrosorb	ACN:Triet. (80:20 %v/v)	1	-	-	-	-	
			1,2	9,8	3,2	926	5,5	
	ACE C18	ACN:Triet. (80:20 %v/v)	1	6,2	4,1	1198	1,8	
			1	5,4	7,9	3958	-	
	Lichrospher	ACN:Triet. (80:20 %v/v)	1	9,8	2,4	810	4,0	
			1,2	7,4	2,8	366	4,3	
		ACN:Triet. (80:20 %v/v)	1	4,2	2,2	2881	0,9	
			1,2	5,0	2,4	2400	1,4	
		ACN:ácido trifluoroacético (80:20 %v/v)	1,2	-	-	-	-	
		ACN:ácido trifluoroacético (60:40 %v/v)	1,2	-	-	-	-	
		Symmetry	ACN:tampão fosfato (70:30 %v/v)	1,2	7,1	2,5	1523	2,8
			ACN:tampão fosfato (72:28 %v/v)	1	7,6	2,1	3406	-
			1,2	6,6	2,3	2794	-	
			ACN:tampão fosfato (75:25 %v/v)	1	7,0	1,9	3178	-
			1,2	5,6	1,3	1305	2,0	

Fonte: O autor (2023).

Legenda: FM = fase móvel; TR = tempo de retenção; TF = fator de cauda; PT = pratos teóricos; k = fator de retenção; "-" = informação não disponível; Triet = trietilamina; LUM = lumefantrina.

Essa diferença na resposta das colunas cromatográficas pode ser explicada pelo uso de diferentes tecnologias empregadas por cada fabricante para preenchê-las. As colunas produzidas pelo grupo Merck apresentam partículas de sílica com derivados octadecil; a *LiChrosorb*® possui partículas irregulares, enquanto a *LiChrospher*® é esférica. A coluna *Symmetry*®, C18, preparada pela empresa Waters possui a tecnologia *endcapped* – na qual os grupos silanois residuais estão inativados – em suas partículas esféricas (MERCK, 2022a, 2022b; WATERS, 2022)

Outras diferenças entre as colunas configuram na concentração de carbono (entre 16,0 e 21,0%) e na área de superfície adquirida (entre 300 e 350 m<sup>2</sup>/g). A massa de carbono se refere a quantidade em porcentagem de massa de carbono na fase estacionária; quanto maior o valor, mais hidrofóbica será a superfície. Contudo,

o fator que parece trazer mais diferença é a superfície específica da coluna. Esse valor descreve a área total da superfície sólida do adsorvente, e influencia na densidade de ligação da coluna, permitindo adequada carga da massa do analito. O impacto disso está na capacidade da coluna, e conseqüentemente na retenção (e no tempo de retenção) e na resolução das moléculas (GODINHO *et al.*, 2020; GUILLEMIN, 1978; PERKINELMER, 2016, 2022).

Embora essas diferenças possam explicar a variação de respostas cromatográficas obtidas neste trabalho, que apresentaram tempos de eluição, ordem de eluição e resoluções distintas entre as diferentes condições testadas, não justificam por si só as divergências vistas na avaliação da reprodutibilidade dos métodos da literatura.

Por exemplo, empregando as mesmas condições descritas por Umapathi, Ayyappan e Darlin Quine (2011), obteve-se variações no tempo de eluição: a lumefantrina era detectada cerca de 1 minuto antes do relatado, enquanto o arteméter era retido até 1,5 minuto a mais. Essa discrepância pode ser resultado da utilização de diferentes cromatógrafos nos dois trabalhos: enquanto os autores acima utilizaram um equipamento produzido pela *Waters*, este trabalho utilizou um cromatógrafo da *Shimadzu*.

Diferentes equipamentos possuem diferentes caminhos pelos quais os solventes da fase móvel e o analito passam e as principais diferenças observados são o *dwell volume* e os efeitos extra-coluna.

O *dwell volume* é definido como o volume de solvente que permanece entre o dispositivo de entrega do gradiente e o início da coluna. Ele acontece devido a uma diferença estrutural entre sistemas cromatográficos binários e quaternários: em cromatógrafos com dois canais, o gradiente é formado após os solventes passarem pelo misturador, de onde segue para o injetor da amostra e a coluna. Já em sistemas quaternários, o gradiente ocorre em uma válvula de proporção do gradiente, etapa anterior ao misturador que aumenta o *dwell volume*.

Os efeitos extra coluna são relacionados ao volume do injetor ao detector; influenciados pelo sistema da agulha, dos tubos conectores da coluna, da célula de detecção e outros dispositivos pré-coluna (HONG; MCCONVILLE, 2018; MILENKOVIĆ *et al.*, 2021; SCHULTZE-JENA *et al.*, 2017).

Essas diferenças podem impactar na largura do pico, na resolução e na eficiência da separação e no tempo de retenção. Levadas em consideração no

desenvolvimento e na transferência das metodologias, ajustes podem ser realizados no sistema ou método cromatográfico para diminuir tais efeitos (HONG; MCCONVILLE, 2018), de modo que a reprodutibilidade seria mais bem avaliada.

De qualquer maneira, durante o desenvolvimento deste trabalho, percebeu-se que a resposta do arteméter variava menos frente as condições cromatográficas avaliadas, e todas as modificações nas condições cromatográficas estabelecidas resultaram em um método de quantificação adequado. A única alteração significativa envolveu a inversão da ordem de eluição nas corridas com as colunas *LiChrosorb®* e *ACE C18*.

Contudo, a lumefantrina é mais sensível às condições cromatográficas, tanto na ordem da eluição, mas também principalmente o fator de cauda e os pratos teóricos. Os pratos teóricos indicam a eficiência da coluna em resolver e analisar a substância, produzindo picos estreitos, e não apresentam um valor fixo, já que o cálculo depende da fase móvel, da fase estacionária, da retenção e do formato do pico; quanto maior o valor, melhor (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Para o arteméter, esse critério variou de 3800 a até mais de 19000, enquanto para a lumefantrina, na melhor condição foi possível obter um valor de quase 4000.

Parte do comportamento cromatográfico da lumefantrina pode ser explicada por sua característica ionizável: com a redução do pH da fase móvel, a lumefantrina ganha prótons, sendo classificada como uma base. Conforme o pH da fase diminui, espera-se que a retenção de bases protonadas também diminua, principalmente se a o pH de trabalho estiver na faixa do  $pK_a \pm 1,5$ ; fora desse espectro, o analito, apesar de ionizável, se assemelha aos compostos neutros (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Nos experimentos deste trabalho, em que  $pK_a$  da lumefantrina é maior que 9 e pH da FM é cerca de 3,4, a retenção seria, portanto, influenciada pela proporção de fase orgânica. Essa teoria pode ser observada com clareza nos resultados obtidos nas corridas em que se empregou a FM constituída por ACN e tampão fosfato; com a mesma coluna, sob o mesmo fluxo (de 1,2 mL/min) se obtém diferentes tempos de retenção de 7,1; 6,6 e 5,6 minutos em diferentes proporções de acetonitrila (70, 72 e 75%, respectivamente).

Ao contrário dessa observação, o pH parece influenciar com maior intensidade no fator de cauda. Entre 2,0 e 3,5, os grupos silanóis da fase estacionária estão menos ionizados, diminuindo a interação de troca iônica amostra-

silanol. Essas interações acarretam formato de picos ruim e eficiência reduzida da coluna, atrapalhando a retenção dos analitos básicos e criando caudas nos picos. Esse parâmetro indica a simetria do pico e idealmente fica em torno de 1, mas a lumefantrina dificilmente apresentou valores menores do que 1,3 em qualquer um dos testes, chegando a apresentar valores de quase 8. Os impactos de valores inadequados de simetria são práticos teóricos baixos - influenciando na resolução -, quantificação imprecisa do próprio pico ou de eventuais picos que acabem por eluir na cauda, e baixa reprodutibilidade de retenção (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Alargamento de picos também pode ser resultado da chamada "sobrecarga da coluna": com o aumento do tamanho da amostra, os picos eventualmente se alargam. Essa situação pode ocorrer pelo grande volume de amostra ou pela massa adicionada na injeção, se o solvente da amostra for de maior força de eluição que a FM, ou se a fase estacionária acabar saturada com a amostra. De acordo com Snyder, Kirkland e Glajch (1997), pode ser observado um pico no formato de triângulo reto, de tamanho proporcional ao tamanho da amostra. Supõe-se que essa descrição condiz com o observado no resultado ilustrado na Figura 7.

Para reverter essas situações, pode-se fazer uso de colunas que sejam "encapadas" (*endcapped*) ou utilizar um menor volume de injeção. Tais mudanças justificam os resultados encontrados para as corridas realizadas nas colunas *Symmetry*® e nos testes com as FM ACN:tampão fosfato, nas quais o volume de injeção foi reduzido de 100 µL para 80 µL e que apresentaram os maiores pratos teóricos e menores fatores de cauda para a lumefantrina.

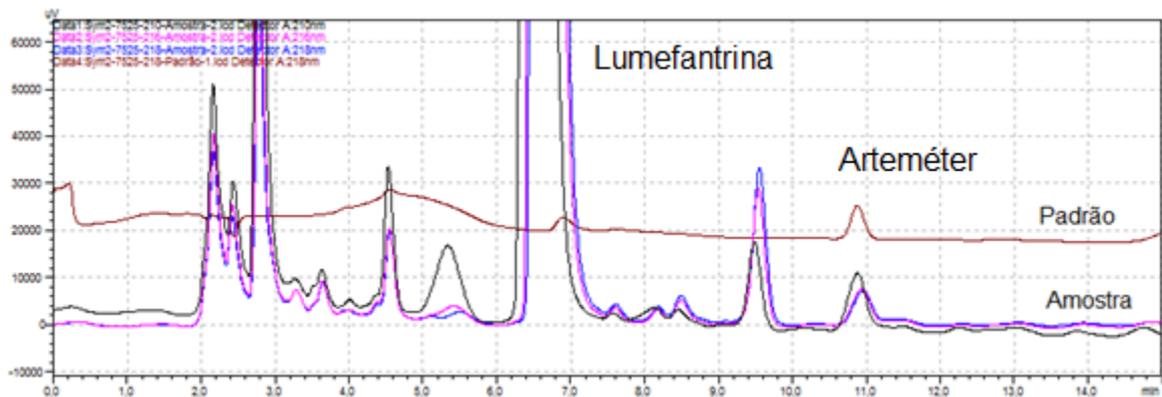
Snyder, Kirkland e Glajch (1997) indicam que injeções de menos de 25 µL sejam realizadas para adequar o fator de cauda do analito, mas acredita-se que esse volume se tornaria, então, um problema para a detecção e quantificação do arteméter. Em corridas com injeções de 80 µL, a resposta analítica é de somente 5 mV (a lumefantrina apresenta picos com mais de 1250 mV, a título de comparação).

Com base no observado experimentalmente, escolheu-se como limite máximo de fator de cauda o valor de 3; condição satisfeita com o uso da coluna *Symmetry*®, nas três composições nominais de fase móvel. Como nas FM constituídas por ACN:ácido trifluoroacético a lumefantrina elui próximo ao volume morto e a quantificação nessa região pode incluir grandes erros, essa condição foi descartada.

Comparando os cromatogramas obtidos com o uso de tampão fosfato e trietilamina 0,5% (v/v), observa-se que os fatores de cauda não são tão distintos entre si. Desta forma a escolha foi decidida em conjunto com os pratos teóricos, e definiu-se a FM constituída por ACN:tampão fosfato (75:25 %v/v) no fluxo de 1,0 mL/min.

Visto que o arteméter, por conta da baixa concentração, possui uma resposta analítica baixa, procurou-se avaliar qual o melhor comprimento de onda no qual o sinal seria o maior para este analito e não causasse uma diminuição significativa na lumefantrina. Na literatura diferentes autores utilizaram 210, 216 ou 218 nm. A Figura 16 traz a comparação dos cromatogramas para os três comprimentos de onda, nos quais já é possível observar que há diferença no sinal para o arteméter. Para confirmar o tempo de eluição do analito, injetou-se uma solução padrão de arteméter (cromatograma superior).

Figura 16 - Comparação dos cromatogramas de amostra em diferentes comprimentos de onda (210, 216 e 218 nm)



Fonte: O autor (2023).

Legenda: linha preta = amostra em 210 nm; linha rosa = amostra em 216 nm; linha azul = amostra em 218 nm; linha marrom = padrão em 218 nm.

As áreas dos picos foram quantificadas pelo software e as médias são trazidas na Tabela 3. É possível notar que o comprimento de onda menor gera uma resposta analítica maior para o arteméter, considerando a mesma concentração; de 210 para 218 nm, por exemplo, a área é quase 50% menor. Para a lumefantrina, contudo, essa variação é pequena: a área para 210 nm é apenas 4% menor do que a maior resposta (em 218 nm). Definiu-se, portanto, o comprimento de onda de 210

nm para o método cromatográfico inicial, apesar de apresentar os maiores coeficientes de variação na resposta de ambos os ativos.

Durante os testes de meio de dissolução, percebeu-se que nessa condição cromatográfica, interferentes do meio e excipientes eluíam na região do arteméter, causando problemas de quantificação nos perfis de dissolução.

Tabela 3 - Valores médios de área e tempo de retenção para o arteméter e lumefantrina em diferentes comprimentos de onda

ATIVO	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	AREA	CV(%)
ARTEMÉTER	210	10,871	205448	3,91
	216	10,932	110819	1,35
	218	10,944	100424	1,74
LUMEFANTRINA	210	6,418	17615869	1,75
	216	6,529	18165596	0,36
	218	6,556	18339235	0,05

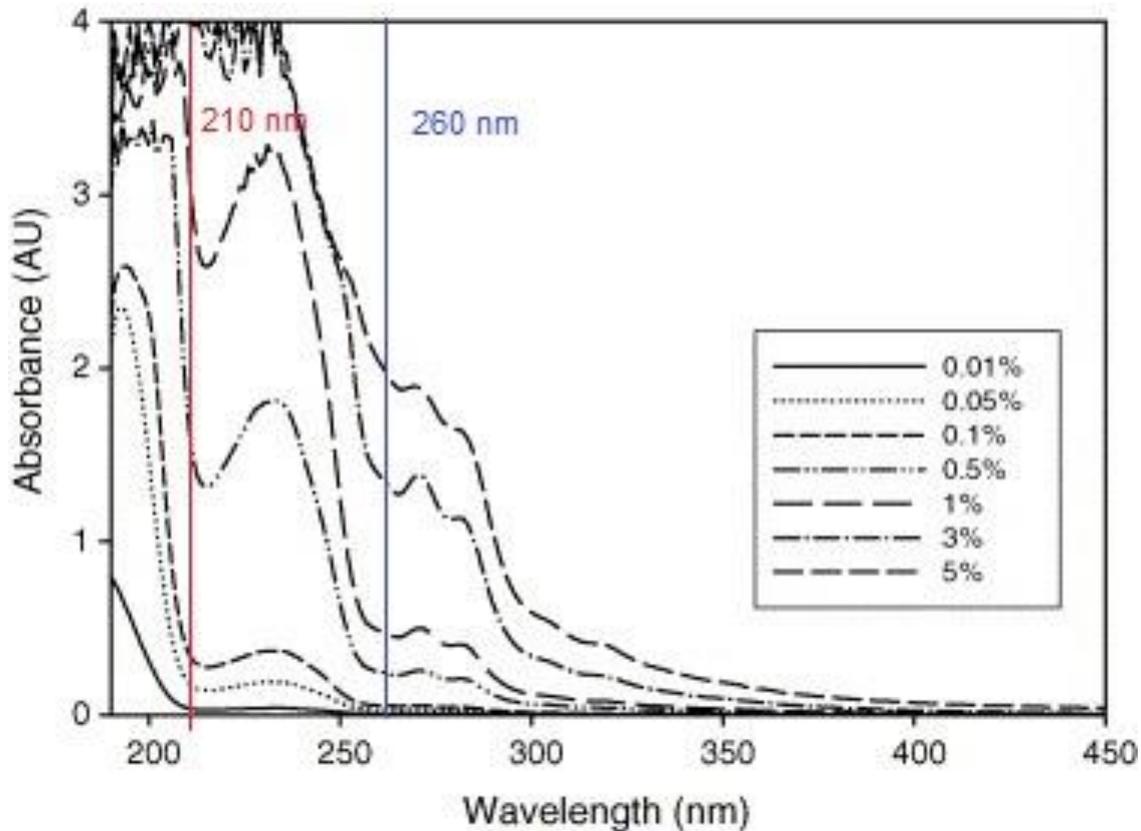
Fonte: O autor (2023).

Peter Wuelfing e colaboradores (2006) levantam a problemática do uso de polissorbato 80 em meios de dissolução quanto ao seu uso em métodos cromatográficos utilizando detecção por UV na região de 200 a 300 nm. A grande absorção molar do surfactante nesta região, associada ainda à presença de impurezas que também possuem cromóforos em suas estruturas, dificultam o seu uso nas metodologias; para minimizar a interferência do P80 o ideal seria utilizar maiores comprimentos de onda de detecção e concentrações mais baixas.

Os estudos sobre o meio de dissolução (discutidos no tópico a seguir com mais detalhes) indicam a utilização de uma concentração de 1% para facilitar a solubilização dos dois princípios ativos, principalmente a lumefantrina. Nesse cenário, um limite aceitável (o *cut off*) seria 260 nm, a partir do qual a absorção do surfactante diminui consideravelmente, embora perto de 210 nm haja um vale que possa ser explorado (Figura 17). Contudo, apesar desse "vale", a absorção do

polissorbato 80 ainda gera interferências na resposta do arteméter, pois o sinal analítico do princípio ativo – devido a sua concentração de trabalho – é baixo.

Figura 17 - Espectros UV/visível de soluções de P80 em diferentes concentrações



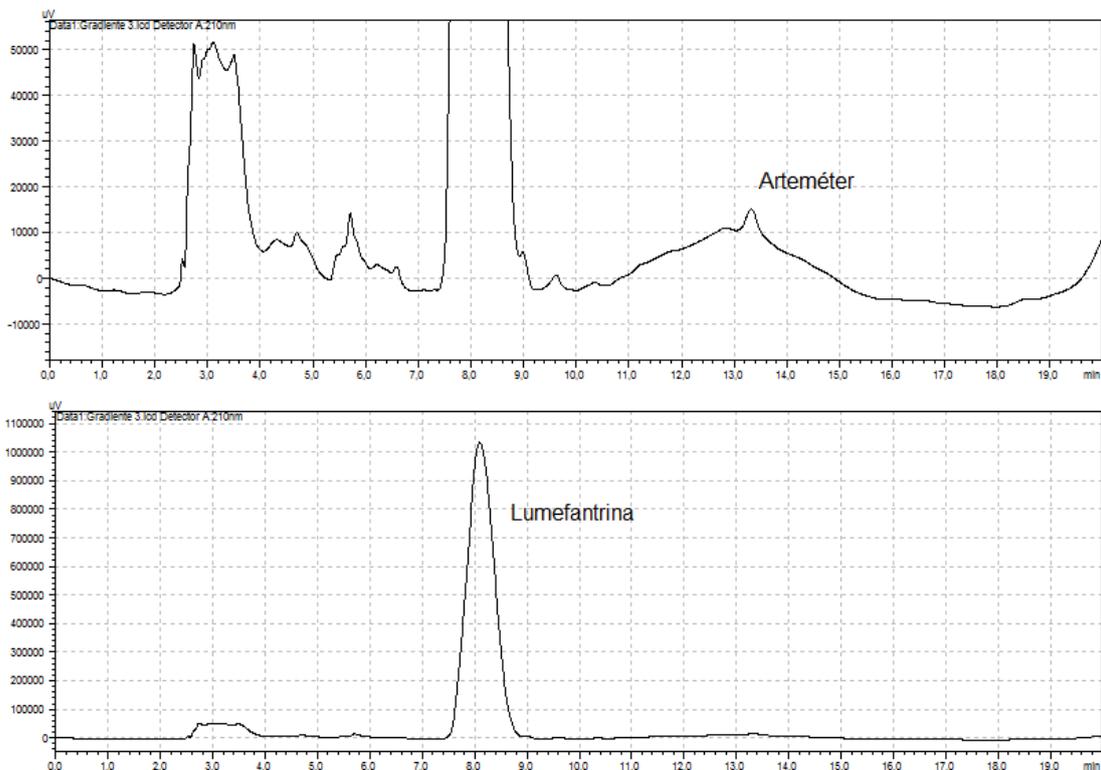
Fonte: adaptado de Peter Wuelfing *et al.* (2006).

Dessa forma, a interferência do surfactante pode ser resolvida ajustando a separação cromatográfica (PETER WUELFING *et al.*, 2006). Por isso, o método cromatográfico precisou ser reavaliado. A resposta observada para a lumefantrina se mantinha adequada, dentro dos parâmetros de tempo de retenção, pratos teóricos e fator de cauda. Avaliou-se a aplicação de um gradiente de fase móvel auxiliar na resolução do arteméter dos interferentes visualizados, mantendo a corrida dentro de 20 minutos, se possível.

As diferentes condições de gradiente estão dispostas no Apêndice B. Considerando que uma menor proporção de solvente orgânico na fase móvel tende a gerar tempos de retenção maiores, testou-se avaliar um gradiente que alterasse a proporção inicial de acetonitrila:tampão fosfato (75:25 %v/v) para uma proporção maior de solvente aquoso após 7 minutos de corrida, influenciando apenas nas retenções do arteméter e do interferente. O resultado inicial é trazido na Figura 18,

na qual é possível observar que o perfil cromatográfico da lumefantrina se mantém constante, apesar de o tempo de retenção ter aumentado. Contudo, esse aumento na retenção também é observado no arteméter, que na condição gradiente se destaca da linha de base, uma vez que o pico de interferente elui em tempos posteriores.

Figura 18 - Cromatogramas obtidos em coluna Symmetry®, FM composta por ACN:tampão fosfato em modo gradiente (Gradiente 1), fluxo de 1,0 mL/min



Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 210 nm.

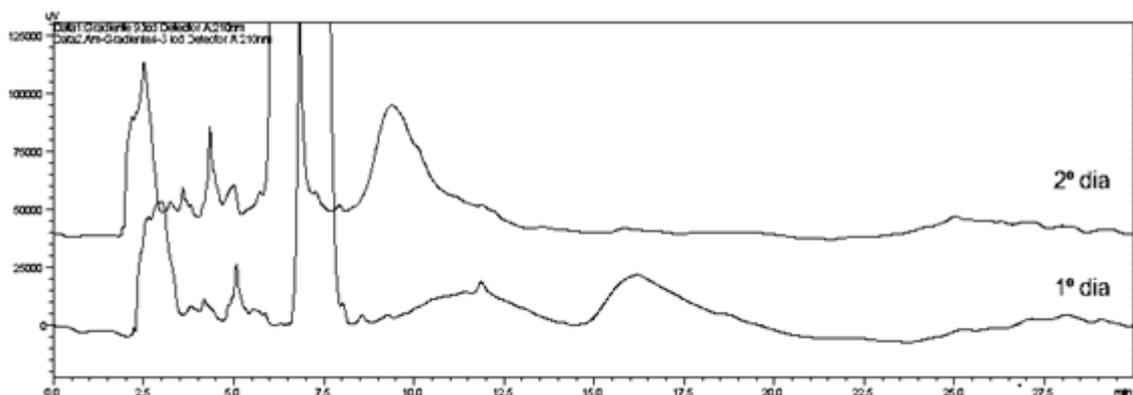
Nesta condição, no final da corrida, há o início da eluição de outros componentes da amostra após o fim da corrida da amostra; em uma sequência analítica, uma injeção atrapalharia a injeção seguinte. Esse comportamento foi observado tanto no Gradiente 1 e no Gradiente 3, com pior perfil nesta condição e então optou-se por excluí-la dos testes.

Assim, outros gradientes foram avaliados modificando os tempos de modo a eluir esse terceiro pico dentro de 20 minutos. Enquanto os tempos de retenção dos princípios ativos mantiveram-se inalterados, a retenção do terceiro pico (considerado um interferente) variava dependendo dos tempos do gradiente estudados. Qualquer

condição cromatográfica seria adequada para a quantificação dos analitos; o critério de escolha foi aquele em que o pico interferente saía completamente da coluna em torno de 20 minutos – critério atendido pelo Gradiente 4.

Novos testes foram feitos com esta condição selecionada para confirmação do perfil cromatográfico. A Figura 19 traz os cromatogramas da injeção do Gradiente 4 em dois dias diferentes; enquanto no primeiro dia observam-se três picos (lumefantrina em torno de 7 minutos, arteméter em torno de 12 minutos e o pico interferente depois de 15 minutos), a segunda injeção apresenta o pico da lumefantrina e coeluição do arteméter e do interferente. Essa condição se repetiu nas cinco corridas testadas do Gradiente 4, indicando que o problema se reproduzia naquele sistema cromatográfico.

Figura 69 - Comparação de injeções do Gradiente 4 em dois dias diferentes

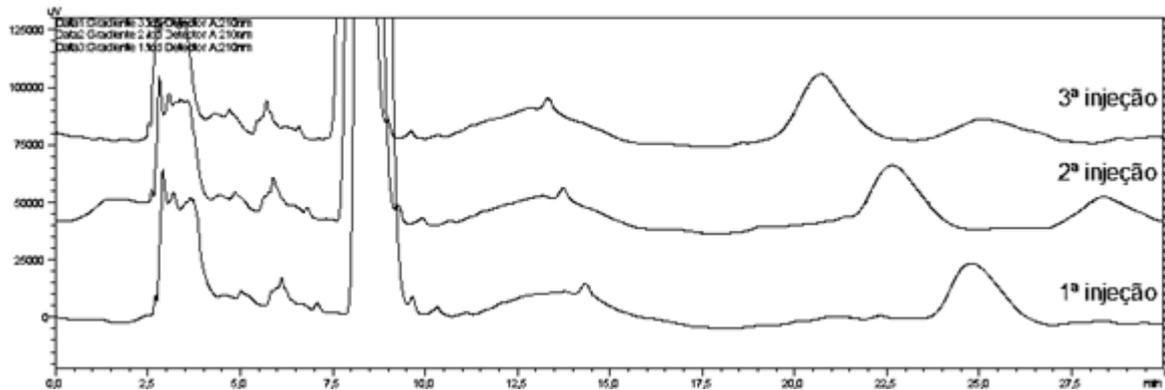


Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 210 nm.

Essa variação de tempo de retenção do pico interferente era observada tanto entre injeções de diferentes gradientes quanto entre injeções subsequentes de um mesmo gradiente. Enquanto uma resposta diferente entre gradientes já seria esperada, visto que a variação no tempo do gradiente muda o ambiente químico dentro da coluna, uma variação dentro de um mesmo gradiente já se mostra mais problemática. Nas Figuras 20 a 23 são trazidas as comparações entre as injeções de cada gradiente. É evidente como os picos do interferente eluem em tempos cada vez menores e/ou apresentando um "ganho" de sinal analítico conforme a amostra era injetada.

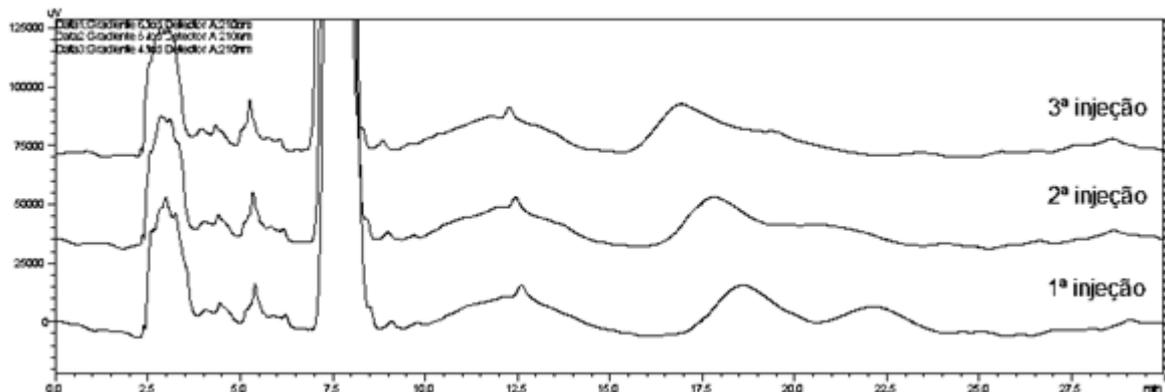
Figura 20 - Cromatogramas de três injeções do Gradiente 1, obtidas em coluna Symmetry®, fluxo de 1,0 mL/min, em uma mesma sequência



Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 210 nm.

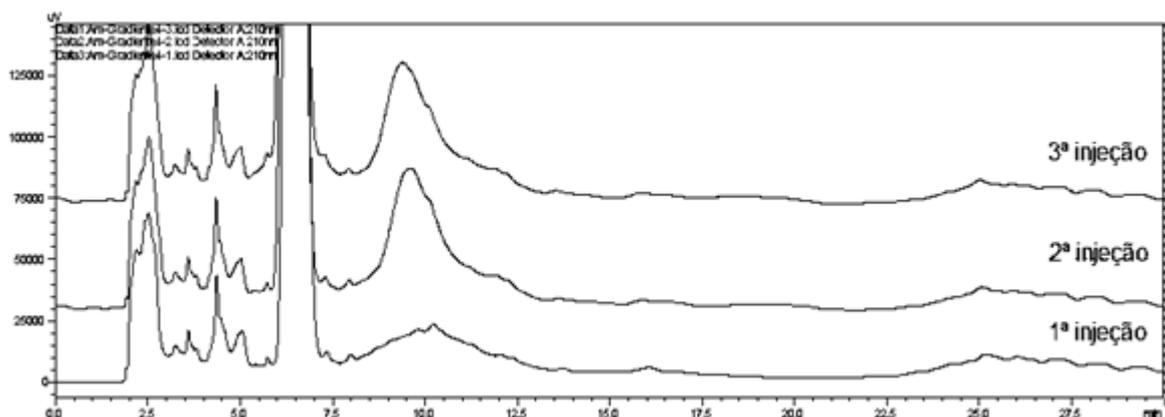
Figura 217 - Cromatogramas de três injeções do Gradiente 2, obtidas em coluna Symmetry®, fluxo de 1,0 mL/min, em uma mesma sequência



Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 210 nm.

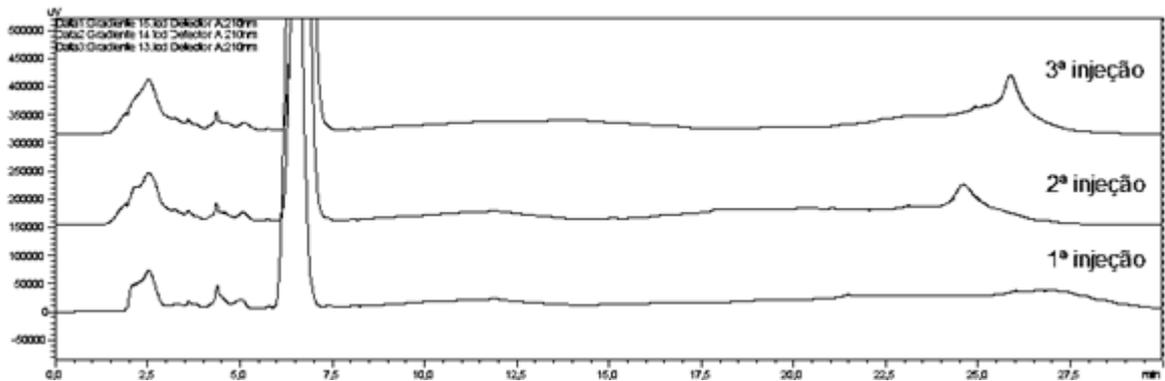
Figura 82 - Cromatogramas de três injeções do Gradiente 4, obtidas em coluna Symmetry®, fluxo de 1,0 mL/min, em uma mesma sequência



Fonte: O autor (2023).

Nota: detecção realizada em 210 nm.

Figura 23 - Cromatogramas de três injeções do Gradiente 5, obtidas em coluna Symmetry®, fluxo de 1,0 mL/min, em uma mesma sequência



Fonte: O autor (2023).

Nota: Detecção realizada em 210 nm.

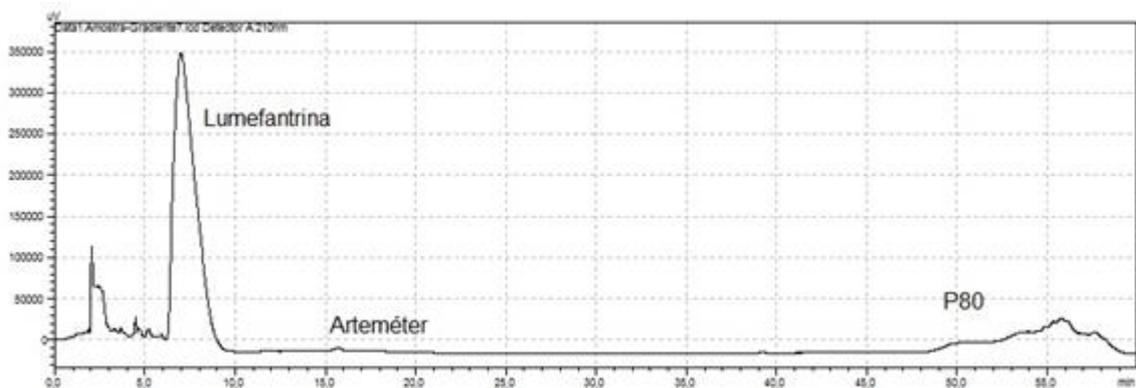
Esse problema pode ser devido ao acúmulo do surfactante durante as corridas, quando a lavagem com solvente orgânico é ineficaz em retirar toda a substância da coluna. O perfil cromatográfico do polissorbato 80, utilizando uma mesma fase móvel, não varia tanto em diferentes colunas cromatográficas – independente da química do preenchimento ou do comprimento da cadeia carbônica (PETER WUELFING *et al.*, 2006).

Para Peter Wuelfing e colaboradores (2006), maiores proporções de solventes orgânicos levam ao aparecimento dos picos do polissorbato 80 na corrida e, assim, indicam que um método cromatográfico adequado inclui um gradiente com maior proporção aquosa para eluição dos princípios ativos seguida de um aumento na proporção orgânica para eluição do surfactante. Diante disso, outros Gradientes foram avaliados.

O Gradiente 6 ainda manteve as proporções avaliadas anteriormente, mudando apenas os tempos de início de rampas – e novamente não houve muita diferença dos testes anteriores, ineficaz em evitar a coeluição do arteméter e do P80, muito menos o acúmulo do surfactante. O Gradiente 7 levou em consideração uma sugestão de Peter Wuelfing e colaboradores (2006).

Em uma corrida de 60 minutos, 60% de ACN permite que a lumefantrina e o arteméter sejam detectados sem interferência, porém com o aumento da proporção orgânica para 90%, o P80 não eluiu, sendo detectado apenas após o retorno a condição inicial (Figura 24). Nessa condição, os parâmetros cromatográficos para a lumefantrina diminuem, principalmente os pratos teóricos que caem para 150.

Figura 24 - Cromatograma no Gradiente 7, obtido em coluna Symmetry(®), fluxo de 1,0 mL/min

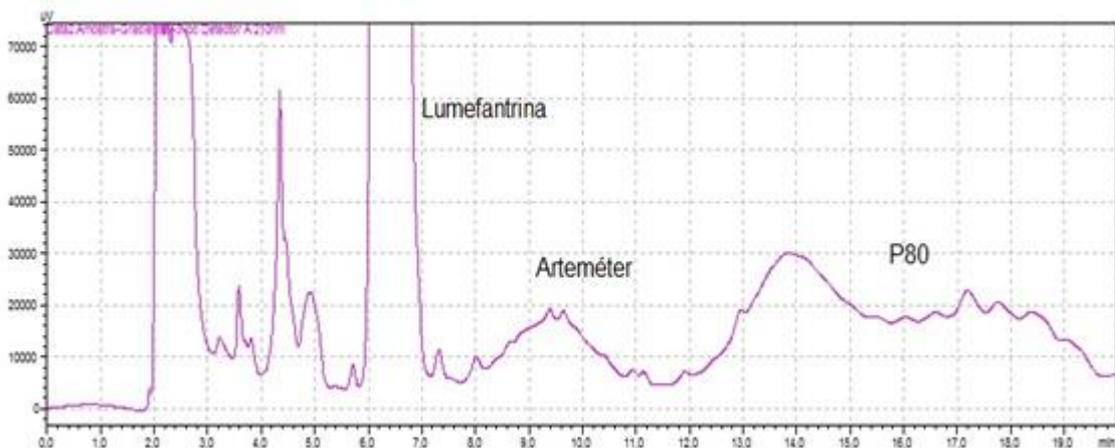


Fonte: O autor (2023).

Nota: Detecção realizada em 210 nm.

Foi testada uma condição isocrática 80:20 (%v/v) (ACN:tampão) para avaliar o perfil cromatográfico do polissorbato 80; em uma corrida de 20 minutos, seria possível retirar toda a substância da coluna – proporção estudada, então, no Gradiente 8. Como ainda havia resquícios de surfactante eluindo em injeções seguintes, uma junção entre gradiente de solvente e de fluxo (Gradiente 9) foi avaliada e mostrou resultados mais positivos (Figura 25).

Figura 25 - Cromatograma no Gradiente 9, obtido em coluna Symmetry(®), fluxo de 1,0 mL/min



Fonte: O autor (2023).

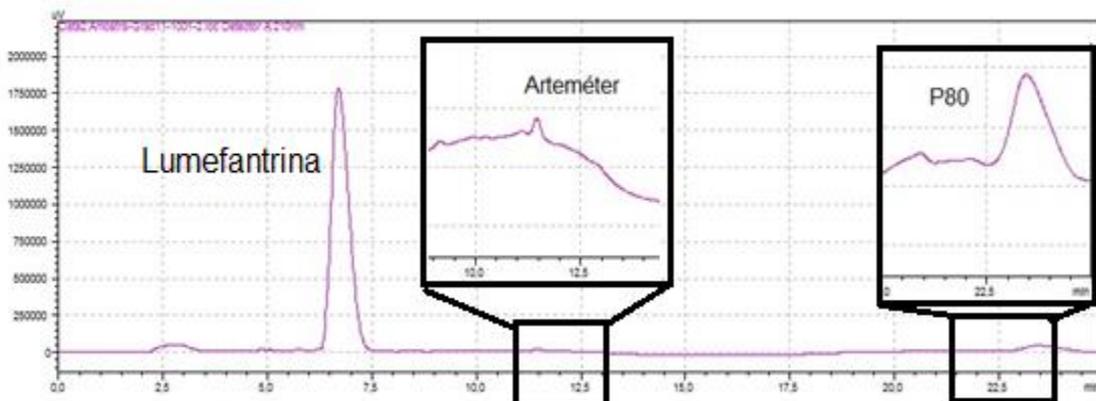
Nota: Detecção realizada em 210 nm.

Diante dos problemas de resolução do arteméter e do P80, sugeriu-se definir o método somente para a dissolução da lumefantrina – de modo que, no Gradiente 10, utilizando as mesmas condições de fluxo e tempo do Gradiente 9, a detecção foi

feita em 390 nm. O cromatograma obtido apresentava apenas um pico, referente a lumefantrina, já que nem o arteméter nem o surfactante absorvem nesse comprimento de onda. Contudo, a resposta analítica era consideravelmente menor, por volta de 60 mV e já era possível notar pequenos ruídos na linha de base, de maneira que o método não parecia adequado para a lumefantrina apenas, nessa condição.

Com base nos 10 gradientes testados até então, identificou-se que as condições ideais para a eluição adequada de lumefantrina, arteméter e do polissorbato 80 são a proporção de ACN:tampão fosfato de 75:25 (%v/v), 60:40 (%v/v) e 80:20 (%v/v), respectivamente. Assim, avaliou-se a aplicação de um método gradiente que fosse composto por essas três condições, em 210 nm. O Gradiente 11 gerou o perfil cromatográfico observado na Figura 26; nota-se que a lumefantrina mantém o formato usual, enquanto o arteméter eluiu em torno de 11 minutos, se destacando da linha de base, e o P80 aparece no final na corrida. O método gradiente se mostrou adequado em resolver os dois princípios ativos da interferência do polissorbato 80 dentro da corrida de 25 minutos. O método final obtido é resumido no Quadro 6 a seguir.

Figura 26 - Cromatograma no Gradiente 11, obtido em coluna Symmetry(®), fluxo de 1,0 mL/min



Fonte: O autor (2023).

Nota: Detecção realizada em 210 nm.

Quadro 6 - Condição final do gradiente do método cromatográfico desenvolvido

TEMPO (min)	PROPORÇÃO DE FASE MÓVEL A (%)	PROPORÇÃO DE FASE MÓVEL B (%)
0	25	75
6	25	75
7	40	60
11	40	60
12	20	80
16	20	80
17	25	75
25	25	75

Fonte: O autor (2023).

Legenda: Fase móvel A = tampão fosfato de potássio monobásico, pH 3,4; Fase móvel B = acetonitrila.

## 4.2 Desenvolvimento da etapa de dissolução

Para a Anvisa e a Farmacopeia Americana, os testes de solubilidade devem ser realizados dentro da faixa do pH fisiológico (pH 1,2 a 7,2) pelo método da agitação orbital em frasco. Como o Setor de Medicamentos do INCQS não apresentava condições técnicas para a realização do experimento conforme as normas vigentes, buscou-se na literatura por trabalhos em que essa avaliação foi realizada.

O único trabalho (dentre os três encontrados na literatura) que atende aos critérios metodológicos é o desenvolvido por Rivelli (2016). Belew e colaboradores (2020) não apresentam resultados nos pH 4,5 e 6,8 para a lumefantrina, como pode ser observado no Apêndice A, e Umaphathi, Ayyappan e Darlin Quine (2011) não seguem o método com os critérios estabelecidos.

Tendo como base os resultados de solubilidade obtidos pela autora, os meios de dissolução testados neste trabalho foram pH 1,2 com LSS, pH 1,2 com P80, pH 4,5 com LSS, pH 4,5 com P80, pH 6,8 com LSS e pH 6,8 com P80.

Em uma dissolução teórica de 100% no volume de meio de 900 mL dos princípios ativos arteméter (20 mg) e lumefantrina (120 mg), a concentração final seria de 22,2 µg/mL e 133,3 µg/mL, respectivamente. Em qualquer um destes meios, a dose de arteméter estaria totalmente solúvel, já que a menor solubilidade relatada foi de 110,2 µg/mL no meio pH 1,2 com LSS. Dentre as seis opções escolhidas, o único meio em que tal dose de lumefantrina seria solúvel é o pH 1,2 com P80 (solubilidade média de 180,65 µg/mL); os outros meios apresentariam concentrações máximas de 55,6 µg/mL.

Como este trabalho fez uso de informações descritas na literatura e há discrepâncias nos valores relatados de solubilidade do arteméter para os meios de pH 1,2 com 1% de P80, pH 4,5 com 1% de LSS e 1% de P80 e pH 6,8 com 1% de LSS (Apêndice A), decidiu-se realizar uma avaliação experimental através dos perfis de dissolução, ainda que houvesse uma provável baixa solubilidade da lumefantrina.

Em um método de dissolução, é necessário, sempre que possível, atender à condição *sink*, definida como: "sendo no mínimo três vezes o volume de meio necessário para se obter uma solução saturada do IFA, considerando a maior dose comercializada do produto" (ANVISA, 2021, p. 12). Para o arteméter, um volume de 500 mL já seria necessário, mas como para solubilizar a lumefantrina mesmo no meio de maior solubilidade são necessários pelo menos 650 mL, fixou-se o volume de 900 mL. Ainda assim, a lumefantrina não apresentará condição *sink*, contudo, a Anvisa permite que essa condição ocorra de acordo com justificativas técnicas (ANVISA, 2021).

Os primeiros meios de dissolução avaliados foram os de pH 1,2, uma vez que a maior resposta para a lumefantrina era observada nessa faixa. A primeira constatação do método foi que, durante o preparo do meio contendo laurilsulfato de sódio, o surfactante se mostrou instável e não solubilizou em água. O aspecto era o de uma suspensão de aspecto leitoso, branco, e que decantava em repouso.

Supôs-se que essa situação poderia ser por conta de incompatibilidade do LSS com algum componente da solução preparada: o surfactante precipita junto de sais de potássio, embora seja estável em soluções ácidas diluídas (SODIUM..., 2009; THE UNITED, 2021), e o tampão utilizado para chegar ao pH de 1,2 possuía

uma solução de cloreto de potássio. O preparo do meio de dissolução foi feito conforme o trabalho de Rivelli (2016), contudo a autora não informa nenhuma ocorrência semelhante a observada neste trabalho. Uma possibilidade seria a reavaliação do tampão, utilizando um meio constituído por uma solução de ácido clorídrico diluída contendo LSS.

Dessa forma, não foi realizado o perfil de dissolução no meio pH 1,2 + 1% de LSS (p/v) e prosseguiu-se com o ensaio com o meio de dissolução de pH 1,2 com 1% de Polissorbato 80 (p/v), após o teste preliminar em béquer (item 3.4.2) ter se mostrado satisfatório.

Nos três trabalhos que discutem a dissolução de arteméter e lumefantrina, as pás foram escolhidas no método validado (UMAPATHI, AYYAPPAN E DARLIN QUINE, 2011; RIVELLI, 2016; BELEW et al., 2020). Além disso, Rivelli (2016) comenta sobre a retenção de parte dos comprimidos dentro das cestas, influenciando de forma negativa nos resultados da dissolução. Portanto, para este trabalho, todos os testes preliminares e o método finalizado foram feitos utilizando o Aparato 2. Inicialmente, a agitação do aparato foi selecionada em 75 rpm, de acordo com valores sugeridos pela Farmacopeia Americana, no Capítulo 1092.

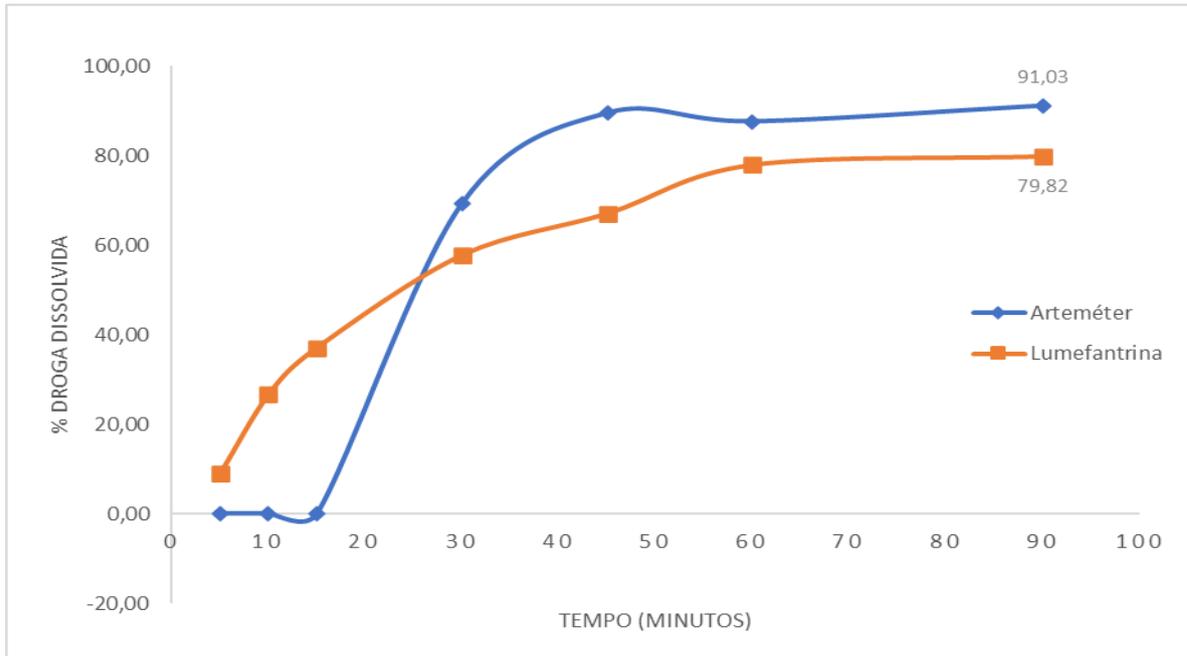
O perfil de dissolução pode ser observado na Figura 27. É possível notar que a resposta da lumefantrina apresenta uma curva "típica" de dissolução, embora a solubilização seja lenta, chegando ao máximo de 80%. A resposta para o arteméter aparentemente se aproxima de um platô em torno de 90%. Os primeiros minutos não puderam ser quantificados porque o pico do analito era de baixa resposta analítica e, nas condições cromatográficas selecionadas, eluia próximo a um interferente de grande resposta.

O uso de surfactantes é permitido em meios de dissolução na concentração mínima possível, acima da concentração micelar crítica, que desenvolva condições *sink*; para o P80, essa concentração crítica é de 0,02 a 0,08% (p/v) (THE UNITED, 2021). A quantidade de fármaco dissolvido em 90 minutos para os dois princípios ativos foi considerada adequada, de modo que decidiu-se avaliar os meios de dissolução contendo 0,5%, 0,25% e 0,1% de P80 (p/v), ainda na agitação de 75 rpm.

Os perfis de dissolução para 0,1% e 0,25% estão ilustrados nas Figuras 28 e 29, respectivamente. O sistema cromatográfico apresentou problemas nas injeções do meio 0,5%, em que todas as injeções de todos os tempos não apresentavam nenhum pico, exceto o tempo final. Assim, a única resposta obtida para o meio pH

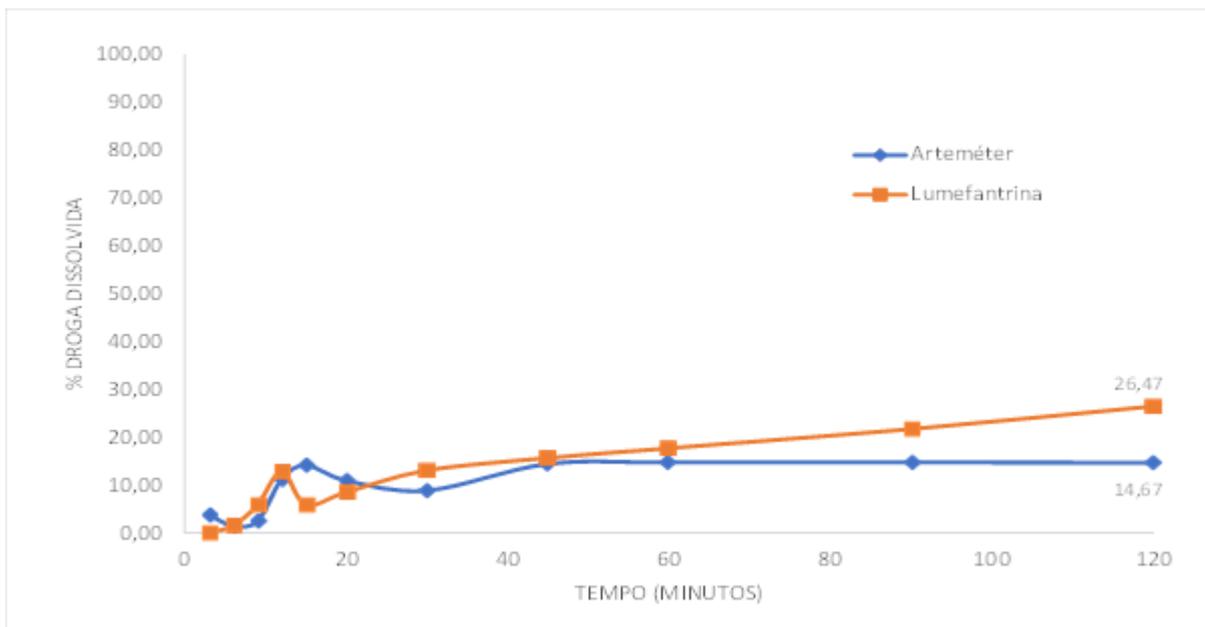
1,2 + 0,5% (p/v) P80 em 75 rpm indica uma dissolução de 47% de arteméter e 69% de lumefantrina em 90 minutos.

Figura 27 - Perfil de dissolução de arteméter e lumefantrina em meio de dissolução pH 1,2 + 1% de P80 (p/v), pás, 75 rpm



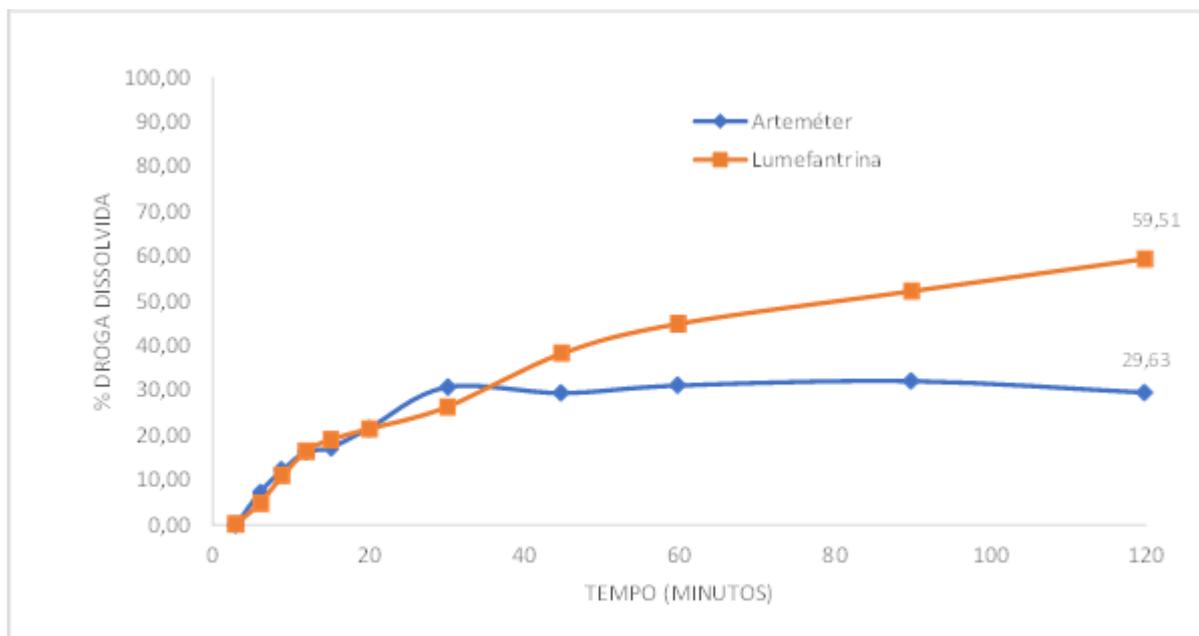
Fonte: O autor (2023).

Figura 28 - Perfil de dissolução de arteméter e lumefantrina em meio de dissolução pH 1,2 + 0,1% de P80 (p/v), pás, 75 rpm



Fonte: O autor (2023).

Figura 29 - Perfil de dissolução de arteméter e lumefantrina em meio de dissolução pH 1,2 + 0,25% de P80 (p/v), pás, 75 rpm



Fonte: O autor (2023).

Dos gráficos, é possível perceber que os dois meios apresentaram resultado inferior para ambos os analitos, comparado com o perfil com 1% do tensoativo. A partir desses experimentos, o último tempo de coleta foi estendido de 90 para 120 minutos, para se avaliar a instalação de um platô – considerado quando duas amostras de dois tempos seguidos apresentam a mesma quantidade de droga dissolvida. Em ambos os casos, percebe-se que o arteméter parece alcançar tal platô, de cerca de 14% para 0,1% de P80, e de 30% para 0,25%. A lumefantrina novamente não apresenta um platô, já que para os dois meios a curva continua em ascensão nos últimos tempos. De qualquer maneira, os dois meios foram considerados inadequados para um método de dissolução.

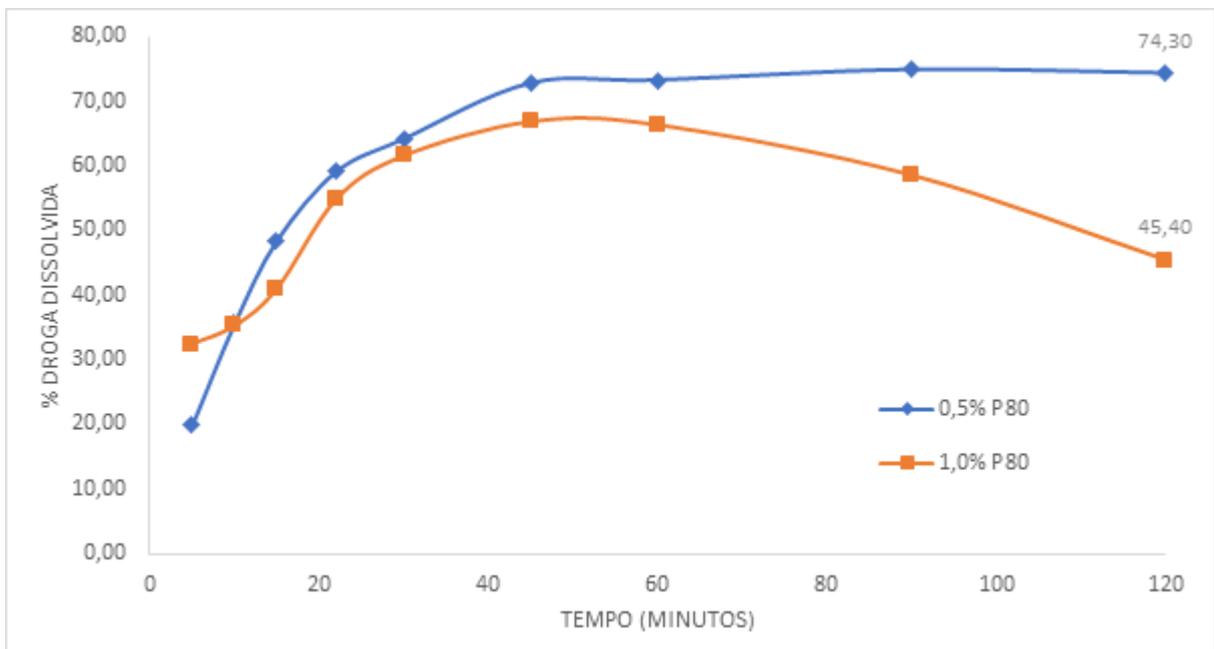
Um novo teste com o meio pH 1,2 com 1% de P80 (p/v) foi realizado, desta vez ajustando a agitação para 100 rpm – velocidade compatível com os trabalhos desenvolvidos na literatura. Além disso, devido aos problemas no sistema cromatográficos anteriormente, um novo ensaio com 0,5% (p/v) também foi realizado, com 100 rpm de agitação. Os resultados destes experimentos são trazidos na Figura 30 para o arteméter e Figura 31 para a lumefantrina.

Dos gráficos, é possível perceber que os dois meios apresentaram resultado inferior para ambos os analitos, comparado com o perfil com 1% do tensoativo. A

partir desses experimentos, o último tempo de coleta foi estendido de 90 para 120 minutos, para se avaliar a instalação de um platô – considerado quando duas amostras de dois tempos seguidos apresentam a mesma quantidade de droga dissolvida. Em ambos os casos, percebe-se que o arteméter parece alcançar tal platô, de cerca de 14% para 0,1% de P80, e de 30% para 0,25%. A lumefantrina novamente não apresenta um platô, já que para os dois meios a curva continua em ascensão nos últimos tempos. De qualquer maneira, os dois meios foram considerados inadequados para um método de dissolução.

Um novo teste com o meio pH 1,2 com 1% de P80 (p/v) foi realizado, desta vez ajustando a agitação para 100 rpm – velocidade compatível com os trabalhos desenvolvidos na literatura. Além disso, devido aos problemas no sistema cromatográficos anteriormente, um novo ensaio com 0,5% (p/v) também foi realizado, com 100 rpm de agitação. Os resultados destes experimentos são trazidos na Figura 30 para o arteméter e Figura 31 para a lumefantrina.

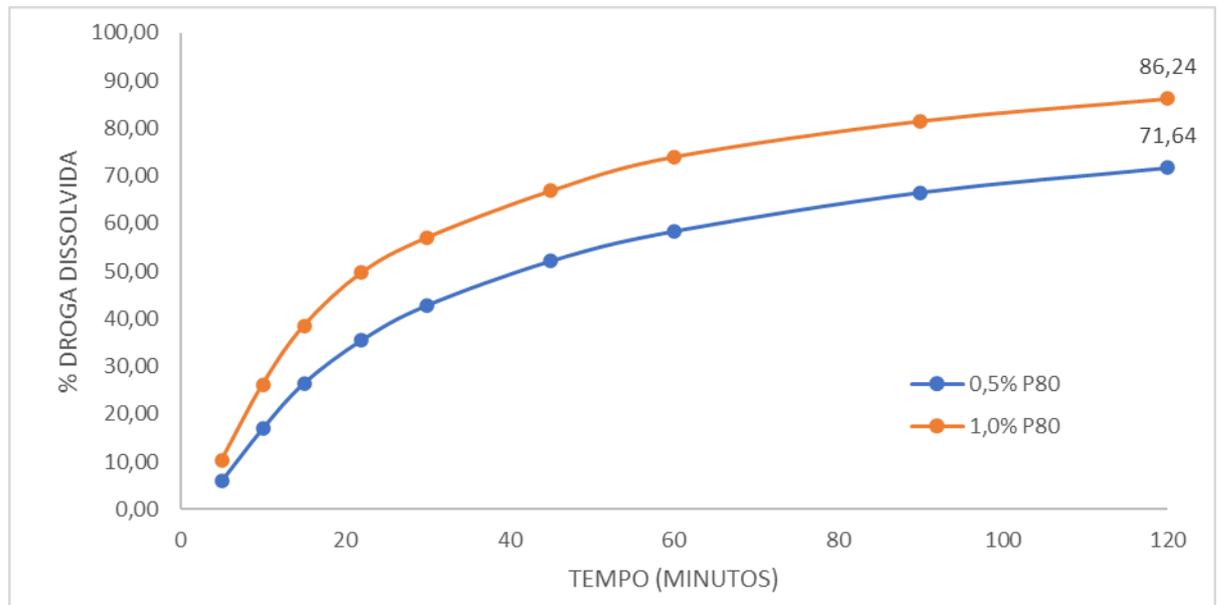
Figura 30 - Perfil de dissolução de arteméter em meio de dissolução pH 1,2 + 0,5% de P80 (p/v) e pH 1,2 + 1,0% de P80 (p/v), pás, 100 rpm



Fonte: O autor (2023).

A resposta do arteméter novamente sofre interferência do meio, como pode ser observado na Figura 30, na curva em laranja que sobe até 67% em 45 e 60 minutos e então torna a descer para 45% em 120 minutos. Não há, contudo, como determinar se os pontos finais tiveram supressão de sinal ou se os pontos

Figura 319 - Perfil de dissolução de lumefantrina em meio de dissolução pH 1,2 + 0,5% de P80 (p/v) e pH 1,2 + 1,0% de P80 (p/v), pás, 100 rpm



Fonte: O autor (2023).

intermediários foram superestimados. Para a lumefantrina, as curvas para 0,5% e 1,0% apresentam o mesmo comportamento (uma curva ascendente que tende a um platô), mas é evidente que uma maior concentração de surfactante impacta positivamente na dissolução.

Os valores de princípio ativo dissolvido encontrado em cada tempo de coleta nos perfis de dissolução estão apresentados na Tabela 4. O Capítulo 1092, da Farmacopeia Americana, descreve que um método de dissolução adequado deve ter um coeficiente de variação menor do que 20% nos tempos iniciais e, no máximo, 10% nos tempos finais.

O meio de pH 1,2 com 0,1% de P80 possui grande variabilidade na resposta, com valores em torno de 20% para a lumefantrina e chegando até a mais de 120% para o arteméter. Os meios com 0,5%, a 100 rpm, e 1,0%, a 75 e 100 rpm, demonstram uma menor variação nas respostas dos analitos em cada tempo de coleta, indicando perfis adequados.

Deve-se considerar, contudo, que alguns testes de curva de dissolução foram feitos utilizando de 2 a 3 cubas. Essa baixa representatividade amostral pode ter influenciado nos resultados descritos, principalmente nos observados nos meios de menores concentrações que apresentavam variações altas, principalmente para o arteméter.

Tabela 3 – Resultados obtidos nos testes de perfil de dissolução, em cada condição, considerando a porcentagem de fármaco dissolvida em cada tempo de coleta

CONDIÇÃO	1		2		3		4		5	
Tempo (min)	ART	CV (%)								
3	3,73	70,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	0,00	0,00	19,89	15,44	32,41	8,31
6	1,44	127,05	7,26	64,90	-	-	-	-	-	-
9	2,45	41,26	12,36	19,56	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	0,00	0,00	35,56	4,01	35,25	26,59
12	11,16	105,01	16,43	14,48	-	-	-	-	-	-
15	14,16	51,78	17,24	15,39	0,00	0,00	48,41	5,84	40,99	8,63
20	10,93	36,17	21,59	8,27	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	59,05	1,28	54,82	5,72
30	8,84	13,78	30,83	20,03	69,29	15,21	64,15	2,49	61,55	15,96
45	14,42	32,24	29,56	3,79	89,42	2,29	72,76	2,26	66,82	8,13
60	14,74	36,54	31,23	3,97	87,54	4,84	73,21	1,79	66,29	14,97
90	14,76	0,00	32,20	0,74	91,03	6,35	74,84	2,62	58,53	6,22
120	14,67	19,16	29,63	3,49	-	-	74,30	0,61	45,40	2,40
CONDIÇÃO	1		2		3		4		5	
Tempo (min)	LUM	CV (%)								
3	0,00	0,00	0,21	0,002	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	8,87	0,00	5,98	0,001	10,30	0,0001
6	1,54	14,81	4,85	3,29	-	-	-	-	-	-
9	5,84	13,25	11,12	7,68	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	26,59	10,37	16,99	2,40	26,24	2,00
12	8,00	0,00	16,50	0,22	-	-	-	-	-	-
15	5,84	16,96	19,03	10,90	37,04	3,51	26,49	1,89	38,55	1,20
20	8,48	16,98	21,48	3,30	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	35,51	1,78	49,67	0,05
30	13,04	1,50	26,35	8,71	57,76	2,59	42,85	2,26	57,09	0,53
45	15,64	11,54	38,42	0,66	67,05	2,76	52,11	1,76	66,85	0,79
60	17,68	17,40	45,00	0,003	73,36	3,89	58,34	1,47	74,01	1,39
90	21,69	20,71	52,32	2,05	79,82	2,38	66,51	1,36	81,56	1,43
120	26,44	10,38	59,51	0,98	-	-	71,64	1,76	86,24	1,34

Fonte: O autor (2023).

Legenda: ART = arteméter; LUM = lumefantrina; CV = coeficiente de variação; min = minutos; condição 1 = meio de pH1,2 + 0,1% de P80, 75 rpm; condição 2 = meio de pH1,2 + 0,25% de P80, 75 rpm; condição 3 = meio de pH1,2 + 1,0% de P80, 75 rpm; condição 4 = meio de pH1,2 + 0,5% de P80, 100 rpm; condição 5 = meio de pH1,2 + 1,0% de P80, 100 rpm.

Nota: nas respostas em que se lê "0,00", entende-se por não foi possível realizar a quantificação; nos tempos com "-", entende-se que o tempo de coleta não foi realizado naquela condição.

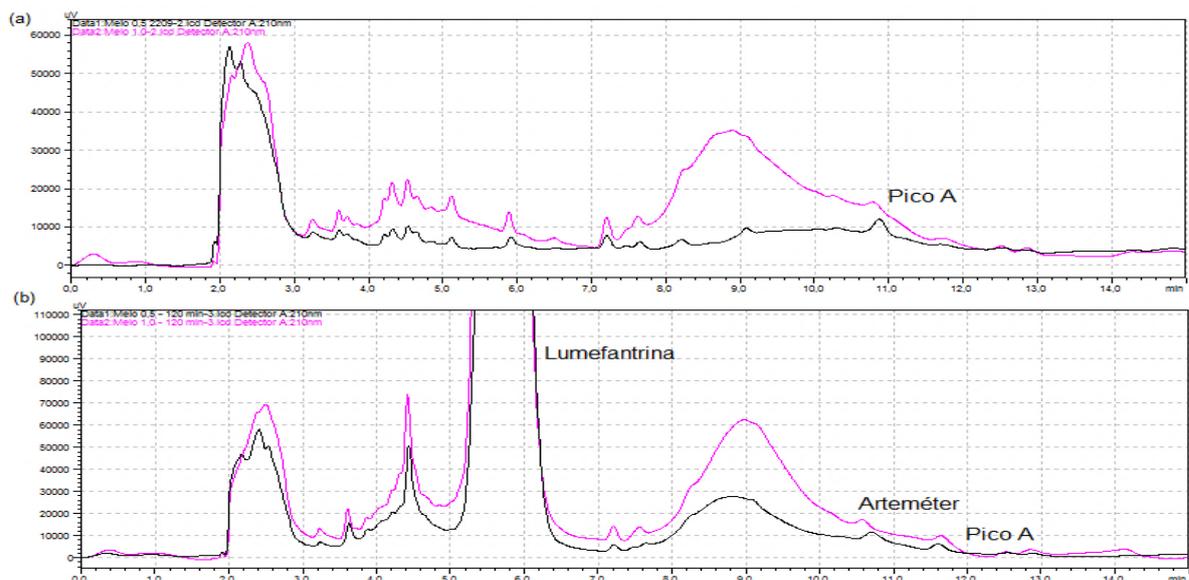
A interferência observada no arteméter pode ser explicada por uma resposta exacerbada na janela de 7 a 12 minutos nos cromatogramas, representada na

Figura 32. A resposta é mais pronunciada no meio com 1% de polissorbato 80 (p/v), no qual a eluição do arteméter ocorre exatamente nesta região, em torno de 10,7 minutos, tornando a quantificação difícil pois o software utilizado (*Labsolutions®*) apresentava problemas para integrar corretamente o pico, muitas vezes não identificando-o ou considerando uma área maior. Apesar de essa região já ser observada nos meios de dissolução "brancos", a dissolução da amostra aumenta a resposta analítica; supõe-se que haja uma soma de resposta do meio com algum ou alguns excipientes.

Ainda, a presença de um pico presente tanto nos diluentes quanto na amostra, em torno de 11,0 minutos, chamado aqui de "Pico A" poderia passar pelo arteméter. Para confirmar a eluição do analito em 10,7 minutos, o cromatograma da amostra foi comparado com injeções de padrão e uma amostra fortificada com padrão.

Quanto aos meios de pH 4,5 e 6,8 com 1% dos surfactantes LSS e P80, as quatro opções foram consideradas insatisfatórias no teste preliminar, portanto não passaram pelo ensaio de perfil de dissolução. Os resultados obtidos em cada pH estão apresentados nas Figuras 33 e 34, respectivamente.

Figura 3210 - Comparação dos cromatogramas para a) meios de dissolução pH 1,2 + 0,5% P80 (p/v) e pH 1,2 + 1,0% P80 (p/v); b) amostra dissolvida nos meios de dissolução pH 1,2 + 0,5% P80 (p/v) e pH 1,2 + 1,0% P80 (p/v), pás, 100 rpm

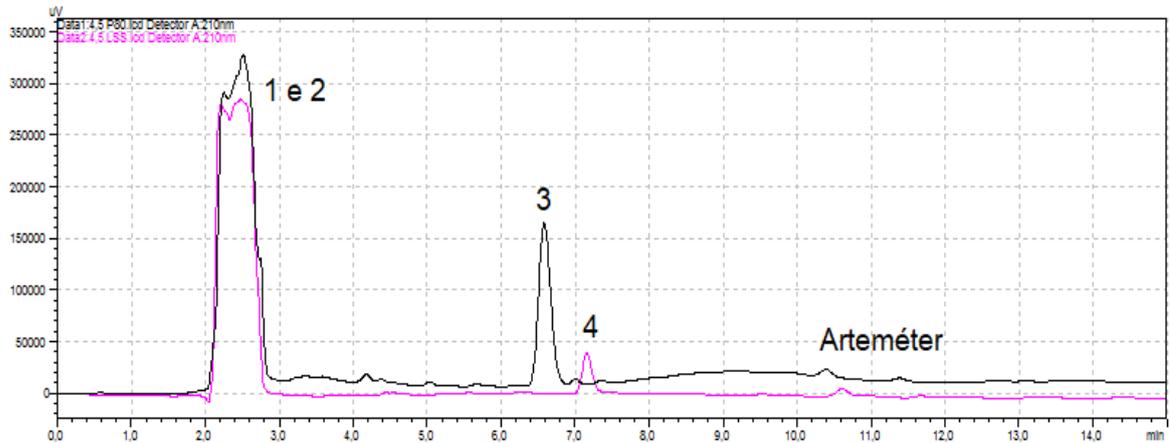


Fonte: O autor (2023).

Legenda: linha preta = meio com 0,5% de P80; linha rosa = meio com 1,0% de P80.

Nota: detecção realizada em 210 nm para todos os cromatogramas (meio e amostra).

Figura 113 - Comparação dos cromatogramas para os meios pH 4,5 + 1,0% de P80 (p/v) e pH 4,5 + 1,0% de LSS (p/v), picos 1-4 representam a lumefantrina

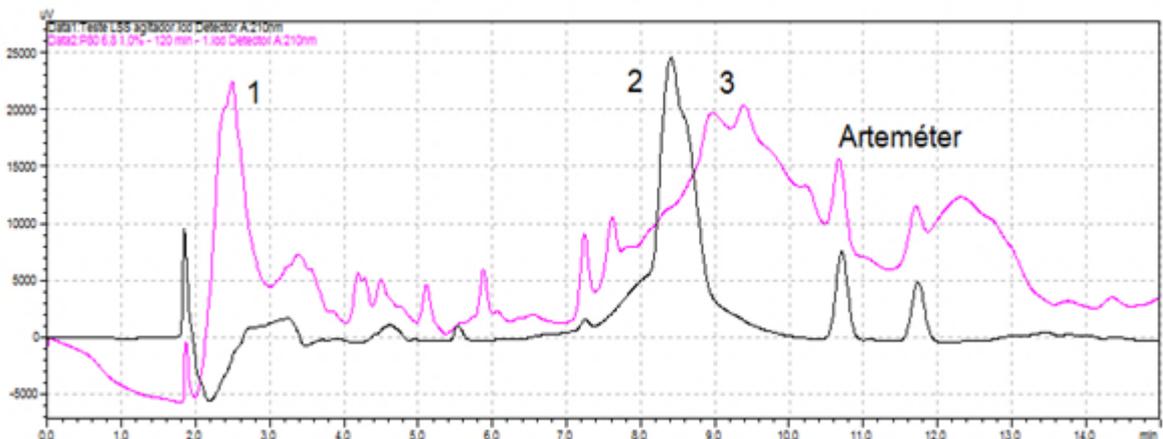


Fonte: O autor (2023).

Legenda: linha preta = meio com P80; linha rosa = meio com LSS.

Nota: detecção realizada em 210 nm para ambas as corridas.

Figura 34 - Comparação dos cromatogramas para os meios pH 6,8 + 1,0% de P80 (p/v) e pH 6,8 + 1,0% de LSS (p/v), picos 1-3 representam a lumefantrina



Fonte: O autor (2023).

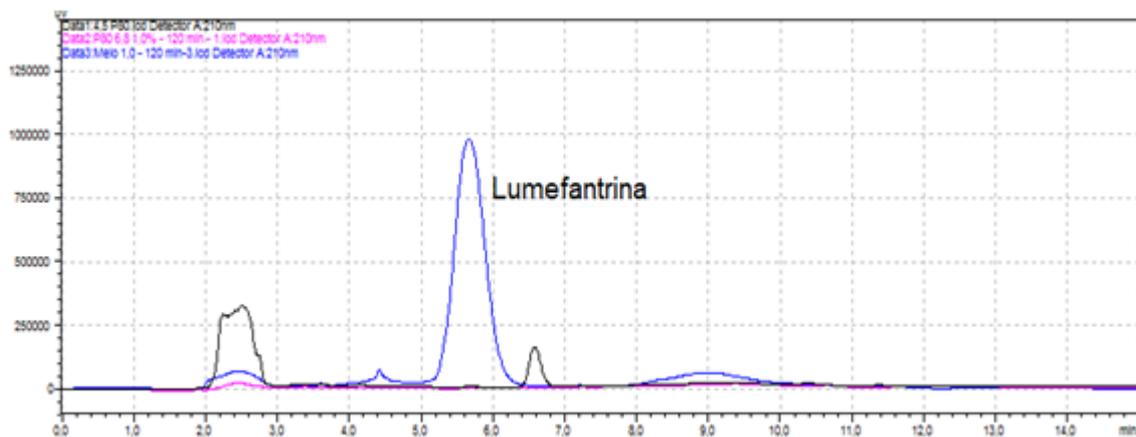
Legenda: linha preta = meio com LSS; linha rosa = meio com P80.

Nota: detecção realizada em 210 nm para ambas as corridas.

No pH 4,5, a lumefantrina se divide em dois picos, um deles eluindo logo no início da corrida (picos 1 e 2 na Figura 33), e outro entre 6 e 8 minutos (pico 3 para P80 e pico 4 para LSS na Figura 33). Já no pH 6,8, a lumefantrina elui com um pico duplo em 8 minutos, com uma resposta discreta (pico 2 na Figura 34), para o LSS; e novamente se divide em dois picos (1 e 3 na Figura 34) para o P80. O arteméter eluiu entre 10 e 11 minutos nos quatro meios de dissolução.

Analisando os dados dentre os três pH e uso dos dois surfactantes, fica claro que o aumento do pH afeta negativamente na solubilização da lumefantrina. Esse comportamento fica explícito na comparação dos cromatogramas da dissolução nos meios pH 1,2, 4,5 e 6,8 com polissorbato 80 (Figura 35); nota-se que a resposta do princípio ativo é maior na condição mais ácida, na qual o pico chega a 1000 mV, enquanto nas outras condições, além dos problemas já expostos acima, a resposta não chega a 350 mV. A influência do pH já foi observada nos trabalhos de Rivelli (2016) e Belew e colaboradores (2020); contudo, a existência de um platô de 80% em 60 minutos foi descrita pela autora, o que não foi observado neste trabalho.

Figura 35 - Comparação dos cromatogramas obtidos nos meios pH 1,2 + 1,0% de P80 (p/v), pH 4,5 + 1,0% de P80 (p/v) e pH 6,8 + 1,0% de P80 (p/v)



Fonte: O autor (2023).

Legenda: linha azul = pH 1,2; linha preta = pH 4,5; linha rosa = pH 6,8.

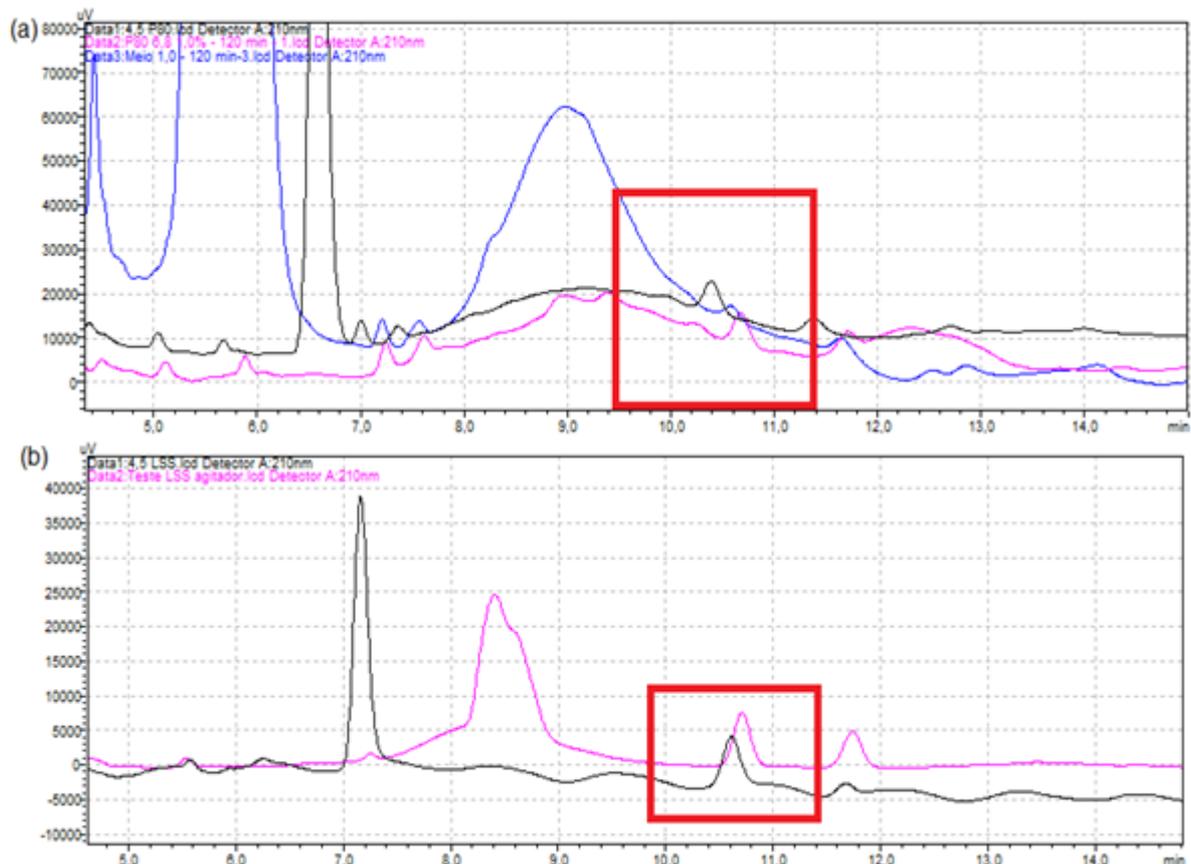
Nota: detecção realizada em 210 nm para as três corridas.

A dissolução dos dois princípios ativos é influenciada pela concentração de surfactante no meio de dissolução: um aumento de 10 vezes na quantidade de polissorbato 80 representa um aumento de 76% e 53% na dissolução do arteméter e lumefantrina, respectivamente. O aumento da agitação gera um aumento mais discreto para a lumefantrina, enquanto melhora ainda mais a solubilização do arteméter (de 47% para 74%) no meio de 0,5% (p/v), mas parece influenciar ainda mais na interferência do meio 1,0% na condição isocrática.

Como o intuito deste trabalho era a escolha de um meio de dissolução único que permitisse a dissolução simultânea dos dois princípios ativos, nos meios de pH 4,5 e 6,8, ao verificar os problemas associados à lumefantrina, o arteméter não foi

sequer quantificado. Visualmente, o meio mais ácido com P80 (Figura 36, cromatograma (a)) parece ter uma resposta analítica menor, mas não é possível atribuir isso a uma baixa solubilidade do arteméter ou uma alta interferência do meio de dissolução. Supõe-se que a resposta analítica desse princípio ativo não difira muito em diferentes pH ou com diferentes surfactantes. Rivelli (2016) indica que as melhores respostas, porém, teriam sido com o pH 4,5 com LSS e pH 6,8 com P80, com dissoluções rápidas, de 80% em 20 e 15 minutos, respectivamente.

Figura 126 - Comparação dos cromatogramas diferentes meios: a) 1,0% de P80 (p/v) nos pH 1,2, 4,5 e 6,8; b) 1,0% de LSS (p/v) nos pH 4,5 e 6,8



Fonte: O autor (2023).

Legenda: linha azul = pH 1,2; linha preta = pH 4,5; linha rosa = pH 6,8; destaques em vermelho = picos referentes ao arteméter.

Nota: detecção realizada em 210 nm em todas as corridas.

Embora a autora relate que nesses meios seriam necessários apenas 6 mL para solubilizar a dose de 20 mg de arteméter, considerando o volume de 900 mL do ensaio, a condição *sink* extrapolaria os critérios e o teste de dissolução não seria capaz de detectar mudanças críticas nas formulações e discriminar entre produtos aceitáveis e não aceitáveis (RIVELLI, 2016; THE UNITED, 2021), de maneira que,

apesar de apresentarem a melhor solubilidade, os meios não seriam adequados para o ensaio.

Pelos dados de solubilidade, em qualquer um dos meios testados neste trabalho, o arteméter poderia chegar a 100% de dissolução, portanto, o fator que afeta mais os resultados é a agitação do meio – condição atestada por Belew e colaboradores (2020). Mas frente a tudo exposto, os dados indicam que a resposta mais adequada é obtida na agitação a 75 rpm, no meio de pH 1,2 + 1,0% de P80.

Nessas condições, os critérios do valor Q e tempo de coleta foram estimados em pelo menos 80% em 60 minutos para o arteméter, e 70% em 90 minutos para a lumefantrina. Um menor valor de fármaco dissolvido para a lumefantrina é justificada pela sua baixa solubilidade; a condição *sink* não é atingida, de maneira que o volume do meio pode não ser suficiente para solubilizar toda a quantidade adicionada. Para Belew e colaboradores (2020), os valores Q seriam 80%, de maneira que o critério estipulado por este trabalho não seria tão discrepante dos apresentados na literatura. Cabe ressaltar que tais valores são apenas estimativas, e a decisão final deve se basear nas normas disponíveis para que o método seja discriminativo.

Os critérios de aceitação do ensaio de dissolução do arteméter seriam, portanto: o primeiro estágio será satisfatório com valores acima de 85%; no segundo estágio, a média de doze unidades deve ser maior que 80% e nenhuma unidade estará abaixo de 65%; no último estágio, a média de 24 unidades está acima de 80%, no máximo duas unidades com resultados inferiores a 65% e nenhuma unidade inferior a 55%. Para a lumefantrina, os valores seriam respectivamente: 75%, em E1; 70% e 55%, para o E2; e 70%, 55% e 45% em E3.

## 5 CONCLUSÃO

O método final proposto foi adequado para a dissolução simultânea dos dois princípios ativos em um único meio de dissolução de comprimidos de liberação imediata da combinação de dose fixa de arteméter (20 mg)/lumefantrina (120 mg) em uma única corrida cromatográfica de 25 minutos. Traz vantagens ao utilizar um surfactante mais acessível, como o polissorbato 80, no meio de dissolução, e realizar a quantificação de maneira mais simples e rápida se comparada com a monografia da Farmacopeia Internacional.

Na otimização do método cromatográfico para a quantificação dos princípios ativos, avaliou-se diferentes colunas cromatográficas, tampões de diferentes sais em diferentes proporções na fase móvel e diferentes comprimentos de onda para a detecção. Ao fim dos testes, definiu-se uma fase móvel composta por acetonitrila e tampão de fosfato de potássio de pH 3,4, em fluxo de 1,0 mL/min, detecção no UV em 210 nm, coluna C18, de 250 mm x 4,6 mm. Embora o objetivo inicial fosse um método isocrático, a resolução adequada da lumefantrina, arteméter e polissorbato 80 foi obtida apenas em condição gradiente de fase móvel.

Na pesquisa do meio de dissolução, observou-se que a solubilização da lumefantrina é consideravelmente influenciada pelo pH, com a melhor resposta em meios mais ácidos; além disso, o aumento da concentração de surfactante – em agitação semelhante – aumenta a solubilização. A dissolução do arteméter é positivamente influenciada pelo aumento da concentração do surfactante e da agitação. Portanto, ficou definido um meio de tampão pH 1,2 com 1% de polissorbato 80 (p/v) sob agitação de 75 rpm. Nessas condições, depois de 60 e 90 minutos, pelo menos 80% de arteméter e 70% de lumefantrina, respectivamente, estão dissolvidos no meio – mas estes valores são apenas estimativas, e os valores Q devem ser oficializados com novos testes e decisões.

Ainda são necessárias as etapas de validação analítica no Setor de Medicamentos, além da avaliação de sua aplicabilidade em comprimidos da associação do antimalárico de diferentes fabricantes, e do seu poder discriminativo. Futuramente, a dissolução de arteméter/lumefantrina poderá ainda ser adicionada aos compêndios oficiais e auxiliar em um controle de qualidade mais rigoroso dos medicamentos fornecidos a população acometida pela malária, ajudando a diminuir o impacto mundial da doença.

## REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Guia de Dissolução Aplicável a Medicamentos Genéricos, Novos e Similares**: guia nº 14/2018 – versão 2. Brasília: 2021, 38 p. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/Guia+14\\_2018\\_vers%C3%A3o+2\\_+de+29+10+21.pdf/9cecb40-217e-4b6e-bf2c-0237641edacb](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3364628/Guia+14_2018_vers%C3%A3o+2_+de+29+10+21.pdf/9cecb40-217e-4b6e-bf2c-0237641edacb). Acesso em: 23 ago. 2022.
- BEARGIE, S. M. *et al.* The economic impact of substandard and falsified antimalarial medications in Nigeria. **PLOS ONE**, [Brasil], v. 14, n. 8, p. 1-16, 1 ago. 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0217910>. Acesso em: 22 set. 2022.
- BELEW, S. *et al.* Development of a dissolution method for lumefantrine and artemether in immediate release fixed dose artemether/lumefantrine tablets. **Malaria Journal**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–12, 7 abr. 2020. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-020-03209-5>. Acesso em: 22 set. 2022.
- BRASIL. Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 24 set. 1976. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l6360.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6360.htm). Acesso em: 24 set. 2022.
- BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l8080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm). Acesso em: 23 set. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. 2. ed. Brasília: [s.n.], 2021. 84 p. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/malaria/guia\\_tratamento\\_malaria\\_2nov21\\_isbn\\_site.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/malaria/guia_tratamento_malaria_2nov21_isbn_site.pdf/view). Acesso em: 10 ago. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil**. Brasília: [s.n.], maio 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no17.pdf>. Acesso em: 9 ago. 2022.
- BROWN, C. K. *et al.* Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. **Pharmaceutical Technology**. Nova Iorque, v. 28, n. 12, p. 1-7, dez. 2004. Disponível em: [http://dissolutiontech.com/DTresour/200511Articles/DT200511\\_A01.pdf](http://dissolutiontech.com/DTresour/200511Articles/DT200511_A01.pdf). Acesso em: 24 set. 2022.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. **Malaria - About Malaria - Biology**. [S. l.], 2022a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Acesso em: 10 ago. 2022.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. **CDC - Malaria - About Malaria - Disease**. [S. l.], 2022b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>. Acesso em: 9 ago. 2022.

EVANS, D. R. *et al.* Poor-quality antimalarials further health inequities in Uganda. **Health Policy and Planning**. [Oxford], v. 34, n. 3, p. 36-47, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6901073/pdf/czz012.pdf>. Acesso em: 22 set. 2022.

FARMACOPEIA Brasileira. 6 ed. Brasília: ANVISA, 2019a. 2 v.

FARMACOPEIA Brasileira. 6 ed. Brasília: ANVISA, 2019b. 1 v.

GODINHO, J. M. *et al.* Importance of Particle Pore Size in Determining Retention and Selectivity in Reversed Phase Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography A**. [S. l.], v. 1634, p. 1-6, 20 dez. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967320309523?via%3Dihub>. Acesso em: 30 out. 2022.

GUILLEMIN, C. L. Specific surface area: The neglected parameter in chromatography. **Journal of Chromatography A**, [S. l.] v. 158, p. 21–32, 1 out. 1978. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300899525>. Acesso em: 30 out. 2022.

HABIB, R. *et al.* HPLC-UV method for simultaneous quantitation of artemether and lumefantrine in fixed dose combination orodispersible tablet formulation. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, [Karachi], v. 33, n. 4, p. 1561–1567, 1 jul. 2020.

HONG, P.; MCCONVILLE, P. R. **Dwell Volume and Extra-Column Volume: What Are They and How Do They Impact Method Transfer?** [Milford]: Waters Corporation, p. 1-9, abr. 2018. Disponível em: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005723en.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2022.

INCQS. **Atividades**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: [https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=73&Itemid=68](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=68). Acesso em: 3 out. 2022.

JACKSON, K. D. *et al.* Impact of substandard and falsified antimalarials in Zambia: Application of the SAFARI model. **BMC Public Health**. [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–11, 9 jul. 2020. Disponível em: <https://bmcpublikealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-020-08852-w>. Acesso em: 22 set. 2022.

MERCK. **LiChrospher® 100 RP-18 and RP-18 Endcapped | Analytics and Sample Preparation | Merck**. [S. l.], 2022a. Disponível em: [https://www.merckmillipore.com/BR/pt/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/lichrospher-hplc-columns-and-sorbents/lichrospher-100-rp-18-and-rp-18-endcapped/PY6b.qB.A\\_UAAAE\\_YwF3.Lxj,nav](https://www.merckmillipore.com/BR/pt/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/lichrospher-hplc-columns-and-sorbents/lichrospher-100-rp-18-and-rp-18-endcapped/PY6b.qB.A_UAAAE_YwF3.Lxj,nav). Acesso em: 29 out. 2022a.

MERCK. **LiChrosorb® RP-18 (5 µm) | Analytical and Sample Preparation | Merck**, [s. l.], 2022b. Disponível em: [https://www.merckmillipore.com/BR/pt/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/columns-for-usp-specifications/l1-octadecylsilane-chemically-linked-to-porous-silica-or-ceramic-micro-particles/lichrosorb-rp-18-5/zBeb.qB.sXMAAAE\\_rAN3.Lxj,nav](https://www.merckmillipore.com/BR/pt/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/columns-for-usp-specifications/l1-octadecylsilane-chemically-linked-to-porous-silica-or-ceramic-micro-particles/lichrosorb-rp-18-5/zBeb.qB.sXMAAAE_rAN3.Lxj,nav). Acesso em: 29 out. 2022b.

MILENKOVIĆ, M. *et al.* Generic approach in a gradient elution HPLC method development that enables troubleshooting free method transfer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 207, p. 1-13, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708521004787?via%3Dihub>. Acesso em: 27 nov. 2022.

NOVARTIS. **Coartem (arteméter + lumefantrina)**: comprimidos dispersíveis – 20 mg + 120 mg, Responsável Técnico: Virginia da Silva Girdali. São Paulo: Novartis Biociências, 2013, (16 p.).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **A study on the public health and socioeconomic impact of substandard and falsified medical products**. Geneva, [s.n.], 38 p, 2017a. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241513432>. Acesso em: 22 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Global Surveillance and monitoring systems for substandard and falsified medical products**. Geneva, [s.n.], 64 p, 2017b. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326708>. Acesso em: 23 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Lumefantrine (Lumefantrinum). *In: THE INTERNATIONAL Pharmacopoeia*, 10th ed. Geneva: WHO, 2020a. Disponível em: <https://digicollections.net/phint/2020/index.html#d/b.6.1.218>. Acesso em: 21 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Artemether and lumefantrine tablets. *In: THE INTERNATIONAL Pharmacopoeia*, 10th. ed. Geneva: WHO, 2020b. Disponível em: <https://digicollections.net/phint/2020/index.html#d/b.6.2.2.14>. Acesso em: 24 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Malaria Report 2021**. Geneva: WHO, 2021, 322 p. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>. Acesso em: 27 ago. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Malaria**. Geneva, 2022a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Acesso em: 8 ago. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Malaria burden data: cases and deaths**. Geneva, 2022b. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/malaria-cases-deaths>. Acesso em: 2 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Guidelines for Malaria**. Geneva, 2022c. Disponível em: <https://app.magicapp.org/#/guideline/LwRMXj/section/nVp9wj>. Acesso em: 30 ago. 2022.

OZAWA, S. *et al.* Modeling the Economic Impact of Substandard and Falsified Antimalarials in the Democratic Republic of the Congo. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [Arlington], v. 100, n. 5, p. 1149–1157, 21 jan. 2019. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/100/5/article-p1149.xml>. Acesso em: 22 set. 2022.

PERKINELMER. **HPLC Column Selection Guide: going under the hood**. Waltham: PerkinElmer, INC, 2016. Disponível em: <https://columnfinder.perkinelmer.oonops.eu/res/documents/howto.pdf>. Acesso em: 29 out. 2022.

PERKINELMER. **A Comparison of Fully Porous C18 Reversed Phase HPLC Columns**. Waltham: PerkinElmer, INC, 2022. Disponível em: <https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/tch-comparison-of-fullyporousc18reversedphase-hplccolumns.pdf>. Acesso em: 29 out. 2022.

PETER WUELFING, W. *et al.* Polysorbate 80 UV/vis spectral and chromatographic characteristics – defining boundary conditions for use of the surfactant in dissolution analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p. 774–782, 7 jun. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708506000598?via%3Dihub>. Acesso em: 19 dez. 2022.

PORTELA, M. C. Avaliação da qualidade em saúde. *In*: ROZENFELD, S. (ed.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. 20. ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2012. p. 259–269.

QUADROS, H. C. *et al.* The Role of the Iron Protoporphyrins Heme and Hematin in the Antimalarial Activity of Endoperoxide Drugs. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 60, 4 jan. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/15/1/60>. Acesso em: 20 set. 2022.

REBIERE, H. *et al.* Fighting falsified medicines: The analytical approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 142, p. 286–306, 5 ago. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708517306192>. Acesso em: 23 set. 2022.

RIVELLI, G. G. **Estudo de dissolução de arteméter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada para avaliação de correlação in vitro-in vivo**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, jul. 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-B4XMEN>. Acesso em: 23 ago 2022.

RUFINO, M. P. **HPLC prático e definitivo: aula 8**. [S.l.: s.n.]. 2022a. Apresentação de slides.

RUFINO, M. P. **HPLC prático e definitivo: aula 3**. [S.l.: s.n.]. 2022b. Apresentação de slides.

SCHULTZE-JENA, A. *et al.* The counterintuitive role of extra-column volume in the determination of column efficiency and scaling of chromatographic processes. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1493, p. 49–56, 14 abr. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967317303278>. Acesso em: 27 nov. 2022.

SHIMADZU Scientific Instruments. Separation Conditions 4 Examining Mobile Phase Ratios and Improving Separation, 2022. Disponível em: <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/technical-support/analysis-basics/lcms-tips/64lab.html>. Acesso em: 27 out. 2022.

SILVA, A. C. P. DA. O Laboratório Oficial na avaliação analítica. *In*: ROZENFELD, S. (ed.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. 20. ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2012. p. 271-301.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2nd. Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997.

SODIUM lauryl sulfate. *In*: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. Londres: Pharmaceutical Press; Washington: American Pharmacists Association, 2009. 944 p.

UMAPATHI, P.; AYYAPPAN, J.; DARLIN QUINE, S. Development and validation of a dissolution test method for artemether and lumefantrine in tablets. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 10, n. 5, p. 643–653, 2011. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/71703>. Acesso em: 23 ago. 2022.

THE UNITED States Pharmacopeia. <1092> **The dissolution procedure: development and validation**. Maryland: U.S. Pharmacopeia, 2021. Disponível em: [https://online.uspnf.com/uspnf/document/1\\_GUID-CE0902BA-77AC-422D-8BF0-A221B5DE6012\\_5\\_en-US](https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-CE0902BA-77AC-422D-8BF0-A221B5DE6012_5_en-US). Acesso em: 23 ago. 2022.

VANDERESSE, R. *et al.* Inactivation of Malaria Parasites in Blood: PDT vs Inhibition of Hemozoin Formation.. *In*: RODRIGUEZ-MORALES. A. J. (ed), **Current Topics in Malaria**, [Londres]: InTech, 2016. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/52229>. Acesso em: 20 set. 2022.

VENKATA RAO, P.; RAMBABU, C. Validated reverse phase high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of artemether and

lumefantrine in fixed combined dosage form. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 159–163, 1 mar. 2017. Disponível em: <https://www.innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/15930>. Acesso em: 09 out. 2022.

VERBEKEN, M. *et al.* Stability-indicating HPLC-DAD/UV-ESI/MS impurity profiling of the anti-malarial drug lumefantrine. **Malaria Journal**, [S. l.], v. 10, 2011. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-51>. Acesso em: 22 set. 2022.

VINETZ, J. M. *et al.* Quimioterapia da malária. *In*: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (eds.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 Ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012. p. 1383–1418.

WANG, J. *et al.* Artemisinin, the Magic Drug Discovered from Traditional Chinese Medicine. **Engineering**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 32–39, 1 fev. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095809918305423?via%3Dihub>. Acesso em: 20 set. 2022.

WATERS. **Symmetry C18 Column, 100Å, 5 µm, 4.6 mm X 250 mm, 1/pk - WAT054275 | Waters**. Disponível em: <https://www.waters.com/nextgen/en/shop/columns/wat054275-symmetry-c18-column-100a-5--m-46-mm-x-250-mm-1-pk.html>. Acesso em: 29 out. 2022.

**APÊNDICE A - MEIOS DE DISSOLUÇÃO AVALIADOS ANTERIORMENTE NA LITERATURA COM A SOLUBILIDADE MÉDIA ESTIMADA EM µg/mL**

pH	MEIO DE DISSOLUÇÃO	AUTOR	ART	LUM
-	Água	1	133	Insolúvel
		2	92	5
	Água + 1,0% LSS	1	4107	16
		2	97	14
	Água + 1,0% BKC	1	1230	11
	Água + 1,0% CTAB	1	2544	11
	Água + 1,0% P80	1	643	11
2		597	6	
1,0-1,2	Água + 1,0% Myrj 52	1	536	34
		1	127	Insolúvel
	Solução HCl	2	104	1
		3	323	-
	Solução HCl + 0,5% LSS	1	2633	216
		2	116	39
	Solução HCl + 1,0% LSS	3	337	59
		1	1055	119
		3	-	93
	Solução HCl + 1,0% BKC	1	2469	175
	Solução HCl + 1,0% CTAB	1	2469	175
	Solução HCl + 0,5% P80	3	10	-
	Solução HCl + 1,0% P80	1	639	272
		2	450	185
		3	17	112
	Solução HCl + 0,5% Myrj 52	3	151	-
	Solução HCl + 1,0% Myrj 52	1	503	813
3		181	-	
2,0-2,3	Solução HCl + 1,0% Myrj 52	1	603	463
		3	290	626
	Solução HCl + 1,5% Myrj 52	1	897	616
		3	452	813
	Solução HCl + 2,0% Myrj 52	1	1077	732
3		652	1033	
4,5	Tampão acetato	1	130	Insolúvel
		2	74	1
	Tampão acetato + 0,5% LSS	3	138	-
	Tampão acetato + 1,0% LSS	1	3896	238
		2	3230	52
		3	219	-
	Tampão acetato + 1,0% BKC	1	1246	6
Tampão acetato + 1,0% CTAB	1	2555	23	
4,5	Tampão acetato + 0,5% P80	3	24	-

pH	MEIO DE DISSOLUÇÃO	AUTOR	ART	LUM
6,8	Tampão acetato + 1,0% P80	1	641	25
		2	625	24
		3	23	-
	Tampão acetato + 0,5% Myrj 52	3	8	-
	Tampão acetato + 1,0% Myrj 52	1	524	19
		3	33	-
	Tampão fosfato	1	119	Insolúvel
		2	102	3
	Tampão fosfato + 0,5% LSS	3	5	-
	Tampão fosfato + 1,0% LSS	1	3511	79
		2	3068	18
		3	5	-
	Tampão fosfato + 1,0% BKC	1	1275	3
	Tampão fosfato + 1,0% CTAB	1	2589	3
	Tampão fosfato + 1,0% P80	1	661	7
2		660	7	
Tampão fosfato + 0,5% Myrj 52	3	22	-	
Tampão fosfato + 1,0% Myrj 52	1	528	7	
	3	37	-	
7,2	Tampão fosfato	2	76	3
	Tampão fosfato + 1,0% LSS	2	105	3
	Tampão fosfato + 1,0% P80	2	100	4

Fonte: O autor (2023). Legenda: LSS – Laurilsulfato de sódio; BKC – Cloreto de benzalcônio; CTAB – Brometo de cetrimônio; P80 – Polissorbato 80; ART – Arteméter; LUM – Lumefantrina; Autor 1 – Umaphathi, Ayyappan e Darlin Quine, 2011; Autor 2 – Rivelli, 2016; Autor 3 – Belew *et al.*, 2020.

**APÊNDICE B - CONDIÇÕES GRADIENTES AVALIADOS NO TRABALHO**

TESTE	TEMPO (min)	PROPORÇÃO DE FASE MÓVEL A (%)	PROPORÇÃO DE FASE MÓVEL B (%)
Gradiente 1	0	25	75
	6	25	75
	7	30	70
	11	30	70
	12	25	75
	20	25	75
Gradiente 2	0	25	75
	6	25	75
	7	30	70
	14	70	30
	15	25	75
	20	25	75
Gradiente 3	0	25	75
	6	25	75
	7	45	55
	17	45	55
	18	25	75
	20	25	75
Gradiente 4	0	25	75
	6	25	75
	7	30	70
	17	30	70
	18	25	75
	20	25	75
Gradiente 5	0	25	75
	6	25	75
	7	15	85
	17	15	85
	18	25	75
	20	25	75
Gradiente 6	0	25	75
	9	25	75
	10	30	70
	19	30	70
	20	25	75
	30	25	75

TESTE	TEMPO (min)	PROPORÇÃO DE FASE MÓVEL A (%)	PROPORÇÃO DE FASE MÓVEL B (%)
Gradiente 7	0	40	60
	28	40	60
	30	10	90
	50	10	90
	52	40	60
	60	40	60
Gradiente 8, Gradiente 9* e Gradiente 10**	0	25	75
	8	25	75
	9	20	80
	13	20	80
	14	25	75
	20	25	75
Gradiente 11	0	25	75
	6	25	75
	7	40	60
	11	40	60
	12	20	80
	18	20	80
	19	25	75
25	25	75	

Fonte: O autor (2023). Legenda: Fase Móvel A = Tampão fosfato, pH 3,4; Fase Móvel B = Acetonitrila. \*O Gradiente 9 possuía também um gradiente de fluxo: 0-8 min: 1,0 mL/min; 9-13 min: 1,5 mL/min; 14-20 min: 1,0 mL/min. \*\*O Gradiente 10 possuía gradiente de fluxo e foi feito no comprimento de onda de 390 nm.