

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DE  
ETORICOXIBE POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Liberato Brum Junior**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS  
PARA AVALIAÇÃO DE ETORICOXIBE POR  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE  
MASSAS**

**por**

**Liberato Brum Junior**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA  
AVALIAÇÃO DE ETORICOXIBE POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA  
E ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

elaborada por  
**Liberato Brum Junior**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sérgio Luiz Dalmora, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Teresa Cristina Tavares Dalla Costa, Dr<sup>a</sup>.** (UFRGS)

**Ronilson Agnaldo Moreno, Dr.** (UNICAMP)

Santa Maria, 31 de maio de 2006.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, amizade, confiança, orientação e revisão crítica.

Aos colegas e bolsistas dos Laboratórios de Bioequivalência e Controle da Qualidade de Produtos Biológicos, pelo auxílio e amizade.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial.

À minha família, em especial aos meus pais, Liberato e Maria, pelo amor e educação.

À Fibeles, pelo amor, carinho e companheirismo.

À UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DE ETORICOXIBE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

AUTOR: LIBERATO BRUM JUNIOR

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de maio de 2006.

Etoricoxibe é um antiinflamatório não esteroide, pertencente ao grupo dos coxibes, que representa a segunda geração dos inibidores seletivos da cicloxigenase-2. É indicado para o tratamento de artrites e dor aguda. No presente trabalho foram desenvolvidas e validadas metodologias para avaliação de etoricoxibe em produtos farmacêuticos e plasma humano. As análises por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) foram realizadas utilizando coluna Synergi fusion C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm), mantida a temperatura ambiente. A fase móvel foi composta de ácido fosfórico 0,01 M, pH 3,0/acetoneitrila (62:38, V/V) na vazão de 1,0 mL/min e detecção no ultravioleta a 234 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 7 minutos, sendo linear na faixa de concentração de 0,02-150 µg/mL. Paralelamente, desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida combinada à espectrometria de massas (CL-EM/EM). Realizaram-se as análises utilizando Luna C<sub>18</sub> (50 mm x 4,6 mm), mantida a 40 °C e fase móvel composta de acetoneitrila:água (95:5, V/V)/0,1% ácido acético (90:10, V/V), na vazão de 0,4 mL/min. O espectrômetro de massas, equipado com fonte de electrospray positivo, foi empregado no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), monitorando as transições de 359,3>280,0 e 332,0>95,0, para o etoricoxibe e piroxicam (padrão interno), respectivamente. A separação cromatográfica foi obtida em 2 minutos, sendo linear na faixa de concentração de 1-5000 ng/mL. Os procedimentos foram validados, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação, incluindo para o método bioanalítico os efeitos de matriz, a recuperação e estudos de estabilidade, cujos resultados cumpriram os requisitos preconizados. Os métodos propostos foram utilizados na análise de produtos farmacêuticos, demonstrando correlação significativa dos resultados ( $r=0,9999$ ). Além disso, os métodos de extração líquido-líquido e em fase sólida desenvolvidos e otimizados propiciaram significativas percentagens de recuperação do etoricoxibe e do padrão

interno nas amostras de plasma. Os procedimentos pesquisados podem ser aplicados para estudos de biodisponibilidade e para aprimorar o controle da qualidade de medicamentos.

Palavras-chave: cromatografia líquida, espectrometria de massas, etoricoxibe, validação, plasma humano, produtos farmacêuticos.

## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGIES FOR THE EVALUATION OF ETORICOXIB BY LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY**

AUTHOR: LIBERATO BRUM JUNIOR

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, May 31<sup>st</sup> 2006.

Etoricoxib is a non-steroidal anti-inflammatory drug, from the coxibs group, that represents a second-generation of COX-2 inhibitors, used for the treatment of arthritis and pain. The methodologies for the evaluation of etoricoxib in pharmaceutical products and plasma were developed and validated in the present work. The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) analysis was carried out using a Synergi fusion C<sub>18</sub> column (150 mm x 4.6 mm), maintained at a controlled-ambient temperature. The mobile phase consisted of phosphoric acid 0.01 M, pH 3.0/acetonitrile (62:38, V/V), run at a flow rate of 1.0 mL/min with detection at 234 nm. The chromatographic separation was obtained within 7.0 min and it was linear in the concentration range of 0.02-150 µg/mL. The liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated using a Luna C<sub>18</sub> column (50 mm x 3.0 mm), maintained at 40 °C and the mobile phase consisted of acetonitrile:water (95:5, V/V)/ 0.1% acetic acid (90:10, V/V), run at flow rate of 0.4 mL/min. The mass spectrometer, equipped with electrospray positive source, was used in multiple reaction monitoring mode (MRM), monitoring the transitions of 359.3>280.0 and 332.0>95.0, for etoricoxib and piroxicam (internal standard), respectively. The chromatographic separation was obtained within 2.0 min and it was linear in the concentration range of 1-5000 ng/mL. The procedures were validated evaluating parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection and limit of quantitation. Besides, for the bioanalytical method, the matrix effects, recovery and stability studies were also analyzed, giving results within the acceptable range. The proposed methods were applied for the analysis of pharmaceutical products, showing significant correlation ( $r=0.9999$ ) of the results. Moreover, the liquid-liquid and solid phase extraction methods developed and optimized allowed high mean recoveries of etoricoxib and internal standard from the plasma samples.

The procedures can be applied for the bioavailability studies and for the quality control of pharmaceutical products.

Keywords: liquid chromatography, mass spectrometry, etoricoxib, validation, human plasma, pharmaceutical products.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química do etoricoxibe.....	26
FIGURA 2 – Produção de eicosanóides a partir do metabolismo do ácido araquidônico pela via da cicloxigenase.....	28
FIGURA 3 – Representação esquemática da fonte de electrospray .....	35
FIGURA 4 – Representação esquemática da fonte de APCI .....	36
FIGURA 5 – Representação esquemática do espectrômetro de massas .....	37
FIGURA 6 – Espectro obtido com a solução da SQR na concentração de 100 µg/mL, na faixa de 200 a 370 nm. Condições cromatográficas: Coluna Synergi Fusion <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,01 M, pH 3,0:acetonitrila (62:38, V/V); vazão: 1 mL/min .....	70
FIGURA 7 – Cromatograma da solução da SQR na concentração de 100 µg/mL: pico 1 - etoricoxibe. Condições cromatográficas: Coluna Synergi Fusion <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,01 M, pH 3,0:acetonitrila (62:38, V/V); vazão: 1 mL/min.; detecção: 234 nm .....	71
FIGURA 8 – Cromatogramas do etoricoxibe: (A) Solução da SQR na concentração de 100 µg/mL: pico 1 - etoricoxibe. (B) Após oxidação: pico 1 - peróxido de hidrogênio, picos 2, 3 e 4 - formas oxidadas, pico 5 - etoricoxibe. (C) Após exposição à luz UV: pico 1 - etoricoxibe, pico 2 - fotodegradado. Condições cromatográficas: Coluna Synergi Fusion <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,01 M, pH 3,0:acetonitrila (62:38, V/V); vazão: 1 mL/min.; detecção: 234 nm .....	72
FIGURA 9 – Representação gráfica da curva de calibração da SQR do etoricoxibe obtida por cromatografia líquida, na faixa de 0,02 a 150 µg/mL (n=3) .....	73

FIGURA 10 – Espectro de massas do etoricoxibe .....	83
FIGURA 11 – Padrão de fragmentação do etoricoxibe e estrutura sugerida do fragmento principal.....	84
FIGURA 12 – Espectro de massas do piroxicam.....	84
FIGURA 13 – Padrão de fragmentação do piroxicam .....	85
FIGURA 14 – Cromatograma do CQB obtido no modo de monitoramento de reação múltipla, contendo 3 ng/mL de etoricoxibe e 25 ng/mL de piroxicam. Coluna Luna <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (50 mm x 4,6 mm); fase móvel: acetonitrila:água (95:5, V/V)/ 0,1% ácido acético (90:10, V/V); vazão: 0,4 mL/min. ....	86
FIGURA 15 – Representação gráfica da curva de calibração do etoricoxibe por CL-EM/EM, obtida pelo programa Masslynx, na faixa de 1 a 5000 ng/mL (n=6). ....	89

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros do método otimizado por cromatografia líquida .....	44
TABELA 2 – Condições otimizadas do método de extração líquido-líquido para etoricoxibe e piroxicam em amostras de plasma.....	51
TABELA 3 – Condições otimizadas do método de extração em fase sólida para etoricoxibe e piroxicam em amostras de plasma, utilizando cartucho HySphere C <sub>18</sub> HD.....	53
TABELA 4 – Parâmetros otimizados para a cromatografia líquida.....	54
TABELA 5 – Parâmetros utilizados no espectrômetro de massas .....	55
TABELA 6 – Obtenção das amostras de plasma padrão da curva de calibração.....	57
TABELA 7 – Preparação das amostras de plasma de controle de qualidade.....	58
TABELA 8 – Obtenção das amostras de plasma de controle da qualidade .....	61
TABELA 9 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração de etoricoxibe por CL.....	73
TABELA 10 – Resultados da curva de calibração, calculados pelo método dos mínimos quadrados .....	74
TABELA 11 – Análise de variância das áreas dos cromatogramas obtidos na determinação da curva de calibração .....	74
TABELA 12 – Determinação da precisão intradia do método analítico para quantificação de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL .....	75

TABELA 13 – Determinação da precisão interdias do método analítico para quantificação de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL .....	76
TABELA 14 – Determinação da precisão entre analistas do método analítico para quantificação de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL .....	76
TABELA 15 – Determinação da exatidão do método analítico para quantificação de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL .....	77
TABELA 16 – Avaliação da robustez do método analítico através do doseamento de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL .....	78
TABELA 17 – Valores experimentais obtidos na recuperação de etoricoxibe e piroxicam em plasma, a partir de diferentes solventes de extração.....	79
TABELA 18 – Valores experimentais obtidos na recuperação de etoricoxibe e piroxicam em plasma, a partir das modificações de pH .....	80
TABELA 19 – Valores experimentais obtidos na recuperação de etoricoxibe e piroxicam em plasma, a partir de diferentes cartuchos de extração .....	81
TABELA 20 – Determinação da recuperação média do procedimento de extração líquido-líquido das amostras de plasma para etoricoxibe e piroxicam .....	87
TABELA 21 – Valores experimentais obtidos na determinação da linearidade do método bioanalítico para quantificação de etoricoxibe em plasma por CL-EM/EM .....	88
TABELA 22 – Parâmetros calculados da curva de calibração do método bioanalítico para quantificação de etoricoxibe em plasma por CL-EM/EM na faixa de concentração entre 1 e 5000 ng/mL .....	88
TABELA 23 – Determinação da precisão e exatidão intradia do método bioanalítico para quantificação de etoricoxibe em plasma por CL-EM/EM.....	90

TABELA 24 – Determinação da precisão e exatidão interdias do método bioanalítico para quantificação de etoricoxibe em plasma por CL-EM/EM.....	91
TABELA 25 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma mantidas à temperatura de -80 °C e submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento.....	92
TABELA 26 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma mantidas à temperatura de -80 °C e submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento....	93
TABELA 27 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma mantidas à temperatura de -80 °C e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento.....	93
TABELA 28 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma analisadas após permanência à temperatura ambiente por 12 horas. ....	94
TABELA 29 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma analisadas 24 horas após o processamento .....	95
TABELA 30 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma analisadas 48 horas após o processamento .....	95
TABELA 31 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma mantidas à temperatura de -80 °C por 120 dias .....	96
TABELA 32 – Determinação de peso médio (PM) dos comprimidos de etoricoxibe.....	98
TABELA 33 – Tempo de desintegração encontrado para os comprimidos de etoricoxibe ....	99
TABELA 34 – Percentagem de umidade encontrada para os produtos analisados através do método de Karl-Fischer .....	100
TABELA 35 – Determinação da friabilidade e dureza dos comprimidos de etoricoxibe.....	100

TABELA 36 – Determinação do teor de etoricoxibe nos produtos farmacêuticos por CL e CL-EM/EM..... 101

TABELA 37 – Determinação da uniformidade de dose do etoricoxibe em comprimidos, expresso em percentagem, por CL ..... 102

TABELA 38 – Determinação da uniformidade de dose do etoricoxibe em comprimidos, expresso em percentagem, por CL-EM/EM..... 103

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AINES	Antiinflamatórios não esteróides
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
CC	Curva de calibração
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CQA	Controle de qualidade alto
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
cm	Centímetro
COX	Ciclooxigenase
CV	Coefficiente de variação
Cp	Comprimido
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
DP	Desvio padrão
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrometria de massas
ES	Electrospray
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonisation
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Molaridade
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro

N	Normalidade
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
r	Coefficiente de correlação de Pearson
$r^2$	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
PG	Prostaglandina
PI	Padrão interno
PM	Peso médio
SQR	Substância química de referência
TX	Tromboxano
UV	Ultravioleta
USP	Farmacopéia Americana
°C	Grau centígrado
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	25
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
<b>3.1 MATERIAIS</b> .....	40
3.1.1 Substâncias Químicas de Referência.....	40
3.1.2 Produtos farmacêuticos comerciais .....	40
3.1.3 Solventes e Reagentes .....	40
3.1.4 Equipamentos e acessórios .....	41
<b>3.2 MÉTODOS</b> .....	44
3.2.1 Cromatografia líquida em fase reversa .....	44
3.2.1.1 Preparação da fase móvel .....	44
3.2.1.2 Preparação da SQR de etoricoxibe .....	44
3.2.1.3 Preparação das amostras.....	45
3.2.1.4 Validação do método analítico .....	45
3.2.1.4.1 Especificidade.....	45
3.2.1.4.1.1 Oxidação química.....	45
3.2.1.4.1.2 Fotólise .....	46
3.2.1.4.1.3 Hidrólise ácida.....	46
3.2.1.4.1.4 Hidrólise básica .....	46
3.2.1.4.2 Linearidade .....	47
3.2.1.4.3 Precisão.....	47
3.2.1.4.3.1 Repetibilidade.....	47
3.2.1.4.3.2 Precisão intermediária .....	47
3.2.1.4.3.2.1 Interdias .....	48
3.2.1.4.3.2.2 Entre analistas.....	48

3.2.1.4.3.3 Cálculos .....	48
3.2.1.4.4 Exatidão .....	49
3.2.1.4.4.1 Cálculos .....	49
3.2.1.4.5 Limite de detecção (LD).....	50
3.2.1.4.6 Limite de quantificação (LQ) .....	50
3.2.1.4.7 Robustez .....	51
3.2.2 Extração líquido-líquido .....	51
3.2.2.1 Preparação das amostras.....	52
3.2.2.2 Desenvolvimento do método .....	52
3.2.3 Extração em fase sólida .....	52
3.2.3.1 Preparação das amostras.....	53
3.2.3.2 Desenvolvimento do método .....	53
3.2.4 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas .....	54
3.2.4.1 Preparação da fase móvel .....	55
3.2.4.2 Preparação da solução diluente.....	56
3.2.4.3 Preparação da SQR de etoricoxibe .....	56
3.2.4.4 Preparação da SQR de piroxicam.....	56
3.2.4.5 Preparação e extração da curva de calibração .....	56
3.2.4.6 Preparação das amostras de plasma de controle de qualidade (CQ) .....	57
3.2.4.7 Extração das amostras de plasma de controle de qualidade (CQ).....	58
3.2.4.8 Validação do método bionalítico .....	59
3.2.4.8.1 Efeitos de matriz.....	59
3.2.4.8.2 Especificidade.....	59
3.2.4.8.3 Recuperação.....	59
3.2.4.8.3.1 Amostras submetidas ao processo de extração.....	60
3.2.4.8.3.2 Amostras não submetidas ao processo de extração, mas adicionadas de plasma branco extraído .....	60
3.2.4.8.4 Linearidade .....	61
3.2.4.8.5 Precisão.....	61
3.2.4.8.6 Exatidão .....	62
3.2.4.8.7 Limite de detecção.....	62

3.2.4.8.8 Limite de quantificação .....	62
3.2.4.8.9 Estudo de estabilidade .....	62
3.2.4.8.9.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento .....	63
3.2.4.8.9.2 Estabilidade de curta duração .....	63
3.2.4.8.9.3 Estabilidade pós-processamento .....	64
3.2.4.8.9.4 Estabilidade de longa duração .....	64
3.2.4.8.9.5 Estabilidade das soluções-padrão .....	64
3.2.5 Ensaio físico e físico-químico .....	64
3.2.5.1 Determinação de peso médio de comprimidos .....	65
3.2.5.2 Determinação do tempo de desintegração dos comprimidos .....	65
3.2.5.3 Determinação da umidade por Karl-Fischer .....	65
3.2.5.4 Determinação da resistência mecânica em comprimidos .....	66
3.2.5.4.1 Friabilidade .....	66
3.2.5.4.2 Dureza .....	66
3.2.5.5 Doseamento do etoricoxibe nas amostras de produtos farmacêuticos .....	66
3.2.5.5.1 Preparação das amostras .....	66
3.2.5.5.2 Doseamento do etoricoxibe por CL .....	66
3.2.5.5.2.1 Cálculos .....	67
3.2.5.5.3 Doseamento do etoricoxibe por CL-EM/EM .....	67
3.2.5.6 Uniformidade de conteúdo das amostras .....	68
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
4.1 Cromatografia líquida em fase reversa .....	70
4.2 Extração líquido-líquido .....	79
4.3 Extração em fase sólida .....	81
4.4 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas .....	82
4.5 Ensaio físico e físico-químico .....	97
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>104</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>106</b>

**7 ANEXOS ..... 115**

7.1 Publicações científicas..... 116

## **INTRODUÇÃO**

---

# 1 INTRODUÇÃO

---

Os antiinflamatórios não esteróides (AINES) destacam-se entre os produtos farmacêuticos mais utilizados em Medicina. São indicados para o tratamento clínico de diversas enfermidades, como: artrites, dor aguda e pirese. Além disso, publicações científicas sugerem que poderiam ser eficazes na prevenção de doenças neurológicas, como Alzheimer, e constituir-se em opção terapêutica para casos de câncer (WARNER & MITCHELL, 2004; HULL, 2005; PATRIGNANI et al., 2005).

Entretanto, somente em 1971, John Vane descobriu que os AINES inibiam a síntese de prostaglandinas, explicando assim suas atividades antiinflamatória, antipirética e analgésica. Na época, esses fármacos foram denominados de “semelhantes à aspirina”, o protótipo da classe. O mecanismo de ação dos AINES baseia-se na inibição do sistema enzimático denominado cicloxigenase (COX), responsável pela síntese dos diferentes tipos de eicosanóides (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>), que são mediadores do processo inflamatório. A enzima cicloxigenase apresenta-se sob duas isoformas, COX-1 e COX-2. A COX-1 é fisiologicamente constitutiva, agindo como citoprotetora gástrica e na manutenção da homeostase renal e plaquetária. Por sua vez, a COX-2 seria indutiva, surgindo apenas em situação de trauma tissular e inflamação, porém estudos recentes indicam sua expressão em alguns tecidos do sistema nervoso central e do rim (HARRIS & BREYER, 2006; BOTTING, 2006).

Desde a descoberta da aspirina, foram desenvolvidos vários antiinflamatórios não esteróides, com estruturas químicas diversas, mas que apresentam propriedades terapêuticas semelhantes, pois atuam de modo não seletivo sobre a COX-1 e COX-2. Os primeiros fármacos seletivos COX-2 surgiram na década de 1980 (meloxicam, nimesulida e etodolac), descobrindo-se posteriormente os superseletivos, grupo dos coxibes, que apresentam a vantagem de ser eficazes no alívio sintomático da dor e inflamação associadas a doenças artríticas, e possuir melhor perfil de segurança gastrointestinal. No momento, encontram-se disponíveis: celecoxibe (Celebra®), parecoxibe (Bextra IM/IV®), lumiracoxibe (Prexige®) e, especialmente, o etoricoxibe, lançado para uso clínico no Brasil em 2002 pelo laboratório Merck Sharp & Dohme, sob o nome comercial de Arcoxia®. Representa a segunda geração dessa classe de medicamentos, com alta seletividade para a COX-2. Atualmente é comercializado em 51 países da Europa, América Latina e Ásia, e a aprovação pelo FDA, nos Estados Unidos, encontra-se sob estudo.

Desde a introdução clínica dos inibidores seletivos da COX-2, foram realizados estudos sucessivos para avaliar seu potencial antiinflamatório e efeitos gastrintestinais, observando-se, porém, risco potencial de eventos adversos cardiovasculares, que fundamentaram a interrupção do uso terapêutico de alguns produtos da classe. Em relação ao etoricoxibe, os estudos clínicos continuam em andamento, visando a aprofundar avaliações, indicações e possíveis efeitos colaterais decorrentes da sua utilização.

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos e bioanalíticos para determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, estudos de dissolução e em matrizes biológicas. A cromatografia líquida, especialmente com detecção no UV, tem sido empregada devido à resolução, precisão e exatidão significativas. Além disso, acoplada à espectrometria de massas, constitui-se em técnica de identificação e caracterização de componentes em misturas complexas de amostras, sendo amplamente adotada na pesquisa clínica e para a determinação de fármacos em matrizes biológicas. Nesse contexto, tem viabilizado estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, importantes para o desenvolvimento de medicamentos genéricos. Atualmente está sendo usada de modo crescente para análise de matéria-prima e produtos farmacêuticos, pois oferece eficiência na quantificação, alta especificidade e sensibilidade, diminuindo o tempo de ensaio (NIESSEN, 2003; KORFMACHER, 2005). Convém observar também a importância do desenvolvimento e otimização dos processos de extração, que visam especialmente a recuperação máxima dos fármacos sob estudo e remoção de interferentes do plasma, justificando os estudos de extração líquido-líquido e em fase sólida.

O desenvolvimento de métodos envolve a avaliação e otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação. Posteriormente, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que a metodologia atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequada para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. Além disso, a escolha do procedimento baseia-se em vários fatores, que incluem a estrutura e características do fármaco, pureza, quantidade de amostra e finalidade da análise, bem como a disponibilidade de equipamentos e reagentes.

Desse modo, o presente trabalho teve por objetivos desenvolver, otimizar e validar procedimentos para avaliação da identidade, pureza e quantificação de etoricoxibe no produto acabado e em plasma humano, através de: a) cromatografia líquida em fase reversa, b) extração líquido-líquido, c) extração em fase sólida, d) cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massas, e) ensaios físicos e físico-químicos das amostras de comprimidos. Nesse contexto, objetiva estabelecer procedimentos que possam contribuir para o domínio tecnológico e científico aprimorando os estudos de biodisponibilidade e a área de controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos.



## **REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

Os antiinflamatórios não esteróides (AINES) que inibem seletivamente a isoforma cicloxigenase-2 (COX-2), denominam-se coxibes. Recentemente, foi desenvolvido o etoricoxibe, que representa a segunda geração dos coxibes, denominado quimicamente 5-cloro-6'-metil-3-[4-(metilsulfonyl) fenil]-2,3'-bipiridina. O etoricoxibe é um pó branco, altamente solúvel em metanol, tetrahydrofurano, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, acetonitrila e clorofórmio. É solúvel em acetato de isopropila, etanol e tolueno. Possui peso molecular de 358,84 Daltons, fórmula molecular  $C_{18}H_{15}ClN_2O_2S$ , e apresenta a estrutura química mostrada na Figura 1 (RIENDEAU et al., 2001).

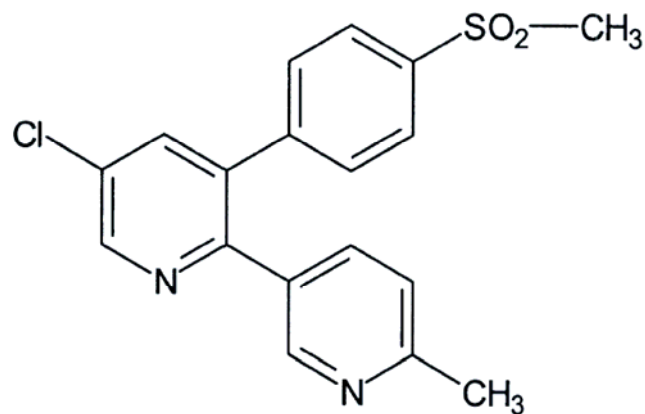


Figura 1 – Estrutura química do etoricoxibe

O etoricoxibe é ativo por via oral, sendo comercializado sob o nome de Arcoxia<sup>®</sup>, como comprimidos revestidos de 60, 90 e 120 mg. Apresenta atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética e é indicado para o tratamento de artrite gotosa aguda, artrite reumatóide, dismenorréia primária, dor aguda, osteoartrite e lombalgia crônica. Apresenta perfil de segurança clínica similar ao dos AINES não-seletivos, porém causa menores complicações gastrointestinais (FRIESEN et al., 1998; RIENDEAU et al., 2001; HUNT et al., 2003; AGRAWAL et al., 2004; MALMSTROM et al., 2004).

Atualmente várias pesquisas clínicas indicam que os coxibes, incluindo o etoricoxibe, seriam eficazes na prevenção de doenças neurológicas como Alzheimer. Além disso, informações oriundas de diversos estudos epidemiológicos humanos, em modelos animais e

de cultura de células, evidenciam a participação da COX-2 no desenvolvimento de processos neoplásicos, pois sua expressão encontra-se altamente elevada em tumores colo-retais, gástricos e esofágicos. Desse modo, os inibidores da COX-2 estão sendo estudados, como opção terapêutica e quimiopreventiva para alguns tipos de câncer (WARNER & MITCHELL, 2004; HULL, 2005; PATRIGNANI et al., 2005).

Durante muitos anos, os AINES foram utilizados por suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias, mas seu mecanismo de ação não era muito bem conhecido. Apenas na década de 60 foi demonstrado que a aspirina atuava inibindo a formação de prostaglandinas (PG) originárias da resposta à inflamação. Estudos posteriores identificaram a enzima denominada cicloxigenase como responsável por esse mecanismo (VANE, 1971; HINZ & BRUNE, 2002; BOTTING, 2006). Os AINES incluem grande variedade de compostos, pertencentes a diferentes classes químicas, porém possuem ações terapêuticas e efeitos colaterais semelhantes. Embora possam ocorrer mecanismos diferentes, geralmente, os efeitos estão relacionados com a ação primária de inibição da cicloxigenase araquidônica e, portanto, da produção de PG e tromboxanos (TX). A maioria dos AINES não inibe apenas as PG nos locais de inflamação, mas também aquelas que exercem funções importantes no organismo, podendo desta forma ocasionar possíveis efeitos colaterais, como as complicações gastrintestinais (MITCHELL & WARNER, 1999; HERSCHMAN et al., 2003; FLOWER, 2003).

Os principais eicosanóides são as PG, os TX e os leucotrienos. São apontados como responsáveis pelo controle de muitos processos fisiológicos e estão entre os mais importantes mediadores e moduladores da reação inflamatória. Os eicosanóides não são encontrados pré-formados nos tecidos. A principal fonte é o ácido araquidônico, um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, contendo quatro ligações duplas. Em condições normais, o ácido araquidônico não está livre para o metabolismo, pois se encontra esterificado nos fosfolípidios da membrana citoplasmática (FITZGERALD & PATRONO, 2001; CARVALHO et al., 2004).

O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por duas vias diferentes: (1) a via da cicloxigenase, na qual produz as PG e os TX e (2) a via da lipoxigenase, que dá início à síntese de leucotrienos e outros compostos. A cicloxigenase é uma enzima bifuncional, tendo duas atividades distintas: a ação principal que catalisa a ciclização oxidativa do ácido araquidônico, produzindo a PGG<sub>2</sub>, e a ação de peroxidase que converte PGG<sub>2</sub> em PGH<sub>2</sub>. A PGH<sub>2</sub> é depois metabolizada por isomerases específicas a PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) ou TXA<sub>2</sub>. Porém essas etapas subseqüentes do metabolismo do ácido

araquidônico diferem conforme as células; nas plaquetas, a via leva à síntese do  $\text{TXA}_2$ ; no endotélio vascular, à síntese da  $\text{PGI}_2$  e, nos macrófagos, principalmente à síntese da  $\text{PGE}_2$  (MITCHELL & WARNER, 1999; MARNETT, 2000; FITZGERALD & PATRONO, 2001; MARNETT, 2002; FLOWER, 2003). A Figura 2 apresenta a via da cicloxigenase.

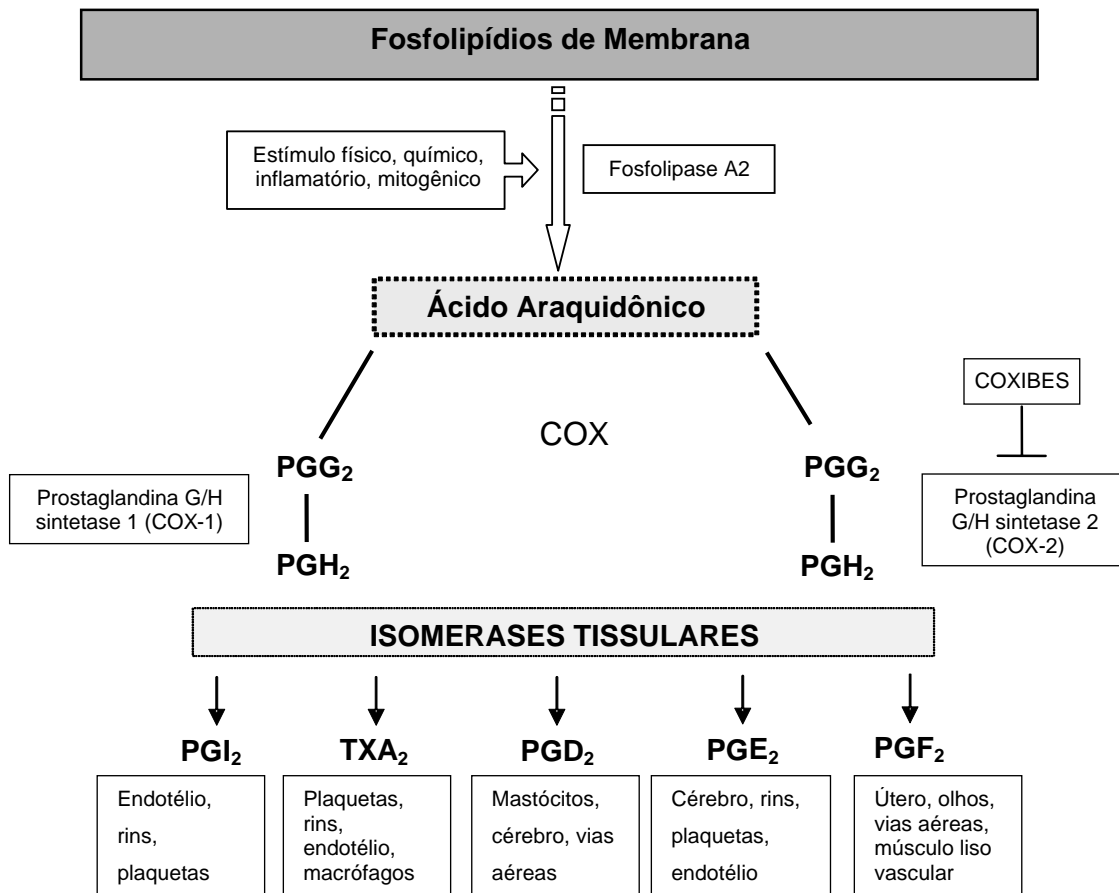


Figura 2 – Produção de eicosanóides a partir do metabolismo do ácido araquidônico pela via da cicloxigenase - Adaptada de Fitzgerald & Patrono, 2001.

Um dos avanços mais importantes na pesquisa de antiinflamatórios foi a descoberta e identificação das duas isoformas da enzima COX: COX-1 e COX-2, com características e ações diferentes. Esse fato desencadeou nova forma de abordagem, com a finalidade de evitar as complicações decorrentes do uso contínuo dos AINES, pois as enzimas estão envolvidas em mecanismos regulatórios diferentes. A COX-1 é enzima constitucional encontrada em vários tecidos e tem diversas funções homeostáticas, entre elas a manutenção e proteção da mucosa gástrica, regulação da hemodinâmica renal, agregação plaquetária, entre outras. Por sua vez, a COX-2 é induzida em resposta a processos inflamatórios e é considerada como a

enzima que produz os eicosanóides mediadores da inflamação. Porém, foi também demonstrada sua expressão constitutiva em alguns tecidos do sistema nervoso central e do rim (HARRIS & BREYER, 2006; BOTTING, 2006). A distinção entre as aparentes funções fisiológicas dessas isoenzimas conduziu à hipótese de que a inibição seletiva da COX-2 diminuiria a inflamação e a dor, sem interferir nos processos fisiológicos normais necessários, por exemplo, à proteção da mucosa gastrointestinal. Essa hipótese fundamentava-se no fato dos AINES tradicionais inibirem ambas as isoenzimas, estando esta inibição associada aos graves efeitos colaterais no trato gastrointestinal, como dispepsia e dor abdominal, além de perfuração ou sangramento gastroduodenal (FITZGERALD & PATRONO, 2001; HINZ & BRUNE, 2002).

Recentemente foi proposta a existência da terceira isoforma, denominada COX-3, que, ao contrário da COX-1 e da COX-2, não produziria eicosanóides pró-inflamatórios, mas, sim, substâncias antiinflamatórias. Tal evidência poderia explicar os períodos de remissão, observados em casos de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide. A COX-3, possivelmente uma variante da COX-1, estaria distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, sendo mais sensível ao paracetamol do que a COX-1 e a COX-2. (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; BOTTING, 2006).

Os primeiros fármacos seletivos COX-2 surgiram na década de 1980 (meloxicam, nimesulida e etodolac), sendo desenvolvidos posteriormente os superseletivos (grupo dos coxibes). No momento, encontram-se disponíveis: celecoxibe (Celebra®), parecoxibe (Bextra IM/IV®), lumiracoxibe (Prexige®) e etoricoxibe (Arcoxia®).

A seletividade para a COX-2 tem sido avaliada principalmente através de ensaios *in vitro*. Destacam-se os ensaios com a enzima humana recombinante, cultura de células e sangue total. Nos ensaios com sangue total, a síntese de TX nas plaquetas durante a formação do coágulo é usada como índice de atividade da COX-1, e a síntese de PGE<sub>2</sub> (principalmente por monócitos) como índice de atividade de COX-2 no sangue total estimulado por lipopolissacarídeos. A maioria desses ensaios determina a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>), que representa a concentração do fármaco que, sob condições controladas, inibe 50% da atividade COX. Para a avaliação dos AINES, adota-se o índice de especificidade relativa, CI<sub>50</sub>, entre as isoformas (COX-1/COX-2). De acordo com esse critério, quanto maior o valor da razão COX-1/COX-2, maior será a seletividade do fármaco sobre a COX-2 (FITZGERALD, 2002; CARVALHO et al., 2004).

Riendeau et al. (2001) demonstraram o perfil pré-clínico do etoricoxibe e compararam os resultados com outros AINES. Na avaliação da seletividade, o etoricoxibe mostrou índice

de especificidade para COX-2 superior, em relação aos AINES, nos ensaios do sangue humano total e enzimático. A taxa de seletividade de inibição da COX-2 pelo etoricoxibe no sangue humano total, determinada pelas concentrações inibitórias 50% (CI<sub>50</sub>), foi de 106, podendo ser comparada, com os valores de 35, 30, 7,6, 3,0 e 2,0 obtidos para rofecoxibe, valdecoxibe, celecoxibe, diclofenaco e meloxicam, respectivamente. A atividade do etoricoxibe foi avaliada em ensaios farmacológicos, demonstrando eficácia para o tratamento da inflamação, alívio da dor e redução da febre, similar à da indometacina. Além disso, apresentou menores efeitos gastrintestinais quando comparado ao diclofenaco, indometacina e ibuprofeno.

Dallob et al. (2003) avaliaram o perfil de seletividade do etoricoxibe após a administração de dose única (5-500 mg) e múltiplas (25-150 mg) em voluntários humanos, através de ensaios com sangue humano total, biópsia gástrica e observação do seu efeito antiplaquetário. O etoricoxibe inibiu a formação da PGE<sub>2</sub> no ensaio com sangue humano total, demonstrando sua seletividade na inibição da COX-2. Mostrou efeito não significativo na inibição da formação de TXA<sub>2</sub> e não interferiu na síntese de PG pela mucosa gástrica, indicando não inibir a COX-1. Além disso, a administração de etoricoxibe não interferiu no efeito inibidor da agregação plaquetária da aspirina.

Diferentes publicações relatam resultados de estudos clínicos em humanos, que demonstram eficácia do etoricoxibe no tratamento de artrite reumatóide e gotosa, comparável com fármacos disponíveis para uso clínico como indometacina, ibuprofeno, naproxeno e diclofenaco. Além disso, foi registrada menor incidência de úlceras, efeitos gastrintestinais e renais (SCHUMACHER et al., 2002; COLLANTES et al., 2002; HUNT et al., 2003; CURTIS et al., 2004).

Diversos estudos foram realizados, desde a introdução dos inibidores seletivos da COX-2 no mercado em 1999, relacionando seu potencial antiinflamatório à sua segurança gastrintestinal, observando-se então, o risco potencial de eventos adversos cardiovasculares. Esses estariam relacionados ao desequilíbrio dos eicosanóides, decorrente da inibição seletiva da COX-2. A manutenção da hemostasia necessita de equilíbrio adequado entre a atividade do TXA<sub>2</sub> produzido pelas plaquetas, e a ação da PGI<sub>2</sub>, derivada da célula endotelial. O TXA<sub>2</sub> é o principal eicosanóide originado pela COX-1 e atua como agregador plaquetário e vasoconstritor, além de estimular a proliferação das células da musculatura lisa. Por outro lado, a formação de eicosanóides pelas células endoteliais resulta na produção de PGI<sub>2</sub> que possui ação vasodilatadora, antiagregante e inibidora da proliferação das células da musculatura vascular. Os inibidores específicos da COX-2 suprimem a produção de PGI<sub>2</sub>

pelas células endoteliais, sem efeitos sobre a produção de TXA<sub>2</sub> plaquetário. Esse desequilíbrio pode levar à agregação plaquetária e vasoconstrição, com maior tendência à oclusão vascular (FITZGERALD, 2002; DRAZEN, 2005; GROSSER et al., 2006).

Pesquisas científicas têm mostrado aumento da incidência de efeitos colaterais como infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão, insuficiência cardíaca, falência renal e reações cutâneas graves, associados ao uso dos coxibes. A recente retirada do mercado dos medicamentos Vioxx® (rofecoxibe) e Bextra® (valdecoxibe), originou intensa discussão científica relativa ao uso dos antiinflamatórios, tornando evidente a importância de se avaliar a relação risco/benefício de cada prescrição, bem como os possíveis efeitos colaterais (FITZGERALD, 2004; DRAZEN, 2005; BENNETT et al., 2005; BERENBAUM, 2005; LA GRENADE et al., 2005; GROSSER et al., 2006).

Com relação ao etoricoxibe, encontra-se em execução estudo multicêntrico, aleatório, duplo-cego em pacientes com osteoartrite e artrite reumatóide, no qual são comparados o etoricoxibe e o diclofenaco. Aproximadamente 35.000 pacientes estão sendo acompanhados clinicamente, e a análise preliminar demonstrou efeitos cardiovasculares semelhantes (GROSSER et al., 2006).

O etoricoxibe é completamente metabolizado sendo menos de 1% da dose recuperada na urina de forma inalterada. Cinco metabólitos foram identificados no homem, sendo o principal o derivado 6'-ácido carboxílico, formado pela oxidação do metabólito 6'-hidroximetil. Esses metabólitos apresentam atividade inibidora da COX-2, baixa ou não-mensurável. Concentrações do estado de equilíbrio foram atingidas sete dias após a administração de 120 mg uma vez ao dia. O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de metabolização do etoricoxibe encontrado foi de 22 horas. A eliminação renal de creatinina foi estimada em aproximadamente 50 mL/min (RODRIGUES et al., 2003).

Agrawal et al. (2001) avaliaram a farmacocinética do etoricoxibe em estudo com planejamento cruzado aleatório, através de administração oral de dose única entre 5 e 120 mg, em 12 voluntários. Observou-se para as doses de 60 e 120 mg biodisponibilidade aproximada de 100%. As concentrações plasmáticas máximas ( $C_{máx}$ ) encontradas, cerca de uma hora após a administração, foram de 95, 201, 411, 788 e 2186 ng/mL para as doses de 5, 10, 20, 40 e 120 mg, respectivamente. A  $t_{1/2}$  foi de aproximadamente 22 horas, o que permite sua administração em dose única diária.

A farmacocinética do etoricoxibe também foi avaliada após a administração de 120 mg de etoricoxibe em dose única e múltipla. No estudo de dose única, realizado em 12 voluntários humanos, a biodisponibilidade relativa foi de 101% com valores de  $C_{máx}$ ,  $T_{máx}$  e

$ASC_{0-\infty}$  de 2,43  $\mu\text{g/mL}$ , 1 h e 41,35  $\mu\text{g h/mL}$ , respectivamente. O estudo com dose múltipla foi realizado através da administração do etoricoxibe em 24 voluntários humanos durante dez dias consecutivos. A concentração do estado de equilíbrio foi atingida em sete dias e os valores de  $C_{\text{máx}}$ ,  $T_{\text{máx}}$  e  $ASC_{0-24\text{h}}$  encontrados foram de 3,59  $\mu\text{g/mL}$ , 1,3 h e 37,83  $\mu\text{g h/mL}$ , respectivamente. Apresentou taxa de ligações às proteínas plasmáticas humanas de aproximadamente 92% na faixa de concentrações de 0,05 a 5  $\mu\text{g/mL}$ . O volume de distribuição ( $V_{\text{dss}}$ ) no estado de equilíbrio foi de, aproximadamente, 120 litros (AGRAWAL et al., 2003).

Estudos de metabolismo, incluindo teste da atividade e caracterização de metabólitos de etoricoxibe, foram realizados utilizando procedimentos cromatográficos e sua combinação com espectrometria de massas. Os autores demonstraram que os metabólitos não modificam o perfil de seletividade para a COX-2 do etoricoxibe (CHAURET et al., 2001).

Kassahun et al. (2001) estudaram a função de enzima hepática no metabolismo do etoricoxibe, realizando a separação dos metabólitos por cromatografia líquida em fase reversa com detecção a 236 e 280 nm, utilizando coluna  $C_8$  mantida a 40 °C. Foi realizado gradiente, com fase móvel binária composta de eluente 1: acetato de amônio 25 mM (pH 7,4):acetonitrila (20:80, V/V) e eluente 2: acetonitrila. Paralelamente realizaram a identificação por espectrometria de massas com ionização por electrospray no modo positivo, usando coluna  $C_8$  e fase móvel composta de 25 mM de acetato de amônio e acetonitrila.

Matthews et al. (2001) desenvolveram e validaram metodologia para determinação e estudo de estabilidade do etoricoxibe em urina e plasma humanos, utilizando um isótopo como padrão interno. Realizaram a extração através de fase sólida e determinação por cromatografia líquida em fase reversa com detecção por fluorescência. A fase móvel utilizada consistiu de tampão acetato 10 mM (pH 4,0):acetonitrila (55:45, V/V). No estudo foi comprovada a estabilidade de dois e oito meses, na urina e plasma, respectivamente, sob temperatura de -20 °C.

Rose et al. (2002) desenvolveram método para a determinação simultânea do etoricoxibe e seu isótopo de carbono 13 em plasma humano. As amostras de plasma foram extraídas em fase sólida e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização química a pressão atmosférica no modo positivo, monitorando as transições de 359,0>280,0 e 365,0>286,0 para o etoricoxibe e seu isótopo, respectivamente. A recuperação média do procedimento foi superior a 70%. Na separação cromatográfica, foi utilizada coluna  $C_{18}$  (50 mm x 3 mm) e fase móvel composta de acetato de amônio (pH 4,0):acetonitrila (65:35, V/V). O método foi validado em duas faixas de concentração, 5-2500



ng/mL para o etoricoxibe e 0,5-250 ng/mL para o isótopo. Os autores destacam a importância da metodologia para estudos clínicos e de biodisponibilidade.

Bräutigam et al. (2003) realizaram a validação de metodologia por cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas e extração em fase sólida para a determinação de etoricoxibe em plasma humano, utilizando a fenazona como padrão interno. O procedimento cromatográfico foi executado em fase reversa com coluna C<sub>18</sub> (30 mm x 2 mm), fase móvel acetonitrila:água (90:10, V/V) e a espectrometria no modo de ionização por electrospray positivo, monitorando as transições de 359,2>280,2 e 189,0>104,1 para o etoricoxibe e padrão interno, respectivamente. O método foi validado na faixa de concentração de 0,2-200 ng/mL, sugerindo sua aplicação para estudos de farmacocinética.

Hartman et al. (2003) desenvolveram e validaram metodologia por cromatografia líquida em fase reversa para realizar a análise de impurezas e quantificação do etoricoxibe. Os autores estudaram diferentes condições de pH, temperatura, fase estacionária e fase móvel. A metodologia foi otimizada com coluna C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm, 3 µm), utilizando como fase móvel 10 mM de fosfato de potássio monobásico (pH 3,1):acetonitrila (72:28, V/V). A especificidade do método analítico foi determinada pelo estudo da degradação da substância química de referência do etoricoxibe, que foi submetida a condições de hidrólise ácida e básica, fotólise e oxidação química.

Matthews et al. (2004) realizaram o isolamento e caracterização dos produtos de degradação formados após a exposição do etoricoxibe à luz ultravioleta (254 nm). Utilizaram cromatografia líquida com detecção por fluorescência e acoplada à espectrometria de massas com ionização química a pressão atmosférica no modo positivo. No método cromatográfico utilizaram coluna C<sub>18</sub> e fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM (pH 4,0):acetonitrila (65:35, V/V).

Werner et al. (2005) desenvolveram método por cromatografia líquida combinada à espectrometria de massas com ionização química, a pressão atmosférica no modo positivo para a determinação simultânea do etoricoxibe e do valdecoxibe em plasma humano. As amostras de plasma, adicionadas de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), foram submetidas à extração líquido-líquido, utilizando a mistura de diclorometano:hexano (50:50) como solvente. As transições de 359,2>280,3 e 315,1>235,1 foram monitoradas para o etoricoxibe e valdecoxibe, respectivamente. O método cromatográfico isocrático foi executado em temperatura ambiente, utilizando coluna C<sub>8</sub> e fase móvel constituída de metanol: 1% de ácido acético (50:50, V/V), e validado nas faixas de concentração de 10-2500 ng/mL (etoricoxibe) e 5-1000 ng/mL (valdecoxibe). A metodologia foi utilizada para a determinação do perfil

farmacocinético após a administração de dose única de etoricoxibe (90 mg) e valdecoxibe (20 mg) em voluntários humanos.

Ramakrishna et al. (2005) desenvolveram e validaram método por cromatografia líquida com detecção no UV (284 nm) para quantificação do etoricoxibe em plasma humano. As amostras foram extraídas por sistema líquido-líquido, utilizando mistura de dietiléter : diclorometano (70:30) como solvente. O etoricoxibe e o padrão interno (zaleplon) foram separados em coluna C<sub>18</sub>, usando como fase móvel água:acetonitrila (58:42, V/V). Foi estabelecida a faixa de concentração do método entre 5-2500 ng/mL. Os autores demonstraram que, na análise do etoricoxibe e padrão interno, não há interferência de outros fármacos que podem ser administrados concomitantemente em clínica.

Sankar et al. (2005) desenvolveram método espectrofotométrico para análise de etoricoxibe e ezetimibe em matéria-prima, utilizando para detecção os comprimentos de onda de 235 e 230 nm, respectivamente.

A determinação do etoricoxibe, ácido salicílico, valdecoxibe, cetoprofeno, nimesulida e celecoxibe em plasma humano através de cromatografia líquida foi estudada por Kumar et al. (2006). Os autores utilizaram sistema de extração líquido-líquido, com acetonitrila. Foi realizado gradiente, com fase móvel ternária composta de eluente 1: 0,05 M ácido fórmico (pH 3,0), eluente 2: acetonitrila e eluente 3: água:metanol (5:95, V/V) e separação em coluna C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm).

O desenvolvimento de técnicas de ionização, tais como a ionização química a pressão atmosférica (APCI) e por electrospray (ES), possibilitou o acoplamento de duas poderosas técnicas analíticas, a espectrometria de massas (EM) com a cromatografia líquida (CL), originando método (CL-EM) robusto e aplicável a grande variedade de matrizes. Dessa forma, o espectrômetro de massas é considerado o detector ideal, pois apresenta alta sensibilidade e seletividade, resposta a diferentes classes de compostos e capacidade de detecção de misturas complexas, com análises rápidas e quantitativas. Nesse sentido, a CL-EM tem sido amplamente utilizada para a determinação de fármacos em estudos clínicos e atualmente vem sendo usada de modo crescente para análise de produtos farmacêuticos (LEE, 2005; PEREIRA et al., 2005).

Yamashita & Fenn (1984) desenvolveram a técnica de ionização por electrospray em 1984, mas somente a partir da década de 90 passou a ser extensamente utilizada na análise de fármacos, metabólitos e produtos de degradação. Nesse modo, o espectrômetro de massas funciona através da ionização das moléculas e sua fragmentação. Após, os íons resultantes são identificados de acordo com sua relação massa/carga. Os três componentes-chave do processo

são: a fonte de íons, o analisador e o detector. A ionização por electrospray atualmente é a técnica mais utilizada na análise de fármacos, podendo ser utilizada no modo positivo (ES+) ou negativo (ES-). Para tal, promove-se a adição ou subtração de um próton ao composto (DOOLEY, 2003; KORFMACHER, 2005; SMYTH, 2005).

Na análise por ES, a amostra normalmente é dissolvida em mistura de água e solvente orgânico, comumente metanol, isopropanol ou acetonitrila, podendo ser infundida diretamente no espectrômetro de massas, ou injetada em fluxo contínuo, ou seja, contida no eluente e separada por coluna cromatográfica. Após a separação, a amostra é injetada no espectrômetro de massas. A passagem da fase líquida para gasosa (dessolvatação) é realizada com auxílio do gás nitrogênio, formando um “spray eletrolítico” e o capilar por onde passa a amostra encontra-se carregado eletricamente, daí a origem do nome electrospray. O composto assim vaporizado é captado pelo cone do espectrômetro e introduzido na câmara de vácuo, analisado e posteriormente detectado e quantificado (NIESSEN, 2003). Na Figura 3 está representada a fonte de electrospray.

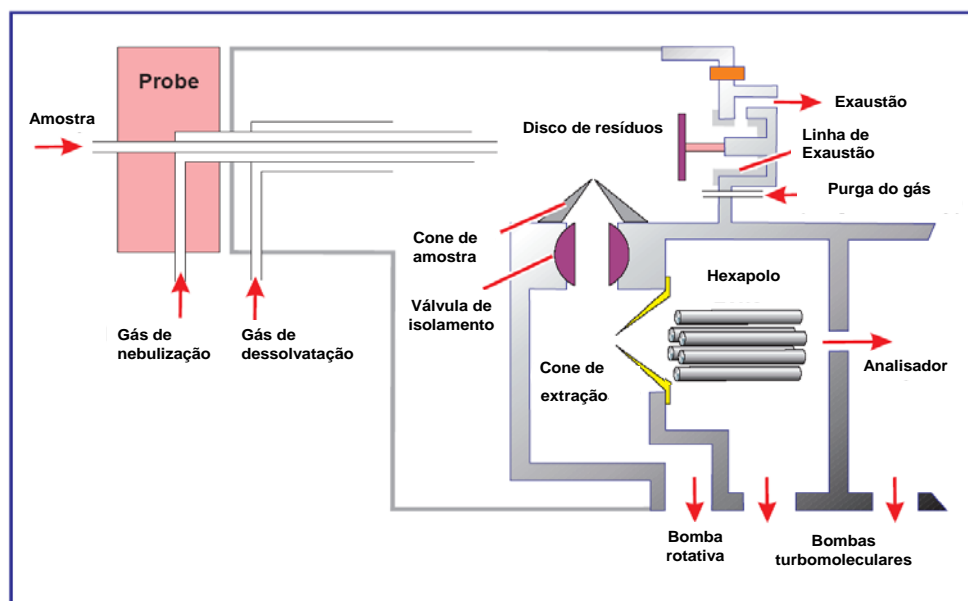


Figura 3 – Representação esquemática da fonte de electrospray.

A ionização química, a pressão atmosférica, é uma técnica similar à ionização por electrospray, onde a fase móvel é introduzida diretamente na fonte de APCI, que contém um vaporizador aquecido, facilitando a dessolvatação/vaporização rápida das gotas. A ionização é realizada por reações íon-molécula, em que o gás reagente é o próprio solvente, ionizado por

descarga corona a pressão atmosférica. É extensamente utilizada na indústria farmacêutica para análise de amostras relativamente polares, apolares, voláteis e não voláteis menores que 1200 Daltons (NIESSEN, 2003). A Figura 4 mostra a fonte de APCI.

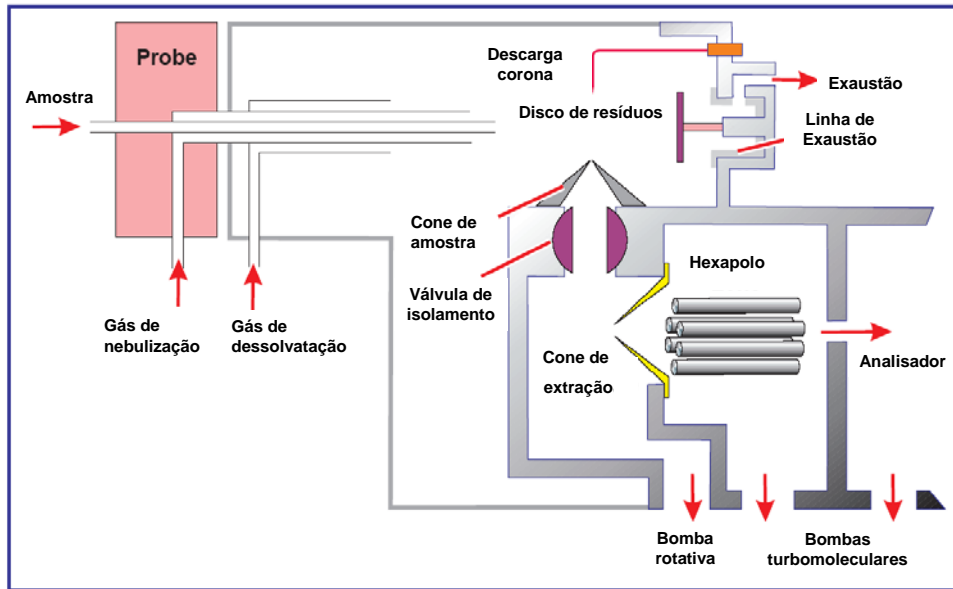


Figura 4 – Representação esquemática da fonte de APCI.

O processo de quantificação de amostras por espectrometria de massas é realizado da seguinte maneira: após a passagem pelo cone, o analito penetra em uma série de compartimentos dispostos em fileira única (tandem) para a seleção e quantificação dos íons. O primeiro compartimento (quadrupolo 1) é onde acontece a seleção dos íons precursores. Um segundo compartimento (quadrupolo 2) é onde a fragmentação ocorre pela colisão dos íons precursores com moléculas do gás de colisão (argônio). Os íons produto penetram no terceiro compartimento (quadrupolo 3), onde são novamente selecionados e finalmente o íon que sai desse último compartimento é detectado por uma célula fotomultiplicadora, como mostra a Figura 5. O número de contagens por segundo é registrado no cromatograma, no qual a área sob a curva é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra (KORFMACHER, 2005).

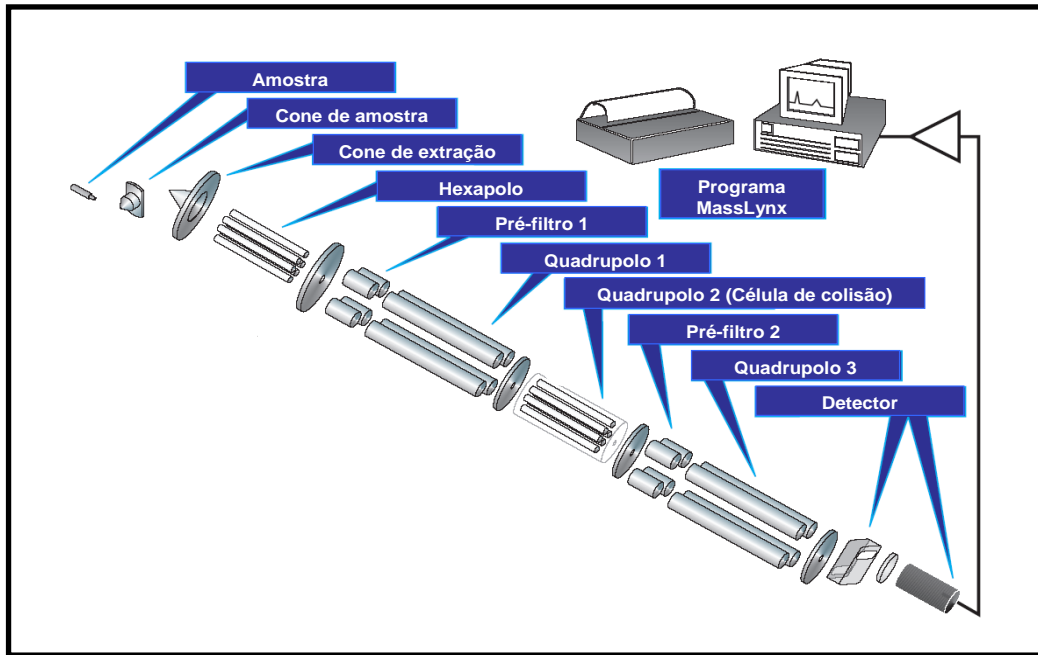


Figura 5 – Representação esquemática do espectrômetro de massas.

A espectrometria de massas, comparada à CL-UV, apresenta vantagem em relação ao tempo de análise, sensibilidade e seletividade; entretanto, até o momento, não é preconizada oficialmente como método analítico para quantificação de produtos farmacêuticos.

Uma das etapas limitantes do processo de análise de misturas em matrizes biológicas é a extração dos analitos de interesse. Essa pode ser executada em fase sólida (EFS) ou líquido-líquido (ELL). A ELL, baseada na solubilidade dos analitos presentes na amostra em dois solventes imiscíveis, pode ser demorada, necessitar grandes volumes de solventes orgânicos, e apresentar baixa reprodutibilidade em decorrência das várias etapas do processo. Por sua vez, a EFS foi desenvolvida para aumentar a reprodutibilidade e diminuir o volume de solventes orgânicos usados. Porém, em geral, requer volumes significativos de plasma e de solventes orgânicos, que necessitam de evaporação e posterior ressuspensão da amostra (LANÇAS, 2004; GONÇALVES et al., 2005). Recentemente foram desenvolvidos os métodos de EFS automatizados que fornecem elevada precisão e sensibilidade, diminuindo o tempo total para preparação de amostras em relação aos métodos tradicionais (SCHELLEN et al., 2003; ALNOUTI et al., 2005).

Procedimento importante nos processos de extração de fármacos de matrizes biológicas consiste na adição de concentração conhecida de padrão interno (PI). Determina-se a relação entre as áreas fornecidas pela amostra e PI, eliminando desse modo, erros decorrentes da extração. O PI deve possuir propriedades químicas similares ao composto sob

análise, estar presente em concentrações similares, apresentar tempo de retenção semelhante e não interferir na análise (CAUSON, 1997).

A validação de métodos analíticos e bioanalíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que o sistema e o método atendem às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. No caso de métodos bioanalíticos, devem-se incluir também parâmetros de efeitos de matriz, recuperação e estabilidade do fármaco na matriz biológica (ICH, 1996; CAUSON, 1997; SHAH et al., 2000; FDA, 2001; ANVISA, 2002; ANVISA, 2003).

É conveniente observar que o etoricoxibe não está descrito em nenhuma farmacopéia e, até o momento, não se encontram na literatura métodos validados para a análise quantitativa em produtos farmacêuticos (RAO et al., 2005). Além disso, há publicações, conforme já destacado, relativas à determinação em matrizes biológicas. Porém, o desenvolvimento e validação de novas metodologias, que aprimorem o controle da qualidade, e que possam ser utilizadas para avaliações em estudos clínicos e farmacocinéticos, representam contribuição significativa para a área de medicamentos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3.1 MATERIAIS

#### 3.1.1 Substâncias Químicas de Referência

- Substância química de referência de etoricoxibe, Merck<sup>1</sup>.
- Substância química de referência de meloxicam, Euresian.
- Substância química de referência de piroxicam, Farmacopéia Européia.
- Substância química de referência de tenoxicam, Farmacopéia Européia.
- Substância química de referência de valdecoxibe, Pfizer<sup>2</sup>.

#### 3.1.2 Produtos farmacêuticos comerciais

Utilizaram-se amostras de seis lotes de produtos farmacêuticos de etoricoxibe contendo 60, 90 e 120 mg/comprimido, em seu prazo de validade, comercializadas no País. As amostras foram identificadas por números arábicos de 1 a 6.

#### 3.1.3 Solventes e reagentes

- Acetato de amônio, Merck<sup>®</sup>.
- Acetato de etila, Tedia<sup>®</sup>.
- Acetonitrila, Tedia<sup>®</sup>.
- Ácido acético glacial, Tedia<sup>®</sup>.
- Ácido clorídrico, Merck<sup>®</sup>.
- Ácido fosfórico 85%, Tedia<sup>®</sup>.

---

<sup>1</sup> Gentilmente doada pela Merck.

<sup>2</sup> Gentilmente doada pela Pfizer.



- Ácido fórmico, Tedia<sup>®</sup>.
- Água purificada, Labconco<sup>®</sup>.
- Argônio, White Martins<sup>®</sup>.
- Celulose microcristalina, Delaware<sup>®</sup>.
- Cera de carnaúba, Delaware<sup>®</sup>.
- Croscarmelose sódica, Delaware<sup>®</sup>.
- Diclorometano, Tedia<sup>®</sup>.
- Dietil éter, Tedia<sup>®</sup>.
- Dióxido de titânio, Delaware<sup>®</sup>.
- Estearato de magnésio, Delaware<sup>®</sup>.
- Fosfato de cálcio dibásico anidro, Delaware<sup>®</sup>.
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado, Merck<sup>®</sup>.
- Fosfato de sódio dibásico, Merck<sup>®</sup>.
- Fosfato de potássio monobásico, Merck<sup>®</sup>.
- Hidróxido de sódio, Merck<sup>®</sup>.
- Hipromelose, Delaware<sup>®</sup>.
- Lactose monohidratada, Delaware<sup>®</sup>.
- Metanol, Tedia<sup>®</sup>.
- Nitrogênio, White Martins<sup>®</sup>.
- Plasma humano, Banco de Sangue do Hospital Universitário - UFSM.
- Peróxido de hidrogênio 30 volumes, Merck<sup>®</sup>.
- Terc-butil metil éter, Tedia<sup>®</sup>.
- Triacetato de glicerol, Delaware<sup>®</sup>.

### 3.1.4 Equipamentos e acessórios

- Agitador orbital de tubos, modelo MA 162, Marconi<sup>®</sup>.
- Aparelho de desintegração, Nova Ética<sup>®</sup>.
- Aparelho de Karl Fisher, Titroline Alpha<sup>®</sup>.
- Balança eletrônica digital, modelo CP225D, Sartorius<sup>®</sup>.
- Balões volumétricos de 10, 20, 25, 50, 100, 500 e 1000 mL, Laborglass<sup>®</sup>.
- Banho de água termostaticado, Tecnal<sup>®</sup>.

- Banho ultrassônico, CTA<sup>®</sup>.
- Bomba de vácuo, Tecnal<sup>®</sup>.
- Cartuchos para extração em fase sólida (10 mm x 2 mm d.i.), Spark<sup>®</sup>:
  - HySphere CN (diâmetro de partícula de 8 µm).
  - HySphere C<sub>2</sub> (diâmetro de partícula de 8 µm).
  - HySphere C<sub>8</sub> (diâmetro de partícula de 8 µm).
  - HySphere C<sub>8</sub> (EC) (diâmetro de partícula de 8 µm).
  - HySphere C<sub>18</sub> (diâmetro de partícula de 8 µm).
  - HySphere C<sub>18</sub> HD (diâmetro de partícula de 7 µm).
  - HySphere Resin GP (diâmetro de partícula de 10-12 µm).
  - HySphere Resin SH (diâmetro de partícula de 15-25 µm).
  - BondElut C<sub>18</sub> (diâmetro de partícula de 40-90 µm).
  - BondElut C<sub>8</sub> (diâmetro de partícula de 40-90 µm).
- Centrífuga refrigerada, MR 23i, Jouan<sup>®</sup>.
- Coluna Luna C<sub>18</sub> (50 mm x 3 mm, 3 µm, 100 Å), Phenomenex<sup>®</sup>.
- Coluna Synergi Fusion C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm, 4 µm, 80 Å), Phenomenex<sup>®</sup>.
- Cromatógrafo líquido, Shimadzu<sup>®</sup>:
  - Bomba LC-10 AD<sub>VP</sub>.
  - Controlador SCL-10 A<sub>VP</sub>.
  - Degaseificador DGU-14 A.
  - Detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10 A<sub>VP</sub>.
  - Injetor automático SIL-10 AD<sub>VP</sub>.
  - Válvula quaternária FCV-10AL<sub>VP</sub>.
  - Forno para colunas CTO-10AD<sub>VP</sub>.
  - Software CLASS-VP V 6.14.
- Destilador, Biomatic<sup>®</sup>.
- Durômetro, Pharma Test<sup>®</sup>.
- Estufa para secagem e esterilização, modelo 315 SE, Nova Ética<sup>®</sup>.
- Espectrômetro de massa, modelo Quattro LC, Micromass<sup>®</sup>.
- Estante para tubos, ComLab<sup>®</sup>.
- Extrator em fase sólida, modelo Prospekt-2, Spark<sup>®</sup>, consistindo dos seguintes módulos:
  - Módulo para troca do cartucho: Permite a colocação de duas bandejas, cada uma com 96 cartuchos de extração. Cada bandeja possui placa computadorizada que

permite obter informações sobre o cartucho, tais como: número de utilizações, tipo de material de empacotamento e data de produção.

- Dispensador de solventes: Permite a utilização de seis solventes diferentes. Neste módulo são selecionados os solventes a ser utilizados, bem como suas velocidades de aplicação no cartucho.
  - Injetor automático, modelo triathlon: Realiza a injeção das amostras de plasma a ser analisadas.
- Filtro estéril e descartável, modelo HV Millex com membrana durapore<sup>®</sup> de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm, Millipore<sup>®</sup>.
  - Freezer – 80 °C, Revco<sup>®</sup>.
  - Freezer – 20 °C, Consul<sup>®</sup>.
  - Friabilômetro, Pharma Test<sup>®</sup>.
  - Membrana filtrante de nylon 0,45 µm, Whatman<sup>®</sup>.
  - Micropipetas de volume ajustável P 10, P 20, P 100, P 200, P 1000, P 5000 e P10000, Gilson<sup>®</sup>.
  - pHmetro, Thermo Orion<sup>®</sup>.
  - Ponteiros descartáveis de 200, 1000, 5000 e 10000 µL, Gilson<sup>®</sup>.
  - Pré-coluna C<sub>18</sub> (Kit Security Guard Cartridges), Phenomenex<sup>®</sup>.
  - Probe para ionização por electrospray, Micromass<sup>®</sup>.
  - Probe para ionização por APCI, Micromass<sup>®</sup>.
  - Purificador de água, Labconco<sup>®</sup>.
  - Sistema de extração e recuperação de solventes, CEBIFAR-UFSM.
  - Sistema de filtração, Millipore<sup>®</sup>.
  - Software Masslynx V 3.5, Micromass<sup>®</sup>.
  - Termômetro de imersão, Incoterm<sup>®</sup>.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Cromatografia líquida em fase reversa

As condições experimentais estabelecidas para análise do etoricoxibe, através do método de CL, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros do método otimizado por cromatografia líquida.

Características	Descrição
Coluna	Synergi Fusion <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm d.i.) 4 µm, Phenomenex <sup>®</sup>
Fase móvel	Ácido fosfórico 0,01 M, pH 3,0:Acetonitrila (62:38, V/V)
Vazão	1,0 mL/min
Comprimento de onda	234 nm
Volume de injeção	10 µL

#### 3.2.1.1 Preparação da fase móvel

Diluíram-se 790 µL de ácido fosfórico em 800 mL de água purificada. Ajustou-se o pH 3,0 com hidróxido de sódio 1 N. Transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água purificada. Homogeneizou-se e filtrou-se, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. Preparou-se no momento do uso.

#### 3.2.1.2. Preparação da SQR de etoricoxibe

Pesaram-se, analiticamente, 10 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL (solução estoque). Alíquota de 1 mL foi transferida para balão volumétrico de 10

mL, completando-se o volume com fase móvel, de modo a obter a solução com concentração de 100 µg/mL.

### **3.2.1.3 Preparação das amostras**

Para cada amostra, determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, que foram triturados até a obtenção de pó homogêneo. Pesaram-se quantidades equivalentes a 10 mg de etoricoxibe e transferiram-se para balões volumétricos de 50 mL, com auxílio de 30 mL de metanol. A solução foi submetida a ultra-som por 15 minutos, completando-se o volume com metanol. Homogeneizou-se e submeteu-se à centrifugação (3.000 rpm) durante 10 minutos. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante e adicionou-se 1 mL de fase móvel, de modo a obter solução com a concentração de 100 µg/mL.

### **3.2.1.4 Validação do método analítico**

A validação foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (ICH, 1996). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

#### **3.2.1.4.1 Especificidade**

A especificidade do método analítico foi determinada pelo estudo da degradação forçada da substância química de referência (SQR). O fármaco foi submetido a condições de hidrólise ácida e básica, fotólise e oxidação química. Avaliaram-se, então, a pureza do pico e percentagem de área referente ao etoricoxibe, utilizando o programa CLASS VP 6.14.

##### **3.2.1.4.1.1 Oxidação química**

Pesaram-se, analiticamente, 5 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 50 mL. Solubilizou-se com 1 mL de acetonitrila e completou-se o volume com solução

contendo 5% de peróxido de hidrogênio 30 volumes, obtendo-se a concentração de 100 µg/mL. O balão foi mantido protegido da luz à temperatura ambiente por 24 horas.

#### **3.2.1.4.1.2 Fotólise**

Pesaram-se, analiticamente, 10 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de acetonitrila e completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. A amostra foi irradiada com luz UV em cubetas de quartzo, à distância de 15 cm, por 1 hora. Transferiu-se 1 mL da amostra para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se solução com concentração teórica de 100 µg/mL.

#### **3.2.1.4.1.3 Hidrólise ácida**

Pesaram-se, analiticamente, 2 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 N, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL. Deixou-se a solução sob refluxo à temperatura de 100 °C por 4 horas. Retirou-se alíquota de 1 mL e neutralizou-se com 1 mL de hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se solução com concentração teórica de 100 µg/mL.

#### **3.2.1.4.1.4 Hidrólise básica**

Pesaram-se, analiticamente, 2 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com hidróxido de sódio 0,1 N, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL. Deixou-se a solução sob refluxo à temperatura de 100 °C por 4 horas. Retirou-se alíquota de 1 mL e neutralizou-se com 1 mL de ácido clorídrico 0,1 N, obtendo-se solução com concentração teórica de 100 µg/mL.

#### **3.2.1.4.2 Linearidade**

Para preparar a curva de calibração, pesaram-se, analiticamente, 10 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se solução com concentração de 1000 µg/mL (solução estoque). A partir da solução estoque, foram realizadas diluições sucessivas com a fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações de 0,02, 0,2, 2, 20, 50, 100 e 150 µg/mL. As curvas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e calculada a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a validade dos parâmetros estatísticos.

#### **3.2.1.4.3 Precisão**

Avaliou-se a precisão do método através do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. Paralelamente foi analisada solução da SQR na concentração de 100 µg/mL.

##### **3.2.1.4.3.1 Repetibilidade**

Preparou-se amostra na concentração de 100 µg/mL e realizaram-se doze determinações sucessivas no mesmo dia. Desse modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

##### **3.2.1.4.3.2 Precisão intermediária**

Avaliou-se a precisão intermediária através das análises executadas por diferentes analistas e em diferentes dias, usando o mesmo método e lotes de amostras iguais, na concentração de 100 µg/mL. As análises foram realizadas em cinco replicatas.

### 3.2.1.4.3.2.1 Interdias

Prepararam-se, diariamente, duas amostras na concentração de 100 µg/mL, e analisaram-se cinco replicatas em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

### 3.2.1.4.3.2.2 Entre analistas

Prepararam-se três amostras na concentração de 100 µg/mL e analisaram-se cinco replicatas, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

### 3.2.1.4.3.3 Cálculos

A concentração de etoricoxibe nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Em que:

$C_A$  = Concentração de etoricoxibe na amostra

$A_A$  = Área média absoluta da amostra

$C_{SQR}$  = Concentração da SQR

$A_{SQR}$  = Área média absoluta da SQR

O valor percentual de etoricoxibe nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Em que:

$C_A\%$  = Concentração percentual da amostra



$C_A$  = Concentração de etoricoxibe encontrada na amostra

$C_T$  = Concentração teórica de etoricoxibe na amostra

#### 3.2.1.4.4 Exatidão

A exatidão foi verificada adicionando-se concentrações de 80, 100 e 120 µg/mL da SQR de etoricoxibe à mistura de excipientes (placebo) e avaliando-se em paralelo soluções com concentrações correspondentes da SQR. As análises foram realizadas em cinco replicatas.

##### 3.2.1.4.4.1 Cálculos

A concentração da SQR de etoricoxibe nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Em que:

$C_A$  = Concentração da SQR de etoricoxibe na amostra placebo

$A_A$  = Área média absoluta da amostra placebo adicionada de SQR

$C_{SQR}$  = Concentração da SQR

$A_{SQR}$  = Área média absoluta da SQR

O valor percentual da SQR de etoricoxibe nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Em que:

$C_A\%$  = Concentração percentual da SQR de etoricoxibe na amostra placebo

$C_A$  = Concentração da SQR de etoricoxibe encontrada na amostra placebo

$C_T$  = Concentração teórica da SQR de etoricoxibe na amostra placebo

#### 3.2.1.4.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 1996), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Com base no valor teórico calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. A fórmula usada foi a seguinte:

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$$

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva de calibração

#### 3.2.1.4.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 1996), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Com base no valor teórico calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. O cálculo foi realizado segundo a fórmula:

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$$

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva de calibração

### 3.2.1.4.7 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de modificações nas condições cromatográficas, tais como: vazão de 0,8, 1,0 e 1,2 mL/min; temperatura de análise: 25, 30, 35 e 40 °C; volume de injeção: 5, 10 e 20 µL; alteração na proporção de acetonitrila: 36, 38 e 40%; variação do pH da fase móvel: 2,8; 3,0 e 3,2 e modificação no comprimento de onda: 200 a 370 nm. Para avaliar a influência desses fatores sobre os resultados do método, realizou-se análise do teor (conforme descrito no item 3.2.3.5) dos comprimidos nas diferentes condições.

### 3.2.2 Extração líquido-líquido

As condições experimentais estabelecidas para extração líquido-líquido do etoricoxibe e piroxicam nas amostras de plasma encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Condições otimizadas do método de extração líquido-líquido para etoricoxibe e piroxicam em amostras de plasma.

<b>Matriz biológica</b>	Plasma
<b>Volume de amostra</b>	500 µL
<b>Padrão interno</b>	Piroxicam
<b>Solvente de extração</b>	Terc-butil metil éter
<b>pH</b>	50 µL de ácido fórmico
<b>Volume de solvente</b>	4 mL
<b>Tempo de agitação</b>	60 segundos
<b>Tempo e rotação na centrífuga</b>	10 minutos a 3500 rpm
<b>Secagem</b>	Fluxo de nitrogênio em banho termostático
<b>Reconstituição</b>	500 µL de acetonitrila:água (50:50, V/V)

### 3.2.2.1 Preparação das amostras

Pipetaram-se alíquotas de 125 µL de solução padrão de etoricoxibe na concentração de 10000 ng/mL e adicionaram-se 25 µL de solução padrão de piroxicam (500 ng/mL), evaporando-se o solvente em corrente de nitrogênio. Adicionaram-se 500 µL de plasma branco ou solução diluente, obtendo-se concentração final de 2500 ng/mL e 25 ng/mL para o etoricoxibe e PI, respectivamente, equivalente ao CQM. Homogeneizou-se em agitador de tubos por 30 segundos. A seguir as amostras de plasma foram purificadas através de extração líquido-líquido, e as de soluções foram injetadas diretamente no sistema de CL-EM/EM.

### 3.2.2.2 Desenvolvimento do método

Iniciou-se o estudo selecionando-se o solvente de extração e analisando concentração equivalente ao CQM, para avaliar os seguintes parâmetros:

- Especificidade para o etoricoxibe e piroxicam.
- Percentagem de recuperação para o etoricoxibe e piroxicam.
- Recuperação mínima dos interferentes presentes na matriz biológica.

Após a escolha do solvente, otimizou-se o método, testando os seguintes fatores:

- pH da extração.
- Tempo em agitador de tubos.
- Tempo e rotação de centrifugação.

### 3.2.3 Extração em fase sólida

As condições experimentais estabelecidas para extração em fase sólida do etoricoxibe e PI nas amostras de plasma encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições otimizadas do método de extração em fase sólida para etoricoxibe e piroxicam em amostras de plasma, utilizando cartucho HySphere C<sub>18</sub> HD.

<b>Etapa</b>	<b>Solvente</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Vazão (mL/min)</b>
Ativação	Metanol	1,0	5,0
Equilíbrio	Água	1,0	5,0
Eluição da amostra	Água	0,75	2,0
Lavagem	Metanol:Água (5:95, V/V)	1,0	2,0

### 3.2.3.1 Preparação das amostras

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.2.2.1. A seguir as amostras de plasma foram purificadas através de extração em fase sólida, e as de soluções foram injetadas diretamente no sistema de CL-EM/EM.

### 3.2.3.2 Desenvolvimento do método

O sistema de extração em fase sólida utilizado está em linha com o sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, conseqüentemente as etapas de extração e análise de fármacos foram realizadas de modo automatizado. O método por extração em fase sólida consistiu em oito etapas principais:

- 1) Um cartucho de extração foi retirado automaticamente da bandeja e colocado no compartimento de separação.
- 2) O injetor automático fez a amostragem do volume de amostra a ser injetado.
- 3) O cartucho foi solvatado, ativando o empacotamento do cartucho.
- 4) O cartucho foi equilibrado com solvente.

- 5) A amostra foi eluída até o cartucho com auxílio de solvente, quantitativamente. Os fármacos foram retidos no cartucho e as proteínas do plasma descartadas.
- 6) O cartucho foi lavado com solvente, a fim de retirar o restante das proteínas do plasma, permanecendo apenas os fármacos.
- 7) A fase móvel foi eluída através do cartucho, transportando os fármacos até a coluna analítica para separação e então até o espectrômetro de massas para quantificação.
- 8) O cartucho utilizado foi retirado automaticamente do compartimento de separação e colocado na bandeja.

O método foi otimizado, com o CQM em plasma, testando-se os seguintes fatores:

- Escolha do cartucho de extração, quando foram avaliados doze diferentes tipos de materiais de empacotamento.
- Otimização das etapas de extração, através da seleção de solventes, volumes e velocidades de aplicação.

### 3.2.4 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

As condições experimentais estabelecidas para a cromatografia líquida encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros otimizados para a cromatografia líquida.

Características	Descrição
Coluna	Luna <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (50 mm x 4,6 mm d.i.) 3 µm, Phenomenex <sup>®</sup>
Temperatura da coluna	40 °C
Fase móvel	Acetonitrila:água (95:5, V/V)/ 0,1% ácido acético (90:10, V/V)
Vazão	0,4 mL/min
Volume de injeção	20 µL

Para a otimização das condições do espectrômetro de massas, eluíram-se diretamente soluções contendo 1000 ng/mL de etoricoxibe e piroxicam e ajustaram-se os parâmetros do equipamento, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros utilizados no espectrômetro de massas.

<b>Características</b>	<b>Descrição</b>
Tipo de ionização	Electrospray positivo
Modo de operação	Monitoramento de reação múltipla (MRM)
Transição monitorada	359,3>280,0 (etoricoxibe) e 332,0>95,0 (piroxicam)
Energia de colisão	30 eV (etoricoxibe) e 20 eV (piroxicam)
Gás do cone (nitrogênio)	74 L/h
Gás de colisão (argônio)	$2,3 \times 10^{-3}$ mbar
Gás de dessolvatação (nitrogênio)	480 L/h
Gás de nebulização (nitrogênio)	80 L/h
Voltagem do capilar	3,2 kV
Voltagem do cone	62 V (etoricoxibe) e 32 V (piroxicam)
Voltagem do extrator	3 V
Voltagem do hexapolo	0,2 V
Temperatura do bloco	120 °C
Temperatura de dessolvatação	450 °C

#### **3.2.4.1 Preparação da fase móvel**

Transferiram-se 5 mL de água ultrapura para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com acetonitrila. Homogeneizou-se, filtrou-se e identificou-se como solução A.

Transferiu-se 1 mL de ácido acético glacial para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água ultrapura. Homogeneizou-se, filtrou-se e identificou-se como solução B.

#### **3.2.4.2 Preparação da solução diluente**

Transferiram-se 500 mL de água ultrapura para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com acetonitrila. Homogeneizou-se, filtrou-se e denominou-se solução diluente.

#### **3.2.4.3 Preparação da SQR de etoricoxibe**

Pesaram-se, analiticamente, 10 mg da SQR de etoricoxibe e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL (solução estoque). A partir da solução estoque, foram realizadas diluições sucessivas com acetonitrila, de modo a obter soluções-padrão nas concentrações de 10, 100, 1000 e 10000 ng/mL.

#### **3.2.4.4 Preparação da SQR de piroxicam**

Pesaram-se, analiticamente, 10 mg da SQR de piroxicam e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL (solução estoque). A partir da solução estoque, foram realizadas diluições sucessivas com acetonitrila, obtendo-se solução-padrão de piroxicam na concentração de 500 ng/mL.

#### **3.2.4.5 Preparação e extração da curva de calibração**

As amostras de plasma padrão da curva de calibração foram preparadas diariamente a partir de soluções-padrão de 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1000 ng/mL e 10000 ng/mL de etoricoxibe. Pipetaram-se alíquotas adequadas de solução-padrão de etoricoxibe e 25  $\mu$ L de solução de PI (500 ng/mL) em tubos de ensaio, evaporando-se o solvente em corrente de nitrogênio. Adicionaram-se 500  $\mu$ L de plasma branco, 50  $\mu$ L de ácido fórmico e homogeneizou-se em agitador de tubos por 30 segundos. Procedeu-se a extração líquido-líquido, adicionando-se 4 mL de terc-butil metil éter e agitando durante 60 segundos.



Colocou-se em centrífuga a 3500 rpm por 10 minutos. Na etapa seguinte, as amostras foram colocadas em gelo seco (para congelar a fase aquosa), filtrando-se em seguida a camada superior orgânica em unidade HV Millex com membrana Durapore®. Evaporou-se o filtrado em fluxo de nitrogênio a 40 °C e reconstituiu-se o resíduo em 500 µL de solução diluente. A Tabela 6 apresenta as diluições realizadas para obtenção das amostras de plasma padrão da curva de calibração.

Tabela 6 – Obtenção das amostras de plasma padrão da curva de calibração.

Concentração da solução padrão de etoricoxibe	Alíquota	Volume de plasma branco		Concentração final de etoricoxibe	Identificação
10 ng/mL	50 µL		500 µL	1 ng/mL	CC1
100 ng/mL	50 µL		500 µL	10 ng/mL	CC2
1000 ng/mL	100 µL		500 µL	20 ng/mL	CC3
1000 ng/mL	50 µL		500 µL	100 ng/mL	CC4
1000 ng/mL	100 µL		500 µL	200 ng/mL	CC5
10000 ng/mL	25 µL		500 µL	500 ng/mL	CC6
10000 ng/mL	50 µL		500 µL	1000 ng/mL	CC7
10000 ng/mL	100 µL		500 µL	2000 ng/mL	CC8
10000 ng/mL	250 µL		500 µL	5000 ng/mL	CC9

#### 3.2.4.6 Preparação das amostras de plasma de controle de qualidade (CQ)

As concentrações das amostras de CQ foram escolhidas com base nos seguintes critérios:

- Controle de qualidade baixo (CQB): correspondente a três vezes a concentração do limite de quantificação.
- Controle de qualidade médio (CQM): concentração intermediária entre os controles baixo e alto.

- Controle de qualidade alto (CQA): correspondente a 80% da maior concentração da curva de calibração.

As amostras de plasma de CQ nas três concentrações (CQB = 3 ng/mL, CQM = 2500 ng/mL e CQA = 4000 ng/mL) foram preparadas no mesmo dia, transferindo-se alíquotas de solução-padrão de etoricoxibe, nas concentrações de 1 µg/mL ou 1000 µg/mL para balões volumétricos de 50 mL, conforme descrito na Tabela 7. A seguir, adicionou-se plasma branco e homogeneizou-se suavemente para evitar a formação de espuma. Após, completou-se o volume e agitou-se vigorosamente para homogeneização. As amostras foram alíquotadas em frascos de polipropileno de 2 mL, devidamente identificados pelo fármaco, concentração, data de preparação, e armazenadas em freezer a -80 °C.

Tabela 7 – Preparação das amostras de plasma de controle de qualidade.

Controle de Qualidade	Concentração da solução padrão de etoricoxibe			
		Alíquota	Volume de plasma branco	Concentração final de etoricoxibe
CQB	1 µg/mL	150 µL	50 mL	3 ng/mL
CQM	1000 µg/mL	125 µL	50 mL	2500 ng/mL
CQA	1000 µg/mL	200 µL	50 mL	4000 ng/mL

### 3.2.4.7 Extração das amostras de plasma de controle de qualidade (CQ)

Descongelaram-se as amostras de CQ à temperatura ambiente. Para tubos selecionados, pipetaram-se 25 µL de solução de PI (500 ng/mL), evaporando-se o solvente em corrente de nitrogênio. Adicionaram-se 500 µL de cada uma das concentrações de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) e 50 µL de ácido fórmico, e homogeneizou-se em agitador de tubos por 30 segundos. Procedeu-se a extração líquido-líquido conforme descrito no item 3.2.4.5.

### **3.2.4.8 Validação do método bioanalítico**

A validação foi conduzida, usando extração líquido-líquido e procedimento preconizado pela literatura (CAUSON, 1997; SHAH et al., 2000; FDA, 2001; ANVISA, 2002; ANVISA, 2003). Os parâmetros avaliados foram: efeitos de matriz, especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e estudo de estabilidade.

#### **3.2.4.8.1 Efeitos de matriz**

Para avaliar os efeitos de matriz foram preparadas três replicatas para cada concentração dos CQ (CQB, CQM e CQA) em seis amostras de plasma de diferentes doadores. As médias dos resultados de cada controle foram comparadas com as de soluções recém-preparadas (etoricoxibe e PI evaporados e reconstituídos em solução diluente) nas mesmas concentrações.

#### **3.2.4.8.2 Especificidade**

Para avaliar a interferência de componentes endógenos, foram analisadas seis amostras de plasma branco, sendo uma de plasma lipêmico, uma de plasma hemolisado e quatro de plasma normal, obtidas de voluntários sadios e isentos de etoricoxibe e PI. Podem ser aceitos interferentes com mesmo tempo de retenção e resposta correspondente a no máximo 20% da área do pico do limite de quantificação inferior do padrão e 5% da área do pico do PI.

#### **3.2.4.8.3 Recuperação**

Foi determinada, comparando-se os resultados das análises de amostras de plasma adicionadas de etoricoxibe e PI, submetidas ao processo de extração, com aqueles de análises de amostras de etoricoxibe e PI, não extraídas, mas adicionadas de plasma branco submetido ao processo de extração. Foram avaliadas três diferentes concentrações de etoricoxibe (CQB: 3 ng/mL, CQM: 2500 ng/mL e CQA: 4000 ng/mL) e uma concentração do PI (25 ng/mL) em

seis repetições. São desejáveis percentagens próximas a 100%, porém admitem-se valores menores (50-60%), desde que a recuperação seja precisa e exata. O coeficiente de variação da recuperação entre as concentrações não deve ser superior a 15%.

#### **3.2.4.8.3.1 Amostras submetidas ao processo de extração**

Pipetaram-se nos tubos planejados, 25  $\mu\text{L}$  de solução de PI (500 ng/mL), evaporando-se o solvente em corrente de nitrogênio. Adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de cada uma das concentrações de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) e 50  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico. A extração foi executada conforme descrito no item 3.2.4.5.

#### **3.2.4.8.3.2 Amostras não submetidas ao processo de extração, mas adicionadas de plasma branco extraído**

Em tubos cônicos, pipetaram-se alíquotas de solução padrão de etoricoxibe correspondentes ao CQB, CQM e CQA, conforme a Tabela 8, e adicionaram-se 25  $\mu\text{L}$  de solução de PI (500 ng/mL), evaporando-se o solvente em corrente de nitrogênio. Extraíram-se amostras de plasma branco, seguindo a mesma metodologia (item 3.2.4.5). Porém, a camada orgânica foi filtrada diretamente nos tubos cônicos nos quais haviam sido pipetados o etoricoxibe e o PI. Evaporou-se o filtrado em fluxo de nitrogênio a 40 °C e reconstituiu-se o resíduo em 500  $\mu\text{L}$  de solução diluente. Essas amostras representam 100% do padrão e PI.

Tabela 8 – Obtenção das amostras de plasma de controle de qualidade.

Controle de Qualidade	Concentração da solução padrão de etoricoxibe	Alíquota	Volume reconstituído	Concentração final de etoricoxibe
CQB	10 ng/mL	150 $\mu$ L	500 $\mu$ L	3 ng/mL
CQM	10000 ng/mL	125 $\mu$ L	500 $\mu$ L	2500 ng/mL
CQA	10000 ng/mL	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	4000 ng/mL

#### 3.2.4.8.4 Linearidade

As curvas de calibração foram construídas a partir de uma amostra branco (plasma branco processado sem PI), uma amostra zero (plasma branco processado com PI) e nove concentrações do etoricoxibe, incluindo o LQ, na faixa de 1 a 5000 ng/mL. Calculou-se a correlação linear entre as concentrações, variáveis independentes (x) e as razões entre as áreas dos picos do etoricoxibe e do PI, consideradas variáveis dependentes (y). Os parâmetros da correlação foram estimados através do método dos mínimos quadrados, utilizando a ponderação (1/x). A linearidade foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ), que deve ser superior a 0,98. Cumprem-se os requisitos de linearidade, se o valor calculado para a exatidão em cada ponto da curva de calibração estiver entre  $\pm 15\%$  da concentração nominal e a precisão, expressa pelo coeficiente de variação, for de no máximo 15%. Porém, para o LQ, admitem-se valores de  $\pm 20\%$  para exatidão e precisão.

#### 3.2.4.8.5 Precisão

Esse parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações (CQB, CQM e CQA). Foram avaliadas a precisão intradia (análise realizada no mesmo dia em seis réplicas) e interdias (análises realizadas em três dias em cinco réplicas por dia). Paralelamente, em cada dia analisou-se uma curva de calibração. O valor do coeficiente de variação das análises não deve ser superior a 15%.

#### **3.2.4.8.6 Exatidão**

O parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações (CQB, CQM e CQA). Foram avaliadas a exatidão intradia (análise realizada no mesmo dia em seis réplicas) e interdias (análises realizadas em três dias em cinco réplicas por dia). Paralelamente, em cada dia analisou-se uma curva de calibração. A exatidão das amostras deve estar entre  $\pm 15\%$  do valor nominal da concentração.

#### **3.2.4.8.7 Limite de detecção**

Determinou-se, através da análise de concentrações conhecidas e decrescentes da solução padrão de etoricoxibe em triplicata, até o menor nível detectado com relação sinal:ruído de 3:1.

#### **3.2.4.8.8 Limite de quantificação**

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do fármaco quantificada com exatidão de  $\pm 20\%$  em relação à nominal e coeficiente de variação de, no máximo, 20%. Nenhuma interferência significativa no tempo de retenção do padrão deverá ser detectada na amostra branco. A resposta do limite de quantificação (área do pico do cromatograma) deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferente endógeno. O limite de quantificação foi determinado, utilizando-se concentrações decrescentes do etoricoxibe, em seis repetições.

#### **3.2.4.8.9 Estudo de estabilidade**

Para a realização do estudo de estabilidade, previamente foram validados os parâmetros de efeitos de matriz, especificidade, recuperação, linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação. Determinou-se a estabilidade de amostras de etoricoxibe em

plasma, mantidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , submetendo-as a três ciclos de congelamento e descongelamento, bem como a estudos de estabilidade de curta duração, pós-processamento e longa duração. A concentração de etoricoxibe após cada período de armazenamento foi determinada com base na curva de calibração preparada para cada análise, e comparada com o resultado das amostras do ciclo zero (recém preparadas e analisadas), sendo o desvio (concentração da amostra de estabilidade/concentração da amostra recém preparada  $\times 100 - 100$ ) permitido, no máximo,  $\pm 15\%$ . Avaliou-se também a estabilidade das soluções-padrão de etoricoxibe e do PI.

#### **3.2.4.8.9.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento**

Determinou-se a estabilidade do etoricoxibe na matriz biológica durante três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA) em triplicata. Prepararam-se 36 amostras de plasma (12 do CQB, 12 do CQM e 12 do CQA). Analisaram-se três amostras de cada concentração (CQB, CQM, CQA) antes do congelamento (ciclo zero). As amostras restantes (vinte e sete) foram submetidas a congelamento por 24 horas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e então, descongeladas à temperatura ambiente e analisadas três amostras de cada concentração (CQB, CQM, CQA). As demais (dezoito amostras) foram recongeladas, por 24 horas e a seguir descongeladas à temperatura ambiente e analisadas três amostras de cada concentração (CQB, CQM, CQA). As nove amostras restantes foram recongeladas, por 24 horas, e então descongeladas e analisadas.

#### **3.2.4.8.9.2 Estabilidade de curta duração**

Determinou-se a estabilidade do etoricoxibe na matriz biológica durante o tempo e nas condições de análise, utilizando-se as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA) em triplicata. Essas foram descongeladas, mantidas em temperatura ambiente durante 12 horas e, então, analisadas.

### **3.2.4.8.9.3 Estabilidade pós-processamento**

Determinou-se a estabilidade do etoricoxibe na matriz biológica durante o tempo de permanência no injetor automático, utilizando-se as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA) em triplicata. Essas foram descongeladas, extraídas e mantidas à temperatura ambiente durante 24 e 48 horas. Decorridos esses períodos foram analisadas.

### **3.2.4.8.9.4 Estabilidade de longa duração**

Esse parâmetro avalia o intervalo de tempo em que as amostras de plasma podem ser armazenadas sem comprometer sua estabilidade. Determinou-se a estabilidade de longa duração utilizando-se amostras de controle de qualidade (CQB, CQM, CQA), em triplicata, congeladas durante 120 dias a -80 °C. Essas foram descongeladas e a seguir analisadas.

### **3.2.4.8.9.5 Estabilidade das soluções-padrão**

A estabilidade das soluções-padrão do etoricoxibe e PI, armazenadas à temperatura de 2-8 °C, foi avaliada através de monitoramento diário, pela injeção de amostras controle-padrão (CP), que foram preparadas pipetando-se em tubos cônicos alíquota adequada de solução padrão de etoricoxibe em acetonitrila correspondente ao CQM e 25 µL de solução do PI (500 ng/mL), evaporando-se o solvente em corrente de nitrogênio e reconstituindo-se o resíduo em 500 µL de solução diluente. As áreas obtidas nas análises diárias foram comparadas, entre si, para avaliar possível perda de estabilidade.

## **3.2.5 Ensaios físicos e físico-químicos**

Os procedimentos foram executados conforme descrito na Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988).



### 3.2.5.1 Determinação de peso médio dos comprimidos

Para a realização do teste, foram escolhidos, aleatoriamente, vinte comprimidos de cada lote, os quais foram pesados individualmente. Calculou-se o peso médio aceitando-se variação de  $\pm 5\%$ .

### 3.2.5.2 Determinação do tempo de desintegração dos comprimidos

Determinou-se a desintegração em água, mantida a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando-se seis unidades de cada lote. Considerou-se como resultado o tempo em minutos e segundos em que foi observada a desintegração total de todos os comprimidos ou apenas restos de seus revestimentos.

### 3.2.5.3 Determinação da Umidade por Karl-Fischer

Para determinar a umidade contida nas formulações, foi utilizado o método de Karl-Fischer, empregando titulador automático. Pesaram-se, aproximadamente, 200 mg do pó resultante da trituração dos comprimidos. Para determinar a percentagem de umidade contida nos produtos, utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{\text{gasto do reagente de Karl-Fischer} \times \text{FC}}{\text{quantidade de amostra (mg)}} \times 100$$

Em que:

FC = fator de correção do reagente de Karl-Fischer

### **3.2.5.4 Determinação da resistência mecânica em comprimidos**

#### **3.2.5.4.1 Friabilidade**

Para a determinação da friabilidade, pesaram-se com exatidão vinte comprimidos de cada lote, que foram colocados no aparelho e submetidos a cem rotações durante cinco minutos. Removeram-se os resíduos de poeira e pesaram-se novamente. A diferença entre o peso inicial e final dos comprimidos expressa em percentagem, correspondeu a friabilidade.

#### **3.2.5.4.2 Dureza**

Para a determinação da dureza, submeteram-se individualmente, dez comprimidos de cada lote à ação do aparelho, medindo-se a força em Newton (N) necessária para esmagá-los.

### **3.2.5.5 Doseamento do etoricoxibe nas amostras de produtos farmacêuticos**

#### **3.2.5.5.1 Preparação das amostras**

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos de cada lote, que foram triturados até obtenção de pó homogêneo. Pesaram-se quantidades equivalentes a 50 mg de etoricoxibe e transferiram-se para balões volumétricos de 50 mL, com auxílio de 30 mL de metanol. As soluções foram submetidas a ultra-som por 15 minutos, completando-se os volumes com metanol. Homogeneizou-se e submeteu-se à centrifugação (3.000 rpm) durante 10 minutos. Armazenou-se o sobrenadante das soluções com concentração de 1 mg/mL (solução estoque).

#### **3.2.5.5.2 Doseamento do etoricoxibe por CL**

Transferiu-se 100  $\mu$ L da solução estoque e adicionaram-se 900  $\mu$ L de fase móvel, obtendo-se solução com concentração de 100  $\mu$ g/mL. Realizaram-se três determinações para cada amostra.

### 3.2.5.5.2.1 Cálculos

A concentração de etoricoxibe nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Em que:

$C_A$  = Concentração de etoricoxibe na amostra

$A_A$  = Área média absoluta da amostra

$C_{SQR}$  = Concentração da SQR de etoricoxibe

$A_{SQR}$  = Área média absoluta da SQR de etoricoxibe

O valor percentual de etoricoxibe nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Em que:

$C_A\%$  = Concentração percentual da amostra

$C_A$  = Concentração de etoricoxibe encontrada na amostra

$C_T$  = Concentração teórica de etoricoxibe na amostra

### 3.2.5.5.3 Doseamento do etoricoxibe por CL-EM/EM

A partir da solução estoque foram realizadas diluições sucessivas com acetonitrila, de modo a obter solução amostra na concentração de 10000 ng/mL de etoricoxibe. Pipetaram-se alíquotas de 50 µL de solução amostra e adicionaram-se 25 µL de solução de PI (500 ng/mL), evaporando-se o solvente em corrente de nitrogênio. Adicionaram-se 500 µL de solução diluente, obtendo-se concentração final de 1000 ng/mL e 25 ng/mL para o etoricoxibe e PI, respectivamente. Realizaram-se três determinações para cada amostra e os resultados foram avaliados na curva de calibração elaborada conforme a Tabela 6, substituindo o plasma por solução diluente.

### **3.2.5.6 Uniformidade de conteúdo das amostras**

Avaliaram-se, individualmente, dez unidades de cada lote do produto. As amostras foram preparadas, transferindo-se cada comprimido para balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de 30 mL de metanol, submetendo-se a ultra-som por 15 minutos e completou-se o volume com metanol. Homogeneizou-se e submeteu-se à centrifugação (3.000 rpm) durante 10 minutos. Retirou-se alíquota do sobrenadante e realizaram-se diluições sucessivas, de modo a obter solução com concentração de 1 mg/mL (solução estoque). Determinou-se o teor de fármaco em cada unidade por CL e CL-EM/EM conforme descrito nos itens 3.2.5.5.2 e 3.2.5.5.3, respectivamente, avaliando-se os resultados com base nas especificações preconizadas (Farmacopéia Brasileira IV Edição, 1988).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 Cromatografia líquida em fase reversa

A análise da substância ativa e do produto farmacêutico acabado é importante para assegurar a qualidade e eficácia terapêutica. O etoricoxibe foi lançado recentemente e encontra-se em uso clínico. Na literatura não se encontram publicações de métodos para análise quantitativa no produto acabado (RAO et al., 2005). Nesse sentido, selecionou-se e desenvolveu-se metodologia analítica por cromatografia líquida com base nas características físico-químicas do etoricoxibe. Na seleção do comprimento de onda de detecção, o espectro do etoricoxibe foi traçado na faixa de 200 a 370 nm, utilizando detector de arranjo de diodos (DAD), obtendo-se pico máximo de absorção em 234 nm, conforme se pode observar na Figura 6.

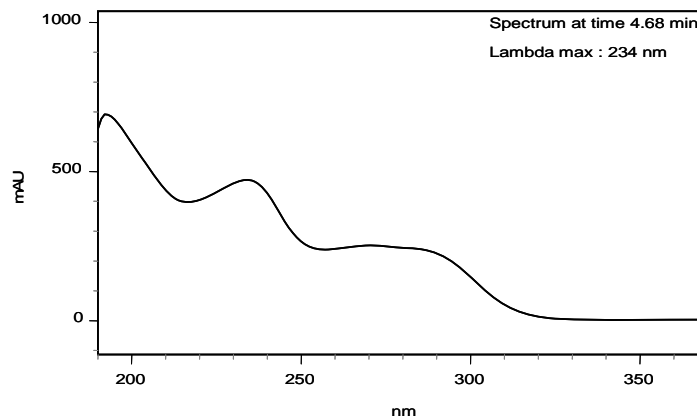


Figura 6 – Espectro obtido com a solução da SQR na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , na faixa de 200 a 370 nm. Condições cromatográficas: Coluna Synergi Fusion<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,01 M, pH 3,0:acetonitrila (62:38, V/V); vazão: 1 mL/min.

Pesquisou-se, também, a fase móvel e testaram-se vários solventes, como: água:metanol, água:etanol, ácido fosfórico 0,01 M:metanol, alterando-se inclusive suas proporções. A fase móvel constituída de ácido fosfórico 0,01 M, pH 3,0:acetonitrila (62:38, V/V) eluída em coluna C<sub>18</sub>, proporcionou tempo de retenção reprodutível de aproximadamente cinco minutos, eficiência adequada (pratos teóricos > 9000), com picos de boa resolução, sensibilidade, seletividade e simetria (< 2%), conforme pode ser observado na Figura 7.

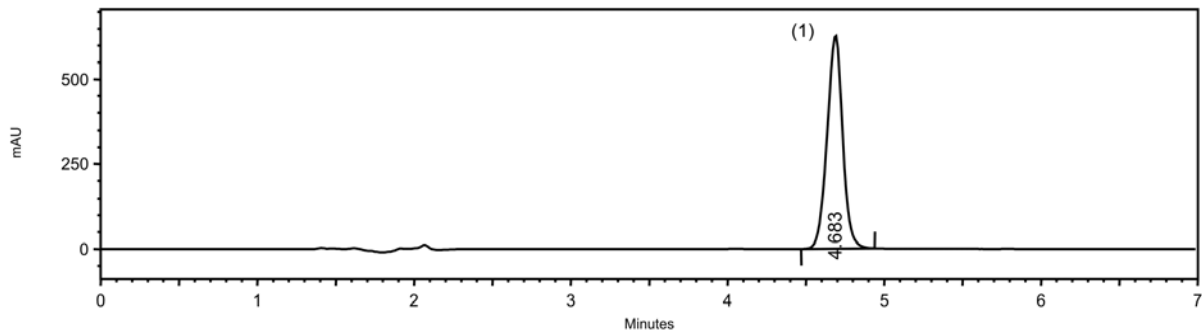


Figura 7 – Cromatograma da solução da SQR na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ : pico 1 - etoricoxibe. Condições cromatográficas: Coluna Synergi Fusion<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,01 M, pH 3,0:acetonitrila (62:38, V/V); vazão: 1 mL/min.; detecção: 234 nm.

As condições otimizadas foram validadas, avaliando-se a especificidade do método após submeter a SQR à degradação. A Figura 8 apresenta os cromatogramas da SQR na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , com pureza de 99,99% e das soluções submetidas à oxidação química e fotólise. Na oxidação química com solução a 5% de peróxido de hidrogênio 30 volumes, por 24 horas, a percentagem de degradação da SQR foi de 24,93%, observando-se também o surgimento de três picos adicionais referentes a produtos de degradação, com tempos de retenção de 2,14, 2,46 e 3,44 minutos. A SQR permaneceu com pureza de 99,98% e sem alteração significativa no tempo de retenção. No tratamento frente à luz UV, verificou-se significativo decréscimo (87,38%) da área do pico do etoricoxibe, mantendo tempo de retenção. Porém, foi detectado um pico adicional em 11,24 minutos, indicando possivelmente que outros produtos de degradação não são detectados no UV. Há publicação indicando que esses derivados podem ser analisados através de métodos por fluorescência (MATTHEWS et al., 2004). Por sua vez, sob condições de hidrólise ácida e básica, não houve degradação, que pode ser explicada pela estabilidade intrínseca do etoricoxibe, de acordo com a literatura (HARTMAN et al., 2003). Pode-se observar também nos cromatogramas que os picos dos produtos formados estão resolvidos em relação ao etoricoxibe, e além disso, utilizando detector de arranjo de diodos, verificou-se que a SQR permaneceu com elevada pureza em todas as determinações. Demonstrou-se, assim, a especificidade do método, que pode ser usado para a avaliação da estabilidade do produto.

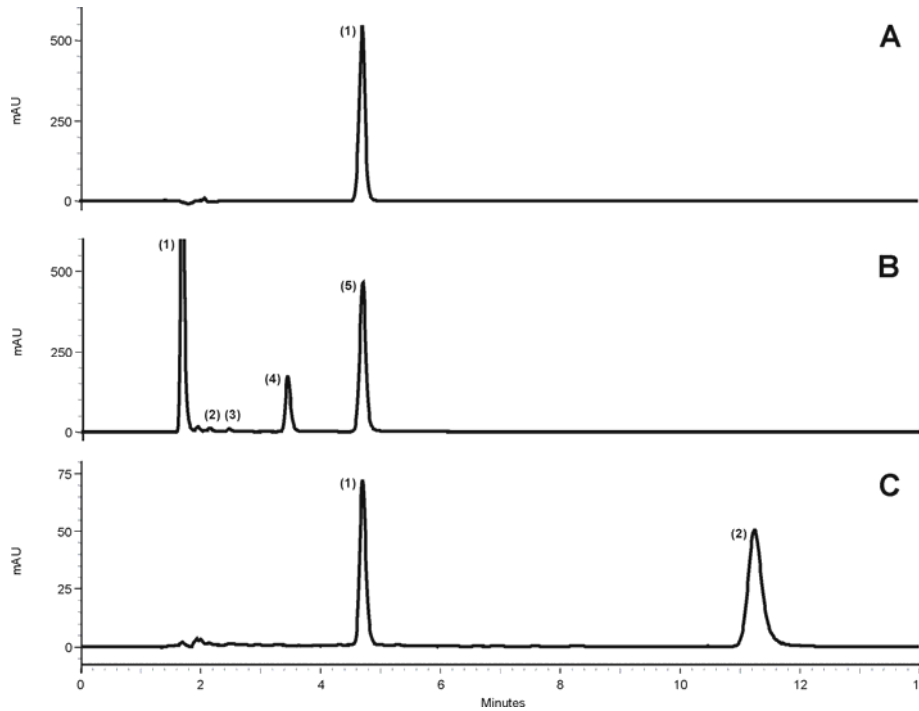


Figura 8 – Cromatogramas do etoricoxibe: (A) Solução da SQR na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ : pico 1 - etoricoxibe. (B) Após oxidação: pico 1 - peróxido de hidrogênio, picos 2, 3 e 4 - formas oxidadas, pico 5 - etoricoxibe. (C) Após exposição à luz UV: pico 1 - etoricoxibe, pico 2 - fotodegradado. Condições cromatográficas: Coluna Synergi Fusion<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm); fase móvel: ácido fosfórico 0,01 M, pH 3,0: acetoneitrila (62:38, V/V); vazão: 1 mL/min.; detecção: 234 nm.

Os valores das áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração, apresentados na Tabela 9, foram plotados em relação à concentração respectiva, observando-se linearidade adequada na faixa de 0,02 a 150  $\mu\text{g/mL}$ , conforme ilustrado na Figura 9.



Tabela 9 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração de etoricoxibe por CL.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Áreas absolutas			Média	CV <sup>a</sup> (%)
	1º dia	2º dia	3º dia		
0,02	1238	1286	1268	1264	1,92
0,2	10053	10061	10056	10057	0,04
2	98084	98116	98580	98260	0,28
20	740280	761061	752610	751317	1,39
50	1853225	1875047	1875658	1867977	0,68
100	3661748	3652151	3668050	3660650	0,22
150	5444755	5522357	5509075	5492062	0,76

<sup>a</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

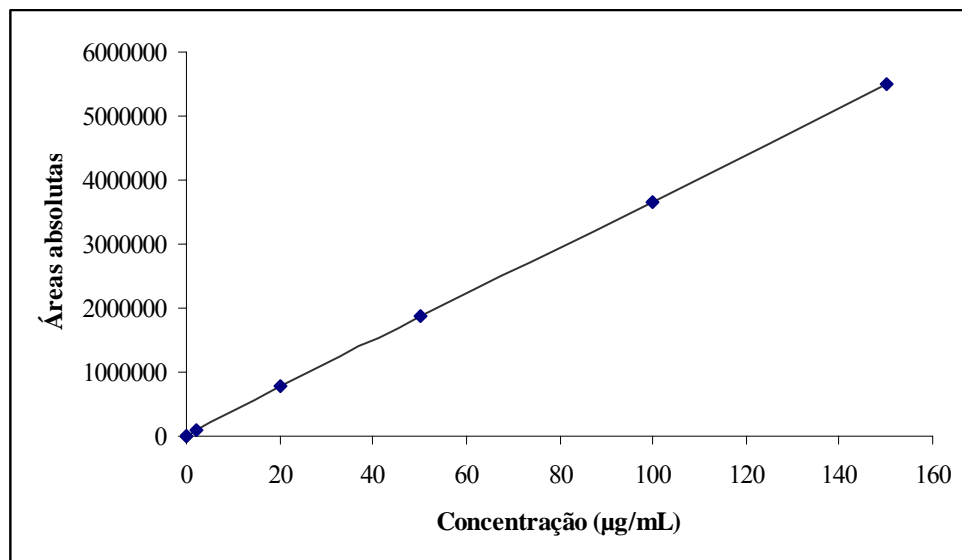


Figura 9 – Representação gráfica da curva de calibração da SQR do etoricoxibe obtida por cromatografia líquida, na faixa de 0,02 a 150  $\mu\text{g/mL}$  (n=3).

A equação calculada da reta foi:  $y = 36534 \pm 195,0x + 15653 \pm 24,54$ , com coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9999, indicando linearidade significativa do método (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultados da curva de calibração, calculados pelo método dos mínimos quadrados.

<b>Parâmetros</b>	<b>Resultados</b>
Faixa de linearidade	0,02 – 150 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 36534x + 15653$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$36453 \pm 195,0$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$15653 \pm 24,54$
Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9999

Realizou-se a análise de variância (ANOVA), utilizando os valores experimentais das áreas, e os resultados calculados demonstram regressão linear significativa ( $P < 0,05$ ), sem desvio de linearidade, para ( $P > 0,05$ ), conforme mostra a Tabela 11.

Tabela 11 – Análise de variância das áreas dos cromatogramas obtidos na determinação da curva de calibração.

<b>Fontes de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Variância</b>	<b>F<sup>a</sup></b>
Entre	6	$8,238 \times 10^{13}$	$1,37 \times 10^{13}$	46670,21 (2,85)
- regressão linear	1	$8,237 \times 10^{13}$	$8,24 \times 10^{13}$	280008 (4,60)
- desvio de linearidade	5	$3,76 \times 10^9$	$7,51 \times 10^8$	2,55 (2,96)
Resíduo	14	$4,12 \times 10^9$	$2,94 \times 10^8$	
Total	20			

<sup>a</sup>Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para  $P=0,05$

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (entre analistas e interdias), expressando-se os resultados com base no coeficiente de variação percentual. A amostra preparada na concentração de 100 µg/mL, definida como 100%, foi submetida a doze determinações no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, apresentaram valor médio de 100,17% com CV de 0,14%, conforme mostra a Tabela 12.

Tabela 12 – Determinação da precisão intradia do método analítico para quantificação de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL.

Análise	Teor ( $\mu\text{g/mL}$ )		Média <sup>a</sup> (%)	CV <sup>b</sup> (%)
	Teórico	Encontrado		
1	100,0	100,27		
2	100,0	99,94		
3	100,0	100,20		
4	100,0	100,00		
5	100,0	99,92		
6	100,0	100,20	100,17	0,14
7	100,0	100,31		
8	100,0	100,15		
9	100,0	100,26		
10	100,0	100,18		
11	100,0	100,29		
12	100,0	100,32		

<sup>a</sup> Média de 12 determinações.

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

Para determinação da precisão interdias, realizaram-se análises de duas amostras em três dias consecutivos, obtendo-se valores experimentais médios de 100,18 e 99,75%, com o CV de 0,34 e 0,17%, respectivamente, de acordo com a Tabela 13.

Tabela 13 – Determinação da precisão interdias do método analítico para quantificação de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL.

<b>Amostra</b>	<b>Dia</b>	<b>Teor<sup>a</sup> (%)</b>	<b>Média<sup>b</sup> (%)</b>	<b>CV<sup>c</sup> (%)</b>
1	1	100,10	100,18	0,34
	2	99,88		
	3	100,56		
2	1	99,75	99,75	0,17
	2	99,58		
	3	99,92		

<sup>a</sup> Média de cinco determinações.

<sup>b</sup> Média de três dias.

<sup>c</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

Para a determinação da precisão entre analistas, três amostras foram avaliadas por diferentes analistas, obtendo-se valores experimentais médios de 100,12, 99,78 e 99,65%, com CV de 0,24, 0,09 e 0,32%, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 – Determinação da precisão entre analistas do método analítico para quantificação de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL.

<b>Amostra</b>	<b>Analista</b>	<b>Teor<sup>a</sup> (%)</b>	<b>Média<sup>b</sup> (%)</b>	<b>CV<sup>c</sup> (%)</b>
1	A	100,29	100,12	0,24
	B	99,95		
2	A	99,71	99,78	0,09
	B	99,85		
3	A	99,88	99,65	0,32
	B	99,42		

<sup>a</sup> Média de cinco determinações.

<sup>b</sup> Média de dois analistas.

<sup>c</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

Nesse sentido, observa-se que, para o método ser considerado preciso, deve fornecer CV dos resultados menor ou igual a 2%, de acordo com a literatura (SHABIR, 2003). Os

dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentam CV inferiores a 0,34%, confirmando a precisão do método proposto.

A exatidão do método pode ser definida como a proximidade dos resultados obtidos com os valores nominais. Conforme pode ser observado na Tabela 15, os dados experimentais, que correspondem à percentagem média de 100,30%, demonstram exatidão significativa, pois se situam entre os limites de 98 – 102%, preconizados pela literatura (SHABIR, 2003).

Tabela 15 – Determinação da exatidão do método analítico para quantificação de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL.

<b>Concentração de etoricoxibe (µg/mL)</b>	<b>Concentração determinada<sup>a</sup> (µg/mL)</b>	<b>Exatidão<sup>a</sup> (%)</b>	<b>CV<sup>b</sup> (%)</b>
80	80,36	100,45	0,17
100	100,20	100,20	0,10
120	120,30	100,25	0,12

<sup>a</sup> Média de cinco determinações.

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

A sensibilidade do método cromatográfico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do etoricoxibe. O valor calculado para o LD foi de 0,002 µg/mL. Por sua vez, o LQ calculado foi de 0,0067 µg/mL, diferente do valor experimental encontrado e adotado de 0,02 µg/mL, com CV de 1,92%. Esses resultados indicam sensibilidade significativa do procedimento.

Avaliou-se também a robustez através de pequenas modificações nos parâmetros do método, tais como: vazão, temperatura de análise, volume de injeção, pH e composição da fase móvel e comprimento de onda. Observou-se que a utilização de diferentes valores de pH e variação na vazão alterou os tempos de retenção. Na execução das análises, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 0,62%, comprovando a robustez da metodologia, frente aos parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 16.

Tabela 16 – Avaliação da robustez do método analítico através do doseamento de etoricoxibe em produtos farmacêuticos por CL.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor investigado</b>	<b>Teor<sup>a</sup> (%)</b>	<b>CV<sup>b</sup> (%)</b>	<b>Valor otimizado</b>
Vazão (mL/min)	0,8	101,42	0,28	1,0
	1,0	100,64	0,15	
	1,2	101,20	0,22	
Temperatura da coluna (°C)	25	100,57	0,10	25
	30	100,95	0,26	
	35	101,33	0,44	
	40	101,00	0,35	
Volume de injeção (µL)	5	101,17	0,62	10
	10	100,46	0,28	
	20	100,35	0,12	
pH da fase móvel	2,8	100,76	0,29	3,0
	3,0	100,91	0,10	
	3,2	100,48	0,34	
% de acetonitrila	36	100,77	0,38	38
	38	100,39	0,12	
	40	100,23	0,27	
Comprimento de onda (nm)	200 – 370	----	----	234

<sup>a</sup> Média de cinco determinações.

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

O método proposto mostrou-se adequado, com especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, de acordo com os requisitos preconizados pela literatura amplamente adotada (ICH, 1996; SHABIR, 2003). Portanto, o método poderá ser empregado, contribuindo para aprimorar o controle da qualidade dos produtos farmacêuticos.

## 4.2 Extração líquido-líquido

Para o procedimento de extração líquido-líquido foram avaliados diferentes solventes e misturas, conforme pode ser observado na Tabela 17, que apresenta também os valores de recuperação obtidos.

Tabela 17 – Valores experimentais obtidos na recuperação de etoricoxibe e piroxicam em plasma, a partir de diferentes solventes de extração.

<b>Solvente testado</b>	<b>Volume de solvente (mL)</b>	<b>Recuperação do etoricoxibe<sup>a</sup> (%)</b>	<b>Recuperação do piroxicam<sup>a</sup> (%)</b>
Acetato de etila	2,0	59,42	52,63
	3,0	62,77	55,45
	4,0	67,85	57,32
Dietiléter	2,0	69,55	63,54
	3,0	72,44	67,45
	4,0	77,88	70,69
Diclorometano	2,0	67,23	68,12
	3,0	71,41	72,46
	4,0	74,12	78,64
Dietiléter:diclorometano (50:50, V/V)	2,0	70,23	73,87
	3,0	74,60	76,21
	4,0	76,14	79,36
Dietiléter:diclorometano (75:25, V/V)	2,0	71,25	72,45
	3,0	79,65	82,34
	4,0	81,81	84,61
Terc-butil metil éter	2,0	84,12	80,23
	3,0	90,89	88,47
	4,0	93,64	89,55

<sup>a</sup> Média de três determinações.

A partir dos solventes que apresentaram melhor especificidade e recuperação, foram testadas diferentes condições de pH, conforme mostra a Tabela 18.

Tabela 18 – Valores experimentais obtidos na recuperação de etoricoxibe e piroxicam em plasma, a partir das modificações de pH.

Condição testada	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Recuperação <sup>a</sup> (%)			
		Dietiléter:		Terc-butil metil éter	
		diclorometano (75:25, V/V)			
		Etoricoxibe	Piroxicam	Etoricoxibe	Piroxicam
Ácido fórmico	25	83,25	87,63	94,77	92,51
	50	87,65	89,26	96,41	94,23
	100	86,81	90,17	95,70	93,65
Ácido acético	25	80,58	87,63	90,54	91,23
	50	84,89	88,47	92,21	89,64
	100	85,41	90,85	93,56	92,33
Tampão fosfato (pH 7,0)	25	75,57	81,65	88,44	84,53
	50	76,35	80,41	91,17	85,18
	100	78,42	83,56	91,35	86,74
Trietilamina	25	78,87	78,96	87,65	87,11
	50	79,37	78,26	90,46	82,32
	100	79,95	82,75	90,87	91,62

<sup>a</sup> Média de três determinações.

A partir da escolha do solvente de extração, volume e pH, outras condições foram testadas, tais como: tempo de agitação e centrifugação. A condição de extração otimizada para as amostras de plasma foi obtida através da adição de 50  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico com agitação de 30 segundos e 4 mL de terc-butil metil éter como solvente de extração, com agitação de 60 segundos. Após centrifugou-se a 3500 rpm por 10 minutos. Na etapa seguinte, as amostras foram colocadas em gelo seco (para congelar a fase aquosa), filtrando-se em seguida a camada superior orgânica em unidade HV Millex com membrana Durapore®. A seguir, evaporou-se o filtrado em fluxo de nitrogênio a 40 °C e reconstituiu-se o resíduo em 500  $\mu\text{L}$  de solução diluente. Verificou-se que maiores tempos de agitação e centrifugação não resultaram em diferença significativa nos resultados. O método demonstrou ser efetivo na purificação das amostras, principalmente pelo baixo custo, fácil operação e eficiência na



remoção de interferentes do plasma, demonstrando especificidade para o etoricoxibe e piroxicam.

### 4.3 Extração em fase sólida

Desenvolveu-se a metodologia de extração em sistema automatizado a partir de método descrito na literatura (SCHELLEN et al., 2003), testando vários tipos de cartuchos, conforme demonstra a Tabela 19.

Tabela 19 – Valores experimentais obtidos na recuperação de etoricoxibe e piroxicam em plasma, a partir de diferentes cartuchos de extração.

<b>Cartucho testado</b>	<b>Recuperação do etoricoxibe<sup>a</sup> (%)</b>	<b>Recuperação do piroxicam<sup>a</sup> (%)</b>
HySphere CN	73,57	70,54
HySphere C <sub>2</sub>	54,21	57,42
HySphere C <sub>8</sub>	69,88	65,23
HySphere C <sub>8</sub> (EC)	72,14	65,84
HySphere C <sub>18</sub> HD	93,57	93,10
HySphere Resin GP	90,54	89,21
HySphere Resin SH	85,63	77,44
BondElut C <sub>18</sub>	88,74	89,23
BondElut C <sub>8</sub>	83,49	80,66

<sup>a</sup> Média de três determinações.

Selecionou-se o cartucho de extração que apresentou melhores percentagens de recuperação para o etoricoxibe e piroxicam e, então, foram otimizadas condições como:

solventes de ativação, equilíbrio e lavagem do cartucho, volumes e velocidade de aplicação. Avaliaram-se solventes e misturas, incluindo metanol, acetonitrila e soluções com ácido fórmico. A melhor recuperação e separação cromatográfica foram obtidas utilizando o cartucho HySphere C<sub>18</sub> HD. Na condição otimizada, o cartucho foi ativado, equilibrado e lavado usando metanol, água e água:metanol (95:5, V/V), respectivamente. Os valores de recuperação encontrados foram de 94,92% e 93,55% para o etoricoxibe e o PI, respectivamente. O tempo total de extração foi de 4 minutos. Na comparação com a extração líquido-líquido, o método proposto apresentou recuperação semelhante e menor tempo para a preparação das amostras, sendo excelente alternativa para execução de elevado número de análises, como ocorre em estudos clínicos ou de biodisponibilidade.

#### **4.4 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**

Para a metodologia por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, selecionou-se a fase móvel a fim de obter melhor seletividade e sensibilidade com menor tempo de separação. Procurou-se, também, viabilizar a coeluição do etoricoxibe e PI, através da utilização de alta proporção de solvente orgânico, diminuindo assim possíveis efeitos de matriz. Foram testados vários solventes, tais como: água:metanol, água:acetonitrila, inclusive em diferentes proporções, bem como modificadores como ácido fórmico, ácido acético e acetato de amônio. A melhor condição cromatográfica foi obtida utilizando acetonitrila:água (95:5, V/V)/ 0,1% ácido acético (90:10, V/V), na vazão de 0,4 mL/min. O ácido acético melhorou a simetria do pico e aumentou a eficiência de ionização do padrão interno. A separação foi realizada usando coluna analítica C<sub>18</sub>, curta (50 mm), adequada para elevado número de análises. O tempo da corrida cromatográfica foi relativamente baixo (2 minutos), especialmente se comparado com outros métodos descritos na literatura (ROSE et al., 2002; BRÄUTIGAM et al., 2003; WERNER et al., 2005). Além disso, a baixa vazão usada e a rapidez da análise resultaram em reduzido consumo de fase móvel, contribuindo para a excelente relação custo/benefício do método estudado.

Para minimizar os possíveis efeitos de matriz do plasma, em geral, tem sido utilizado isótopo estável do fármaco sob estudo como padrão interno. Porém, para o etoricoxibe não se encontram isótopos disponíveis comercialmente, optando-se, então, por testar fármacos como: meloxicam, piroxicam, tenoxicam e valdecoxibe. O piroxicam foi selecionado como padrão interno, por apresentar efeitos de matriz, tempo de retenção e recuperação semelhantes aos do

etoricoxibe. Além disso, encontra-se disponível comercialmente e, no método otimizado, propiciou sensibilidade adequada para análise.

Dados da literatura indicam que o modo de ionização por APCI é menos suscetível a problemas de supressão iônica (MALLET et al., 2004; ZHONG et al., 2005). Porém, no desenvolvimento do método, verificou-se a necessidade de maior vazão de fase móvel, alta temperatura e voltagem para obtenção de resultados satisfatórios. Desse modo, selecionou-se a ionização por ES no modo positivo, que além de possibilitar o uso de menor volume de fase móvel, apresentou melhor eficiência na ionização do etoricoxibe e do PI. Após a otimização e seleção dos parâmetros do equipamento, determinou-se o espectro de massas, observando-se os íons moleculares do etoricoxibe e do PI de 359,3 e 332,0 Daltons, respectivamente. Além disso, a energia de colisão no quadrupolo 2, aplicada aos íons moleculares do etoricoxibe e PI, produziu fragmentos significantes. Os íons produto de 280,0 e 95,0 Daltons foram selecionados porque apresentaram maior abundância e estabilidade para as finalidades analíticas. As transições utilizadas na quantificação das amostras no modo de reações múltiplas foram de 359,3>280,0 e 332,0>95,0 para o etoricoxibe e PI, respectivamente. As figuras 10 e 11 apresentam o espectro total e o perfil de fragmentação obtido com o etoricoxibe e as figuras 12 e 13 com o piroxicam.

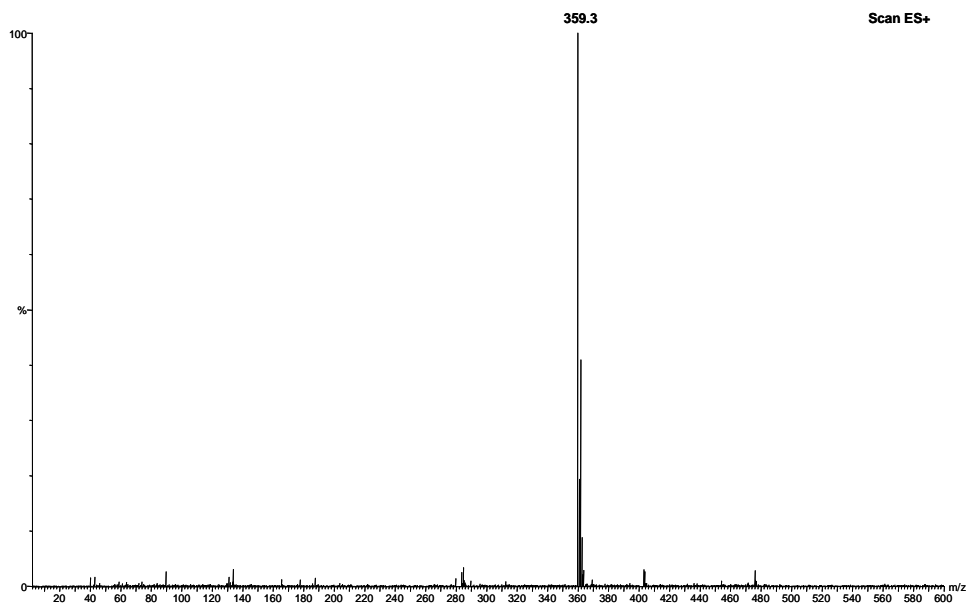


Figura 10 – Espectro de massas do etoricoxibe.

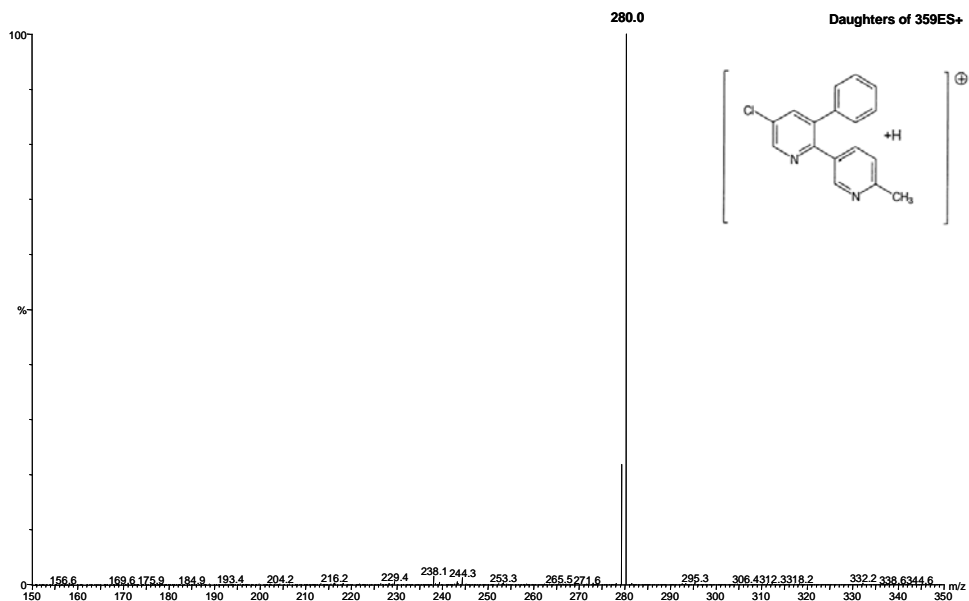


Figura 11 – Padrão de fragmentação do etoricoxibe e estrutura sugerida do fragmento principal.

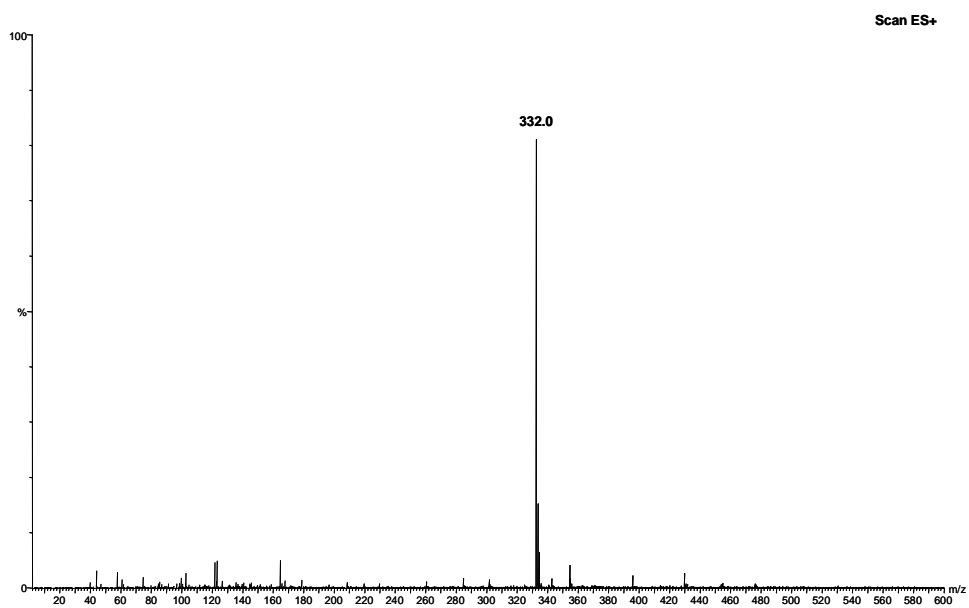


Figura 12 – Espectro de massas do piroxicam.

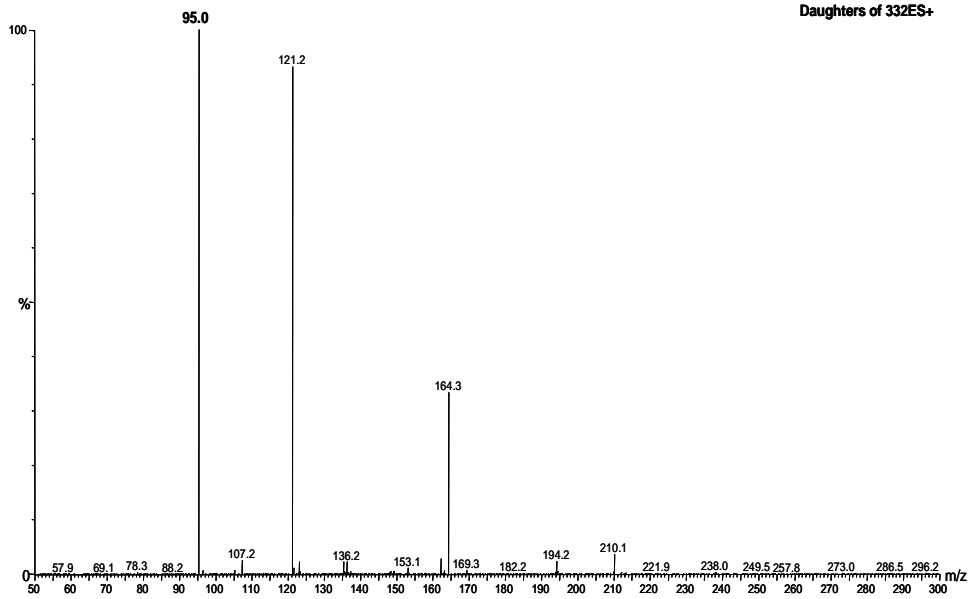


Figura 13 – Padrão de fragmentação do piroxicam.

Realizou-se a avaliação dos efeitos de matriz e da possível supressão iônica para o etoricoxibe e PI, obtendo-se coeficiente de variação das áreas dos picos inferiores a 6,20%, o que indica pequena variação na eficiência de ionização com diferentes amostras de plasma. Além disso, os valores de recuperação foram superiores a 93,35%, sugerindo que a supressão iônica produzida pelos componentes do plasma não interfere na repetibilidade do método.

O acoplamento da cromatografia líquida e da espectrometria de massa no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) mostrou alta especificidade e sensibilidade nas análises, pois somente os íons derivados do etoricoxibe e PI foram monitorados, conforme pode ser observado na Figura 14. A comparação dos cromatogramas das amostras de plasma branco e do etoricoxibe na concentração do LQ, demonstrou que não há interferência da matriz biológica nos tempos de retenção do etoricoxibe (0,79 minutos) e do PI (0,97 minutos) nas condições analisadas, confirmando a especificidade do método desenvolvido.

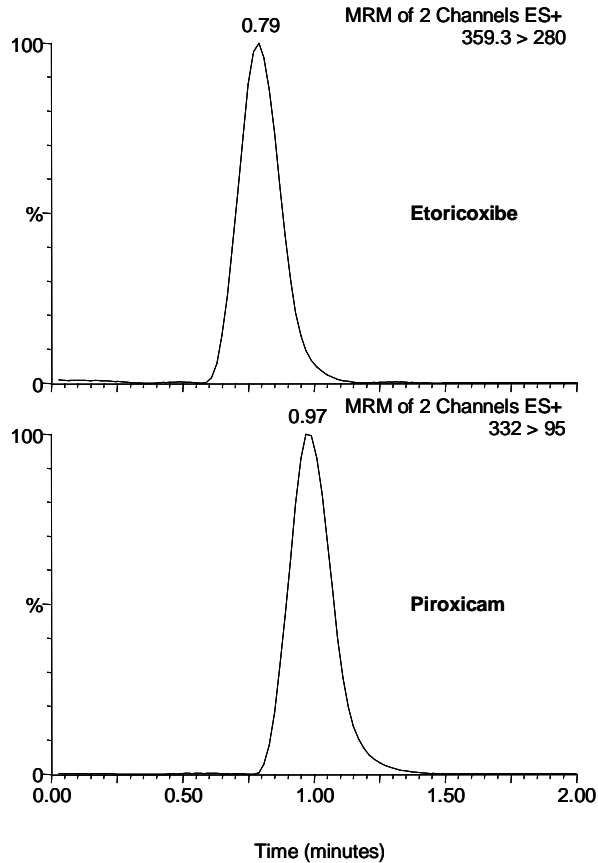


Figura 14 – Cromatograma do CQB obtido no modo de monitoramento de reação múltipla, contendo 3 ng/mL de etoricoxibe e 25 ng/mL de piroxicam. Coluna Luna<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (50 mm x 4,6 mm); fase móvel: acetonitrila:água (95:5, V/V)/ 0,1% ácido acético (90:10, V/V); vazão: 0,4 mL/min.

O método de extração líquido-líquido, desenvolvido utilizando terc-butil metil éter como solvente de extração e 50 µL de ácido fórmico, propiciou significativa percentagem de recuperação média para o etoricoxibe (96,09%) e PI (95,54%) com precisão e exatidão nos três níveis de concentração estudados (Tabela 20). Os dados de extração líquido-líquido disponíveis na literatura mostram recuperações de 76,1% e 82,9% no plasma humano, menores do que a recuperação demonstrada no presente trabalho (WERNER et al., 2005; RAMAKRISHNA et al., 2005).

Tabela 20 – Determinação da recuperação média do procedimento de extração líquido-líquido das amostras de plasma para etoricoxibe e piroxicam.

Concentração de etoricoxibe (ng/mL)	Recuperação (%)	
	Etoricoxibe <sup>a</sup> (CV%) <sup>b</sup>	Piroxicam <sup>a</sup> (CV%) <sup>b</sup>
<b>3</b>	97,22 (7,26)	98,93 (7,22)
<b>2500</b>	92,74 (4,04)	93,72 (5,34)
<b>4000</b>	98,32 (4,01)	93,97 (5,00)
<b>Média</b>	96,09 (3,08)	95,54 (3,08)

<sup>a</sup> Média de seis determinações.

<sup>b</sup> CV% = coeficiente de variação percentual.

A linearidade foi avaliada efetuando seis determinações de nove concentrações de etoricoxibe na faixa de 1-5000 ng/mL, que abrange as concentrações plasmáticas descritas nos estudos clínicos da literatura (AGRAWAL et al., 2001; AGRAWAL et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003). Os valores experimentais apresentados na Tabela 21, com CV inferiores a 6,25%, foram adotados para o cálculo do coeficiente de determinação ( $r^2=0,9993$ ,  $y=0,457897 \pm 16,6x + 0,812231 \pm 10,3$ ) mostrado juntamente com os demais parâmetros na Tabela 21, que indica a linearidade significativa da curva de calibração.

Tabela 21 – Valores experimentais obtidos na determinação da linearidade do método bioanalítico para quantificação de etoricoxibe em plasma por CL-EM/EM.

<b>Concentração de etoricoxibe (ng/mL)</b>	<b>Concentração determinada (ng/mL)<sup>a</sup></b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
1	1,09	6,25	109,00
10	9,72	3,90	97,20
20	19,53	3,38	97,65
100	99,16	0,89	99,16
200	193,54	2,41	96,77
500	490,86	3,12	98,17
1000	997,30	5,88	99,73
2000	1958,45	3,33	97,92
5000	5061,33	1,33	101,22

<sup>a</sup> Média de seis determinações.

Tabela 22 – Parâmetros calculados da curva de calibração do método bioanalítico para quantificação de etoricoxibe em plasma por CL-EM/EM na faixa de concentração entre 1 e 5000 ng/mL.

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>
Faixa de linearidade	1 – 5000 ng/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,457897x + 0,812231$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,457897 \pm 16,6$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$0,812231 \pm 10,3$
Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9993



Os valores das razões entre as áreas dos picos do etoricoxibe e do PI foram plotados em relação a cada concentração respectiva, observando-se linearidade adequada na faixa de 1 a 5000 ng/mL, conforme ilustrado na Figura 15.

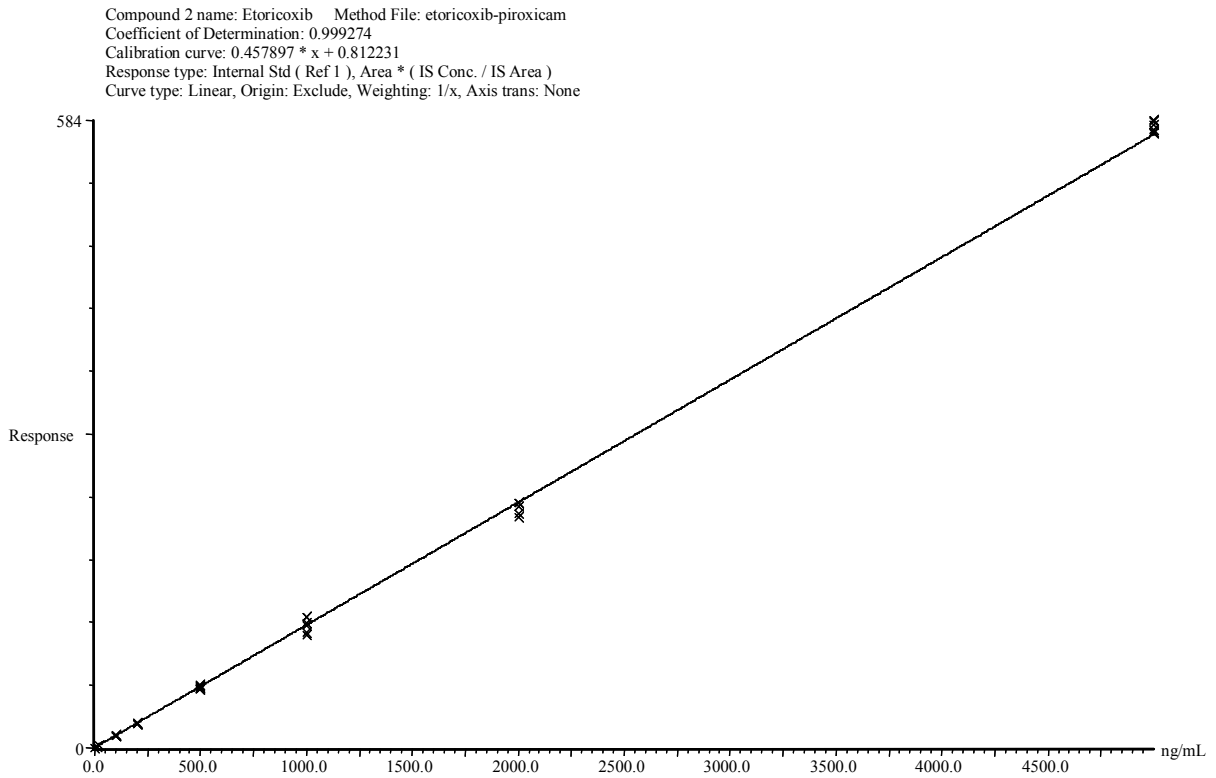


Figura 15 - Representação gráfica da curva de calibração do etoricoxibe por CL-EM/EM, obtida pelo programa Masslynx, na faixa de 1 a 5000 ng/mL (n=6).

Avaliou-se também a precisão que, conforme demonstrado na Tabela 23, variou entre 4,18 e 6,33% com exatidão entre 100,30 e 108,33% para amostras analisadas no mesmo dia (intradia).

Tabela 23 – Determinação da precisão e exatidão intradia do método bioanalítico para quantificação de etoricoxibe em plasma por CL-EM/EM.

<b>Concentração de etoricoxibe (ng/mL)</b>	<b>Concentração determinada (ng/mL)<sup>a</sup></b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>3</b>	3,25	6,33	108,33
<b>2500</b>	2512,84	4,18	100,51
<b>4000</b>	4011,99	4,78	100,30

<sup>a</sup> Média de seis determinações.

Para análises em diferentes dias (interdias), a precisão variou de 3,85 a 9,41% e a exatidão entre 98,34 e 103,67%, de acordo com a Tabela 24.

Tabela 24 – Determinação da precisão e exatidão interdias do método bioanalítico para quantificação de etoricoxibe em plasma por CL-EM/EM.

<b>Concentração de etoricoxibe (ng/mL)</b>	<b>Dia</b>	<b>Concentração determinada (ng/mL)<sup>a</sup></b>	<b>Média<sup>b</sup></b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>3</b>	1	3,23	3,11	9,41	103,67
	2	3,32			
	3	2,79			
<b>2500</b>	1	2496,6	2458,6	3,85	98,34
	2	2383,4			
	3	2495,7			
<b>4000</b>	1	4020,0	4048,4	6,09	101,21
	2	3908,8			
	3	4216,5			

<sup>a</sup> Média de cinco determinações.

<sup>b</sup> Média de três dias.

Observa-se que o método apresenta precisão, pois os valores do CV para cada nível de concentração foram inferiores ao limite aceito de 15% e a exatidão correspondente, na faixa de 85 a 115% do valor nominal, cumprindo parâmetros preconizados (CAUSON, 1997; SHAH et al., 2000; FDA, 2001; ANVISA, 2002; ANVISA, 2003).

Determinou-se o valor experimental para o LD que foi de 0,1 ng/mL. Do mesmo modo, o resultado encontrado para o LQ foi de 1 ng/mL, com coeficiente de variação de 6,25%. Esses dados demonstram significativa sensibilidade do método.

A estabilidade de um fármaco em fluídos biológicos depende de suas propriedades químicas, do material de acondicionamento, do tempo e temperatura de estocagem. Assim, os ensaios foram planejados e executados com base nas reais condições de manuseio e análise das amostras. Os resultados obtidos em cada etapa do estudo de estabilidade foram comparados com os de amostras recém-preparadas, aceitando-se desvio de, no máximo,  $\pm 15\%$ . Nesse contexto, observou-se que as amostras se mantiveram estáveis quando

armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e analisadas após três ciclos de congelamento e descongelamento, com valores de desvio inferiores a 10,22%, conforme mostrado nas Tabelas 25, 26 e 27, comprovando que podem ser congeladas e descongeladas sem comprometer sua integridade.

Tabela 25 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma mantidas à temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento.

Amostras recém-preparadas			Ciclo 1			
Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
2528,06	3,76	101,12	2587,12	2,47	102,34	2,34
4069,91	0,77	101,75	4036,13	2,41	100,90	-0,83

<sup>a</sup> Média de três determinações.

Tabela 26 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma mantidas à temperatura de -80 °C e submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostras recém-preparadas			Ciclo 2			
Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
3,23	4,65	107,78	3,02	1,78	100,66	-6,50
2528,06	3,76	101,12	2649,87	1,29	105,99	4,82
4069,91	0,77	101,75	4156,61	3,52	103,92	2,13

<sup>a</sup> Média de três determinações.

Tabela 27 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma mantidas à temperatura de -80 °C e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostras recém-preparadas			Ciclo 3			
Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
3,23	4,65	107,78	2,90	3,31	96,67	-10,22
2528,06	3,76	101,12	2662,05	7,38	106,48	5,30
4069,91	0,77	101,75	4428,65	3,65	110,72	8,81

<sup>a</sup> Média de três determinações.

A estabilidade de curta duração foi avaliada, mantendo-se amostras de plasma de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA), à temperatura ambiente por 12 horas após o descongelamento. Decorrido esse período foram processadas, analisadas e os resultados comparados com os de amostras de etoricoxibe recém-preparadas, obtendo-se desvios

inferiores a 11,80%, como mostra a Tabela 28, indicando estabilidade pelo período de 12 horas, até seu processamento.

Tabela 28 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma analisadas após permanência à temperatura ambiente por 12 horas.

<b>Amostras recém-preparadas</b>			<b>Amostras processadas após 12 horas à temperatura ambiente</b>			
<b>Concentração determinada<sup>a</sup></b>	<b>Precisão</b>	<b>Exatidão</b>	<b>Concentração determinada<sup>a</sup></b>	<b>Precisão</b>	<b>Exatidão</b>	<b>Desvio</b>
<b>(ng/mL)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(ng/mL)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
3,23	4,65	107,78	2,86	6,32	95,33	-11,45
2528,06	3,76	101,12	2725,22	1,44	109,01	7,80
4069,91	0,77	101,75	3589,62	1,67	89,74	-11,80

<sup>a</sup> Média de três determinações.

A estabilidade pós-processamento, avaliada no tempo e condições de análise, foi determinada utilizando-se amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente e processamento. Determinou-se assim a estabilidade durante o período máximo de permanência no injetor automático até análise cromatográfica. Os resultados foram comparados com os de amostras recém-preparadas, obtendo-se valores de desvio inferiores a 11,76 e 10,22% para as amostras analisadas 24 e 48 horas após o processamento, respectivamente, conforme as Tabelas 29 e 30. Dessa maneira, o etoricoxibe pode ser analisado até 48 horas após a colocação no injetor automático.

Tabela 29 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma analisadas 24 horas após o processamento.

Amostras recém-preparadas			Amostras analisadas 24 horas após o processamento			
Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
3,23	4,65	107,78	2,85	3,17	94,89	-11,76
2528,06	3,76	101,12	2506,27	5,50	100,25	-0,86
4069,91	0,77	101,75	4110,22	6,38	102,76	0,99

<sup>a</sup> Média de três determinações.

Tabela 30 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma analisadas 48 horas após o processamento.

Amostras recém-preparadas			Amostras analisadas 48 horas após o processamento			
Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentração determinada <sup>a</sup> (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
3,23	4,65	107,78	2,90	4,34	96,56	-10,22
2528,06	3,76	101,12	2494,30	9,96	99,77	-1,33
4069,91	0,77	101,75	4117,65	8,75	102,94	1,17

<sup>a</sup> Média de três determinações.

Pesquisou-se também a estabilidade de longa duração das amostras de plasma de CQ contendo etoricoxibe. Os resultados foram comparados com os de amostras recém-preparadas,

obtendo-se valores de desvio inferiores a 10,53%, conforme a Tabela 31, indicando estabilidade por, pelo menos, 120 dias à temperatura de -80 °C.

Tabela 31 – Determinação da estabilidade de etoricoxibe em amostras de plasma mantidas à temperatura de -80 °C por 120 dias.

<b>Amostras recém-preparadas</b>			<b>Amostras armazenadas a -80 °C durante 120 dias</b>			
<b>Concentração determinada<sup>a</sup></b>	<b>Precisão</b>	<b>Exatidão</b>	<b>Concentração determinada<sup>a</sup></b>	<b>Precisão</b>	<b>Exatidão</b>	<b>Desvio</b>
<b>(ng/mL)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(ng/mL)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
3,23	4,65	107,78	2,89	2,57	96,22	-10,53
2528,06	3,76	101,12	2655,28	3,48	106,21	5,03
4069,91	0,77	101,75	3818,29	3,93	95,46	-6,18

<sup>a</sup> Média de três determinações.

A estabilidade das soluções padrão de etoricoxibe e PI em acetonitrila, armazenadas de 2-8 °C foi determinada através de análise diária durante o desenvolvimento e a validação do método no período de 30 dias. Os resultados obtidos encontram-se dentro dos limites especificados, com coeficiente de variação de 2,51% e 3,15% para o etoricoxibe e o PI, respectivamente.

Em todos os testes realizados para avaliação da estabilidade do etoricoxibe em plasma foram encontrados resultados de acordo com os limites especificados, indicando que as condições de manuseio e análise das amostras são adequadas, podendo ser sugeridas para a realização de estudos clínicos e de biodisponibilidade. Além disso, os resultados do estudo de validação demonstraram que a metodologia otimizada apresenta especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão, cumprindo os requisitos descritos para métodos bioanalíticos (CAUSON, 1997; SHAH et al., 2000; FDA, 2001; ANVISA, 2002; ANVISA, 2003). Entre as vantagens, destacam-se a rapidez de análise (tempo total de corrida de 2 minutos) e simplicidade do procedimento que envolveu apenas uma etapa de extração líquido-líquido,



utilizando o piroxicam como padrão interno. Desse modo, proporcionou baixo custo de execução, constituindo-se em excelente alternativa aos métodos descritos na literatura para determinação do etoricoxibe em estudos clínicos.

#### **4.5 Ensaios físicos e físico-químicos**

Realizaram-se as análises físico-químicas recomendadas para o controle da qualidade lote-a-lote de formas farmacêuticas orais, dos seis lotes de produtos acabados. Determinou-se o peso médio dos comprimidos de etoricoxibe que cumpriram a especificação que preconiza variação de  $\pm 5\%$  para produtos acima de 250 mg. Os valores obtidos nessa determinação encontram-se na Tabela 32, com os respectivos cálculos das médias e limites.

Tabela 32 – Determinação de peso médio (PM) dos comprimidos de etoricoxibe.

Cp	1 (60 mg)	2 (60 mg)	3 (90 mg)	4 (90 mg)	5 (120 mg)	6 (120 mg)
1	307,5	319,2	468,6	470,7	630,8	628,7
2	316,4	314,3	474,7	473,2	624,6	627,1
3	317,4	316,9	475,3	474,7	628,6	625,8
4	318,9	317,3	470,8	467,2	624,4	623,9
5	311,8	319,7	466,9	473,8	629,8	626,2
6	321,6	311,8	465,1	469,7	625,5	623,0
7	319,2	317,6	470,3	473,6	621,7	622,5
8	311,1	312,3	476,7	474,1	631,9	629,8
9	314,9	318,1	471,6	475,4	627,7	627,3
10	315,3	313,4	469,6	472,7	630,1	632,4
11	313,9	314,8	477,5	471,3	623,4	622,2
12	314,7	317,3	477,2	477,9	620,7	623,8
13	318,8	314,7	471,8	476,2	623,9	626,4
14	311,1	313,5	465,0	464,8	623,5	620,5
15	314,1	320,3	470,9	473,2	627,4	628,2
16	317,7	318,1	475,1	470,4	629,8	632,6
17	314,5	312,6	468,2	466,6	626,4	625,1
18	318,0	318,5	465,7	472,1	630,1	628,9
19	307,9	310,9	470,9	472,5	623,8	624,7
20	319,5	313,2	472,2	468,7	632,4	629,3
PM ± DP	315,2±3,9	315,7±2,89	471,2±3,94	471,9±3,32	626,8±3,50	626,4±3,31
Limite inferior	299,5	299,9	447,6	448,3	595,5	595,1
Limite superior	331,0	331,5	494,8	495,5	658,2	657,7

A desintegração constitui-se em etapa importante para a absorção do fármaco, pois, para que ocorra a liberação no organismo, o mesmo deve estar em solução sendo necessária a desagregação em partículas menores ou grânulos. Os dados do teste de desintegração, apresentados na Tabela 33 demonstram que os produtos cumprem as especificações, com tempo inferior a 30 minutos.

Tabela 33 – Tempo de desintegração encontrado para os comprimidos de etoricoxibe.

<b>Produto</b>	<b>mg por comprimido</b>	<b>Tempo</b>
1	60	1 min e 36 seg
2	60	1 min e 47 seg
3	90	1 min e 52 seg
4	90	1 min e 21 seg
5	120	1 min e 12 seg
6	120	1 min e 17 seg

A determinação da umidade nas formas farmacêuticas é importante, pois sua presença pode interferir no peso médio, teor, uniformidade, desintegração, dissolução e estabilidade do fármaco. Conforme mostrado na Tabela 34, os produtos analisados apresentaram percentagem abaixo de 5%.

Tabela 34 – Percentagem de umidade encontrada para os produtos analisados através do método de Karl-Fischer.

<b>Produto</b>	<b>mg por comprimido</b>	<b>Umidade (%)</b>
1	60	3,2
2	60	3,1
3	90	3,7
4	90	4,1
5	120	3,2
6	120	2,8

Efetuuou-se também o teste de friabilidade, verificando-se valores entre 0,04% a 0,17%. No mesmo sentido o teste de dureza forneceu valores superiores ao limite mínimo especificado de 30 N, cumprindo as especificações, conforme mostra a Tabela 35.

Tabela 35 – Determinação de friabilidade e dureza dos comprimidos de etoricoxibe.

<b>Produto</b>	<b>mg por comprimido</b>	<b>Friabilidade<sup>a</sup> (%)</b>	<b>Dureza<sup>b</sup> (N)</b>
1	60	0,04 ± 2,60	261,3 ± 2,61
2	60	0,11 ± 1,75	263,3 ± 1,77
3	90	0,15 ± 1,22	260,3 ± 3,45
4	90	0,10 ± 1,93	258,4 ± 2,11
5	120	0,17 ± 2,34	251,2 ± 3,50
6	120	0,15 ± 1,87	247,5 ± 1,65

<sup>a</sup> Média de vinte comprimidos ± DP.

<sup>b</sup> Média de dez comprimidos ± DP.

Os métodos por CL e CL-EM/EM desenvolvidos e validados no presente trabalho, foram utilizados para o doseamento do etoricoxibe nos produtos farmacêuticos e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 36. A análise estatística comparativa dos métodos foi realizada através do coeficiente de correlação de Pearson, que demonstrou correlação significativa ( $r=0,9999$ ).

Tabela 36 – Determinação do teor de etoricoxibe nos produtos farmacêuticos por CL e CL-EM/EM.

Teor declarado		Teor encontrado <sup>a</sup>					
		CL <sup>b</sup>			CL-EM/EM <sup>b</sup>		
mg por comprimido				CV <sup>c</sup>			CV <sup>c</sup>
Amostra		mg	%	%	mg	%	%
1	60	60,72	101,20	0,23	61,01	101,68	0,25
2	60	61,10	101,83	0,31	61,35	102,25	0,37
3	90	90,69	100,77	0,31	91,03	101,14	0,39
4	90	90,27	100,30	0,42	90,60	100,67	0,30
5	120	120,77	100,64	0,20	121,56	101,30	0,33
6	120	121,55	101,29	0,28	122,10	101,75	0,40

<sup>a</sup> Coeficiente de correlação de Pearson (r=0,9999)

<sup>b</sup> Média de três determinações

<sup>c</sup> Coeficiente de variação percentual

A uniformidade de conteúdo é importante para avaliar a homogeneidade do lote, preconizando-se valores individuais entre 85 a 115%, com CV máximo de 6%. Os valores experimentais obtidos através dos métodos por CL e CL-EM/EM cumprem as especificações e encontram-se nas Tabelas 37 e 38, respectivamente.

Tabela 37 – Determinação da uniformidade de dose de etoricoxibe em comprimidos, expresso em percentagem, por CL.

<b>Amostra</b>	<b>1 (60 mg)</b>	<b>2 (60 mg)</b>	<b>3 (90 mg)</b>	<b>4 (90 mg)</b>	<b>5 (120 mg)</b>	<b>6 (120 mg)</b>
1	100,73	101,92	100,35	101,34	100,18	101,07
2	101,21	100,87	101,13	100,51	100,96	101,48
3	99,87	100,72	100,55	101,22	101,38	101,83
4	100,93	101,34	101,47	100,33	100,87	102,29
5	100,72	100,77	101,05	100,58	101,03	100,65
6	100,38	100,67	100,37	101,27	100,95	100,87
7	101,25	101,44	99,86	99,64	100,45	101,94
8	100,58	101,73	100,33	100,12	102,32	102,12
9	100,68	101,36	100,52	100,38	100,47	101,91
10	100,95	101,22	101,20	99,85	102,14	100,54
Média	100,73	101,20	100,68	100,52	101,07	101,47
CV% <sup>a</sup>	0,40	0,43	0,50	0,59	0,69	0,63

<sup>a</sup> Coeficiente de variação percentual

Tabela 38 – Determinação da uniformidade de dose de etoricoxibe em comprimidos, expresso em percentagem, por CL-EM/EM.

<b>Amostra</b>	<b>1 (60 mg)</b>	<b>2 (60 mg)</b>	<b>3 (90 mg)</b>	<b>4 (90 mg)</b>	<b>5 (120 mg)</b>	<b>6 (120 mg)</b>
1	101,68	102,20	99,56	101,41	100,62	100,23
2	100,89	101,65	101,32	100,24	101,23	102,18
3	101,47	100,84	100,14	100,84	101,57	100,74
4	100,95	101,98	101,57	99,56	100,95	102,65
5	99,74	102,64	100,60	100,33	100,10	100,47
6	101,94	100,52	99,65	99,91	102,36	100,38
7	101,84	101,67	101,74	100,48	102,57	102,30
8	100,87	101,45	100,22	100,32	102,35	102,57
9	100,98	100,94	100,82	99,67	100,17	102,49
10	100,77	100,75	102,10	100,92	101,48	102,32
Média	101,11	101,46	100,77	100,37	101,34	101,63
CV% <sup>a</sup>	0,64	0,68	0,88	0,57	0,88	1,01

<sup>a</sup> Coeficiente de variação percentual

Demonstrou-se, portanto, que os métodos por CL e CL-EM/EM propostos podem ser utilizados para a análise quantitativa do etoricoxibe em produtos farmacêuticos, com resultados comparáveis. Encontram-se na literatura métodos por CL-EM/EM para determinação do etoricoxibe em matrizes biológicas, porém nenhum deles estudou sua aplicabilidade à análise quantitativa em formulações farmacêuticas. Nesse sentido, o método proposto constitui-se em alternativa viável em relação ao método por CL-UV, oferecendo eficiência na quantificação, alta especificidade e sensibilidade, diminuindo o tempo de análise. A escolha entre as duas metodologias dependerá da aplicação analítica e da estrutura laboratorial disponível.

## **CONCLUSÕES**

---



## 5 CONCLUSÕES

---

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método analítico por cromatografia líquida em fase reversa para análise de etoricoxibe em produtos farmacêuticos, sugerindo sua aplicação para a área de controle da qualidade.
- ✓ Desenvolveu-se e padronizou-se procedimento de extração líquido-líquido que proporcionou alta percentagem de recuperação do etoricoxibe e do padrão interno nas amostras de plasma, com significativa reprodutibilidade.
- ✓ Pesquisou-se o método de extração em fase sólida automatizada que forneceu resultados comparáveis, constituindo-se em significativo avanço e alternativa para extração de amostras biológicas, especialmente em estudos clínicos e de biodisponibilidade.
- ✓ Desenvolveu-se e otimizou-se método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação do etoricoxibe em plasma humano que foi validado, cumprindo os parâmetros preconizados e sendo sugerida sua aplicação a estudos clínicos e de biodisponibilidade.
- ✓ Os testes físico-químicos forneceram resultados que demonstram a qualidade dos lotes de etoricoxibe adotados neste estudo.
- ✓ Utilizou-se também o método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para a determinação do etoricoxibe em produtos farmacêuticos e realizou-se a análise comparativa com a cromatografia líquida em fase reversa. Demonstrou-se correlação estatisticamente significativa ( $r=0,9999$ ) entre os resultados dos métodos estudados.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho contribuem para estabelecer bases para progressivos trabalhos científicos na área e procedimentos importantes para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a segurança e a eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis no País.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AGRAWAL, N. G. B. et al. Dose proportionality of oral etoricoxib, a highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in healthy volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, p. 1106-1110, 2001.

AGRAWAL, N. G. B. et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in man. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, p. 268-276, 2003.

AGRAWAL, N. G. B. et al. The effects of modifying in vivo cytochrome P450 3A (CYP3A) activity on etoricoxib pharmacokinetics and of etoricoxib administration on CYP3A activity. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, p. 1125-1131, 2004.

ALNOUTI, Y. et al. Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1080, p. 99-106, 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade e bioequivalência**, v. 1, Brasília, 2002.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, Diário Oficial da União, 2003.

BENNETT, J. S. et al. The use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). **Circulation**, v. 111, p. 1713-1716, 2005.

BERENBAUM, F. Vioxx and cardiovascular events : a class effect?. **Joint Bone Spine**, v. 72, p. 1-3, 2005.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, p. 208-219, 2006.

BRÄUTIGAM, L.; NEFFLEN, J. U.; GEISLINGER, G. Determination of etoricoxib in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionisation. **Journal of Chromatography B**, v. 788, p. 309-315, 2003.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxigenase-2: Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, p. 448-464, 2004.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHAURET, N. et al. In vitro metabolism considerations, including activity testing of metabolites, in the discovery and selection of the COX-2 inhibitor etoricoxib (MK-0663). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 1059-1062, 2001.

COLLANTES, E. et al. A multinacional randomized, controlled, clinical trials of etoricoxib in the treatment of rheumatoid arthritis. **BMC Family Practice**, v. 3, p. 1-10, 2002.

CURTIS, S. P. et al. Renal effects of etoricoxib and comparator nonsteroidal anti-inflammatory drugs in controlled clinical trials. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 70-83, 2004.

DALLOB, A. et al. Characterization of etoricoxib, a novel, selective COX-2 inhibitor. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, p. 573-585, 2003.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 471-481, 2003.

DRAZEN, J. M. COX-2 inhibitors : a lesson in unexpected problems. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1131-1132, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FDA - Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, May 2001.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitor of cyclooxygenase-2. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 6, p. 433-442, 2001.

FITZGERALD, G. A. Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. **The American Journal of Cardiology**, v. 89, p. 26-32, 2002.

FITZGERALD, G. A. Coxibs and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 17, p. 1709-1711, 2004.

FLOWER, R. J. The development of COX2 inhibitors. **Nature Reviews**, v. 2, p. 179-191, 2003.

FRIESEN, R. W. et al. 2-Pyridinil-3-(4-methylsulfonyl)-phenylpyridines: Selective and orally active cyclooxygenase-2 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 2777-2782, 1998.

GONÇALVES, J. C. S. et al. On-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS-MS) for quantification of bromazepam in human plasma. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 5, p. 601-607, 2005.

GROSSER T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 4-15, 2006.

HARRIS, R. C.; BREYER, M. D. Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 1, p. 236-245, 2006.

HARTMAN, R. et al. Development and validation of an HPLC method for the impurity and quantitative analysis of etoricoxib. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 15, p. 2551-2566, 2003.

HERSCHMAN, H. R.; TALLEY, J. J.; DUBOIS, R. Cyclooxygenase 2 (COX-2) as a target for therapy and noninvasive imaging. **Molecular Imaging and Biology**, v. 5, n. 5, p. 286-303, 2003.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2 – 10 years later. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 367-375, 2002.

HULL, M. A. Cyclooxygenase-2: How good is it as a target for cancer chemoprevention?. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1854-1863, 2005.

HUNT, R. H. et al. The gastrointestinal safety of the COX-2 selective inhibitor etoricoxib assessed by both endoscopy and analysis of upper gastrointestinal events. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 8, p. 1725-1733, 2003.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: **Guideline on validation of analytical procedure: Methodology**, 1996.

KASSAHUN, K. et al. Role of human liver cytochrome P4503A in the metabolism of etoricoxib, a novel cyclooxygenase-2 selective inhibitor. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 6, p. 813-820, 2001.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p. 1357-1367, 2005.

KUMAR, V. V. P. et al. Simultaneous quantitation of etoricoxib, salicylic acid, valdecoxib, ketoprofen, nimesulide and celecoxib in plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 125-132, 2006.

LA GRENADE, L. et al. Comparison of reporting of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in association with selective COX-2 inhibitors. **Drug Safety**, v. 28, n. 10, p. 917-924, 2005.

LANÇAS, F. Extração em fase sólida (SPE). São Paulo: Editora Rima, 2004. 93p.

LEE, H. Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 2, n 7-8, p. 1161-1202, 2005.

MALLET, C. R.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 1, p. 49-58, 2004.

MALMSTROM, K. et al. Etoricoxib in Acute Pain Associated with Dental Surgery: A Randomized, Double-Blind, Placebo- and Active Comparator–Controlled Dose-Ranging Study. **Clinical Therapeutics**, v. 26, p. 667-679, 2004.

MARNETT, L. J. Cyclooxygenase mechanisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 545-552, 2000.

MARNETT, L. J. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 68-69, p. 153-164, 2002.

MATTHEWS, C. Z. et al. High-throughput, semi-automated determination of a cyclooxygenase II inhibitor in human plasma and urine using solid-phase extraction in the 96-well format and high-performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization-fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 751, p. 237-246, 2001.

MATTHEWS, C. Z. et al. Isolation and structural characterization of the photolysis products of etoricoxib. **Pharmazie**, v. 59, p. 913-919, 2004.

MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D. Cyclooxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1121-1132, 1999.

NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 413-436, 2003.

PATRIGNANI, P. et al. New insights into COX-2 biology and inhibition. **Brain Research Reviews**, v. 48, p. 352-359, 2005.

PEREIRA, A. S. et al. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, p. 107-111, 2005.

RAMAKRISHNA, N. V. S. et al. Validated liquid chromatographic ultraviolet method for the quantitation of etoricoxib in human plasma using liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p. 215-221, 2005.

RAO, R. N.; MEENA, S.; RAO, A. R. An overview of the recent developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 349-363, 2005.

RIENDEAU, D. et al. Etoricoxib (MK-0663): Preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 2, p. 558-566, 2001.

RODRIGUES, A. D. et al. Absorption, metabolism, and excretion of etoricoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in healthy male volunteers. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 2, p. 224-232, 2003.

ROSE, M. J. et al. Simultaneous determination of unlabeled and carbon-13-labeled etoricoxib, a new cyclooxygenase-2 inhibitor, in human plasma using HPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 2, p. 405-416, 2002.



SANKAR, D. G. et al. UV spectrophotometric determination of etoricoxib and ezetimibe. **Asian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 2812-2814, 2005.

SCHELLEN, A. et al. Generic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast determination of drugs in biological fluids. **Journal of Chromatography B**, v. 788, p. 251-259, 2003.

SCHUMACHER, H. R. et al. Randomised double blind trial of etoricoxib and indometacin in treatment of acute gouty arthritis. **British Medical Journal**, v. 324, p. 1488-1492, 2002.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis, understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHAH, V. P. et al. Bionalytical method validation – A revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, p. 1551-1557, 2000.

SMYTH, W. F. Recent studies on the electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected nitrogen-containing drug molecules and its application to drug analysis using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 824, p. 1-20, 2005.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v. 231, p. 232-235, 1971.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **The FASEB Journal**, v. 18, p. 790-804, 2004.

WERNER, U. et al. A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantitation of both etoricoxib and valdecoxib in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 19, p. 113-118, 2005.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, p. 4451-4459, 1984.

ZHONG, G. P. et al. Simultaneous determination of metformin and gliclazide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of two formulations in healthy volunteers. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 1462-1471, 2005.

## **ANEXOS**

---

## 7 ANEXOS

---

### 7.1 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

BRUM JUNIOR, L.; CENI, D. C.; FRONZA, M.; OLIVEIRA, P. R.; DALMORA, S. L. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of etoricoxib in human plasma and pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 1-13, 2006.

BRUM JUNIOR, L.; FRONZA, M.; CENI, D. C.; BARTH, T.; DALMORA, S. L. Validation of LC and LC-MS/MS methods for the determination of etoricoxib in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**, *in press*, 2006.