

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE
REVERSA PARA ANÁLISE DE FEBUXOSTATE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARLON BOTH DUARTE

Santa Maria, RS, Brasil

2013

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA ANÁLISE DE FEBUXOSTATE

por

MARLON BOTH DUARTE

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

2013

**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 MÉTODO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA ANÁLISE
DE FEBUXOSTATE**

elaborada por
Marlon Both Duarte

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Lisiane Bajerski, Dr^a. (URI/SANTIAGO)

Cristiane Franco Codevilla, Dr^a. (UFRGS)

Santa Maria, 25 de julho de 2013.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, iluminação, saúde e força para enfrentar os obstáculos;

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

aos meus pais, Jorge Brandi Duarte e Cleonice Maria Both Duarte, pelo exemplo, apoio, incentivo, amor e educação, e ao meu irmão Rafael Both Duarte, pelo carinho e amizade;

a minha noiva Fernanda Real Dotto, pelo amor, atenção, paciência e compreensão, fundamentais para a conclusão de mais uma etapa;

aos colegas, bolsistas e técnicos 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 UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;

ao CNPq, pelo apoio financeiro;

ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico;

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

*“A beleza da vida está
nos amores incondicionais,
nos desafios ultrapassados,
nas conquistas alcançadas
e nas que ainda estão por vir”*

(Francesca Moraes)

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA ANÁLISE DE FEBUXOSTATE

AUTOR: MARLON BOTH DUARTE

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de Julho de 2013.

Febuxostate é um novo fármaco, não purínico, indicado para o tratamento da hiperuricemia em pacientes com gota. No presente trabalho foi desenvolvido e validado método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) para determinação de febuxostate em produtos farmacêuticos. No método por CL-FR foi utilizada coluna XTerra C₁₈ (150 mm x 3,9 mm d.i), mantida a 25 °C. A fase móvel foi composta de água ultra-pura (pH 3,5): acetonitrila (40:60, v/v), eluída na vazão de 0,8 mL/min com detecção no ultravioleta a 316 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 3,9 min, sendo linear na faixa de concentração de 0,25-30 µg/mL ($r^2=0,9995$). A especificidade do método foi comprovada através de estudos de degradação realizados por cromatografia líquida e espectrometria de massas, demonstrando que não houve interferência dos excipientes e dos produtos de degradação na quantificação do fármaco. Além disso, o teste de citotoxicidade *in vitro* das amostras degradadas, apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à forma intacta. A precisão foi de 100,54%, com “bias” menor do que 0,65%. Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,08 e 0,28 µg/mL, respectivamente. O procedimento foi validado, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e teste de adequabilidade do sistema, cujos resultados estão de acordo com os requisitos preconizados. O método proposto foi aplicado no estudo de dissolução e análise de formas farmacêuticas de comprimidos, contribuindo, assim, para aprimorar o controle da qualidade de medicamentos, bem como garantir a segurança e eficácia no uso terapêutico.

Palavras-chave: febuxostate; hiperuricemia; cromatografia líquida em fase reversa; citotoxicidade; validação; dissolução.

ABSTRACT

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

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A REVERSE PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE ANALYSIS OF FEBUXOSTAT

AUTHOR: MARLON BOTH DUARTE

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, July 25th 2013.

Febuxostat is a novel non purine drug indicated for the treatment of hyperuricemia in gout. A reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the determination of febuxostat in pharmaceutical dosage forms. The LC method was carried out on a XTerra C₁₈ column (150 mm x 3.9 mm I.D.), maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of water (pH 3.5) – acetonitrile (40:60, v/v), run at a flow rate of 0.8 mL/min and using photodiode array (PDA) detection at 316 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time of 3.9 min, and was linear over the range of 0.25 - 30 µg/mL ($r^2=0.9995$). The specificity and stability-indicating capability of the method was proven through degradation studies were carried out by LC and MS and showing also, that there was no interference of the excipients and degradation products in the quantification of the drug. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of the degraded products showed significant differences ($p<0.05$). The accuracy was 100.54% with bias lower than 0.65%. The limits of detection and quantitation were 0.08 and 0.28 µg/mL, respectively. The procedure was validated evaluating parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantitation, robustness, and system suitability test, giving results within the acceptable range. The proposed method was applied for dissolution studies and the analysis of tablet dosage forms, contributing to assure the safety and therapeutic efficacy.

Keywords: Febuxostat; Hyperuricemia; Reversed-phase liquid chromatography; Cytotoxicity; Validation; Dissolution.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Representação da formação fisiológica de urato (Adaptada de CHOI et al., 2005)..... | 19 |
| FIGURA 2 – Estrutura química do Febuxostate..... | 22 |
| FIGURA 3 – Representação esquemática da ação inibitória seletiva do febuxostate sobre as enzimas do metabolismo da purina/pirimidina (Adaptada de TAKANO et al., 2005)..... | 23 |
| FIGURA 4 – Estruturas químicas: (a) Febuxostate (b) 67M-1, (c) 67M-2 e (d) 67M-4 (e) acil-glucuronido (GRABOWSKI et al., 2011)..... | 24 |

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

| | |
|--|----|
| FIGURE 1 – Chemical structure of febuxostat..... | 58 |
| FIGURE 2 – RP-LC chromatograms of febuxostat ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). (a) Febuxostat reference solution: peak 1 = febuxostat. (b) Febuxostat sample solution: peak 1 = febuxostat. (c) After acidic hydrolysis: peak 1 = febuxostat, peak 2 = degraded form. (d) After basic hydrolysis: peak 1 = febuxostat, peak 2 = degraded form. (e) After neutral conditions: peak 1 = febuxostat. (f) After oxidation: peak 1 = febuxostat, peak 2 = degraded form, peak 3 = hydrogen peroxide. (g) After exposition to UV light: peak 1 = febuxostat, peak 2 = photodegraded forms..... | 59 |
| FIGURE 3 - The full scan MS spectra of febuxostat. (a) febuxostat reference substance solution, and after: (b) acid condition: degraded product = m/z 70; (c) basic condition: degraded product = m/z 91; (d) exposition UV light: degraded product = m/z 102; (e) oxidation condition: degraded product = m/z 143. Febuxostat = m/z 318..... | 60 |

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

| | |
|---|----|
| TABLE 1 – Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for febuxostat in samples of pharmaceutical formulation..... | 54 |
| TABLE 2 – Accuracy of RP-LC for febuxostat in the formulations..... | 55 |
| TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure..... | 56 |
| TABLE 4 – Determination of febuxostat in pharmaceutical dosage forms by the RP-LC method..... | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AINES | Anti-inflamatórios não-esteroidais |
| AU | Ácido úrico |
| AUS | Ácido úrico sérico |
| CL | Cromatografia líquida |
| CL-FR | Cromatografia líquida em fase reversa |
| CL-MS | Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas |
| C _{máx} | Concentração máxima |
| CV% | Coeficiente de variação percentual |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EMA | Agência Européia de Medicamentos |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FRPF sintase | Fosforibosilpirofosfato sintase |
| FDA | Food and Drug Administration |
| HGPRT | Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase |
| Kg | Kilograma |
| M | Molar |
| MALDI-TOF | Ionização/dessorção de matriz assistida por laser – tempo de voo |
| mg | Miligrama |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| nm | Nanômetro |
| ng | Nanôgrama |
| OMPDC | Orotidina-5'-monofosfato descarboxilase |
| OPRT | Orotato fosforribosil transferase |
| PI | Padrão interno |
| PNP | Purina nucleosídeo fosforilase |

| | |
|---------------|---|
| Q-TOF | Detector por tempo de vôo |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| r^2 | Coefficiente de determinação |
| $T_{1/2}$ | Tempo de meia-vida |
| t_{max} | Tempo para atingir a concentração plasmática máxima |
| UPLC | Cromatografia líquida de ultra eficiência |
| USP | Farmacopéia Americana |
| UV | Ultravioleta |
| XO | Xantina oxidase |
| XOR | Xantina oxidoreductase |
| °C | Grau celsius |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrômetro |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA | 34 |
| 4 DISCUSSÃO | 63 |
| 5 CONCLUSÕES | 67 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A gota é conhecida desde a Antiguidade e denominada como “doença dos reis”. Esta doença afeta pessoas de todas as camadas da sociedade e segundo o *National Health and Nutrition Examination Survey III* tem aumentado significativamente sua incidência e prevalência na população. Cerca de 5,1 milhões de americanos sofrem de gota, principalmente, homens e mulheres com mais de 30 e 50 anos, respectivamente (KRAMER; CURHAN, 2002). No Brasil, não se dispõe de estatísticas precisas sobre a doença.

A gota é uma doença reumatológica, inflamatória e metabólica que ocorre pela deposição de cristais de urato monossódico no interior de articulações e tecidos. Está intimamente associada à hiperuricemia, que se caracteriza pela presença de altos níveis de ácido úrico no sangue ($> 7 \text{ mg dL}^{-1}$) que resultam da redução da excreção ou do aumento de sua produção (CHOI et al., 2005).

Os fármacos utilizados para alterar os níveis séricos de urato no sangue são classificados como uricosúricos (eliminam o ácido úrico pela urina), uricoestáticos (impedem a formação do ácido úrico) e uricolíticos (destroem o ácido úrico formado) (SHOJI et al., 2004). Atualmente, existem disponíveis no mercado agentes uricosúricos, tais como probenicida, anlodipina, os agentes uricolíticos, como o rasburicase e agentes uricoestáticos como alopurinol e, em especial, o febuxostate (HYON et al., 2005).

Nas últimas quatro décadas, a terapia de redução dos níveis de urato baseou-se no tratamento profilático de primeira escolha com alopurinol. Esse procedimento é eficaz em muitos casos de pacientes com hiperuricemia e gota, mas cerca de 20% destes relataram efeitos colaterais (dor abdominal, diarreia, gastrite, sonolência, cefaléia ou erupções cutâneas) e 5% interromperam a medicação. Desse modo, como alternativa ao tratamento dessa doença, foi pesquisado e desenvolvido o Febuxostate, que tem apresentado boa tolerância em todos os grupos de pacientes, bem como, os sensíveis ao alopurinol (MIAO; BRIAN, 2008).

O Febuxostate foi aprovado para comercialização pela Agência Européia de Medicamentos (EMA) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2008 e 2009, respectivamente. É o primeiro fármaco comercializado em 40 anos como alternativa ao alopurinol para o tratamento de hiperuricemia em pacientes com gota. Atualmente, não se encontra disponível para comercialização no Brasil, apenas nos Estados Unidos (Uloric[®]), Europa (Adenuric[®]), Índia (Febutaz[®]) e Ásia (Feburic[®]).

O febuxostate é um agente anti-gotoso, pertencente ao grupo uricoestático, com elevada potência, rápido início de ação e duração prolongada, que apresenta, além de sua atividade reumatológica, importante atividade anti-inflamatória. Desse modo, por apresentar ação mais ampla no mecanismo fisiopatológico, permite melhor qualidade de vida do portador da doença.

As pesquisas na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos para sua caracterização e determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, garantindo sua qualidade. A escolha do procedimento analítico baseia-se em vários fatores, que incluem a estrutura e características do fármaco, pureza, teor da amostra e finalidade da análise, bem como a disponibilidade de equipamentos e reagentes. O desenvolvimento de métodos envolve a avaliação e otimização de condições, e então, a validação é necessária para demonstrar, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos (SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; ICH, 2005; SHABIR et al., 2007).

A cromatografia líquida (CL), especialmente com detecção no ultravioleta (UV), tem sido empregada devido à resolução, precisão e exatidão significativas. Atualmente, se destaca entre os métodos usados para a análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas. É amplamente utilizada, pois, através da escolha adequada de colunas, fase móvel e método de detecção, possibilita a separação e quantificação dos diferentes componentes da formulação (SWARTZ; KRULL, 1998).

Os estudos de toxicidade *in vitro* tem mostrado que os testes com culturas celulares são sensíveis, rápidos, baixo custo e reprodutíveis. Atualmente, estes testes de citotoxicidade consistem em colocar a substância em estudo, direta ou indiretamente, em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (BORENFREUND et al., 1988).

Com base no exposto, o presente trabalho tem por objetivos: a) desenvolver método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CL-FR) para análise de febuxostate; b) validar os parâmetros recomendados para produtos farmacêuticos; c) estudar condições de dissolução e aplicação do método para

determinação do fármaco liberado; d) Analisar os produtos de degradação por espectrometria de massas e avaliar sua citotoxicidade *in vitro*. Nesse contexto, pretende-se contribuir para aprimorar o controle de qualidade dos comprimidos de febuxostate, garantindo a segurança e eficácia clínica desse medicamento.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nos últimos anos houve um aumento nos casos de gota, como também, maior prevalência e complexidade clínica da doença, devido aos limitados avanços para o tratamento dessa enfermidade. Entre os principais fatores envolvidos, destacam-se: a longevidade das pessoas, o uso de diuréticos e aspirina em baixas doses, insuficiência renal crônica, hipertensão arterial sistêmica, obesidade e síndrome metabólica. Além disso, o tratamento terapêutico com a colchicina, os anti-inflamatórios não esteróides e o alopurinol têm algumas limitações no seu uso, como a intolerância, alergias e as contra-indicações específicas de cada um. (BIEBER; TERKELTAUB, 2004, BECKER et al., 2005b).

Os avanços na compreensão da biopatologia do processo inflamatório da gota possibilitaram novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos, tais como: inibidores das moléculas de adesão celular, inibidores das lipooxigenases e receptores de leucotrienos, inibidores das citocinas, inibidores da fosfolipase A₂, e inibidores da ciclooxigenase específicos de isoformas (BRUTON et al., 2006). Novas estratégias estão sendo abordadas para os avanços em terapias anti-inflamatórias para gota, entre elas: ataque ao complemento C5b-9 da membrana, antagonismo do receptor melanocortina-3 do fagócito, as quimiocinas CXC1 e CXCL8, fator de necrose tumoral- α , e inflamação NLRP3, o qual, através da ativação da caspase-1, promove endoproteólise de IL-1 β e, conseqüentemente, maturação e secreção (CRONSTEIN; TERKELTAUB, 2006; MARTINON et al., 2006). Recentemente, novas pesquisas destacaram a importância de conduzir terapias de forma adequada, visto que muitos pacientes acabam por receber terapias inapropriadas devido à falta de profissionais especializados na área (BORSTAD et al., 2004; ZHANG et al., 2006). Novos estudos constataram que etorocoxibe (inibidor seletivo COX-2), prednisolona (anti-inflamatório esteroideal) e naproxeno (anti-inflamatório não-esteroideal) são eficientes para o tratamento de gota aguda, porém estão sendo realizados sucessivos estudos para verificar os efeitos adversos (RUBIN et al., 2004; MAN et al., 2007; JANSSENS et al., 2008).

Atualmente, destacam-se duas estratégias para o tratamento da gota: o controle das crises agudas e condutas a longo prazo da gota crônica. O tratamento da gota aguda visa diminuir a dor e utiliza fármacos que atuam na inflamação articular, entre os quais destacam-se os agentes supressores do recrutamento e de ativação de leucócitos como a colchicina (alcalóide), os AINES (indometacina) e glicocorticóides (ciclosporina e verapamil). Por sua vez, o tratamento da doença crônica tem por finalidade modificar o metabolismo das purinas

para obter concentrações plasmáticas normais de urato. Consequentemente são utilizados agentes que diminuem a concentração plasmática de urato, como alopurinol e febuxostate que atuam no metabolismo das purinas reduzindo a síntese de ácido úrico. Probenecida, sulfimpirazona, losartana e benzbromarona são agentes uricosúricos que resultam no aumento da excreção de ácido úrico renal, assim, diminuindo a concentração de AUS. A urato oxidase (uricase) oxida o ácido úrico, que é moderadamente solúvel, para a alantoína, produto final altamente solúvel, que é facilmente excretado pela urina (STAMP et al., 2007).

O ácido úrico é um ácido fraco, $pK_a=5,8$, que existe em grande parte do organismo (plasma) na sua forma ionizada de urato (99%), a pH fisiológico ($pH=7.4$). É o produto final do metabolismo das purinas, decomposição dos nucleotídeos purínicos, principalmente adenina e a guanina dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), que são metabolizados e levam a formação da xantina e hipoxantina que, através da enzima xantina-oxidase, aos produtos finais: o ácido úrico e o urato monossódico. Os níveis de urato no organismo dependem, diretamente, do equilíbrio entre a ingestão dietética (fonte exógena), síntese e da taxa de excreção (fontes endógenas) (LOEB, 1972; LIEBMAN et al., 2007), como ilustrado na Figura 1.

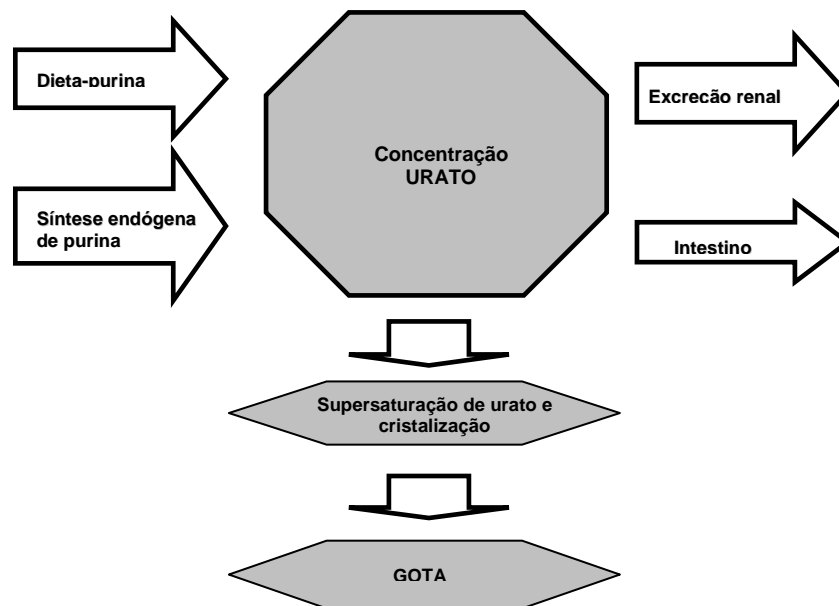


Figura 1. Representação da formação fisiológica de urato (adaptada de CHOI et al., 2005).

O ácido úrico é excretado pelo organismo através dos rins (65%) e pelo trato gastrintestinal (35%). O organismo humano não é capaz de metabolizar ou destruir os uratos,

mas por ser muito hidrossolúvel, é facilmente eliminado pelo rim em quantidades de 600-700 mg/dia nas dietas normais. Num indivíduo normal, 1/3 do ácido úrico é degradado e excretado pelo intestino e 2/3 pelos rins. Estudos realizados com membranas do túbulo proximal indicam que a primeira etapa da reabsorção consiste na captação de urato do líquido tubular por um transportador capaz de atuar como permutador de ânions, denominado URAT1 (transportador de urato 1, SLC22A12). Conseqüentemente, os novos avanços na compreensão da disposição renal de ácido úrico incluem a identificação do URAT1, como um mediador da reabsorção aniônica de urato no lúmen da membrana apical das células epiteliais do túbulo proximal, com transportador eletrogênico de hexose GLUT9 (transportador glicose 9; SLC2A9) mediando a reabsorção aniônica de urato no interstício peritubular, e enfim, para a circulação pela membrana basolateral (ANZAI et al., 2008; ENDOU; ANZAI, 2008; VITART et al., 2008).

A concentração de urato no plasma humano é de 4,0 a 6,0 mg/dL. Quando os níveis plasmáticos ultrapassam 7,0 mg/dL nos homens ou 6,0 mg/dL nas mulheres, estes são clinicamente diagnosticados com hiperuricemia. É um problema metabólico comum, que tem sido observado ao longo dos anos. Na maioria dos pacientes, é assintomática, pois o paciente não apresenta nenhum sintoma, como: gota, artrite, litíase (cálculos renais), doenças renais (nefrite) e formação de depósitos de ácido úrico, formando os tofos.

A hiperuricemia pode ser o resultado da redução da excreção de ácido úrico (85% a 90%) ou do aumento da sua produção (10% a 15%). Em indivíduos cuja excreção diária de ácido úrico esteja acima dos valores de referência, pode ocorrer redução relativa na eliminação renal, ou seja, tanto a hiperprodução quanto a hipoexcreção contribuiriam para a hiperuricemia. Entre as causas conhecidas de hiperprodução de AU está o aumento na síntese de purinas, citam-se anormalidade no metabolismo das enzimas envolvidas na síntese de nucleotídeos purínicos (exemplo: deficiência e hiperatividade da fosforibosilpirofosfato sintase (FRPF sintetase) e HGFRT, respectivamente), degradação acelerada do trifosfato de adenosina (ATP) (gerada por abuso de etanol, doenças do armazenamento de glicogênio, ingestão de frutose, intolerância hereditária à frutose, hipoxemia e exercício muscular excessivo), doenças hemolíticas, obesidade, ácido nicotínico, administração de warfarina e ingestão na dieta. Também ocorre quando há anormalidades na depuração renal de urato devido a diversos fatores, entre eles destacam-se: acidose láctica, cetoacidose diabética, diabetes insipidus, insuficiência renal crônica, hipertensão arterial, uso de salicilatos. O AU, cuja solubilidade no plasma – 120 mg dL^{-1} a 37°C – é razoável, apresenta-se, contudo, predominantemente na forma de urato monossódico, que apresenta solubilidade plasmática

cerca de 50 vezes menor que a do ácido, 6,8 mg/dL à mesma temperatura. A ionização do AU decorre de seu pKA 5,8 estar abaixo do pH do fluido extracelular, na faixa de 7,4, como também pelos altos níveis de sódio no meio. Justifica-se assim a relativa propensão de, em caso de hiperuricemia, ocorrer formação de cristais de urato que, ao se depositarem sobre juntas e articulações ósseas, iniciam o processo inflamatório que resulta na artrite gotosa (BRUTON et al., 2006; GAFFO; SAAG, 2008).

A gota é uma doença exclusiva dos seres humanos, pois a maioria dos mamíferos possui a enzima uricase que é responsável pela metabolização dos produtos de degradação das purinas em uma substância hidrossolúvel, a alantoína, que é facilmente excretada pelo organismo. A gota está intimamente associada com a hiperuricemia, porém, é possível o desenvolvimento da doença na ausência de hiperuricemia, podendo ocorrer em decorrência de uma resposta imune ao urato ou ao depósito preferencial do urato no líquido sinovial. Na maioria dos casos, é desencadeada pela cristalização de ácido úrico no interior das articulações e tecidos. A reação inflamatória que caracteriza o ataque agudo da gota ocorre em consequência de uma reação do organismo à presença de cristais alojados, gerando uma resposta inflamatória que envolve a infiltração local de monócitos, que liberam fatores quimiotáticos (C5a e IL-8) responsáveis pelo recrutamento de outras células inflamatórias. Neste momento, a produção de lactato apresenta-se elevada nos tecidos sinoviais e nos leucócitos associados ao processo inflamatório, favorecendo a redução local do pH, que promove a deposição adicional de urato. Logo, devido ao acúmulo de cristais e outras influências causam acumulação de neutrófilos na articulação que irão tentar fagocitá-los. A fagocitose fará com que haja liberação de radicais livres tóxicos, como prostaglandinas e leucotrienos, que contribuem para a inflamação no tecido lesionado, bem como para a quimiotaxia de mais neutrófilos. São também libertadas enzimas hidrolíticas, devido à lise dos neutrófilos. Portanto, conseqüentes reações inflamatórias, podendo chegar à degeneração e destruição óssea, como também da cartilagem (resposta infamatória crônica aos cristais de urato) (TERKELTAUB, 1996; CHOI et al., 2005; MANDEL, 2008).

Como demonstrado, o ácido úrico não é o único mediador envolvido no processo reumatotógico e inflamatório. Dessa forma, fármacos que apresentam ação mais ampla no mecanismo fisiopatológico, proporcionando ação anti-inflamatória além do alívio sintomático, podem revelar-se mais efetivos, propiciando melhor alívio sintomático das patologias reumatológicas, melhorando a qualidade de vida do paciente. Nesse contexto, foi lançado o febuxostate, que apresenta potente ação uricosúrica, e anti-inflamatória, esta última, em estudo para melhor caracterizá-la (OSADA et al., 1993; KHOSRAVAN et al., 2006a).

O Febuxostate, desenvolvido pelo laboratório Teijin Pharma Ltda (Tokyo, Japão) em 1991, é um anti-hiperuricêmico quimicamente denominado ácido 2 - [3-ciano-4-(2-metil-propoxi) fenil] - 4 - metiltiazol - 5 - carboxílico. É um pó cristalino branco, não higroscópico, com $pK_a=3,42$, e ponto de fusão de, aproximadamente, 205°C . Possui peso molecular de 316,38, e fórmula empírica $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$, com a estrutura química ilustrada na Figura 2 (WHO, 2002; KROSHARAVAN et al., 2007; EMEA, 2008; FDA, 2011).

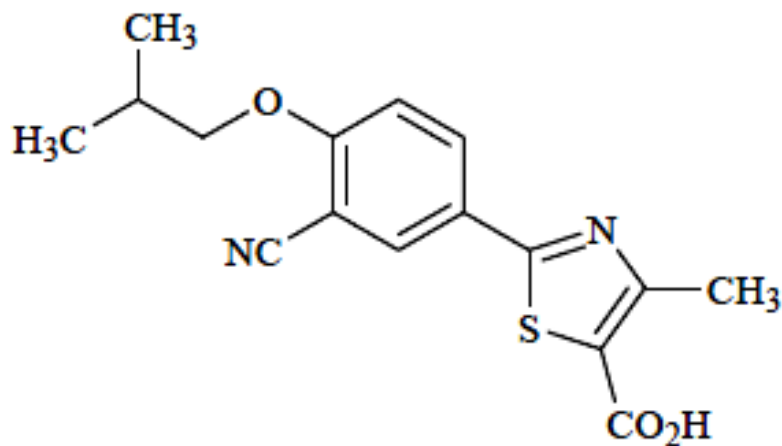


Figure 2. Estrutura química de Febuxostate.

Febuxostate é administrado via oral, sendo comercializado desde 2008 e 2009, na Europa, incluindo França, Reino Unido, Alemanha, Irlanda, Itália, Grécia, Áustria, Espanha e Chipre, pelos laboratórios Patheon France (França) e Menarini (Alemanha) sob o nome de Adenuric[®] na forma de comprimidos de 80 e 120 mg, e nos EUA e Canadá, pelo laboratório Takeda Pharmaceuticals Inc. em comprimidos de 40 e 80 mg, respectivamente. Em maio de 2011, a Teijin Pharma lançou o fármaco no Japão e Coréia sob o nome de Feburic[®], e visam para os próximos anos o mercado dos países como: China, Hong Kong, Taiwan, México, Oriente Médio, Caribe e Norte Africano. Todavia, não há previsão de seu registro no Brasil.

Este fármaco exerce efeito terapêutico através da redução dos níveis de ácido úrico (AU) sérico, sendo indicado clinicamente no tratamento da hiperuricemia e gota. O principal mecanismo de ação está associado à inibição seletiva da xantina oxidase (XO), enzima responsável por catalisar as duas últimas etapas do metabolismo das purinas, oxidando de hipoxantina para xantina e a xantina para ácido úrico. A nível molecular exerce atividade inibitória enzimática através de interações hidrofóbicas de alta afinidade com os aminoácidos

do sítio ativo da enzima XO, molibdênio-pterina. Esta ligação do febuxostat com a XO persiste independentemente do estado redox do cofator do molibdênio e bloqueia o acesso do substrato ao sítio ativo, acarretando a inativação da enzima (OKAMOTO; NISHINO, 2008). Entretanto, destaca-se dentro da classe dos fármacos anti-hiperuricêmicos, uma vez que não apresenta interações secundárias com enzimas envolvidas no metabolismo da purina e pirimidina, como a guanina deaminase, hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT), purina nucleosídeo fosforilase (PNP), orotato fosforribosil transferase (OPRT) e orotidina-5'-monofosfato descarboxilase (OMPDC), não alterando, portanto, significativamente a síntese total de purinas, conforme ilustrado na figura 3 (OSADA et al., 1993; TAKANO et al., 2005; BECKER et al., 2005a; BRUCE, 2006; TEKELTAUB et al., 2009).

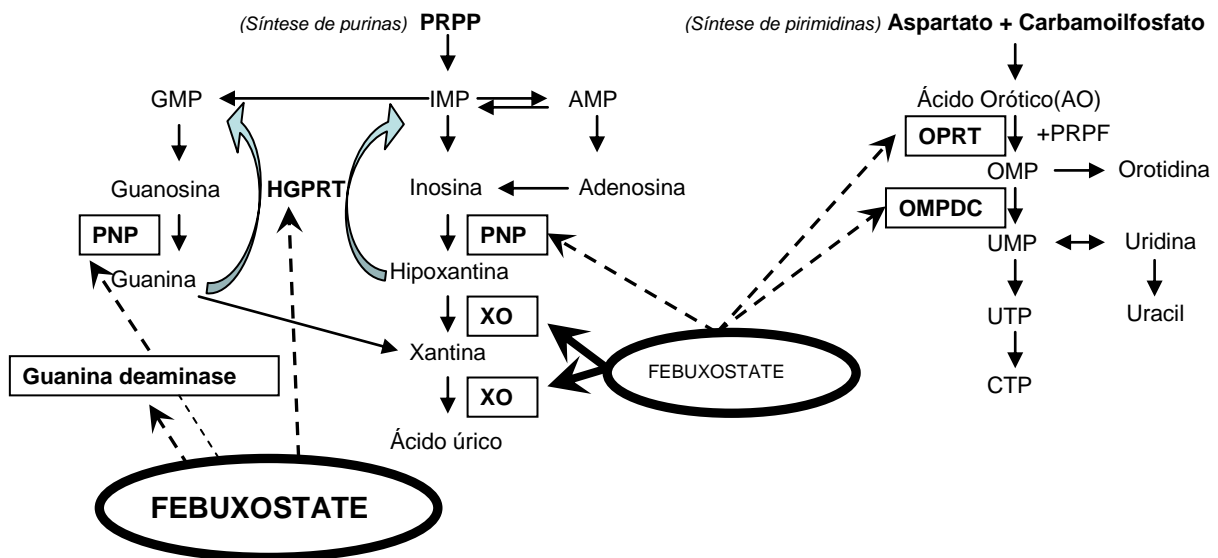


Figura 3. Representação esquemática da ação inibitória seletiva de febuxostate sobre as enzimas do metabolismo de purina/pirimidina (adaptada de TAKANO et al., 2005).

O febuxostate, após administração via oral, liga-se fortemente a albumina (99%) e sofre absorção de 85% de seu conteúdo, atingindo concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) de 5000 ng mL⁻¹ em 1 hora, em voluntários humanos saudáveis (BRUCE, 2006). Apresenta tempo de meia-vida de 5 - 8 horas e sofre metabolização hepática pelas vias: acil-glucuronidação, gerando em maior proporção (22% a 44% da dose) seu principal metabólito o acil-glucuronido, pela oxidação do radical isobutil nos carbonos primário e terciário, metabólitos ativos oxidativos 67M-1, 67M-2, respectivamente, e 67M-4 (metabólito secundário) em

menores quantidades (2% á 8%), como mostra a Figura 4 (MAYER et al., 2005; KHOSRAVAN et al., 2006b).

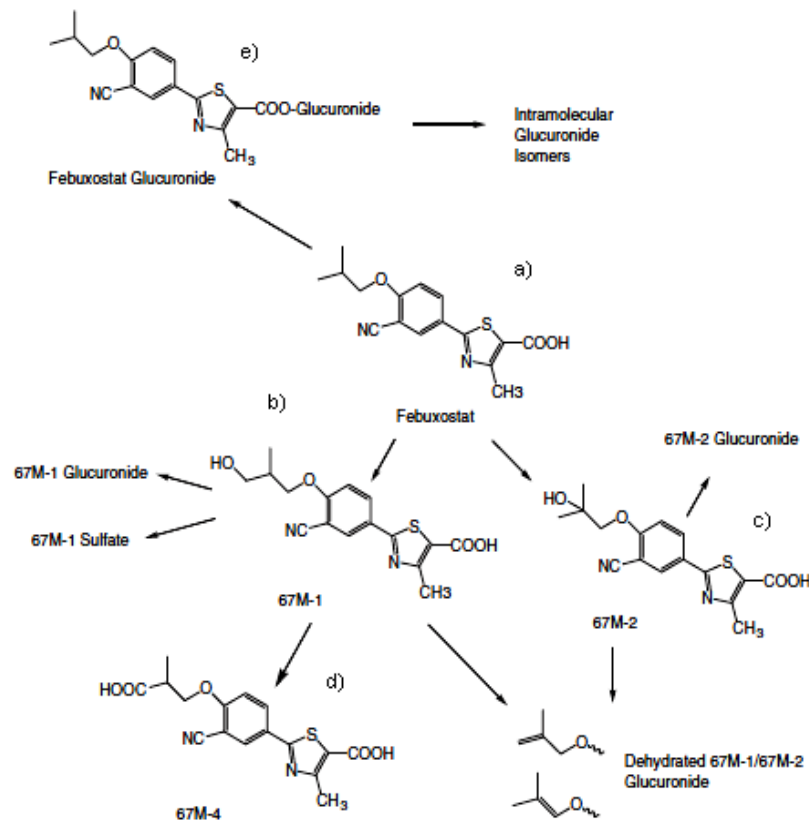


Figura 4. Estruturas químicas: (a) Febuxostate (b) 67M-1, (c) 67M-2 e (d) 67M-4 (e) acil-glucuronido (GRABOWSKI et al., 2011).

Estudos revelaram que o febuxostate pode ser administrado simultaneamente com alimentos e antiácidos, visto que estes fatores não alteram significativamente sua resposta terapêutica (KHOSRAVAN et al., 2007). Demonstrou-se, também, que não ocorreram alterações em sua farmacocinética, quando o mesmo foi associado a outros fármacos para o tratamento de gota aguda, entre eles a colchicina, a indometacina e o naproxeno (KHOSRAVAN et al., 2005; KHOSRAVAN et al., 2006c).

Becker et al. (2005b) realizaram estudo clínico comparando o febuxostate ao alopurinol em voluntários com hiperuricemia e gota. Nesse estudo, os autores distribuíram aleatoriamente 762 pacientes com gota e ácido úrico sérico > 8,0 mg/dL para receber febuxostate (80 mg e 120 mg/dia) ou alopurinol (300 mg/dia) por 52 semanas. Os autores concluíram que o febuxostate, em uma dose diária de 80mg a 120mg, foi mais efetivo que o alopurinol na dose diária comumente utilizada de 300mg para redução de urato sérico, e que

ocorreram reduções semelhantes nas crises de gota e área de tofos em todos os grupos de tratamento.

Sabán-Ruíz et al. (2013) realizaram estudos sobre os efeitos anti-inflamatórios sobre o sistema vascular gerado pelo tratamento com febuxostate e, conseqüentemente, diminuição dos níveis de XO. A xantina oxidoreductase (XOR) catalisa as duas últimas reações que levam à formação de ácido úrico. XOR é um complexo molibdoflavoenzima presente em duas diferentes formas funcionais: desidrogenase e xantina-oxidase (XO). XO é uma fonte importante de espécies reativas de oxigênio (EROs), que contribuem para a inflamação vascular. Sob condições fisiológicas normais, que se encontra principalmente sob a forma de desidrogenase, enquanto que, em situações inflamatórias, modificação pós-tradução converte a forma de desidrogenase em XO. Estas condições inflamatórias levam a um aumento nos níveis de XO e, portanto, um aumento da geração de EROs pelo processo enzimático, finalmente resultando em alterações na função vascular. Também tem sido demonstrado que a XO secundariamente leva à formação de peroxinitrito. O peroxinitrito é um dos principais EROs produzido pela reação de óxido nítrico e de radicais superóxido, e é considerado marcador para as espécies reativas de azoto, acompanhada por estresse oxidativo. Febuxostate é um inibidor XO-específico para o tratamento de hiperuricemia. Como febuxostate inibe ambas as formas oxidada e reduzida da enzima, conseqüentemente, inibe a formação de EROs, diminuindo a inflamação promovida pelo estresse oxidativo. A administração de febuxostate também demonstrou que reduziu nitro-estresse oxidativo. O estudo também observou que os níveis séricos de XO estão significativamente aumentados em vários estados patológicos, tais como a inflamação, isquemia, envelhecimento e que XO derivada da formação de EROs está envolvida no dano oxidativo. Assim, é possível que a inibição desta via enzimática pelo febuxostate gere benefícios contra a inflamação vascular. Também realizaram testes em modelos animais, que geraram dados e resultados satisfatórios sobre os efeitos anti-inflamatórios, juntamente com a redução da atividade de XO.

Cooper et al. (2006) desenvolveram e validaram metodologia para determinação de ácido úrico, xantina e hipoxantina no soro humano para estudos farmacodinâmicos de febuxostate durante a etapa clínica. Realizaram a determinação por CL-FR com detecção no UV (260 nm) e utilizaram a uridina como padrão interno (PI). O método cromatográfico em gradiente foi executado em temperatura de 35°C, utilizando coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel A, constituída por tampão fosfato de potássio 47 mM (100%) para eluir analitos hidrofílicos e o PI, e fase móvel B, composta por acetonitrila:tampão fosfato de potássio 47

mM (50:50,V/V) para a remoção de interferentes. O estudo foi realizado com a administração de febuxostate (70 mg) uma vez ao dia em voluntários humanos.

Kadivar et al. (2011) realizaram o isolamento e identificação dos produtos formados durante o processo de síntese de febuxostate por cromatografia líquida com detecção no UV (315 nm) e acoplada à espectrometria de massas (Q-TOF) com ionização química a pressão atmosférica no modo positivo. No método cromatográfico utilizaram coluna C₁₈ em eluição por gradiente, variando a proporção entre a fase móvel A e B composta de acetato de amônio 0,01 M (pH 3,5):acetonitrila, respectivamente. Observaram a presença de quatro impurezas (amida, sec-butil, des-ciano, des-ácido) que foram confirmadas pelos métodos de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho.

Grabowski et al. (2011) desenvolveram e validaram metodologia por CL-FR para determinação de febuxostate em amostras de urina, fezes e plasma humanos, utilizando o ácido 2-naftólico como padrão interno. Realizaram a extração em fase sólida e determinação por cromatografia líquida com detecção por fluorescência. A fase móvel utilizada consistiu de 0,032% de ácido acético glacial em água:acetonitrila (55:45, V/V). O método foi utilizado para estudos de biodisponibilidade e farmacocinética, que demonstraram principalmente a presença de febuxostate inalterado nas amostras, e dos seus metabólitos em menores concentrações (67M-1, 67M-2 e 67M-4), que combinados contribuem em torno de 8% da sua atividade do fármaco. Em geral, observaram que urina e fezes índices de 14% de febuxostate, 30% de acil-glicuronido (principal metabólito), 10% de 67M-1, 11% de 67M-2 e 14% de 67M-4.

Wang et al. (2012) desenvolveram método por cromatografia líquida combinada à espectrometria de massas com ionização química, a pressão atmosférica no modo positivo para a determinação de febuxostate em plasma humano, utilizando como padrão interno (PI) o d₇-febuxostat. As amostras de plasma, adicionadas a solução de PI:metanol-água (50:50, V/V), foram desproteinizadas com acetonitrila. As transições de 317>261 e 324>(261-262) foram monitoradas para o febuxostate e d₇-febuxostate, respectivamente. A separação cromatográfica foi executado em temperatura ambiente, utilizando coluna C₁₈ e fase móvel constituída de acetonitrila:acetato de amônia 5mM:ácido fórmico (85:15:0,015,V/V/V). A metodologia foi validada na faixa de concentração de 10-5000 ng/mL e utilizada para realizar o estudo farmacocinético após a administração de dose única de febuxostate (80 mg) em voluntários humanos.

Chandu et al. (2013) desenvolveram metodologia por CL-MS/MS com ionização por ES no modo positivo para determinação de febuxostate em plasma humano em estudo de

bioequivalência. As análises foram realizadas com espectrômetro de massas operando no modo MRM, utilizando febuxostate D7 como padrão interno. As transições de 317>261,1 e 324,2>262,1 foram utilizadas para monitorar a febuxostate e PI, respectivamente. Utilizaram sistema de extração líquido-líquido com uma mistura de terc-butil metil éter e ácido fórmico, com recuperação média de 81,59% para a febuxostate e 89,28% para o PI. A fase móvel constituída de formiato de amônia 10mM e acetonitrila foi eluída isocraticamente com vazão de 0,8 mL/min e um tempo total da corrida analítica de 2,5 min. O método foi linear na faixa de 1-80000 ng/mL. O C_{max} observado após administração de dose única de 80 mg, em 14 voluntários, foi de 3065,46 e 3726,09 ng/mL, com áreas sob a curva da concentração plasmática vs tempo (ASC) de 13774,96 e 14367,34 ng h/mL para o produto teste e referência, respectivamente.

Krishnareddy et al. (2012) desenvolveram método e realizaram validação parcial para a determinação de febuxostate em solução concentrada e produto acabado por CL-FR com detecção no UV a 315 nm. Utilizaram coluna C_{18} e fase móvel composta de tampão fosfato (pH 2,5):metanol (20:80, V/V) eluída isocraticamente na vazão de 1,0 mL/min. A separação foi realizada com tempo de retenção de 3,61 minutos, e os resultados foram expressos em ppm.

Lakade et al. (2012) validaram método para determinação de febuxostate em produto acabado por CL-FR com detecção a 316 nm. O método foi otimizado com coluna C_{18} e fase móvel composta por metanol:ácido orto-fosfórico (90:10, V/V) eluída isocraticamente na vazão de 1,0 mL/min. A separação foi realizada com tempo de retenção de 5,28 minutos na faixa de concentração entre 10-100 μ g/mL. O trabalho apresenta discordâncias entre a descrição e os resultados.

Gunda et al. (2012) validaram parcialmente método por cromatografia líquida em fase reversa para determinação de febuxostate em formulações usando coluna C_{18} , fase móvel composta de metanol:tampão fosfato pH 3,0 (60:40%) com detecção a 318 nm, e tempo de retenção de 11,20 minutos. Expressaram os resultados em ppm.

Muvvala et al. (2012) estudaram método para soluções concentradas por CL-FR com detecção no UV a 275 nm. O método foi otimizado com coluna C_{18} , a temperatura ambiente, e fase móvel composta por tampão acetato de amônia 10 mM (pH 4,0):acetonitrila (15:85, V/V) eluída isocraticamente na vazão de 1,2 mL/min. Os autores estudaram diferentes condições de pH, temperatura e fase móvel. A separação foi obtida em 3,45 min, e os resultados descritos como áreas, sem tratamento estatístico.

Kumar et al. (2012) desenvolveram e validaram método em comprimidos por CL-FR com detecção no UV a 320 nm. O método foi otimizado com coluna C₁₈, a temperatura ambiente, e fase móvel composta por acetonitrila:tampão fosfato 0,02M (60:40, V/V, pH=3,5) eluída isocraticamente na vazão de 1,0 mL/min. A separação foi realizada no tempo de retenção 3,4 minutos, e os resultados expressos em área.

Rao et al. (2012) desenvolveram método para a determinação de febuxostate em amostras concentradas e produto acabado por CL-FR com detecção no UV a 320 nm. O método foi otimizado com coluna C₈, a temperatura ambiente, e fase móvel composta por acetonitrila:tampão fosfato 0,43M (60:40, V/V, pH=3,0) eluída isocraticamente. O tempo de retenção foi de 3,145 minutos, e os resultados foram expressos em área, e as amostras com identificação inadequada.

Annapurna et al. (2012) validaram método por CL-FR para determinação de febuxostate em formulações usando coluna C₁₈ e fase móvel composta de hidrogênio fosfato de tetrabutyl amônio:acetonitrila (30:70) com detecção a 216 nm. O tempo de retenção foi de 5,73 min e a faixa linear de 0,01 a 300 µg/mL.

Reddy & Sekhar (2012) desenvolveram método por CL-FR para determinação de substâncias relacionadas no febuxostate solução concentrada e comprimidos. Usaram coluna C₁₈ e fase móvel composta de tampão fosfato (pH 3,0):metanol, em gradiente, com detecção a 318 nm. O método foi validado com tempo de retenção de 3,6 minutos, descrevendo os dados brutos no artigo, sem identificação da origem das impurezas.

Sahu et al. (2012) desenvolveram e validaram metodologia por cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UPLC) para análise de impurezas e quantificação do febuxostate em solução concentrada. A metodologia foi otimizada com coluna C₁₈, utilizando como fase móvel tampão acetato de amônia (pH 4,5):acetonitrila (30:70, V/V), com tempo de retenção de 2,046 minutos. A especificidade do método analítico foi determinada pelo estudo da degradação da substância química de referência do febuxostate, que foi submetida a condições de hidrólise ácida e básica, fotólise, oxidação química e térmica.

Sheth & Pandya (2013) desenvolveram e validaram metodologia por cromatografia líquida para quantificação do febuxostate e estudo de cinética de degradação em meio ácido. Os autores estudaram diferentes condições de pH, fase estacionária e fase móvel. A especificidade do método analítico foi determinada pelo estudo da degradação da substância química de referência do febuxostate, que foi submetida às condições de hidrólise ácida e básica, fotólise, oxidação química e térmica e foram analisadas utilizando CL e CL-MS Q-TOF, a pressão atmosférica no modo positivo. O método cromatográfico foi executado em

temperatura ambiente, coluna C₁₈, utilizando como fase móvel metanol:água (0,02% TFA) (95:5, V/V), com detecção no UV a 315 nm, e validado na faixa de concentração de 5-30 µg/mL.

Mandle et al. (2013) desenvolveram e validaram metodologia por cromatografia líquida em fase reversa para realizar a análise de febuxostate em solução concentrada e formas farmacêuticas. A metodologia foi otimizada com coluna C₁₈, utilizando como fase móvel metanol:água (80:20, V/V), detecção no UV a 315 nm. A separação foi obtida com tempo de retenção de 2,25 min., com tempo de corrida de 10 minutos, demonstrados nas figuras dos estudos de degradação da substância de referência sob condições de hidrólise ácida e básica, fotólise, térmica e oxidação química.

Lakade et al. (2011) desenvolveram e validaram método espectrofotométrico para determinação de febuxostate em comprimidos utilizando metanol como diluente. Foi realizado a varredura do espectro na faixa de 200-400 nm e o fármaco apresentou um máximo de absorção (λ_{max}) em 316 nm. A estabilidade das soluções de referência foi avaliada, por dois meses, em temperatura ambiente e geladeira (4°C), as quais permaneceram estáveis. O método foi validado de acordo com os parâmetros e especificações do guia USP.

Bagga et al. (2011) desenvolveram método espectrofotométrico para análise de febuxostate em produto farmacêutico, utilizando para detecção o comprimento de onda de 315 nm. Obtiveram uma faixa linear entre 0,2-15 µg/mL e limite de quantificação e detecção de 0,1743 µg/mL e 0,5281 µg/mL, respectivamente.

KumaraSwamy et al. (2012) desenvolveram e validaram método espectrofotométrico para a determinação simultânea de febuxostate e ketorolac (AINES) em matéria-prima e produto acabado, utilizando para detecção os comprimentos de onda de 321 e 215 nm, respectivamente.

Sheth et al. (2012) desenvolveram método por espectrofotometria diferencial para determinação de febuxostate em comprimidos. Empregou-se como diluente metanol, que apresentaram máximos de absorção entre 260 nm e 315 nm, respectivamente, alternando entre absorbâncias positivas e negativas. A metodologia foi utilizada para estudo de dissolução de comprimidos de 40mg, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução, aparato 2 (pás) e rotação de 75 rpm, e temperatura de 37±0,5°C.

Dentre os métodos analíticos empregados para análise de fármacos pode-se citar a espectrofotometria com detecção na região do UV. Em virtude de sua simplicidade e custo relativamente baixo, este tem sido bastante utilizado. Porém, a cromatografia líquida (CL) se destaca entre os métodos atuais de análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos

acabados e amostras biológicas, pois apresenta resolução, precisão e exatidão significativas. É o método analítico amplamente utilizado, uma vez que, através da escolha adequada de colunas, fase móvel e método de detecção, possibilita a separação, quantificação e identificação de diferentes componentes de uma formulação (SWARTZ & KRULL, 1998).

O ensaio de dissolução é uma das ferramentas mais adequadas para se verificar o desempenho de um fármaco, sob a forma sólida, no que se refere à sua liberação a partir da forma farmacêutica (PITA et al., 2004). Atualmente, o teste de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais constitui-se em procedimento importante para a pesquisa, desenvolvimento, produção, controle e garantia da qualidade de formulações. Teste e perfil de dissolução detectam erros na fabricação de fármacos, pois asseguram a uniformidade e reprodutibilidade lote a lote, bem como avaliam a qualidade da formulação em função do tempo e condições de armazenagem durante o período de validade do medicamento. Os estudos de dissolução *in vitro* são essenciais para a avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações, considerando também parâmetros importantes como: fármaco e a formulação, equipamento, meio de dissolução, temperatura e o método analítico. Para fármacos que não possuem monografia oficial, existe necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos (MANADAS et al., 2002).

Justifica-se a preocupação de estudar modelos experimentais *in vitro* que possam avaliar quantitativamente e qualitativamente os efeitos das substâncias sobre o organismo humano, uma vez que, busca-se obter formulações mais seguras. Além disso, fornecer subsídios que reforcem o controle de qualidade de fármacos disponíveis no mercado (PINTO et al., 2000)

Nesse contexto, a validação de métodos analíticos é importante e se inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, materiais e operadores. Um processo de validação bem desenvolvido e registrado fornece dados e resultados de que o sistema e o método atendem às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005), entre os principais parâmetros avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, teste de adequabilidade do sistema, limite de detecção e limite de quantificação (ANVISA, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI et al. , 2004; ICH, 2005; DEJAEGHER; HEYDEN, 2007; SHABIR et al, 2007; USP, 2012; INJAC et al., 2008). A capacidade de um método analítico de separar, detectar e quantificar impurezas ou produtos de degradação são recomendados para avaliação de formulações farmacêuticas durante seu

desenvolvimento e controle de qualidade (SINGH; BAKSHI, 2002). Nesse contexto, estudos forçados e de especificidade devem ser realizados a fim de demonstrar a capacidade e garantir a adequabilidade do procedimento analítico. Recomendam-se a obtenção dos prováveis produtos de degradação através da avaliação da susceptibilidade da molécula sob estudo a condições de estresse como temperaturas elevadas, oxidação, fotólise e hidrólises em ampla faixa de pH (ICH, 1993; RAO; NAGARAJU, 2003; ICH, 2003; ICH, 2006; SHABIR et al., 2007).

É importante ressaltar que o febuxostate não está descrito em nenhuma farmacopéia e os trabalhos descritos na literatura para a análise quantitativa em produtos farmacêuticos estão incompletos, apresentando dados parcialmente validados ou apenas fazem parte de registros nacionais. Nesse sentido, o desenvolvimento e validação de novas metodologias, que aprimorem o controle da qualidade, representam contribuição significativa para a área de medicamentos.

A publicação científica efetuada no contexto da dissertação, que foi submetido à revista ACTA Chromatographica está anexada a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos na mesma.

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3.1 – DUARTE, M. B.; STAMM, F. P.; CALEGARI, G. Z.; FREITAS, G. W.; SOUTO, R. B.; WALTER, M. E.; DALMORA, S. L. Validation of Stability-indicating RP-LC Method for the Determination of Febuxostat in Pharmaceutical Formulations.

**Validation of Stability-indicating RP-LC Method for the Determination of
Febuxostat in Pharmaceutical Formulations**

Marlon Both Duarte^b, Fernanda Pavani Stamm^b, Guilherme Zanini Calegari^b,
Guilherme Weber de Freitas^a, Ricardo Bizogne Souto^b, Maurício Elesbão Walter^b
and Sérgio Luiz Dalmora^{a*}

^aDepartment of Industrial Pharmacy and

^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences,

Federal University of Santa Maria

97.105-900 – Santa Maria-RS, Brazil

*Corresponding author. Phone/fax: + 55 (55) 3220 8952.
E-mail address: dalmorasl@gmail.com

Summary. Febuxostat is a novel non purine drug indicated for the treatment of hyperuricemia in gout. A reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the determination of febuxostat in pharmaceutical dosage forms. The LC method was carried out on a XTerra C18 column (150 mm x 3.9 mm i.d.), maintained at 25°C. The mobile phase consisted of water (pH 3.5) – acetonitrile (40:60, v/v), run at a flow rate of 0.8 mL/min and using photodiode array (PDA) detection at 316 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time of 3.9 min, and was linear over the range of 0.25 - 30 µg/mL ($r^2 = 0.9995$). The specificity and stability-indicating capability of the method was proven through degradation studies and showing also, that there was no interference of the excipients. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of the degraded products showed significant differences ($p < 0.05$). The accuracy was 100.54% with bias lower than 0.65%. The limits of detection and quantitation were 0.08 and 0.25 µg/mL, respectively. Moreover, method validation demonstrated acceptable results for precision, sensitivity and robustness. The proposed method was applied for dissolution studies, and the analysis of tablet dosage forms, contributing to assure the safety and therapeutic efficacy.

Key Words: Febuxostat, Hyperuricemia, Reversed-phase liquid chromatography, Stability-indicating, Cytotoxicity, Validation

Introduction

Febuxostat (TEI-6720) is a novel potent non-purine, selective inhibitor of xantine oxidase (XO), orally administered that is indicated for the treatment of hyperurcaemia in patients with gout [1,2].

Febuxostat (2-(3-cyano-4-(2-methylpropoxy)phenyl-4-methylthiazole-5-carboxylic acid (*Fig. 1*), is a novel non-purine with a empirical formula $C_{16}H_{16}N_2O_3S$, and molecular weight of 316. It is a weak acid with $pK_a = 3.42$. Is a potent inhibitor of both the oxidized and reduced forms of XO, that catalysis the last two steps of purine catabolism in humans: the oxidation of hypoxanthine to XO and of XO to uric acid, and this may account for the greater potency and longer lasting hypouricemic activity compared to the existing drugs. This mechanism is mediated by high affinity binding to the enzyme in a molecular channel leading to the molybdenum-pterin active site. The binding of febuxostat of XO persists independent of the redox-state of the molybdenum cofactor and blocks substrate access to the active site [3]. After oral administration, is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract [4,5].

Fig. 1

A gradient RP-LC-MS/MS method using C_{18} column and detection at 315 nm was applied to identify impurities profile of synthetic febuxostat active pharmaceutical ingredient (API), with mobile phases of 0.01 M aqueous ammonium acetate pH 3.5 and acetonitrile [6]. An isocratic UPLC method was validated for the forced degradation studies only for febuxostat API, using a C_{18} column and mobile phase of ammonium acetate buffer pH 4.5 and acetonitrile [7]. Bioavailability and pharmacokinetic studies of febuxostat were performed by isocratic RP-LC method

with fluorescence detection at 320-380 nm, using a C₁₈ column and mobile phase composed of 0.032% glacial acetic acid in water:acetonitrile (55:45, v/v) with the sensitivity of 0.01 µg mL⁻¹[8]. A LC-MS/MS using C₁₈ column and acetonitrile-5 mM ammonium acetate-formic acid (85:15:0.015, v/v/v) as the mobile phase, and with positive ion electrospray ionization mode was validated for the determination of febuxostat in human plasma with the sensitivity of 10.0 ng mL⁻¹[9].

Development and validation of stability-indicating methods, using the approach of stress testing as determined by the ICH guideline [10], is highly recommended for the quantitative analysis of pharmaceutical formulations and must be able to resolve from its potential impurities and degradation products, and validated as recommended [11,12]. Febuxostat is approved by FDA and EMA, but at the moment, is not described in any Pharmacopoeia.

The aim of this research was to validate a stability-indicating RP-LC method for the quantitative analysis of febuxostat in tablet dosage forms, and to evaluate the degraded products by mass spectrometry and *in vitro* cytotoxicity test, contributing to the development of methods to monitor stability and thereby to assure the quality, safety and therapeutic efficacy.

Experimental

Chemical and reagents

Febuxostat reference substance was purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK). A total of seven batches of Uloric[®] (Takeda Pharmaceuticals, North America, USA) tablets containing 40 and 80 mg of febuxostat were obtained from commercial sources within their shelf life period and were identified by Arabic numbers from 1 to 7. HPLC-grade acetonitrile was obtained from (Tedia, Fairfield, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, USA).

Apparatus

A Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used equipped with a SCL-10A_{VP} system controller, LC-10 AD_{VP} pump, DGU-14A degasser, CTO-10A_{VP} column oven, SIL-10AD_{VP} autosampler and a SPD-M10A_{VP} photodiode array (PDA) detector. The detector was set at 316 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.12 software program.

The MS experiments were performed on a triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK), model Quattro LC, equipped with an electrospray ionization (ESI) source in positive mode, set up in scan mode, using a Masslynx (v 3.5) software program. A syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA, USA) was used to infuse the samples.

Preparation of reference solution

The stock solution of febuxostat was prepared by weighing 10 mg of the reference substance, transferred to individual 25 mL volumetric flask and diluted to volume with acetonitrile, obtaining a concentration of 0.4 mg mL^{-1} . The stock solution was stored at 2-8 °C protected from light, and daily diluted to $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ in mobile phase.

Preparation of sample solutions

To prepare the sample solution, tablets containing 40 and 80 mg of febuxostat were accurately weighed and crushed to a fine powder. An appropriated amount was transferred into an individual volumetric flask, diluted to volume with acetonitrile, and filtered through a $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ membrane filter (Millipore, Bedford, USA), obtaining the final concentration of 0.4 mg mL^{-1} of the active pharmaceutical ingredient. This solution was stored at 2-8 °C protected from light, and daily diluted to $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ in mobile phase.

RP-LC method

The experiments were performed on a reversed-phase Waters (Dublin, Ireland) XTerra C₁₈ column (150 mm x 3.9 mm i.d., with a particle size of $5 \text{ } \mu\text{m}$ and pore size of 100 \AA). The LC system was operated isocratically at 25 °C using a mobile phase of water (pH 3.5) - acetonitrile (40:60, v/v). This was filtered through a $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ membrane filter (Millipore, Bedford, USA) and run at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} . The injection volume was $20 \text{ } \mu\text{L}$ for both standard and samples. Other columns

tested: Gemini C₁₈ (150 mm x 3.0 mm i.d., 5 µm, 110 Å) (Phenomenex ,Torrance, USA); ACE (150 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm, 100 Å) (ACT, Aberdeen, Scotland), Symmetry C₁₈ (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm, 100 Å) (Waters, Dublin, Ireland); Jupiter C₁₈ (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm, 300 Å) (Phenomenex ,Torrance, USA); Shim-pack CLC-ODS C₁₈ (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm, 120 Å) (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Mass spectrometry method

The mass spectrometer conditions were optimized with direct injection of febuxostat reference solution (20000 ng mL⁻¹) into the system. The best response was obtained with electrospray capillary potential of 3.0 kV, cone voltage of 30 V, RF lens voltage of 0.5 V, source temperature of 110 °C, and ESI probe temperature of 350 °C, respectively. Before the analysis, the samples were diluted to 20000 ng mL⁻¹ in acetonitrile:water (60:40, v/v), and introduced into the mass spectrometer by direct infusion at 35 µL min⁻¹. The mass spectrometry data were acquired in the m/z range between 10 and 500 amu.

***In vitro* cytotoxicity test**

The *in vitro* cytotoxicity method was performed as described elsewhere [13], based on the neutral red uptake (NRU) assay, with the exposure of NCTC clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC number CCL-1) to the degraded samples of febuxostat. The pH of the samples was adjusted to 7.0, and the positive and diluent controls, together with the febuxostat reference solution were included in the assay. The NRU assay was performed on the 96-well microplate, maintained at 37 °C in a

5% CO₂ incubator for 24 h, with the cell suspension having a density of about 2×10^5 cells mL⁻¹. The neutral red released was evaluated by the addition of extractant solution, and the absorbance measured at 540 nm using a microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

Validation of the RP-LC method

The method was validated using samples of pharmaceutical formulations with the label claim of 40 mg by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and robustness, following the ICH guidelines [12].

Specificity

Specificity is the ability of the method to measure the analyte response in the presence of its potential impurities [11]. The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting sample solution (0.4 mg mL⁻¹) to accelerated degradation by acidic, basic, neutral, oxidative, and photolytic conditions to evaluate the interference in the quantitation of febuxostat. After the procedures, the samples were diluted in mobile phase to a final concentration of 20 µg mL⁻¹. A sample solution prepared in 1 M hydrochloric acid was used for the acidic hydrolysis, and a sample solution in 0.1 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation. The solutions were refluxed at 100 °C for 60 min and 15 min, respectively, cooled and neutralized with acid or base, as necessary. For the study under neutral condition, the sample solution was diluted in acetonitrile and heated at 80 °C for 2 h. Oxidative degradation was induced by exposing the samples to 20% H₂O₂ for 24 h. Photodegradation was induced by exposing the samples to 200 watt hours/square meter of near ultraviolet light for 2 h. The pH 7.0 was adjusted for the analysis and the samples were diluted

with the mobile phase to a final concentration of $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. The interference of the excipients of the pharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only placebo added with febuxostat at a concentration of $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Then, the stability-indicating capability of the method was established by determining the peak purity of febuxostat in the degraded samples using a PDA detector. Additionally, the febuxostat reference substance and the degraded samples were evaluated by the *in vitro* cytotoxicity test.

Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves, each one with eight reference substance concentrations of febuxostat, including the LOQ, in the range of $0.25 - 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ prepared in mobile phase. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 30 min with the mobile phase flowing through the system. Three replicates of $20 \mu\text{L}$ injections of the reference solutions were made to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of febuxostat to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and determination coefficient.

Precision and accuracy

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of the same concentration sample of febuxostat, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on

three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was evaluated by the recovery of known amounts of the reference substance added to sample solution to obtain solutions at concentrations of 16, 20, and 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation and also expressed as the percentage relative error (bias %) between the measured mean concentrations and added concentrations.

Limit of detection and limit of quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH [12], using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness was determined by analyzing the same samples ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) under a variety of conditions of the method parameters, such as: flow rate, percent of acetonitrile, pH of buffer in mobile phase, temperature and different columns. To assess the stability of sample solutions of febuxostat, the samples were tested maintained for 48 h at 2-8 $^{\circ}\text{C}$ and also placed

into the autosampler for 24 h at room temperature. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

System suitability test

The system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and repeatability of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference solution containing $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of febuxostat. The parameters measured were peak area, retention time, theoretical plates and tailing factor (peak symmetry).

Analysis of pharmaceutical tablet dosage forms

For the quantitation of febuxostat in the pharmaceutical dosage forms, twenty tablets containing 40 and 80 mg of febuxostat were separated, accurately weighed and crushed to a fine powder. An appropriate amount of the tablet dosage form was transferred into an individual volumetric flask, diluted to volume with acetonitrile and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter (Millipore, Bedford, USA), obtaining the final concentration of 0.4 mg mL^{-1} of febuxostat (stock solution). For the analysis, the stock solution of each batch was diluted to appropriate concentration with mobile phase, injected in triplicate and the percentage recoveries of the drug per tablet calculated against the respective reference substance.

Results and discussion

Optimization of chromatographic conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time. Acetonitrile and methanol were tested as organic solvent, in different composition mixtures with water. Acetonitrile with 0.01M ammonium acetate buffer pH 3.5 and 4.5 (70:30 v/v) showed sensitivity and lower retention time, but with peak impurity for the pharmaceutical formulation. The composition of water-acetonitrile (40:60, v/v) was selected due to peak symmetry (about 1.16), separation time of the API and their degraded products, and excipients of the pharmaceutical formulation, with appropriate sensitivity and higher peak purity. For the selection of the best wavelength detection a PDA detector was used. Columns from different sources were evaluated, selecting the XTerra C₁₈ analytical column as it provides the best chromatographic performance. The optimized conditions of the LC method were validated for the analysis of febuxostat in pharmaceutical dosage forms.

A typical chromatogram obtained by the proposed RP-LC method, demonstrating the resolution of the symmetrical peak corresponding to febuxostat is shown in *Fig. 2a,b*. The retention time of (3.9 min) was adjusted to allow the determination of the drug and the degradation products, without interference in the peak purity, which is suitable for quality control laboratories.

Method validation

A stability-indicating method is defined as an analytical procedure that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients or other potential impurities [14] as shown in *Fig. 2*. Under the acidic conditions, a significant decrease of the area was observed, with an additional peak eluting at 2.0 min. The basic condition exhibited decrease of the area, and only one peak was detected at 0.9 min. The neutral condition resulted in decrease of the area without any additional peak, indicating that the degradation products were not detected by UV. Under the oxidative condition febusostat content exhibited significant decrease of the area with an additional peak at 2.0 min. The photolytic condition showed significant decrease of the area with an additional peak at 0.8 min. Previous results obtained using API showed degradation only for the basic condition [7]. The studies with the PDA detector showed that the febusostat peak was free from any coeluting peak, with values of peak purity index higher than 0.9999, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of febusostat in pharmaceutical formulations.

Fig. 2

The febusostat reference substance and degradation samples were also analysed by MS, with electrospray ionization in the positive mode. MS spectra resulted in the identification of one degraded product in the acid, basic, photolytic and oxidation conditions, with the m/z values of 70, 91, 102 and 143, respectively, as shown in *Fig. 3*. Besides, evaluation of the main peak from RP-LC method showed the m/z of 318, attributable to febusostat.

Fig. 3

The analytical curves constructed for febuxostat were found to be linear over the range of 0.25 – 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The value of the determination coefficient calculated ($r^2 = 0.9995$), $y = (116772.33 \pm 4061.42) x + (1359.40 \pm 3315.60)$, where, x is concentration and y is the peak absolute area) indicated the linearity of the analytical curve for the method. Moreover, the relative standard error of slope can be used as a parameter with respect to the precision of the regression, as a general acceptance criterion for the linearity performance of the analytical procedure [12].

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of the concentration of 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and the value obtained was 0.39%.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-day); the mean values obtained were 100.61 and 100.70% with RSD 0.57 and 0.62%, respectively. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by three analysts; the values were found to be 100.53 and 100.82% with RSD 1.12 and 0.76%, respectively. The results are shown in *Table I*.

Table I

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 16, 20 and 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ giving concentrations of 16.10, 20.08 and 24.14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, with RSD lower than 0.58% (*Table II*). The recoveries obtained for febuxostat with a mean value of 100.54% and bias lower than 0.65%, demonstrated that the method is accurate within the desired range.

Table II

For the calculation of the LOD and LOQ, a calibration equation, $y = 116772.33x + 1359.40$, was generated by using the mean values of the three independent analytical curves. The LOD and LOQ were obtained by using the mean of the slope, 116772.33 ± 4061.42 , and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as 3315.60. The LOD and LOQ calculated were 0.08 and $0.28 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with the precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$, was found to be $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

The robustness of the analytical procedure [15, 16] was determined by analyzing samples containing $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ in triplicate, by the one-variable-at-a-time (OVAT) approach. The results and the experimental range of the selected variables, evaluated are given in *Table III*, together with the optimized values. Additionally, the robustness was also evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT) approach [16] at three levels (1 unit per parameter up or down around optimized values). The results for the OVAT and MVAT procedures were within the acceptable deviation ($\text{RSD} < 2\%$), and an analysis of the variance showed non-significant differences ($p > 0.05$) for the dosage of the sample solutions. The analysis performed with a wider level of variations of the pH, acetonitrile percentage and flow rate, showed changes of the retention time related to the optimized conditions. Moreover, the peak symmetry values were also evaluated showing non-significant differences ($p > 0.05$).

The stability of reference and sample solutions was assessed after storage for 48 h at 2-8 °C, and also placed in to an autosampler for 24 h at room temperature, showing non-significant changes ($< 2\%$), relative to freshly prepared samples, as recommended [11].

Table III

A system suitability test was performed and the RSD values calculated for the retention time, tailing factor and peak area were 0.48, 0.33 and 0.27%, respectively. The number of theoretical plates was about 4535, with RSD of 0.95%. The experimental results show that the parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the system is suitable for the analysis intended.

Cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity test of the degraded forms related to the intact molecule was performed trying to detect some possible effects resulting from the instability of the samples during storage. However, when subjected to degradation, such as acid, basic hydrolysis, oxidative photodegradation and neutral conditions, increased toxicity was detected with $IC_{50} = 16.13 \mu\text{g mL}^{-1}$, $19.43 \mu\text{g mL}^{-1}$, $47.65 \mu\text{g mL}^{-1}$, $63.76 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $64.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, showing significant differences ($p < 0.05$) related to the intact molecule with mean $IC_{50} = 68.03 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Method application

The validated RP-LC method was applied for the determination of febuxostat in tablet dosage forms, without prior separation of the excipients of the formulation, as shown in *Table IV*. The results obtained for the pharmaceutical formulations were in accordance with the label claim, between 96.30 and 104.57%. In addition a dissolution test was developed for tablet dosage forms ($n = 12$), using USP apparatus 2, 75 rpm rotation speed, and 900 mL of deaerated water with 0.5% sodium lauryl sulphate at pH = 6.8 (adjusted with 85% o-phosphoric acid), as

dissolution medium. The percentage of febuxostat released was quantified by the RP-LC method showing dissolution greater than 86% at 15 and 30 min, with CV < 0.64%, meeting the specifications [17]. Moreover the method was also successfully applied for the determination of febuxostat in human plasma with the liquid liquid extraction conditions validated with the LLOQ of 1 µg/mL. Tablets were also subjected to the physicochemical tests of weight variation, disintegration, hardness and friability, meeting specifications.

Table IV

Conclusions

The results of the validation studies show that the RP-LC method is specific, stability-indicating, accurate, and possess significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients and degraded products, as demonstrated also by MS studies. Therefore, the proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of febuxostat in pharmaceutical dosage forms, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy.

Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Project 306898/2011-0, for the support.

References

- [1] H. R. J. R. Schumacher, M. A. Becker, E. Lloyd, P. A. Macdonald, C. Lademacher, *Rheumatology*, **48**, 188 (2009)
- [2] C. L. Gray, N. E. Walters-Smith, *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, **68**, 389 (2011)
- [3] Y. Takano, Y. Hase-Aoki, H. Horiuchi, L. Zhao, Y. Kasahara, S. Kondo, M. A. Becker, *Life Sci.*, **76**, 1835 (2005)
- [4] R. Khosravan, B. A. Grabowski, J. T. Wu, N. Joseph-Ridge, L. Vernillet, *Clin. Pharmacokinet.*, **45**, 821 (2006)
- [5] R. Khosravan, B. Grabowski, J. T. Wu, N. Joseph-Ridge, L. Vernillet, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **65**, 355 (2007)
- [6] M. H. Kadivar, P. K. Sinha, D. Kushwah, P. Jana, H. Sharma, A. Bapodra, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **56**, 749 (2011)
- [7] K. Sahu, M. Shaharyar, A. A. Siddiqui, *Med. Chem. Res.*, **22**, 1641 (2013)
- [8] B. A. Grabowski, R. Khosravan, L. Vernillet, D. J. Mulford, *J. Clin. Pharmacol.*, **51**, 189 (2011)
- [9] H. Wang, P. Deng, X. Chen, L. Guo, D. Zhong, *Biomed. Chromatogr.*, **27**, 34 (2013)
- [10] ICH; *Stability testing of new drugs substance and products Q1A(R2)*; International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Geneva, 2003.
- [11] G. A. Shabir, *J. Chromatogr. A.*, **987**, 57 (2003)
- [12] ICH; *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*; International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Geneva, 2005.

- [13] D. R. Nogueira, M. S. Sangoi, M. L. Silva, V. Todeschini, S. L. Dalmora, J. Sep. Sci., [31](#), 3098 (2008)
- [14] K. M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T. D. Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, Adv. Drug Deliv. Rev., **59**, 29 (2007)
- [15] B. Dejaegher, Y. V. Heyden, J. Chromatogr. A., **1158**, 138 (2007)
- [16] R. Injac, M. Boskovic, N. Kocevar, T. Vovk, Anal. Chim. Acta., **620**, 150 (2008)
- [17] United States Food and Drug Administration (US-FDA); Guidance for Industry, Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, 1997.

Table I. Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for febuxostat in samples of pharmaceutical formulation

| Sample | Inter-days | | | Between-analysts | | |
|--------|------------|---------------------------|----------------------|------------------|---------------------------|----------------------|
| | Day | Recovery ^a (%) | RSD ^b (%) | Analysts | Recovery ^a (%) | RSD ^b (%) |
| 1 | 1 | 101.25 | 0.57 | A | 101.74 | 1.12 |
| | 2 | 100.44 | | B | 100.35 | |
| | 3 | 100.14 | | C | 99.50 | |
| 2 | 1 | 101.35 | 0.62 | A | 101.40 | 0.76 |
| | 2 | 100.09 | | B | 99.95 | |
| | 3 | 100.67 | | C | 101.10 | |

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

Table II. Accuracy of RP-LC for febuxostat in the formulations

| Nominal concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Mean concentration measured ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | RSD ^b (%) | Accuracy (%) | Bias ^c (%) |
|--|---|-------------------------|-----------------|--------------------------|
| 16 | 16.10 | 0.58 | 100.65 | 0.65 |
| 20 | 20.08 | 0.37 | 100.40 | 0.40 |
| 24 | 24.14 | 0.27 | 100.58 | 0.58 |

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

^cBias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

Table III. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure

| Variable | Range investigated | Febuxostat ^a (%) | RSD ^b (%) | Optimized value |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------|
| Mobile phase pH | 3.3 | 98.30 | 0.63 | 3.5 |
| | 3.5 | 100.28 | 0.37 | |
| | 3.7 | 99.52 | 0.71 | |
| Acetonitrile (%) | 58 | 98.70 | 0.54 | 60 |
| | 60 | 99.88 | 0.32 | |
| | 62 | 101.52 | 0.52 | |
| Flow rate (mL min ⁻¹) | 0.6 | 98.78 | 0.64 | 0.8 |
| | 0.8 | 100.23 | 0.26 | |
| | 1.0 | 99.07 | 0.70 | |
| Solution stability | Autosampler 24 h | 100.19 | 0.67 | - |
| | 2-8 °C 24 h | 99.98 | 0.24 | - |
| | 2-8 °C 48 h | 98.48 | 0.49 | - |
| Wavelength (nm) | 210-320 | - | - | 316 |

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

Table IV. Determination of febuxostat in pharmaceutical dosage forms by the RP-LC method

| Theoretical amount | | | Experimental amount | |
|--------------------|---------------|-------|---------------------|----------------------|
| Sample | mg per tablet | mg | Recovery (%) | RSD ^b (%) |
| 1 | 40 | 39.77 | 99.42 | 0.76 |
| 2 | 40 | 36.61 | 97.10 | 0.84 |
| 3 | 40 | 41.26 | 103.15 | 0.88 |
| 4 | 40 | 41.74 | 103.36 | 0.35 |
| 5 | 40 | 36.34 | 96.30 | 0.94 |
| 6 | 40 | 39.75 | 99.38 | 0.81 |
| 7 | 80 | 81.26 | 104.57 | 0.15 |

^a Mean of three replicates

^b RSD = Relative standard deviation

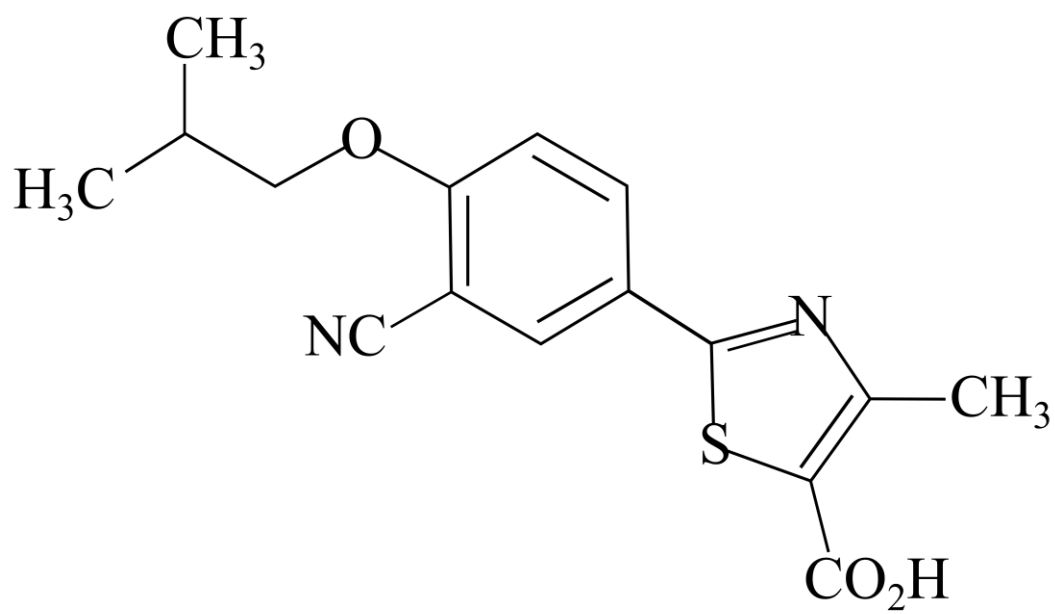
Fig. 1.

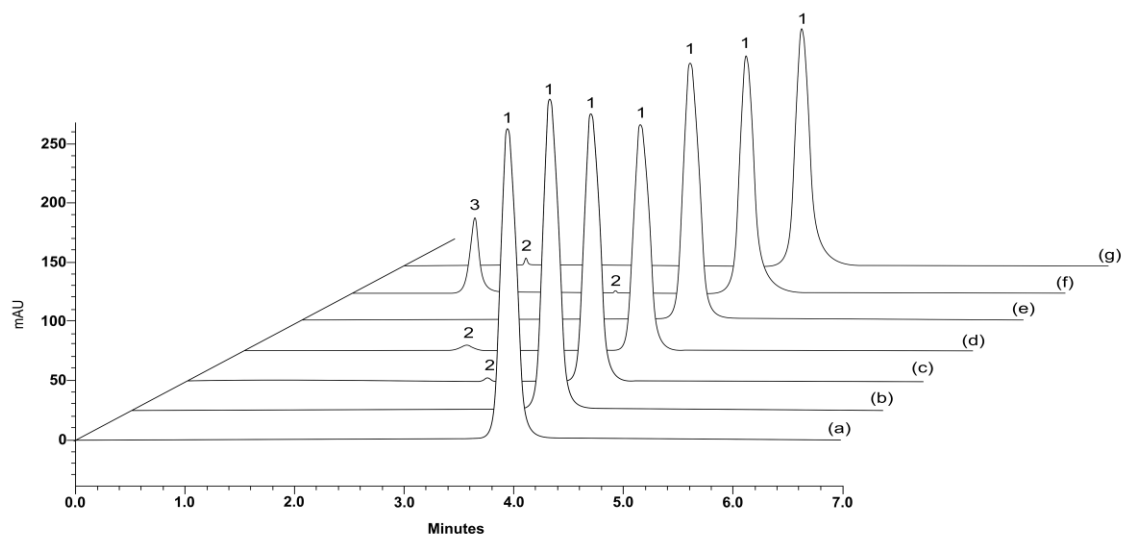
Fig. 2.

Fig. 3.

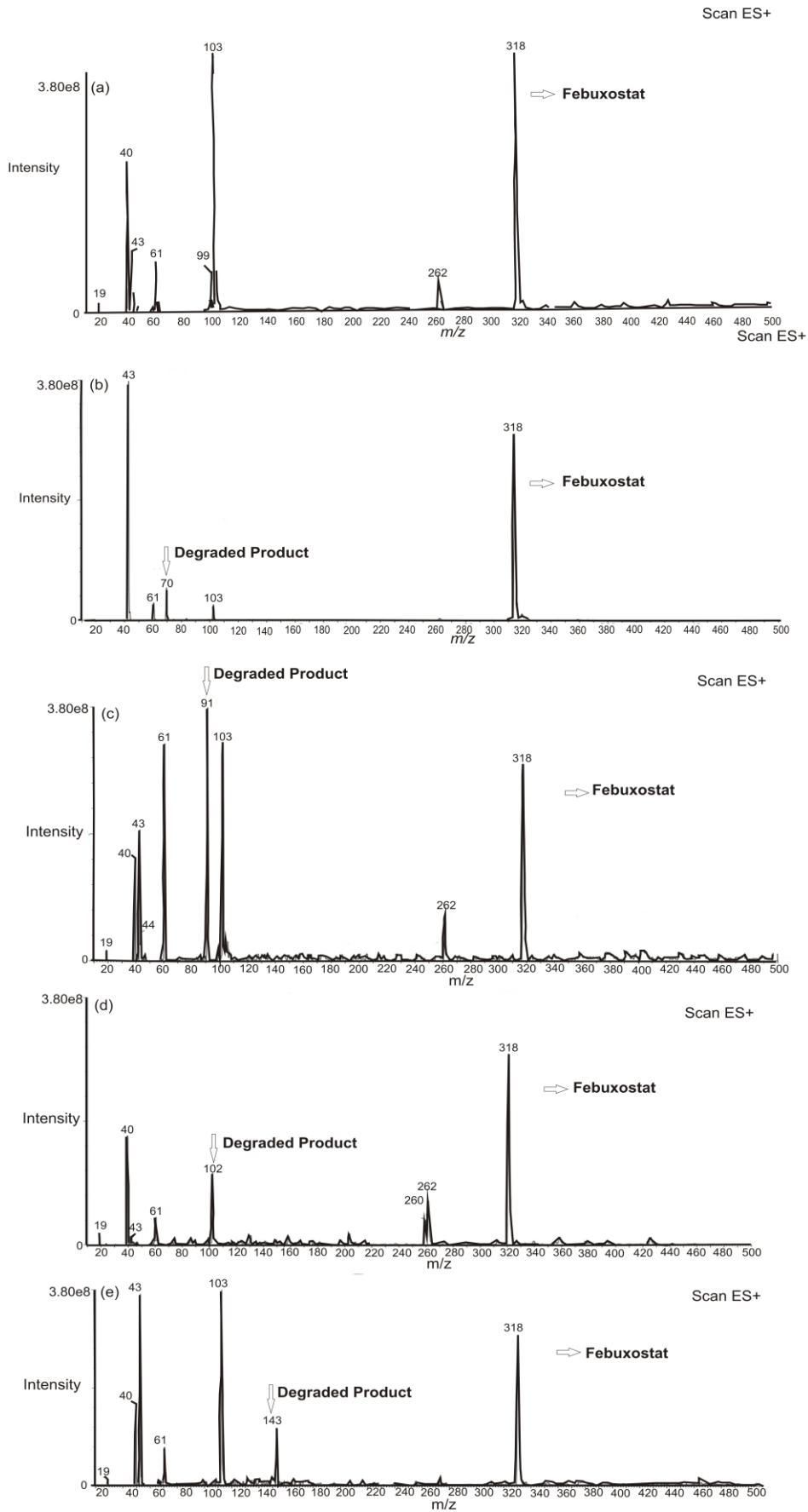


Figure Captions:

Fig. 1. Chemical structure of febuxostat

Fig. 2. RP-LC chromatograms of febuxostat ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). (a) Febuxostat reference solution: peak 1 = febuxostat. (b) Febuxostat sample solution: peak 1 = febuxostat. (c) After acidic hydrolysis: peak 1 = febuxostat, peak 2 = degraded form. (d) After basic hydrolysis: peak 1 = febuxostat, peak 2 = degraded form. (e) After neutral conditions: peak 1 = febuxostat. (f) After oxidation: peak 1 = febuxostat, peak 2 = degraded form, peak 3 = hydrogen peroxide. (g) After exposition to UV light: peak 1 = febuxostat, peak 2 = photodegraded forms

Fig. 3. The full scan MS spectra of febuxostat. (a) febuxostat reference substance solution, and after: (b) acidic condition: degraded product = m/z 70; (c) basic condition: degraded product = m/z 91; (d) exposition to UV light: degraded product = m/z 102; (e) oxidation condition: degraded product = m/z 143. Febuxostat = m/z 318

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A análise da matéria-prima e do produto farmacêutico acabado é importante para assegurar a qualidade e eficácia terapêutica. O febuxostate foi lançado 2008 e 2009 e encontra-se em uso clínico. Os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, estudos de dissolução e análises de fármacos, tanto em produtos farmacêuticos quanto em matrizes biológicas. Nesse sentido, avançou-se para o estudo de metodologias de acordo com as especificações descritas na literatura, necessárias para o controle da qualidade, estabelecendo bases científicas e tecnológicas para inclusão em compêndios oficiais da área (ICH, 1996; SHABIR, 2003).

Diversos parâmetros devem ser avaliados durante o desenvolvimento e validação de um método analítico de quantificação. Porém, também devem ser avaliadas características do método como simplicidade de execução, tempo necessário para realizar as análises, geração de resíduos e custos de materiais e equipamentos necessários. Dentre os métodos existentes, a CL é a técnica analítica mais utilizada para análises farmacêuticas, apresentando maior sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados e foi escolhida para a presente pesquisa.

Observa-se que a discussão apresentada a seguir baseia-se no artigo já submetido, e identificado como **ARTIGO 3.1**.

A CL possibilita a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros cromatográficos do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. Assim, desenvolveu-se e validou-se o procedimento para a determinação de febuxostate em formulações farmacêuticas, conforme preconizado na literatura (ICH, 2005). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

O método proposto empregou coluna cromatográfica C₁₈, de amplo uso em laboratórios de controle de qualidade, com base nas características estruturais do febuxostate. A fase móvel constituída por acetonitrila e água mostrou-se a mais adequada, proporcionando tempo de retenção reprodutível de, aproximadamente, 3,9 minutos, boa eficiência (pratos teóricos > 6000), seletividade e simetria (< 2%). Na avaliação da especificidade obtiveram-se cromatogramas nos quais os picos dos produtos de degradação encontraram-se bem resolvidos em relação ao pico do padrão (Figura 1), e sem interferência dos excipientes da formulação.

Além disso, utilizando o detector de arranjo de diodos (DAD), verificou-se que a substância química de referência (SQR) permaneceu com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando especificidade e que o procedimento também pode ser usado para avaliação da estabilidade.

O método apresentou regressão linear significativa $r^2 = 0,9995$, na faixa de concentração de 0,25 - 30 $\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 1,12% (Tabela 1), o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza coeficiente de variação menor ou igual a 2%. O valor médio experimental do teste de exatidão foi de 100,54%, demonstrando exatidão significativa, pois o valor percentual sugerido é de $100 \pm 2\%$ em relação ao declarado (SHABIR, 2003; SHABIR et al., 2007). Na avaliação da robustez, observou-se que as variações na proporção de acetonitrila, na vazão da fase móvel e nos valores de pH alteraram os tempos de retenção. Os resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico apresentaram CV% inferiores a 2%, mostrando que o equipamento e condições da metodologia são adequados para assegurar a exatidão e precisão dos dados analíticos (USP, 2012). Concluiu-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregado para análise de febuxostate. A determinação quantitativa dos comprimidos selecionados para esse estudo forneceu resultados médios entre 96,30 e 104,57%, conforme a tabela 4, estando de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados para produtos farmacêuticos entre 95 e 105% (USP, 2012).

Paralelamente, desenvolveu-se o teste de dissolução com base na baixa solubilidade em água, testando diferentes condições, meios e velocidades de rotação, até atingir a condição selecionada que apresentou o melhor perfil de liberação do fármaco. As condições otimizadas foram: 75 rpm (velocidade de rotação) e 900 mL de água desaerada com 0,5% de lauril sulfato de sódio a pH = 6,8 (ajustado com ácido orto-fosfórico 85%), como meio de dissolução, observando-se que não foram encontrados métodos neste sentido na literatura para avaliação do perfil de dissolução de febuxostate empregando a CL-FR. Avaliou-se a dissolução dos comprimidos ($n = 12$) e os perfis de dissolução mostraram percentagens de fármaco dissolvidas superiores a 86% em 15 e 30 minutos, valores considerados adequados conforme descrito na literatura (SHAH et al., 1995; FDA, 1997). Além disso, o método também foi aplicado com sucesso para a determinação de febuxostate em plasma humano com as condições de extração líquido-líquido validados com o LLOQ de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Acrescenta-se que há publicações sobre métodos de análise para o febuxostate, conforme descrito na revisão da literatura, com as devidas limitações. Neste sentido, além de publicados em revistas de menor impacto, com apresentação científica inadequada, observa-se que os resultados foram expressos em ppm ou somente com valores de áreas, sem cálculos estatísticos, estão descritos com erros para o desvio padrão e coeficiente de variação e as tabelas não têm identificação adequada, as figuras são repetitivas e formatadas inadequadamente. Os estudos de validação foram realizados parcialmente, mas sem avaliar interferência de excipientes, e os estudos de degradação incompletos, respectivamente (KRISHNAREDDY et al., 2012; LAKADE et al., 2012; MUVVALA et al., 2012; KUMAR et al., 2012; RAO et al., 2012; GHUNDA et al., 2012).

Observa-se também método estudado sem realizar estudo de degradação, mas testando impurezas, sem especificar a substância química de referência e as amostras usadas (REDDY; SEKHAR, 2012). Testado em laboratório (dado não-mostrado) observou-se baixo índice de pureza do pico principal no comprimento usado. Além disso, Annapurna et al., (2012), apresentaram os dados de área para os cálculos de precisão e não os teores, a robustez foi citada como média de três condições diferentes, e o comprimento de onda selecionado é inadequado pois a detecção no UV entre 200-224 nm, poderia apresentar interferência com solventes orgânicos, conforme citado por Kowalski et al., 2005.

Demonstrou-se, portanto, a importância e contribuição do método validado no presente trabalho, com suas vantagens, podendo ser aplicado para estudos de estabilidade, dissolução e controle da qualidade de produtos farmacêuticos.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método específico, sensível, preciso, exato e robusto por cromatografia líquida em fase reversa para identificação e análise quantitativa de febuxostate em produtos farmacêuticos, sugerindo sua aplicação para a área de controle da qualidade.
- ✓ Analisaram-se produtos de degradação da substância de referência, por espectrometria de massas, identificados pelas suas massas características.
- ✓ Realizaram-se estudos de citotoxicidade *in vitro* avaliando os efeitos das amostras degradadas em relação à molécula íntegra, demonstrando-se diferença significativa dos resultados ($P < 0,05$).
- ✓ Desenvolveu-se teste de dissolução, estudando as condições e avaliando a percentagem dissolvida dos comprimidos de febuxostate pelo método validado, demonstrando resultados superiores a 86% em 15 e 30 minutos.
- ✓ Concluí-se que o método estudado e validado representa contribuição no sentido de estabelecer metodologia analítica, aprimorar o controle da qualidade e garantir a segurança e eficácia terapêutica do produto farmacêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNAPURNA M, M.; KUMAR B, S. P.; MOHAPATRO, C.; NAGIREDDY, N. R. Stability-indicating liquid chromatographic method for the determination of febuxostat in pharmaceutical dosage form. **The Global Journal of Pharmaceutical Research**. v. 1, p. 677-688, 2012.

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.

ANZAI N, ICHIDA K, JUTABHA P, KIMURA T, BABU E, JIN CJ, SRIVASTAVA S, KITAMURA K, HISATOME I, ENDOU H, SAKURAI H: Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, p. 26834-26838, 2008.

BAGGA, P.; SALMAN, M.; SIDDIQUI, H. H.; ANSARI, A. M.; MEHMOOD, T.; SINGH, K. A simple UV spectrophotometric method for determination of febuxostat in bulk and pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v.2, p.2655-2659, 2011.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BECKER, M. A.; SCHUMACHER, H.R JR.; WORTMANN, R.L. Febuxostat, a novel non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase: a twenty-eight day, multicenter, phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response clinical trial examining safety and efficacy in patients with gout. **Arthritis & Rheumatism - American College of Rheumatology**. v.52, p.916-923, 2005a.

BECKER, M. A.; SCHUMACHER JR, H. R.; WORTMANN, R. L.; MACDONALD, P. A.; EUSTACE, D.; PALO, W.A.; STREIT, J.; JOSEPH-RIDGE, N. Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout. **The New England Journal of Medicine**. v. 353(23), p. 2450-2461, 2005b.

BIEBER, J. D.; TERKELTAUB, R.A. Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. **Arthritis Rheumatology**. v. 50, p. 2400-2414, 2004.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in vitro**. v. 2, p.1-6, 1988.

BORSTAD, G. C.; BRYANT, L. R.; ABEL, M. P.; SCROGGIE, D. A.; HARRIS, M. D.; ALLOWAY, J. A. Colchicine for prophylaxis of acute flares when initiating allopurinol for chronic gouty arthritis. **The Journal of Rheumatology**. v. 31, p. 2429-2432, 2004.

BRUCE, S. P. Febuxostat: a selective xanthine oxidase inhibitor for the treatment of hyperuricemia and gout. **The Annals of Pharmacotherapy**. v. 40, p. 2187-2194, 2006.

BRUTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

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

CHANDU, B. R.; KANALA, K.; HWISA, N. T.; KATAKAM, P.; KHAGGA, M. Bioequivalence and pharmacokinetic study of febuxostat in human plasma by using LC-MS/MS with liquid liquid extraction method. **SpringerPlus – a SpringerOpen Journal**. 2013.

CHOI, H. K. ; MOUNT, D. B. ; REGINATO, A. M. Pathogenesis of gout. **Annals of Internal Medicine**. v. 143, p. 499-516, 2005.

CRONSTEIN, B. N.; TERKELTAUB, R. The inflammatory process of gout and its treatment. **Arthritis Research & Therapy**. 8(Suppl 1):S3, 2006.

COOPER, N.; KHOSRAVAN, R.; ERDMANN, C.; FIENE, J.; LEE, J.W. Quantification of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human serum by HPLC for pharmacodynamic studies. **Journal of Chromatography B**. v. 837, p. 1-10, 2006.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography A**. v. 1158, p. 138-157, 2007.

DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas. 39^a ed. Rio de Janeiro: JBM, 2011.

EMA – **European Medicines Agency**, Evaluation of Medicines for Human Use, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Doc Ref: EMA/258531/ 2008.

ENDO H, ANZAI N: Urate transport across the apical membrane of renal proximal tubules. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**. v. 27, p. 578-584, 2008.
EUROPEAN Pharmacopoeia. 7. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011.

FALASCA, G. F. Metabolic diseases: gout. **Clinical Dermatology**. v. 24, p. 498-508, 2006.

FDA - **Food and Drug Administration**, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, January 2011.

FDA - **Food and Drug Administration**, Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, 1997.

GAFFO, A. L.; SAAG, K. G. Management of hyperuricemia and gout in CKD. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 52, p. 994-1009, 2008.

GRABOWSKI, B. A.; KHOSRAVAN, R.; VERNILLET, L.; MULFORD, D. J. Metabolism and excretion of [¹⁴C] febuxostat, a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase, in healthy male subjects. **Journal of Clinical Pharmacology**. v. 51, p. 189-201, 2011.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2. ed. Guanabara Koogan, 2009. cap. 47. p. 787-793.

GUNDA, A.; ARAVINDSAI, N.; TUPALLY, K. R.; KUMAR A, A. Estimation of febuxostat drug present in formulation by RP-HPLC. **Journal of Pharmacy Research**. v.5, p. 1224-1227, 2012.

HYON, K. C.; MOUNT, D. B.; REGINATO, A. M. Pathogenesis of Gout. **Annals of Internal Medicine**. v. 143, p. 499-516, 2005.

ICH - **International Conference on Harmonization: Q1A - Stability Testing of New Drug Substances and Products**, 1993.

ICH - **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of**

Pharmaceutical for Human use; Q 2B- validation of Analytical procedure: methodology, 1996.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Stability testing of new drugs substance and products Q1A(R2), p. 1-18, 2003.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), p. 1-13, 2005.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on impurities in new drug substances, 2006.

INJAC, R.; BOSKOVIC, M.; KOCEVAR, N.; VOVK, T. Comparative study of robustness between micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography using one-variable-at-a-time and a new multi-variable-at-a-time approach. **Analytica Chimica Acta**. v. 620, p. 150-161, 2008.

INN – International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances, WHO Drug information. v. 16(1), p. 81-112, 2002.

JANSSENS, H. J.; JANSSEN, M.; VAN DE LISDONK, E. H.; VAN RIEL, P. L.; VAN WEEL, C. Use of oral prednisolone or naproxen for the treatment of gout arthritis: a double-blind, randomized equivalence trial. **The Lancet**. v. 371, p. 1854-1860, 2008.

KADIVAR, H. K.; SINHA, P. K.; KUSHWAH, D.; JANA, P.; SHARMA, H.; BAPODRA, A. Study of impurity carryover and impurity profile in Febuxostat drug substance by LC-MS/MS technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 56, p. 749-757, 2011.

KHOSRAVAN, R.; MAYER, M. D.; WU, JT.; JOSEPH-RIDGE, N.; VERNILLET, L. Effect of concomitant administration of febuxostat and colchicine on pharmacokinetics of febuxostat and colchicine at steady state. **Arthritis Rheumatologic**. v. 52, p.102–103, 2005.

KHOSRAVAN, R.; GRABOWSKI, B. A.; WU, JT.; JOSEPH-RIDGE, N.; VERNILLET, L. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of febuxostat, a non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase, in a dose escalation study in healthy subjects. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 8, p. 821-841, 2006a.

KHOSRAVAN, R.; GRABOWSKI, B. A.; MAYER, M.D.; WU, JT.; JOSEPH-RIDGE, N.; VERNILLET, N. The effect of mild and moderate hepatic impairment on pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of febuxostat, a novel non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase. **The Journal of Clinical Pharmacology**. v. 46, p. 88-102, 2006b.

KHOSRAVAN, R.; WU, JT.; JOSEPH-RIDGE, N.; VERNILLET, L. Pharmacokinetic interactions of concomitant administration of febuxostat and NSAIDs. **The Journal of Clinical Pharmacology**. v. 46, p.855–866, 2006c.

KHOSRAVAN, R.; GRABOWSKI, B.; WU, JT.; JOSEPH-RIDGE, N.; VERNILLET, L. Effect of food or antacid on pharmacokinetics and pharmacodynamics of febuxostat in healthy subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 65, p. 355–363, 2007.

KOWALSKI, P.; KONIECZNA, L.; CHMIELEWSKA, A.; OLEDZKA, I.; PLENIS, A.; NIENIECKI, M.; LAMPARCZYK, H. Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, p. 983-989, 2005.

KRAMER, H. M.; CURHAN, G. The association between gout and nephrolithiasis: the National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-1994. **America Journal of Kidney Diseases**. v. 40, p. 37-42, 2002.

KRISHNAREDDY Y.; SUNDARAGANAPATHY R.; THANGADURAI S, A.; HEMANTH G.; JABULINGAM M.; NIRAIMATHI V. Development and validation of a new RP-HPLC method for estimation of febuxostat in bulk and marketed formulation. **Journal of Pharmacy Research**. v. 5, p. 3900-3903, 2012.

KUMAR, R. S.; KUMAR, B. V. V. R.; KUMAR, P. A. A RP-HPLC method development and validation for the estimation of febuxostat in bulk and pharmaceutical dosage forms. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 3, p. 205-208, 2012.

KUMARASWANY, G.; KUMAR, J. M. R.; SHESHAGIRIRAO, J. V. L. N. Simultaneous estimation of febuxostat and ketorolac in pharmaceutical formulations by spectroscopic method. **International Journal of Chemtech Research**. v. 4, p. 847-850, 2012.

LAKADE, S. H.; BHALEKAR, M. R. Development and validation of new spectrophotometric method for determination of febuxostat in tablets dosage forms. **Journal of Pharmacy Research**. v.4, p. 3122-3123, 2011.

LAKADE, S. H.; BHALEKAR M. R.; HARDE, M. T. Development and validated reverse phase HPLC method for the determination of febuxostat in bulk and formulation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 4, 2012.

LIEBMAN, S. E.; TAYLOR, J. G.; BUSHINSKY, D. A. Uric acid nephrolithiasis. **Current Rheumatology Reports**, v. 9, p. 251-257, 2007.

LOEB, J.N. The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. **Arthritis & Rheumatism - American College of Rheumatology**. v.15, p. 189-192, 1972.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, p. 375-399, 2002.

MAN, C. Y.; CHEUNG, I. T.; CAMERON, P. A.; RAINER, T. H. Comparison of oral prednisolone/paracetamol and oral indomethacin/paracetamol combination therapy in the treatment of acute goutlike arthritis: a double-blind, randomized, controlled trial. **Annals of Emergency Medicine**. v. 49, p. 670-677, 2007.

MANDEL, B. F. Clinical manifestations of hyperuricemia and gout. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. v. 75(Suppl 5), p. 5-8, 2008.

MANDLE, S. D.; BURADE, K. B. An improved stability-indicating HPLC method for febuxostate in bulk and pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Research**. v. 4, p. 1-10, 2013.

MARTINON F.; PÉTRILLI, V.; MAYOR, A.; TARDIVEL, A.; TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NLRP3 inflammasome. **Nature**. v. 440, p. 237-241, 2006.

MAYER, M. D.; KHOSRAVAN, R.; VERNILLET, L.; WU, JT.; JOSEPH-RIDGE, N.; MULFORD, D. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of febuxostat, a new non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase in subjects with renal impairment. **American Journal of Therapeutics**. v. 12, p. 22-34. 2005.

MIAO, H.; BRIAN, T. Febuxostat in the management of hyperuricemia and chronic gout: a review. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. p. 1209-1220, 2008.

MUVVALA, S. S.; RATNAKARAM, V. N.; NADENDLA, R. R. A validated RP-HPLC method for the estimation of febuxostat in bulk drugs. **International Journal of PharmaTech Research**, v. 4, p. 1358-1366, 2012.

OKAMOTO, K.; NISHINO, T. Crystal structures of mammalian xanthine oxidoreductase bound with various inhibitors: allopurinol, febuxostat, and FYX-051. **Journal of Nippon Medical School**. v.75, p. 2–3, 2008.

OSADA, Y.; TSUCHIMOTO, M.; FUKUSHIMA, H.; TAKAHASHI, K.; KONDO, S.; HASEGAWA, M.; KOMORIYA, K. Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents. **European Journal of Pharmacology**. v. 241, p. 183–188, 1993.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T.. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000.

PITA, N. O. G.; PRATES, E. C.; FERRAZ, H. G. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de ciprofloxacino 250 mg comercializados como similares no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 40, n. 3, jul./set., 2004.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 33, p. 335-377, 2003.

RAO, K. N.; GANAPATY, S.; RAO, L. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of febuxostat in bulk and tablet dosage form. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**. v. 2, p. 1104-1108, 2012.

REDDY, M. N. C.; SEKHAR, K. B. C. Estimation of related substances of febuxostat in bulk & 40/80/120 mg tablets by RP-HPLC. **International Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences**. v. 1, p.1-10, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUBIN, B.R.; BURTON, R.; NAVARRA, S.; ANTIGUA, J.; LONDOÑO, J.; PRYHUBER, K. G.; LUND, M.; CHEN, E.; NAJARIAN, D. K.; PETRUSCHKE, R. A.; OZTURK, Z. E.; GEBA, G. P. Efficacy and safety profile of treatment with etoricoxib 120 mg once daily compared with indomethacin 50 mg three times daily in acute gout: a randomized controlled trial. **Arthritis & Rheumatism - American College of Rheumatology**. v. 50, p. 598-606, 2004.

SABÁN-RUIZ, J.; ALONSO-PACHO, A.; FABREGATE-FUENTE, M.; DE LA PUERTA GONZÁLEZ-QUEVEDO, C. Xanthine oxidase inhibitor febuxostat as a novel agent postulated to act against vascular inflammation. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 94-103, 2013.

SAHU, K.; SHAHARYAR, M.; SIDDIQUI, A. A. Establishment of inherent stability of febuxostat and development of a validated stability-indicating method by UPLC according to ICH requirement. **Medicinal Chemistry Research**. DOI 10.1007/s00044-012-0160-5, 2012.

SINGH, S; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology On-Line**. 2000.

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, n.1, p.57-66, 2003.

SHABIR, G. A.; LOUGH, W. J.; ARAIN, S.A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 30, p. 311-333, 2007.

SHAH, V. P. et al. In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 125, p. 99-106, 1995.

SHETH, M. V.; JOSHI, S.; PATEL, M. Development and application of difference spectrophotometric method for determination of febuxostat in tablets. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 3, p. 1621-1624, 2012.

SHETH, M. V.; PANDYA, J. J. ICH guidance in practice: development of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay method for febuxostat and degradation kinetic in acid hydrolytic condition. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 4, p. 671-681, 2013.

SHOJI, A.; YAMANAKA, H.; KAMATANI, N. A retrospective study of the relationship between serum urate level and recurrent attacks of gouty arthritis: evidence for reduction of recurrent gouty arthritis with antihyperuricemic therapy. **Arthritis & Rheumatism**. v.51, p. 321-325, 2004.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. v. 2, p. 12-20, 1998.

TAKANO, Y.; HASE-AOKI, K.; HORIUCHI, H.; ZHAO, L.; KASAHARA, Y.; KONDO, S.; BECKER, M. A. Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. **Life Sciences**. v. 76, p. 1835–1847, 2005.

TERKELTAUB, R. Gout: fresh insights into an ancient disease. **Science & Medicine**. v. 3, p. 22-31, 1996.

TERKELTAUB, R. Gout: novel therapies for treatment of gout and hyperuricemia. **Arthritis Research & Therapy**. DOI 10.1186/ar2738, 2009.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 35 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2012.

USP Dictionary of USAN and International Drug Names. 37th ed. Rockville: United States Pharmacopeia, 2006.

VITART, V.; RUDAN, I.; HAYWARD, C.; GRAY, N. K.; FLOYD, J.; PALMER, C. N.; KNOTT, S. A.; KOLCIC, I.; POLASEK, O.; GRAESSLER, J.; WILSON, J. F.; MARINAKI, A.; RICHES, P. L.; SHU, X.; JANICIJEVIC, B.; SMOLEJ-NARANCIC, N.; GORGONI, B.; MORGAN, J.; CAMPBELL, S.; BILOGLAV, Z.; BARAC-LAUC, L.; PERICIC, M.; KLARIC, I. M.; ZGAGA, L.; SKARIC-JURIC, T.; WILD, S. H.; RICHARDSON, W. A.; HOHENSTEIN, P.; KIMBER, C. H.; TENESA, A.; DONNELLY, L. A.; FAIRBANKS, L. D.; ARINGER, M.; MCKEIGUE, P. M.; RALSTON, S. H.; MORRIS, A. D.; RUDAN, P.; HASTIE, N. D.; CAMPBELL, H.; WRIGHT, A. F. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. **Nature Genetics**. v. 40, p. 437-442, 2008.

ZHANG, W.; DOHERTY, M.; BARDIN, T.; PASCUAL, E.; BARSKOVA, V.; CONAGHAN, P.; GERSTER, J.; JACOBS, J.; LEEB, B.; LIOTÉ, F.; MCCARTHY, G.; NETTER, P.; NUKI, G.; PEREZ-RUIZ, F.; PIGNONE, A.; PIMENTÃO, J.; PUNZI, L.; RODDY, E.; UHLIG, T.; ZIMMERMANN-GÖRSKA, I. EULAR evidence based recommendations for gout. Part II: Management. Report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCSIT). **Annals Rheumatic Diseases**. v. 65, p. 1312-1324, 2006.

WANG, H.; DENG, P.; CHEN, X.; GUO, L.; ZHONG, D. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of febuxostat in human plasma. **Biomedical Chromatography**. DOI 10.1002/bmc.2744, 2012.