

**MÁRCIO CARDOSO PINTO**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO  
PARA QUANTIFICAÇÃO DE NIMESULIDA NO PLASMA HUMANO  
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

**Bragança Paulista - SP**

**2009**

**MÁRCIO CARDOSO PINTO**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO  
PARA QUANTIFICAÇÃO DE NIMESULIDA NO PLASMA HUMANO  
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

**ORIENTADORA**

Profa. Dra. Silvana A. Calafatti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Bragança Paulista – SP**

**2009**

QV 38  
P729d

Pinto, Márcio Cardoso.

Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação de Nimesulida no plasma humano utilizando cromatografia líquida de alta eficiência / Márcio Cardoso Pinto. -- Bragança Paulista, 2009.  
61 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação: Silvana Aparecida Calafatti.


1. Nimesulida. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Validação de método. 4. Equivalência terapêutica. I. Calafatti, Silvana Aparecida. II. Título.


Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de  
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.



PINTO, Márcio Cardoso. "Desenvolvimento de Método Analítico para Quantificação da Nimesulida no Plasma Humano Usando CLAE". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e nove de Junho de 2009 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Silvana Aparecida Calafatti - Orientadora e Presidente  
Universidade São Francisco

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Carlos Eduardo Pulz Araújo  
Universidade São Francisco

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Iara Lucia Tescarollo Dias  
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA: Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825  
CÂMPUS DE CAMPINAS: Rod. Gen. Milton Tavares de Lima, 1572 - CEP 13081-688 - Distrito de Barão Geraldo - Fone: (19) 3754-3300  
CÂMPUS DE ITATIBA: Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933  
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO: Rua Harroemann, 352 - Pari - CEP 03031-040. Fone: (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

## AGRADECIMENTOS

### A DEUS...

Aos meus avós, Sebastião (*in memoriam*) e Antônia (*in memoriam*) a quem devo minha educação;

À minha irmã, pessoa especial que está sempre ao meu lado;

À senhora Elsa Ito Rosa, que me incentivou a crescer;

Aos meus amigos, eternos companheiros, que sempre me ajudaram.

À Profa. Dra. Silvana A. Calafatti, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação e, sobretudo, pelo constante apoio e confiança demonstrado durante o desenvolvimento desta dissertação;

À Profa. Ms. Silvia Elisa Acedo Menin, pelo apoio e estímulo durante a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Iara Lúcia Tescarollo Dias, por tudo que tem me ajudado durante esta etapa da minha vida;

Ao Prof. José Antônio Garcia Sanches, pela contribuição à minha formação;

Ao Prof. Ms. Joaquim Gilberto de Oliveira, pela oportunidade concedida à minha pessoa;

A Profa. Dra. Aparecida Érica Bighetti, por tudo que tem me ajudado e incentivado a crescer;

Aos meus amigos João Batista de Souza e Benedito Carlos Leme, pela colaboração na realização deste trabalho;

Aos meus amigos de trabalho, Vagner, Dona Léo, Dona Nice, Jéssica, Héliida e Mariana;

A Claudete, Gisele, Amanda, Alexandre, Bete, Patrícia, Daniela e todas as outras pessoas da UNIFAG, por toda a ajuda durante o desenvolvimento prático do trabalho;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

# SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
III. OBJETIVO.....	17
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Material.....	18
4.2 Métodos.....	19
4.2.1 Generalidades.....	19
4.2.1.1 Preparo da fase móvel.....	20
4.2.1.2 Soluções padrão.....	20
4.2.1.2.1 Nimesulida.....	20
4.2.1.2.2 Tolazamida (PI).....	20
4.3 Desenvolvimento do método de análise da Nimesulida.....	21
4.4 Preparo das amostras de calibração e controle de qualidade.....	22
4.5 Obtenção da curva de calibração.....	22
4.6 Validação do método.....	23
4.7 Estudo de estabilidade do fármaco no fluido biológico.....	25
4.7.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....	25
4.7.2 Estabilidade de curta duração.....	26
4.7.3 Estabilidade das amostras de plasma não processada.....	26
4.7.4 Estabilidade das soluções padrão.....	26
4.7.4.1 Estabilidade da solução de Nimesulida em condições de temperatura e luz.....	26
4.7.5 Estabilidade de longa duração.....	27
4.8 Extração das amostras.....	27

4.8.1 Extração por precipitação.....	27
4.8.2 Extração líquido-líquido.....	28
4.9 Análise estatística.....	28
V. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
5.1 Avaliação da fase móvel.....	31
5.2 Extração das amostras.....	32
5.3 Especificidade do método.....	33
5.4 Curva de calibração.....	35
5.5 Precisão e exatidão do método.....	38
5.6 Estabilidade de Nimesulida no plasma humano.....	42
VI. CONCLUSÃO.....	54
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55



## LISTA DE ABREVIATURAS

A A	ácido araquidônico
AINE	antiinflamatório não-esteroidal
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COX	ciclooxigenase
COX-1	ciclooxigenase 1
COX-2	ciclooxigenase 2
CQA	controle de qualidade alto
CQB	controle de qualidade baixo
CQM	controle de qualidade médio
LQ	limite de quantificação
µg	micrograma
mL	mililitro
ng	nanograma
nm	nanômetro
PG	prostaglandina
PI	padrão interno
rpm	rotação por minuto
UV/Vis	ultravioleta/visível

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química da Nimesulida.....	6
<b>Figura 2:</b> Avaliação da fase móvel: cromatograma da Nimesulida 15 µg/mL e Tolazamida (p.i.) 100 µg/mL. Condições cromatográficas: coluna analítica Phenomenex®, Luna-CN (5,0 µm, 150 x 4,6 mm); fase móvel Tampão fosfato 0,05M, pH 5,5:Metanol:Acetonitrila (4:2,5:3,5, v/v/v); vazão 3,0 mL/min; detecção 258 nm.....	32
<b>Figura 3:</b> <b>A)</b> Plasma branco normal; cromatograma referente ao branco do analito e do padrão interno. <b>B)</b> Plasma branco hemolisado; cromatograma referente ao branco do analito e do padrão interno. <b>C)</b> Plasma branco lipêmico; cromatograma referente ao branco do analito e do padrão interno.....	34
<b>Figura 4:</b> <b>A)</b> Cromatograma referente à Solução de Nimesulida 200,0 ng/mL (LQ). <b>B)</b> Cromatograma referente à Solução de Tolazamida 100,0 µg/mL.....	35
<b>Figura 5:</b> Representação gráfica da curva de calibração da SQR da Nimesulida em plasma humano obtida por cromatografia líquida, na faixa de 200,0 a 15.000,0 ng/mL.....	38
<b>Figura 6a:</b> Cromatogramas da Nimesulida 15 µg/mL exposição a luz: (A) tempo zero, (B) tempo 2, (C) tempo 3 e (D) tempo 4. Condições cromatográficas: coluna analítica Phenomenex®, Luna-CN (5,0 µm, 150 x 4,6 mm); fase móvel Tampão fosfato 0,05M, pH 5,5:Metanol:Acetonitrila (4:2,5:3,5, v/v/v); vazão 3,0 mL/min; detecção 258 nm.....	50
<b>Figura 6b:</b> Cromatogramas da Nimesulida 15 µg/mL ao abrigo da luz: (E) tempo zero, (F) tempo 2, (G) tempo 3 e (HD) tempo 4. Condições cromatográficas: coluna analítica Phenomenex®, Luna-CN (5,0 µm, 150 x 4,6 mm); fase móvel Tampão fosfato 0,05M, pH 5,5:Metanol:Acetonitrila (4:2,5:3,5, v/v/v); vazão 3,0 mL/min; detecção 258 nm.....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros do método otimizado por cromatografia líquida.....	19
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros utilizados na validação.....	24
<b>Tabela 3:</b> Avaliação da composição da fase móvel.....	31
<b>Tabela 4:</b> Avaliação do solvente extrator.....	33
<b>Tabela 5:</b> Valores experimentais obtidos na determinação da linearidade do método bioanalítico para quantificação da Nimesulida no plasma por CLAE.....	37
<b>Tabela 6:</b> Determinação da precisão e exatidão intra-lote do método bioanalítico para quantificação da Nimesulida no plasma por CLAE.....	39
<b>Tabela 7:</b> Análise intralote da Nimesulida .....	40
<b>Tabela 8:</b> Análise intralote da Nimesulida.....	40
<b>Tabela 9:</b> Análise interlotes.....	41
<b>Tabela 10:</b> Determinação da estabilidade da Nimesulida em plasma submetida a ciclo de congelamento e degelo.....	43
<b>Tabela 11:</b> Determinação da estabilidade da Nimesulida em plasma submetida a ciclo de congelamento e degelo.....	43
<b>Tabela 12:</b> Determinação da estabilidade da Nimesulida em plasma submetida a ciclo de congelamento e degelo.....	44
<b>Tabela 13:</b> Médias e desvios obtidos no estudo de estabilidade da Nimesulida em plasma submetida à análise no autoinjeter.....	45
<b>Tabela 14:</b> Estabilidade de plasma dopado com solução padrão de Nimesulida, e variação entre as médias dos controles de qualidade para amostras em plasma mantidas à temperatura ambiente por 6 horas em relação às medias das amostras recém-preparadas.....	46
<b>Tabela 15:</b> Resultado das análises de estabilidade das soluções padrão de Nimesulida e Tolazamida.....	47
<b>Tabela 16:</b> Determinação da Nimesulida ao abrigo da luz e em condições	

normais..... 49

**Tabela 17:** Estabilidade de longa duração para a Nimesulida em fluido biológico e variação das médias dos controles de qualidade para as amostras de longa duração em relação às médias das amostras recém-preparadas..... 52

## RESUMO

Os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) fazem parte de um grupo de medicamentos extensamente comercializados em todo o mundo. Dentre estes agentes, destaca-se a Nimesulida uma potente droga antiinflamatória não-esteroidal, seletivo-inibidora da cicloxigenase-2 (COX-2), com propriedades antiinflamatórias, antipirética e analgésica.

O aumento na utilização de medicamentos genéricos no mercado brasileiro deu um grande impulso no estudo da bioequivalência, que consiste em avaliar a concentração do fármaco presente em líquidos biológicos. Sendo assim, desenvolveu-se um método analítico eficaz, confiável e apropriado para determinação quantitativa da Nimesulida em plasma humano utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação e quantificação. As razões para a popularidade do método é a sua sensibilidade e a fácil adaptação para determinações quantitativas.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um método analítico para quantificação da Nimesulida no plasma humano através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com detecção espectrofotométrica no UV/Vis em 258 nm. As corridas cromatográficas foram realizadas em coluna analítica Phenomenex<sup>®</sup> Luna-CN (5,0 µm, 150 x 4,6 mm) e fase móvel constituída por tampão fosfato (pH 5,5):metanol:acetonitrila (4,0:2,5:3,5, v/v/v). A extração foi líquido-líquido usando diclorometano como solvente extrator, foi usado pequeno volume de plasma (200 µL), e o padrão interno usado Tolazamida. A eficiência do processo de extração do método através da recuperação mostrou-se preciso e exato. O limite de quantificação da Nimesulida usado foi de 200,0 ng/mL com curva de calibração linear até 15.000,0 ng/mL. O volume de injeção foi de 20 µL com tempo total de corrida de 3 minutos.

Os testes realizados para avaliar a estabilidade do fármaco em plasma forneceram resultados dentro dos limites especificados, indicando que as

condições de manuseio e análise das amostras são adequadas.

O desenvolvimento do método envolveu avaliação e otimização de condições, incluiu etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação. Este método demonstrou ser rápido e sensível para determinações dos limites de concentrações plasmáticas, podendo ser aplicado em testes de bioequivalência.

## **ABSTRACT**

The non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most commercialized drugs in the world. The Nimesulide is a powerful non-steroidal anti-inflammatory drug, which acts as a selective inhibitor of the Cyclooxygenase 2 enzyme and is one of the most powerful antipyretic, anti-inflammatory and pain reliever drugs available.

As the usage of generic drugs increased, a great impulse was given to the study of the bioequivalence, the evaluation in the concentration of the active principles in biological liquids. Therefore, an efficient, appropriate and trustful analytical method was developed to determine the Nimesulide quantitatively in human plasma, the high-performance liquid chromatography.

A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method for determination of Nimesulide in human plasma has been developed. The chromatographic system uses a reversed-phase Luna-CN column with UV-Vis detection at 258 nm. Mobile-phase consisted of phosphate buffer (pH 5,5):methanol:acetonitrile (4,0:2,5:3,5, v/v/v) at a flow-rate of 3,0 mL/min. Liquid-liquid extraction using dichloromethane was employed and Tolazamide was used as an internal standart. Only 200  $\mu$ L of plasma are used for sample preparation and a 20  $\mu$ L aliquot was injected into the high-performance liquid chromatography column. The limit of quantitation is 200 ng/mL and the calibration curve is linear up to 15000 ng/mL. The run time was 3,0 min.

The high-performance liquid chromatography is the most used of all the analytical methods of separation and quantification of chemical substances. The reasons for the popularity of this method are its sensitivity and easy adaptation to the quantitative measurements. The evaluation of the method has involved evaluation and optimization of the conditions, including sample preparation, chromatographic separation, detection and quantification. The proposed method was applied to the determination of Nimesulide in plasma samples from the bioequivalence study.

## I. INTRODUÇÃO

O controle da dor e da inflamação é o objetivo dos mais primários na origem do homem. Ao se demonstrar a ação antipirética da salicina desde 1829, por Leraux, um longo caminho de pesquisa foi desencadeado e, em 1899, o ácido acetilsalicílico foi introduzido, na medicina, por Dresser, com o nome de aspirina, que se perpetuou com o passar dos anos (BRENOL; XAVIER; MARASCA, 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

Com a descoberta da aspirina, abriu-se um novo campo no combate à dor e à inflamação, possibilitando o surgimento, alguns anos depois, de um grupo variado de medicamentos com ações farmacológicas semelhantes ao da aspirina, definido como drogas antiinflamatórias não-esteróides (MOREIRA; CARVALHO, 2001).

Os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) estão entre os mais utilizados fármacos, sendo os agentes terapêuticos amplamente prescritos para tratamento de processos inflamatórios e dolorosos músculo-esqueléticos (RAO et al., 2005). Atualmente há mais de 50 AINEs diferentes no mercado global e esses agentes proporcionam alívio sintomático de dor e edema em artropatia crônica, como ocorre na osteoartrite, na artrite reumatóide e em afecções inflamatórias mais agudas, como traumas esportivos, fraturas, entorses e outras lesões das partes moles. Também proporcionam alívio nas dores pós-operatória, dentais, menstruais, cefaléias e enxaquecas (RANG et al., 2007). Entretanto, somente em 1971, John Vane descobriu que os AINEs inibiam a síntese de prostaglandinas, explicando assim suas atividades antiinflamatória, antipirética e analgésica. Sua ação antiinflamatória decorre da inibição de síntese de prostaglandinas, efetuadas mediante a inativação das ciclooxigenase constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2). A primeira é responsável pelos efeitos fisiológicos das prostaglandinas em sítios gástricos e renais. A segunda surge nos locais inflamatórios, reduzindo os efeitos adversos. As pesquisas têm sido direcionadas para a busca de representantes com maior seletividade pela ciclooxigenase 2 (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Desde a introdução da aspirina (ácido acetilsalicílico) no arsenal terapêutico dos processos inflamatórios, novas drogas têm sido desenvolvidas com o propósito de obterem-se antiinflamatórios com menos reações adversas e que possuam uma maior eficácia. Foram desenvolvidos vários antiinflamatórios não-esteróides, com estruturas químicas diversas, mas que apresentam propriedades terapêuticas semelhantes, pois atuam de modo não-seletivo sobre a



COX-1 e COX-2. Os primeiros fármacos seletivos surgiram na década de 1980, como Meloxicam, Etodolac, Nimesulida, entre outros (JUNIOR, 2006).

Apesar de a COX ter sido identificada há mais de 20 anos, maior progresso no entendimento de suas funções tem acontecido na última década. O impulso nas pesquisas advém do fato de os AINEs terem comprovado eficácia em diversas indicações terapêuticas, mas apresentarem importantes reações adversas, principalmente gastrointestinais (KUMMER; COELHO, 2002).

Quimicamente a Nimesulida é identificada como N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanosulfonamida um fármaco antiinflamatório inibidor seletivo da COX-2, sendo o primeiro industrializado com essas características. A Nimesulida foi sintetizada em 1976, pela Helsinn Chemical S.A., e existe no mercado brasileiro desde 1993 com diversas denominações e formas farmacêuticas (FALLAVENA; SCHAPOVAL, 2004).

A Nimesulida é um agente antiinflamatório não-esteroidal que difere dos demais compostos desta classe de inibidores seletivos pelo fato de exibir um caráter ácido em virtude do grupo químico sulfonilida, mostrando alta atividade antiinflamatória, antipirética e analgésica, baixa toxicidade, moderado incidente gástrico e alto índice terapêutico (PIEL et al., 1999).

A Nimesulida e o meloxicam mostram algum grau de inibição “preferencial” para COX-2 (KUMMER; COELHO, 2002). A ação da Nimesulida sobre a COX-1 é muito pequena, diminuindo o risco de lesões gastroduodenais quando comparada aos demais AINEs. É bem comprovada a preferência da Nimesulida pela COX-2, garantindo a sua eficácia e perfil de segurança frente a outros AINEs (KULKARNI, 2002).

Desde a introdução clínica dos inibidores seletivos da COX-2 foram realizados estudos sucessivos para avaliar seu potencial antiinflamatório e efeitos gastrointestinais como dor e desconforto epigástrico, sangramento gastrointestinal ocasional e úlcera gástrica ou intestinal, observando-se, porém, risco potencial de eventos adversos cardiovasculares, que fundamentaram a interrupção do uso terapêutico de alguns produtos da classe (JUNIOR, 2006).

A farmacodinâmica clínica e o potencial terapêutico da Nimesulida têm sido extensivamente estudados. O mecanismo de ação tem sido investigado e envolve interferentes com a produção/ação de mediadores (KHAKSA; UDUPA, 1999).

O aumento na utilização de medicamentos genéricos no mercado brasileiro deu um grande impulso no estudo da bioequivalência, cujo objetivo é avaliar se uma droga em duas ou mais formas farmacêuticas similares alcança a circulação sistêmica na mesma velocidade relativa; isto é, os perfis dos níveis plasmáticos da droga, obtidos com o uso de duas formas farmacêuticas, são similares, ou seja, que a nova droga tenha a mesma composição e eficácia dos medicamentos já existentes no mercado. O estudo da bioequivalência consiste em avaliar a concentração do fármaco ou droga presente em líquidos biológicos coletados ao longo do tempo (CHOW; LIU, 2000).

Além do aumento na utilização de medicamentos genéricos, os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos e bioanalíticos para determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, estudo de dissolução e em matrizes biológicas. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação e quantificação. As razões para a popularidade do método são a sua sensibilidade e a fácil adaptação para determinações quantitativas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Muitas áreas têm interesse em análises de compostos encontrados em fluidos biológicos, como; ambiental, farmacêutica, análises clínicas, medicina legal, entre outras (DRUMER, 1999; POLETTINI, 1999). E a análise cromatográfica desses compostos presentes em fluidos biológicos, principalmente soro, plasma e urina, em geral, requer um pré-tratamento da amostra. As razões para isso são inúmeras, destacando-se a complexidade das matrizes biológicas, das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração das substâncias a serem analisadas, no nível de traço (HUBERT et al. 1999; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001)

As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise. As técnicas mais comumente utilizadas para a extração e/ou pré-concentração de fármacos presentes em fluidos biológicos são: extração por precipitação simples de proteínas, extração líquido-líquido, extração em fase sólida. A eficiência de extração (recuperação) é avaliada a partir das características de cada analito em questão, como seu pKa, coeficiente de partição e estabilidade no meio de extração (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Outro parâmetro importante é a estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros (ROMEY et al., 2007).

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Devem-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas (ANVISA, 2003).

O desenvolvimento de métodos envolve a avaliação e otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda à exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Um método analítico deve, idealmente, ser exato, para fornecer valores próximos dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, ser preciso com grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, ser seletivo para que a exatidão não desvie com interferentes potenciais, ser sensível ou capaz de determinar concentrações, as menores possíveis, e enfim, responder de forma proporcionalmente linear, ao longo de ampla faixa de concentração ( ANVISA, 2003; GIL et al., 2007).

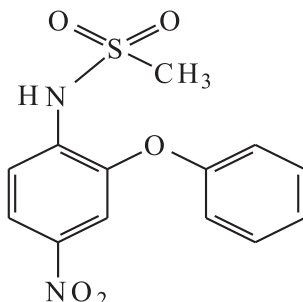
A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, mediante sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem-definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (WHO, 1992; CODEX, 1995).

Atualmente, há grande interesse no desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e que forneçam parâmetros apropriados para análises quantitativas de fármacos, sobretudo em amostras biológicas. Tais métodos são importantes para análises de rotina durante o controle de qualidade e também no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. Desse modo, o trabalho teve como objetivo desenvolver, otimizar e validar um método para identificação e quantificação da Nimesulida no plasma humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Nimesulida, denominado quimicamente de N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida, é uma potente droga antiinflamatória não-esteroidal, inibidor seletivo da cicloxigenase-2 (COX-2), com propriedades antiinflamatória, antipirética e analgésica, que difere de outros compostos dessa classe pelo fato de exibir um caráter ácido em virtude do grupo químico sulfonanilida (ASTIGARRAGA et al., 2001). A Nimesulida é um pó amarelo pálido, cristalino, levemente untuoso ao tato, inodoro, não-higroscópico, praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em etanol e metanol, muito solúvel em acetona, clorofórmio, acetonitrila e dimetilformamida, solúvel em soluções de hidróxidos alcalinos. Insolúvel em soluções ácidas, com ponto de fusão entre 143°C a

145°C, possuindo peso molecular de 308,31g/mol, forma molecular  $C_{13}H_{12}N_2O_5S$  e apresentando a estrutura química mostrada na Figura 1 (FARMACOPÉIA BRAS., 2002).



**Figura 1:** Estrutura química da Nimesulida

A Nimesulida é comercializada na forma de comprimidos, comprimidos dispersíveis, suspensão oral, granulados e supositórios. Antiinflamatório não-esteroidal (AINE) do grupo da sulfonanilida, possui adequada ação antipirética e analgésica e potente ação antiinflamatória. É bem absorvida por via oral, atingindo picos plasmáticos entre uma e duas horas, sendo sua excreção realizada em 70% pelas fezes e 23% pela urina. Sua meia-vida plasmática é de 3-4 horas, porém sua ação persiste entre 8 e 12 horas. Utilizada em doses de 3-5 mg/Kg/dia até uma dosagem máxima de 400 mg/dia dividida em 2-3 tomadas (MOREIRA; CARVALHO, 2001).

Com a descoberta da COX-2 em 1991, a indústria farmacêutica passou a investir maciçamente no desenvolvimento de AINEs seletivos para essa enzima, na busca de medicamentos com ação terapêutica potente, mas sem os efeitos colaterais indesejados. Esses medicamentos tornaram-se disponíveis no mercado, apresentando ação antiinflamatória efetiva e riscos significativamente menores de toxicidade gastrointestinal, comparativamente aos AINEs convencionais, prometendo resolver a morbidade associada ao uso prolongado de antiinflamatórios. Mais recentemente, o uso prolongado de inibidores seletivos para COX-2 vem emergindo também como uma possibilidade preventiva e terapêutica para algumas doenças não-inflamatórias em que ocorre aumento da expressão da COX-2, como é o caso de certos tipos de cânceres, notadamente os de origem epitelial e do mal de Alzheimer (CARVALHO; CARVALHO; SANTOS, 2004).

A Nimesulida tem mostrado, em estudos, efeitos antiproliferativos em uma variedade de linhagens celulares tumorais, incluindo câncer de colo (LAMM et al., 2005).

Apesar dos seus substanciais benefícios clínicos, os antiinflamatórios não-esteróides, que exercem ação analgésica e antiinflamatória pela inibição das enzimas COXs, têm significantes efeitos indesejáveis, que limitam o seu uso (MOREIRA; CARVALHO, 2001).

A Nimesulida, um inibidor seletivo de COX-2, além de inibir cicloxigenases, principalmente a COX-2, tem ação antiinflamatória também por agir como inibidor de radicais de oxigênio e da produção e liberação de ácido hipocloroso em neutrófilos, sem, no entanto, afetar suas ações. Tem eficácia clínica comparável à do diclofenaco e do naproxeno. O perfil ulcerogênico da Nimesulida é menor quando comparada aos antiinflamatórios habituais (RANG et al., 2007).

Os AINEs incluem grande variedade de compostos, pertencentes a diferentes classes químicas, porém têm ações muito semelhantes às da aspirina; todos compartilham, em maior ou menor grau, os mesmos tipos de efeitos adversos baseados em seus mecanismos de ação. Tais efeitos incluem irritações gástricas, que podem variar desde um simples desconforto até a formação de úlcera; efeito sobre o fluxo sanguíneo renal no rim comprometido; tendência para prolongar o sangramento por inibição da função plaquetária. De maneira controversa, argumenta-se que todos AINEs, mas especialmente os fármacos seletivos para COX-2, podem aumentar a probabilidade de eventos trombóticos, como infarto do miocárdio por inibição da síntese de prostaglandina (RANG et al., 2007).

Embora possam ocorrer mecanismos diferentes, geralmente os efeitos estão relacionados com a ação primária de inibição da cicloxigenase araquidônica e, portanto, da produção de PG e tromboxanos. A maioria dos AINEs não inibe apenas as PG nos locais de inflamação, mas também aquelas que exercem funções importantes no organismo, podendo, desta forma, ocasionar reações adversas, como as complicações gastrointestinais (MICHEL; WARNER, 1999; FLOWER, 2003; HERSCHMAN; TALLEY; DUBOIS, 2003).

As prostaglandinas são produtos originados do ácido araquidônico (AA), que é obtido da dieta ou do ácido linoléico, encontrando-se presentes em todos os tecidos animais e exercendo várias funções. Quimicamente, são partes de um grupo denominado eicosanóides, derivados do AA e liberados de fosfolípidos de membrana de células lesadas, por ação catalítica da fosfolipase A<sub>2</sub>. As COX-1 e COX-2 e a hidroxiperoxidase catalisam as etapas sequenciais de síntese dos prostanoídes (PGs clássicas e tromboxanos) e as lipoxigenases transformam o AA em leucotrienos e outros compostos (BRENOL; XAVIER; MARASCA, 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre por meio da inibição específica da COX e conseqüente redução da conversão do AA em PGs. Reações mediadas pelas COXs, a partir do AA, produzem PGG<sub>2</sub>, que sob ação da peroxidase forma PGH<sub>2</sub>, sendo então convertidas às PGs, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos (TXA<sub>2</sub>) (BRENOL; XAVIER; MARASCA, 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

As PGs têm ação vasodilatadora, a PGD<sub>2</sub> é liberada de mastócitos ativados por estímulos alérgicos ou outros e a PGE<sub>2</sub> inibe a ação de linfócitos e outras células que participam das respostas alérgicas ou inflamatórias. Além de promoverem vasodilatação, sensibilizam os

nociceptores (hiperalgesia) e estimulam os centros hipotalâmicos de termorregulação. A  $PGI_2$  predomina no endotélio vascular e atua causando vasodilatação e inibição da agregação plaquetária. O  $TXA_2$  predomina nas plaquetas, causa efeitos contrários, como vasoconstrição e agregação plaquetária (SHUMACHER; KLIPPEL; KOOPMAN, 2001; OLIVEIRA et al., 2007).

Os leucotrienos aumentam a permeabilidade vascular e atraem os leucócitos para o sítio da lesão. A histamina e a bradicinina aumentam a permeabilidade capilar e ativam os receptores nocigênicos (SHUMACHER; KLIPPEL; KOOPMAN, 2001; OLIVEIRA et al., 2007).

Existem pelo menos duas isoformas de COX, que apresentam diferenças na sua regulação e expressão. A atividade de ambas são inibidas por todos os AINEs em graus variáveis. A COX-1 e COX-2 possuem 60% de homologia na sua sequência de aminoácidos, expressa em muitos tecidos. As COX-1, ditas como constitutivas, auxiliam na manutenção da integridade da mucosa gastroduodenal, homeostase vascular, agregação plaquetária e modulação do fluxo plasmático renal (SHUMACHER; KLIPPEL; KOOPMAN, 2001).

A COX-2 é uma enzima indutível, e sua expressão é aumentada em processos inflamatórios. Ela é expressa constitutivamente no cérebro, rins, ossos e, provavelmente, no sistema reprodutor feminino. Sua atividade é importante na modulação do fluxo sanguíneo glomerular e balanço hidroeletrolítico. Sua expressão é inibida pelos glicocorticóides, o que explicaria os efeitos antiinflamatórios dessas substâncias esteroidais (SHUMACHER; KLIPPEL; KOOPMAN, 2001).

O mecanismo de ação da Nimesulida baseia-se na inibição da COX-2, decorrente da interação do grupamento sulfonamida da molécula do fármaco. O fármaco reduz a incidência de efeitos indesejáveis associados à inibição da COX-1 fisiológica, bem como as irritações gastrointestinais (LAGES et al., 1998; RAO et al., 2005).

As isoformas de COX desempenham funções diferentes na saúde e na doença. A COX-1 é expressa constitutivamente em vários tecidos, como, por exemplo, o trato gastrintestinal, onde origina PGs que preservam a integridade da mucosa gástrica e limitam a ação da secreção ácida; nos rins, onde diminuem a resistência vascular renal, promovendo a perfusão, e nas plaquetas, onde elas mantêm a homeostase da membrana. Já a COX-2 é principalmente uma enzima induzida, que produz rapidamente grandes quantidades de prostanoídes envolvidos nos mecanismos da dor e da resposta inflamatória. Por exemplo, a  $PGE_2$  é quimiotática para neutrófilos e a  $PGI_2$  regula a permeabilidade vascular, facilitando o extravasamento de leucócitos. A COX-2 também influi em várias funções fisiológicas, como a função da mácula densa renal, na cicatrização de úlceras gastrointestinais, na reprodução feminina, no *turnover* ósseo, no metabolismo da cartilagem e em processos patológicos, como a polipose intestinal, o câncer colorretal e a doença de Alzheimer (MOREIRA; CARVALHO, 2001).

Hoje, é abundante a disponibilidade de AINEs e coxibes. Por essa razão, desenvolver uma análise que tem uma aplicação genérica para determinação quantitativa de um número de AINEs e coxibes tem significativa utilidade. Acredita-se que simultâneas determinações de AINEs e coxibes

oferecem as seguintes vantagens: fácil e conveniente monitoramento da rotina clínica; aplicabilidade para investigação da rotina farmacocinética, incluindo estudos de interações entre drogas; simultânea análise de dosagem de formas farmacêuticas. Muitos métodos para determinações simultâneas de AINEs em plasma humano têm sido publicados, como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com UV, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector eletroquímico, ou eletroforese capilar (KUMAR et al., 2006). Devido à grande quantidade de prescrições desses agentes AINEs, essas drogas inibem a atividade de COX-1 e COX-2, e que conduzem a efeitos colaterais indesejáveis como úlcera no trato gastrointestinal. Por estas razões uma grande parte de interesse tem sido dedicada para o desenvolvimento de seletivos inibidores de COX-2. Moléculas como celecoxibe, rofecoxibe e valdecoxibe têm exibido aumento seletivo por COX-2 e poucas reações adversas com redução da toxicidade gastrointestinal. Isso tem induzido a várias pesquisas no mundo, bem como os autores estão empreendendo novos estudos cromatográficos para inibidores de COX-2 (RAO et al., 2005).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação e quantificação. As razões para a popularidade do método é a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas, sua adequação a separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, sua aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria e para muitos campos da ciência (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Em uma revisão recente, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi a técnica analítica mais empregada na determinação de inibidores da COX – 2 em diferentes matrizes, seguida pela espectrofotometria na região do ultravioleta e visível. De acordo com o mesmo trabalho, pôde-se perceber que as metodologias apresentam uma grande variação nas condições cromatográficas empregadas, principalmente no que se refere à detecção, composição e pH da fase móvel e tipo de coluna utilizada (RAO et al., 2005).

Poucos métodos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência usando detecção no UV têm sido reportados para a determinação de Nimesulida em plasma humano (ASTIGARRAGA et al., 2001).

Alguns métodos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência têm sido relatados para a determinação de Nimesulida em fluidos biológicos. Todos os métodos publicados empregam extração líquido-líquido, separação em colunas de fase reversa usando fase móvel ácida e detecção entre 230-290 nm (PTACEK; MACEK; KLÍMA, 2001).

Sora et al. (2007) apresentaram um método de CLAE seletivo, sensível e exato para análise de Nimesulida e seu maior metabolito 4'-hydroxy-nimesulida em amostras no plasma humano. A preparação da amostra foi por extração líquido-líquido usando acetonitrila. A técnica de separação foi de cromatografia líquida em fase reversa com detecção no UV, usando comprimento de onda em 300 nm. A separação foi realizada em coluna RP18e (Chromolith Performance), usando fase móvel constituída por Trietilamina 0,2% em água pH 3,0 (corrigido com ácido fosfórico) e metanol (1:1, v/v). Foi usado pequeno volume de plasma para preparação da amostra

(200 µL), e o padrão interno usado foi Nitrazepam. O limite de quantificação da Nimesulida usado foi 64 ng/mL. O volume de injeção foi de 750 µL e o total da corrida analítica foi de 7 minutos. O método validado foi aplicado durante estudo de biodisponibilidade para uma formulação contendo Nimesulida, avaliado do comércio na Romênia.

Rao et al., (2005) desenvolveram um método de CLAE em fase reversa, isocrático, para separação e determinação de inibidores da COX-2, celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe, nimesulida e nabumetona, usando 4-cloro-2-nitroanilina como padrão interno. Foi realizada boa separação cromatográfica usando fase reversa com coluna Inertsil C<sub>18</sub>, fase móvel constituída de metanol e solução aquosa de ácido acético 0,05% (68:32 v/v) usando fotodiodo com detecção em 230 nm. O método é apropriado não somente para avaliar ativos em formas farmacêuticas como avaliações em plasma humano.

Alguns autores verificaram a existência de métodos publicados para determinação de Nimesulida em plasma usando fase reversa, em fase móvel ácida (pH 3 – 5,5) e detecção espectrofotométrica entre 230-290 nm. Por isso propôs um método para ser aplicado na determinação de Nimesulida em amostras de plasma para estudos de bioequivalência. O método foi publicado para determinação de Nimesulida em plasma em fase reversa usando fase móvel constituída de acetonitrila:metanol:tampão fosfato pH 7,3 (30:5:65, v/v/v) e detecção espectrofotométrica a 404 nm. O limite de quantificação foi de 80 ng/mL com curva de calibração até 10.000,0 ng/mL. O método mostrou ser apropriado para estudos farmacocinéticos com adequada sensibilidade e rapidez (PTACEK; MACEK; KLÍMA, 2001).

Outros autores descreveram um método para quantificação da Nimesulida em plasma humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ Tandem espectrometria de massa para aplicação de estudos de bioequivalência. A extração foi líquido-líquido usando éter etílico e diclorometano, e celecoxibe foi usado como padrão interno. A corrida cromatográfica foi de 4,5 minutos e a curva de calibração foi linear com concentrações entre 10,0 – 2.000,0 ng/mL (ASTIGARRAGA et al., 2001).

Khaksa e Udupa (1999) desenvolveram um método rápido e sensível para determinação da Nimesulida em plasma humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O sistema cromatográfico usado foi fase reversa em coluna C<sub>18</sub> com detecção no UV/Vis em 230 nm; fase móvel constituída por tampão fosfato (pH 5,5) : metanol : acetonitrila (50:20:30; v/v/v) com fluxo de 1,4/min. A Nimesulida foi extraída por meio da separação com diclorometano. A média total de recuperação de 98% para ambos inter e intra-amostras, reprodutibilidade com coeficiente de variação entre 0,3 a 1%. A curva de calibração foi linear nas concentrações limite de 0,05-5 µg/mL, e o menor limite de detecção foi de 30 ng/mL. O tempo de retenção da Nimesulida foi de aproximadamente 12 minutos. Esse método demonstrou ser rápido e sensível e permitiu a determinação dos limites de concentrações plasmáticas que são observados depois da administração de doses de relevância clínica de Nimesulida (KHAKSA; UDUPA, 1999).



Estudos para determinação de Nimesulida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em matrizes biológicas são desenvolvidos geralmente com corridas mais longas para assegurar a eficiência de separação e são validados para faixas de trabalho limitadas (FERRARIO; BIANCHI, 2003; MALTESE; MAUGERI; BUCOLO, 2004). Em um estudo para determinação de Nimesulida e seus principais metabolitos em urina, usou-se método de eluição por gradiente e as corridas foram realizadas em 50 minutos (CARINI et al., 1998). Outros estudos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência desenvolveram metodologias para determinação do fármaco em presença de produtos de degradação ou misturas com outros fármacos (RUELA; ARAÚJO; PEREIRA, 2009). Tais métodos apresentaram faixas de trabalho mais amplas, porém a necessidade de obter uma separação adequada para quantificar outros compostos exigiu corridas mais longas para detecção da Nimesulida.

Uma próxima etapa, que pode ser eventualmente necessária, diz respeito a preparação da amostra. As diversas técnicas preparativas têm a finalidade de recuperar o analito da matriz, livrando-o de composto que interfira na análise, concentrando-o à uma escala possível de ser analisada e tornando a matriz compatível com o sistema analítico. Como a etapa de preparação da amostra é quase sempre realizada manualmente, ela se torna, na maioria dos casos, o ponto crítico da análise, fazendo com que a precisão e a exatidão do método fiquem estritamente dependentes dos procedimentos de preparação adotados, o que resulta em um maior tempo e esforço por parte do operador (GIL et al., 2007).

Fluidos biológicos não devem ser injetados diretamente nas colunas analíticas comuns de CLAE em virtude das proteínas presentes nas matrizes biológicas, que causam o entupimento e perda de eficiência das mesmas, por sua adsorção acumulativa no suporte. Para evitar a rápida deterioração da coluna analítica, é necessário realizar um pré-tratamento da amostra antes de sua injeção no sistema cromatográfico; este pré-tratamento visa obter os analitos livres da presença de proteínas e da interferência dos compostos endógenos presentes na matriz biológica (HAGESTAM; PINKERTON, 1995; STEVENSON, 1995).

O pré-tratamento adequado a ser feito depende da matriz com a qual se está trabalhando, bem como à que se aplica o método. Um dos procedimentos usuais de preparação das amostras biológicas é a limpeza da matriz biológica mediante precipitação dos interferentes com um solvente apropriado, que envolve as seguintes etapas: precipitação e centrifugação das proteínas; extração dos analitos a partir do sobrenadante, utilizando solventes orgânicos; evaporação do solvente de extração; reconstituição dos analitos na fase móvel e, finalmente, injeção no sistema cromatográfico (STEVENSON, 1995; SNYDER; KIRKLAND, 1997).

Na rotina, as técnicas mais utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes no fluido biológico são: extração líquido-líquido e extração em fase sólida.

Em uma extração líquido-líquido ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). O resultado positivo e eficiente da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extração. Para alguns sistemas, o

valor da constante de distribuição entre as fases pode ser aumentado por meio do ajuste do pH, para prevenir a ionização de ácidos ou bases; pela da formação de par iônico com solutos ionizáveis; pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros, para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase móvel (SNYDER; KIRKLAND, 1997).

Esse tipo de extração é vantajoso por ser simples e pela variedade de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, ocorre a desnaturação das proteínas presentes na amostra, eliminando assim a contaminação da coluna cromatográfica (SNYDER; KIRKLAND, 1997).

A extração líquido-líquido possui algumas desvantagens, por exemplo, as amostras que possuem grande afinidade pela água, que são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito. Esta técnica é necessária à utilização de solventes ultrapuros, uma vez que impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra. O grande volume de solvente utilizado acaba gerando problemas de descartes, além de ser um processo suscetível a erros e de difícil automação. Apesar dessas desvantagens, a extração líquido-líquido é considerada uma técnica clássica de pré-tratamento de amostra (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Para a extração ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas usa-se extração em fase sólida. Nesta emprega-se sorventes recheados em cartuchos, nas formas de seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em Cromatografia Líquida em coluna (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

De modo geral, a preparação de amostras deve ser um procedimento rápido, que tenha poucas etapas, capaz de produzir recuperações quantitativas e reprodutivas do analito e, de preferência, apresentar a possibilidade de automação (GIL et al., 2007).

Procedimento importante nos processos de extração de fármacos de matrizes biológicas consiste na adição de concentração conhecida de padrão interno (PI). Determinam-se a relação entre as áreas fornecidas pela amostra e PI, eliminando, desse modo, erros decorrentes da extração. O PI deve possuir propriedades químicas similares ao composto sob análise, estar presente em concentrações similares, apresentar tempo de retenção semelhante e não interferir na análise (CAUSON, 1997).

A adoção da Política Nacional de Medicamentos Genérico pelo Governo Federal (Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999) envolve a produção de medicamentos de melhor qualidade, mais seguros e eficazes, comprovados mediante realização de testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência contribuindo para aumento do acesso aos medicamentos e fortalecendo a indústria nacional através do desenvolvimento tecnológico. Para isso, são necessários o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas capazes de quantificar o fármaco em fluidos biológicos (ANVISA, 1999).

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

### III. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para quantificação de Nimesulida no plasma humano com perspectiva de aplicação em estudos de bioequivalência.

### IV. MATERIAIS e MÉTODOS

#### 4.1 Materiais

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da marca Shimadzu, composto de bomba analítica LC – 10AD, Auto-Injetor SIL – 10AD VP, detector (UV-Vis) SPD – 10A VP e sistema controlador SCL – 10A VP. Para registrar os resultados utilizou-se um software Class VP 6.14 SP1.

Para o desenvolvimento e aplicação da metodologia analítica foi usada a coluna analítica Phenomenex®, P/Nº 00F-4252-E0, Luna-CN (5 µm ,150 x 4,60 mm).

Os padrões utilizados de Nimesulida e Tolazamida (padrão interno) foram padrões primários com certificados rastreáveis. A Nimesulida foi adquirida da Fundação Oswaldo Cruz com validade vigente, lote nº 1049, e a Tolazamida adquirido U. S. Pharmacopeia com validade vigente, lote G-2.

As medidas de pH foram feitas utilizando peagâmetro Orion (USA), modelo 420A, com precisão de  $\pm 0,01$  pH.

As pesagens dos reagentes foram feitas em uma balança analítica Precisa 40 SM – 200 A, original da Alemanha, com precisão de 0,00001 g.

As pipetas de volume variável utilizadas no preparo das amostras foram da fabricante Gilson (França), e as ponteiros de pipetas descartáveis Axygen (USA). As cetrifugações das amostras foram feitas em uma centrífuga Eppendorf (Germany), modelo 5415 R e a homogeneização das amostras foi realizada em mesa agitadora Fine PCR (Coréia) e misturador Phoenix (USA).

Todos os reagentes utilizados nas análises cromatográficas foram de grau HPLC e adquiridos da J. T. Baker. Todos foram filtrados a vácuo em um sistema Millipore, utilizando-se membranas de 0,45 µm, e posteriormente degaseificados antes de serem utilizados. Os eluentes usados foram sempre medidos na relação volume/volume. Os solventes utilizados no preparo das amostras também foram adquiridos da J. T. Baker.

A água utilizada no preparo da solução tampão para composição da fase móvel foi obtida de um sistema Milli-Q (Millipore).

O material biológico usado foi plasma humano coletado de diferentes indivíduos, e as condições do plasma utilizado no preparo da matriz para construção das curvas de calibração e controles de qualidade foram plasma humano normal. Na especificidade foi avaliado plasma lipêmico e hemolisado para verificação da aplicação do método para esse tipo de amostra.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Generalidades

As condições experimentais estabelecidas para análise da Nimesulida por meio do método de Cromatografia Líquida encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1:** Parâmetros do método otimizado por Cromatografia Líquida

Características	Descrição
Coluna	Luna-CN (5 µm, 150 x 4,60 mm). Phenomenex
Fase móvel	Tampão Fosfato de Sódio: Metanol:Acetonitrila (4:2,5:3,5 v/v/v)
Vazão	3,0 mL/min
Comprimento de onda	258 nm
Volume de injeção	20 µL

#### 4.2.1.1 Preparo da fase móvel

Para um litro da solução tampão pesou-se exatamente 7,0980 g do sal (fosfato dibásico de sódio) que foi diluído com água Milli-Q até 950 mL. Depois se ajustou o pH com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), até obter um pH 5,5. Transferiu-se tudo para um balão volumétrico de 1.000 mL e completou-se o volume com água.

Em uma proveta de 500 mL, mediu-se 400 mL de tampão. Mediu-se 250 mL de metanol e 350 mL de acetonitrila utilizando-se provetas de 250 e 500 mL, respectivamente. Transferiram-se todos os volumes para um frasco de vidro de 1000 mL, homogeneizando-se, filtrando-se e degaseificando-se.

#### **4.2.1.2 Soluções padrão**

##### **4.2.1.2.1 Nimesulida**

Uma massa correspondente a 0,00501 g de Nimesulida (teor: 100,3%), previamente seca em estufa a 105° C por 2 horas, foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (5,0 mL) e preparada com metanol para obtenção de uma solução de concentração 1.005,0 µg/mL de Nimesulida.

A partir da solução estoque foram feitas diluições de 15 µg/mL e 100 µg/mL para serem utilizadas nos testes de pré-estudo e validação. Foi também avaliado a estabilidade da solução de Nimesulida na concentração de 15 µg/mL em condições de temperatura e luz no local de desenvolvimento do método analítico.

##### **4.2.1.2.2 Tolazamida (padrão interno)**

Uma massa correspondente a 0,00507 g de Tolazamida, previamente seca em estufa a 60° C por 3 horas, foi cuidadosamente pesada e preparada com metanol em um balão volumétrico (5,0 mL), para obtenção de uma solução de concentração 1.014,0 µg/mL de Tolazamida. A partir desta solução preparou-se Tolazamida na concentração de 100,0 µg/mL em metanol. A solução de trabalho da Tolazamida usada foi de concentração de 100,0 µg/mL, e foi preparada a partir da solução de concentração 1.014,0 µg/mL (solução estoque), usando um volume pipetado de 0,9862 mL para obter 10 mL de volume final.

#### **4.3. Desenvolvimento do método de análise da Nimesulida**

Uma massa de 0,005 g (5000 µg) do padrão de Nimesulida foi precisamente pesada, dissolvida em metanol e transferida para um balão volumétrico de 5,0 mL, dessa forma obtendo-se uma solução estoque. A solução estoque preparada apresentou uma concentração de 1.000,0 µg/mL. Com base na qual foi preparada outra solução padrão na concentração de 100,0 µg/mL, que foi usada no preparo das soluções padrão de calibração e soluções padrões de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) nas seguintes concentrações:

Soluções padrões de calibração: 200,0; 500,0; 1.000,0; 3.000,0; 5.000,0; 7.000,0; 10.000,0 e 15.000,0 ng/mL.

Soluções padrão de controle de qualidade: 600,0; 6.000,0 e 13.000,0 ng/L.

Os valores de concentração dos controles de qualidade do método foram calculados seguindo as normas estabelecidas por Guia de Validação publicado pela Agência Reguladora Oficial (ANVISA, 2003):

- a) O controle de qualidade de baixa concentração (CQB) deve ser menor ou igual a três vezes o valor do limite de quantificação (LQ).
- b) O controle de qualidade de média concentração (CQM) deve ser aproximadamente a média entre CQB e CQA.
- c) O controle de qualidade de alta concentração (CQA) deve ser em torno de 75-90% da maior concentração da curva de calibração.

#### **4.4 Preparo das amostras de calibração e controle de qualidade**

As amostras foram preparadas através da extração líquido-líquido do analito (Nimesulida) e do padrão interno (Tolazamida) das amostras biológicas. Foram adicionados 50 µL das soluções padrão (diluídos em metanol) em tubos eppendorff, 400 µL de plasma humano e, após agitação de um minuto em mesa agitadora, 1.000 µL de diclorometano, e agitando-se novamente por cinco minutos. Após agitação centrifugou-se à 14.000 rpm, durante cinco minutos, à temperatura de 4° C, retirando e transferindo-se 700 µL do sobrenadante para tubos de eppendorff . Evaporou-se o solvente sob fluxo de nitrogênio e ressuspendeu-se o resíduo em 200 µL de acetonitrila, agitando por dois minutos em mesa agitadora. O volume, após agitação, foi transferido para *inserts* de vidro descartáveis, e um volume de 20 µL foi injetado no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

#### **4.5 Obtenção da curva de calibração**

A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (ANVISA, 2003). Para isso foi gerada uma curva de calibração do fármaco (Nimesulida), a qual foi usada para calcular sua concentração nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo.

A curva de calibração incluiu a análise de amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de, no mínimo, 6 (seis) amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno, contemplando o limite de variação esperado, do limite de quantificação até 120% da concentração mais alta que se pretende analisar (ANVISA, 2003).

A curva de calibração usada para quantificação do fármaco nas amostras foi construída a partir de 8 concentrações conhecidas do analito (Nimesulida).

A partir da solução padrão de calibração de Nimesulida, foram preparadas amostras de calibração, em triplicatas, nas seguintes concentrações: 200,0; 500,0; 1.000,0; 3.000,0; 5.000,0; 7.000,0; 10.000,0 e 15.000,0 ng/mL.

Os resultados foram analisados por métodos estatísticos apropriados como, por exemplo, o cálculo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Devem-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático), o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular e o intercepto da reta.

Os critérios para aceitação da curva de calibração seguem normas estabelecidas por guias publicados por agências reguladoras oficiais. De acordo com as normas atualmente em vigor, aceita-se desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LQ; desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações na curva de calibração; no mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LQ e a maior concentração da curva de calibração, e o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 (ANVISA, 2003).

#### **4.6 Validação do método**

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ICH, 1996; ANVISA, 2003). Para validação do método os seguintes parâmetros foram avaliados conforme a Tabela 2.



**Tabela 2:** Parâmetros utilizados na validação

<b>Parâmetro</b>	<b>Definição</b>
Especificidade	Verificação de interferentes no tempo de retenção do analito.
Linearidade	Faixa linear da concentração plasmática onde os resultados do detector são diretamente proporcionais a concentração do fármaco.
Limite de quantificação	Menor concentração do fármaco que pode ser quantificada com precisão e exatidão.
Recuperação	Eficiência do processo de extração.
Precisão	Representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de uso.
Exatidão	Avalia a variação entre o valor nominal do analito e o valor obtido pelo método.
Robustez	Medida da capacidade de um método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

A precisão e exatidão foram avaliadas através de lote, sendo este considerado conjunto completo de amostras em estudo, com um número apropriado de padrões e controles de qualidade para sua validação e que tem sua análise completa nas mesmas condições (ANVISA, 2003).

Para avaliação da precisão e exatidão do método, foram determinadas em um mesmo lote (intralote) e em lotes diferentes (interlotes), analisando três lotes e cinco vezes cada amostra. A precisão e exatidão intralote foram determinadas utilizando um lote contendo uma curva de

calibração com os padrões LQ (200,0 ng/mL), CQB (600,0 ng/mL), CQM (6.000,0 ng/mL) e CQA (13.000,0 ng/mL), e cinco amostras de cada controle de qualidade.

A precisão para os controles não deveria exceder 15% para o LQ admitiram-se valores menores ou iguais a 20%. A exatidão para as amostras dos controles de qualidade admitiu desvios não superiores a 15% do valor nominal; para o LQ, desvios maiores ou iguais a 20%.

A validação interlotes considerou precisão para os controles de qualidade obtidos não excedendo 15% para o LQ e admitiram-se valores menores ou iguais a 20%. O valor da exatidão para os controles aceitou desvios de  $\pm 15\%$  do valor nominal para o LQ, desvios menores ou iguais a 20%.

#### **4.7 Estudo da estabilidade do fármaco no fluido biológico**

Para a realização do estudo de estabilidade foram observados os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, limite de variação e robustez, previamente validados.

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

Para avaliar a estabilidade da Nimesulida durante três ciclos de congelamento e degelo, foram analisadas cinco amostras de cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA). As amostras foram congeladas à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e mantidas nesta temperatura por 24 horas. Após este tempo, foram submetidas ao degelo natural, à temperatura ambiente, extraídas e analisadas. O mesmo procedimento foi repetido até completar o terceiro ciclo de congelamento e degelo.

##### **4.7.2 Estabilidade de curta duração**

Para avaliar a estabilidade de curta duração, mantiveram-se as amostras dentro do autoinjeter, à temperatura ambiente, e cada amostra de controle de qualidade foi analisada em triplicata nos tempos de 0 a 24 horas.

##### **4.7.3 Estabilidade das amostras de plasma não processada**

Para avaliar as amostras de plasma não processadas, foram mantidas durante seis horas à temperatura ambiente. Após este tempo foram extraídas e analisadas e comparadas com amostras recém-preparadas.

#### **4.7.4 Estabilidade das soluções padrão**

As análises foram realizadas com soluções padrão de Nimesulida 15,0 µg/mL e da Tolazamida 100,0 µg/mL. As soluções foram analisadas após serem mantidas durante seis horas à temperatura ambiente e depois de mantidas durante sete dias sob refrigeração. Os resultados foram comparados com as variações das médias para cada controle de qualidade das amostras recém-preparadas e mantidas sob refrigeração durante sete dias.

##### **4.7.4.1 Estabilidade da solução de Nimesulida em condições de temperatura e luz**

A estabilidade da solução de Nimesulida foi avaliada em condições de temperatura e luz no local de desenvolvimento do método analítico.

A estabilidade da solução foi analisada mediante o preparo da solução de Nimesulida (SQR) na concentração de 15 µg/mL, utilizando como solvente o metanol e acondicionada em 2 frascos, sendo 1 frasco cor âmbar (abrigo da luz) e outro transparente (exposição à luz), à temperatura ambiente (~20°C). A estabilidade das soluções em frascos âmbar e transparente foram determinadas por meio da quantificação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por espectrofotometria no UV/VIS em 258 nm, usando coluna Phenomenex, Luna – CN (5,0 µm, 150 x 4,5 mm) mantida à temperatura ambiente (~20°C).

#### **4.7.5 Estabilidade de longa duração**

Para avaliar a estabilidade do fármaco em plasma, em condições de longa duração, foram analisadas três diferentes concentrações (CQB, CQM e CQA) em quintuplicata no tempo inicial e após 63 dias estocadas a -20 °C.

#### **4.8 Extração das amostras**

Para determinar a escolha do melhor método de extração foram avaliados os métodos de extração da amostra utilizando a técnica de precipitação e extração líquido-líquido.

#### 4.8.1 Extração por precipitação

O método de extração por precipitação foi avaliado usando o solvente acetonitrila. Amostras de plasma (200 µL) contendo Nimesulida foram extraídas pela adição de 50 µL da solução do padrão interno Tolazamida (100 µg/mL em metanol) e 600 µL do solvente acetonitrila gelado, agitados por 2 minutos, em mesa agitadora. Após agitação, centrifugou-se a 14.000 rpm, durante 15 minutos, a temperatura de 4°C, transferiram-se 200 µL sobrenadantes para *inserts* e injetaram-se alíquotas de 20 µL no sistema cromatográfico.

#### 4.8.2 Extração líquido-líquido

O método de extração líquido-líquido foi avaliado utilizando os solventes acetato de etila e diclorometano.

O método de extração líquido-líquido, usando diclorometano como solvente extrator foi avaliado com amostras de plasma contendo Nimesulida extraídas pela adição de 50 µL da solução do padrão interno Tolazamida (100 µg/mL em metanol), agitando-se por 1 min em mesa agitadora. Após agitação, adicionaram-se 1.000 µL de diclorometano, agitando-se novamente por 5 min, centrifugando-se a 14.000 rpm, durante 5 min, à temperatura de 4°C. Transferiram-se 700 µL do sobrenadante para tubos eppendorff, evaporou-se o solvente sob fluxo de nitrogênio e ressuspendeu-se o resíduo em 200 µL de acetonitrila. Foi agitado o volume transferido para *inserts* e injetaram-se alíquotas de 20 µL no sistema cromatográfico.

Para a extração líquido-líquido, usando acetato de etila como solvente extrator, foi avaliado com amostras de plasma contendo Nimesulida extraídas pela adição de 50 µL da solução do padrão interno Tolazamida (100 µg/mL em metanol), agitando-se por 1 min em mesa agitadora. Após agitação adicionaram-se 1.000 µL de acetato de etila, agitou-se novamente por 5 min, centrifugando-se a 14.000 rpm, durante 5 min, à temperatura de 4°C. Transferiram-se 700 µL do sobrenadante para tubos eppendorff, evaporando-se o solvente sob fluxo de nitrogênio e ressuspendendo-se o resíduo em 200 µL de acetonitrila. Agitou-se e transferiu-se o volume para *inserts* e injetaram-se alíquotas de 20 µL no sistema cromatográfico.

#### 4.9 Análise estatística

Os cálculos foram baseados em função da curva de calibração construída para o fármaco analisado, no sistema de dados do Class VP 6.14, utilizando os padrões de calibração. As funções de calibração foram calculadas através da razão entre as áreas dos picos da Nimesulida e do

padrão interno Tolazamida. As concentrações do analito nas amostras foram calculadas a partir da equação de regressão linear, obtida com a curva de calibração (concentração de Nimesulida em função das razões das áreas).

## **V. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A análise da substância ativa é importante para assegurar a qualidade e eficácia do produto terapêutico. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação e quantificação. As razões para grande utilização do método é a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas, sua adequação à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para indústria, para muitos campos da ciência e para o público (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A separação de uma mistura por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência se dá por uma ou mais interações entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel, as quais podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou forças de Van Der Waals, entre outras. Os modos de separação podem ser classificados de acordo com a natureza destas interações. São eles: cromatografia em fase normal, pareamento de íons ou troca iônica, exclusão e em fase reversa, a qual foi utilizada neste trabalho (CASS; DEGANI, 2001).

Poucos métodos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência usando detecção no UV têm sido encontrados para a determinação de Nimesulida em plasma humano (ASTIGARRAGA et al., 2001). Por essa razão, selecionou-se e desenvolveu-se uma metodologia analítica para determinação de Nimesulida em plasma humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com detecção por espectrofotometria no UV/Visível, utilizando Tolazamida como padrão interno. Na seleção do comprimento de onda de detecção, obteve-se pico máximo de absorção em 258 nm.

Alguns métodos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência têm sido relatados para a determinação de Nimesulida em fluidos biológicos. Todos os métodos publicados empregam extração líquido-líquido e separação em colunas de fase reversa usando fase móvel ácida e detecção entre 230 e 290 nm (PTACEK; MACEK; KLÍMA, 2001).

### **5.1 Avaliação da fase móvel**

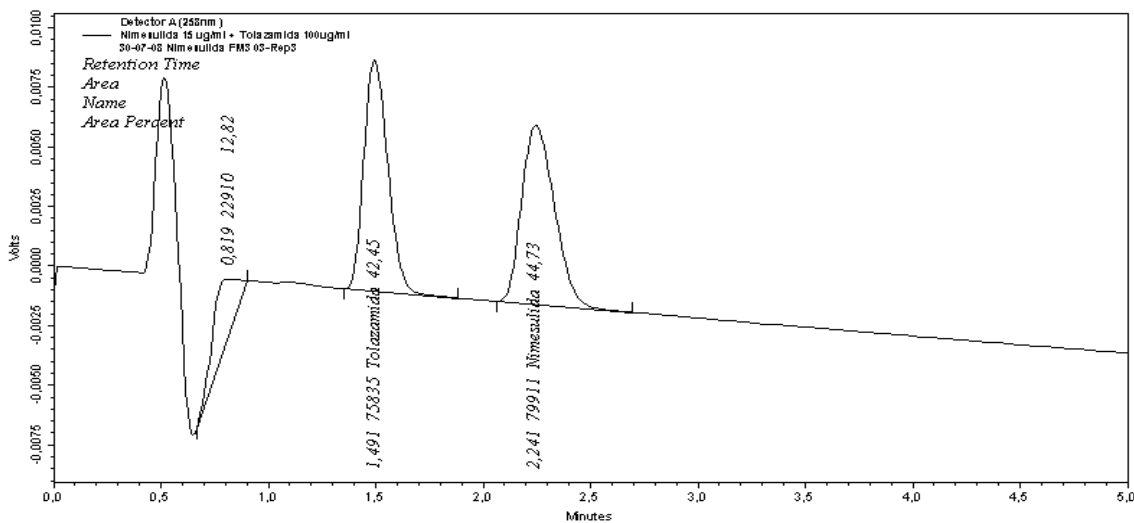
Para a escolha da melhor fase móvel, avaliaram-se diferentes proporções de modificador orgânico mantendo-se sempre o mesmo pH.

Avaliando-se os resultados apresentados na Tabela 3 para a investigação da proporção da fase móvel na otimização de separação da Nimesulida e Tolazamida (PI) na coluna analítica, manteve-se o pH do tampão fosfato em 5,5 e variaram-se as proporções entre os modificadores

orgânicos (acetonitrila e metanol) e do tampão fosfato. A fase móvel que apresentou a melhor resposta cromatográfica foi a constituída por Tampão Fosfato:Metanol: Acetonitrila nas proporções de 4,0:2,5:3,5 eluída em coluna Luna-CN; proporcionaram tempo de retenção reprodutível, com picos de boa resolução, sensibilidade, seletividade e simetria, conforme a Figura 2.

**Tabela 3:** Avaliação da composição da fase móvel

Fase móvel			Parâmetros cromatográficos			
Tampão Fosfato: MeOH:ACN	pH	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	α	R <sub>s</sub>
4,0:2,5:3,5	5,5	3,0	1,27	2,34	1,84	2,90
7,0:1,5:1,5	5,5	3,0	1,19	2,42	2,03	-
3,0:3,5:3,5	5,5	3,0	0,30	0,62	2,06	1,18
3,5:3,5:3,0	5,5	3,0	0,57	1,57	2,66	2,60



**Figura 2:** Avaliação da fase móvel: cromatograma da Nimesulida 15 µg/mL e Tolazamida (PI) 100 µg/mL. Condições cromatográficas: coluna analítica Phenomenex®, Luna-CN (5,0 µm, 150 x 4,6 mm); fase móvel Tampão fosfato 0,05M, pH 5,5:Metanol:Acetonitrila (4:2,5:3,5, v/v/v); vazão 3,0 mL/min; detecção 258 nm.

## 5.2 Extração das amostras

O desenvolvimento de métodos para a análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos tradicionalmente inclui etapas de tratamento preliminar da amostra, como, por exemplo, precipitação de proteínas, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, etc. Em muitos casos tais procedimentos são os responsáveis por grande parte do tempo empregado em um método analítico e, além disso, o grande manuseio da amostra, assim como dificuldades na reprodutibilidade e possíveis decomposições das amostras podem ocasionar baixos níveis de recuperação dos analitos que se encontram em baixas concentrações.

De modo geral, a preparação de amostras deve ser um procedimento rápido, que tenha poucas etapas, capaz de produzir recuperações quantitativas e reprodutivas do analito (GIL et al., 2007).

Podem-se observar na literatura várias técnicas de extração em plasma, e o método de extração líquido-líquido usado neste trabalho apresentou eficiência na extração, usando diclorometano como solvente extrator.

O solvente acetato de etila apresentou resultado melhor em relação ao diclorometano, mas teve alguns problemas relacionados com o tempo de evaporação além de arrastar mais impurezas. Por esse motivo foi selecionado o solvente diclorometano (Tabela 4).

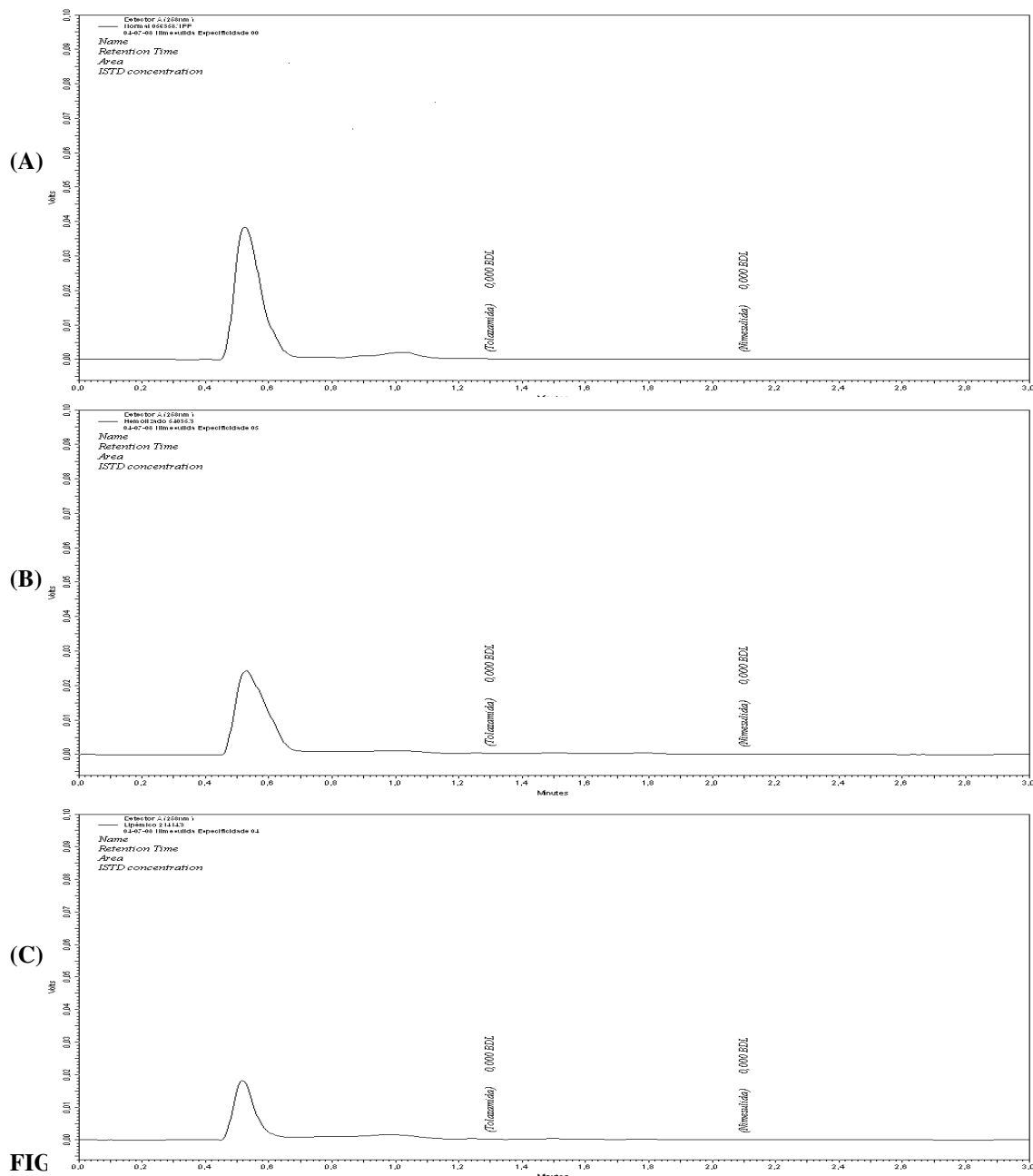
O método de extração através da precipitação com acetonitrila não apresentou boa eficiência na extração em comparação com o método líquido-líquido.

**Tabela 4:** Avaliação do solvente extrator

Extração	Solvente extrator	Área					
		CQB	PI	CQM	PI	CQA	PI
Líquido-Líquido	Diclorometano	4465	49367	34793	49380	74913	50204
Líquido-Líquido	Acetato de etila	6727	53705	34524	36200	78616	34659
Precipitação	Acetonitrila	1740	19309	12156	18786	25929	18754

### 5.3 Especificidade do método

A especificidade do método foi avaliada mediante amostras branco de plasma humano, testadas utilizando-se os procedimentos de extração e as condições cromatográficas (Figura 3) para avaliar interferência no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos com uma solução aquosa da Nimesulida analisada em concentração próxima ao limite de quantificação (Figura 4). Os resultados apresentados nos cromatogramas mostram que não ocorreram interferências nos respectivos tempos de retenção do fármaco e padrão interno.



**FIG** ANALITO E DO PADRÃO INTERNO. **B)** PLASMA BRANCO HEMOLISADO, CROMATOGRAMA REFERENTE AO BRANCO DO ANALITO E DO PADRÃO INTERNO. **C)** PLASMA BRANCO LIPÊMICO, CROMATOGRAMA REFERENTE AO BRANCO DO ANALITO E DO PADRÃO INTERNO.



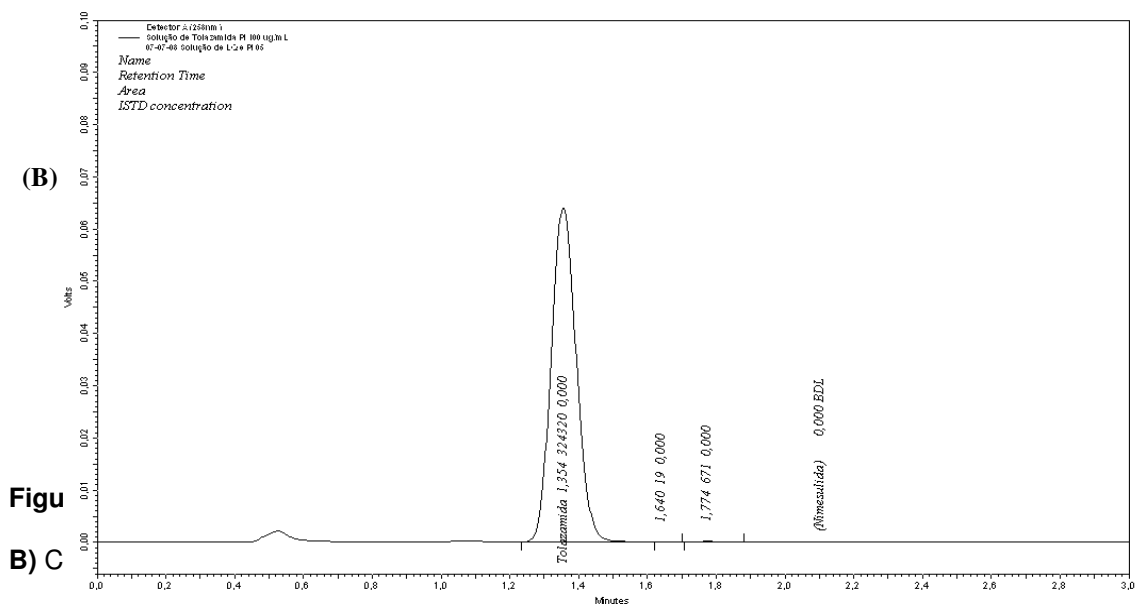
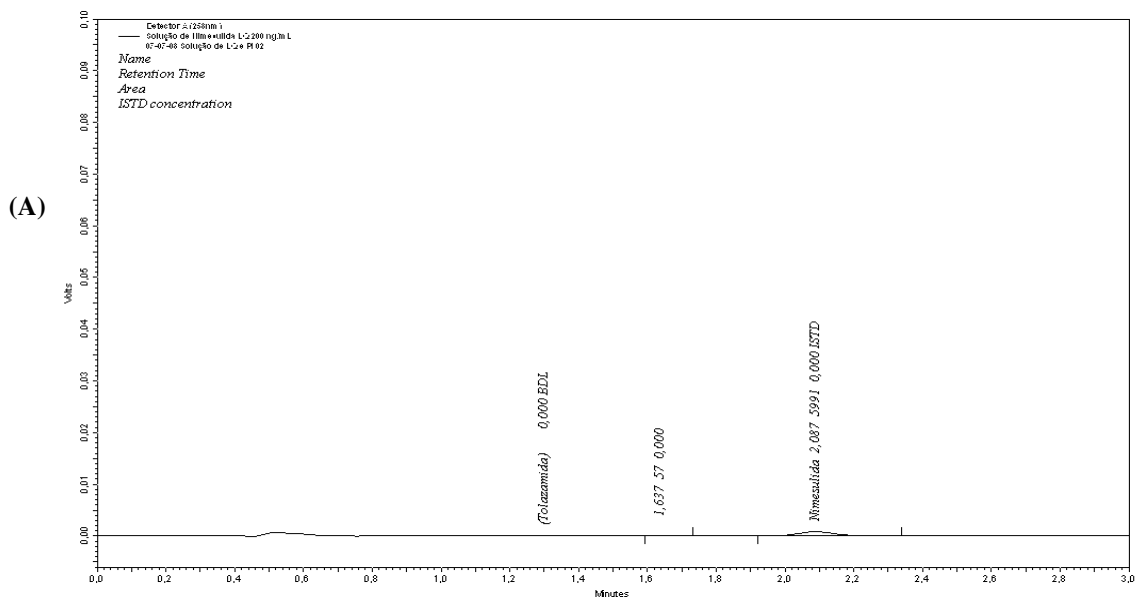


Figura B) C

#### 5.4 Curva de calibração

Para definir a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, foi gerada uma curva de calibração com oito padrões contendo o fármaco e padrão interno. A curva de calibração na validação foi feita em triplicata, utilizando-se depois uma curva média para determinar as concentrações do analito nas amostras. As concentrações dos padrões foram definidas em testes preliminares, incluindo a primeira quantificação de amostras, levando-se em consideração a sensibilidade do método e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem analisadas.

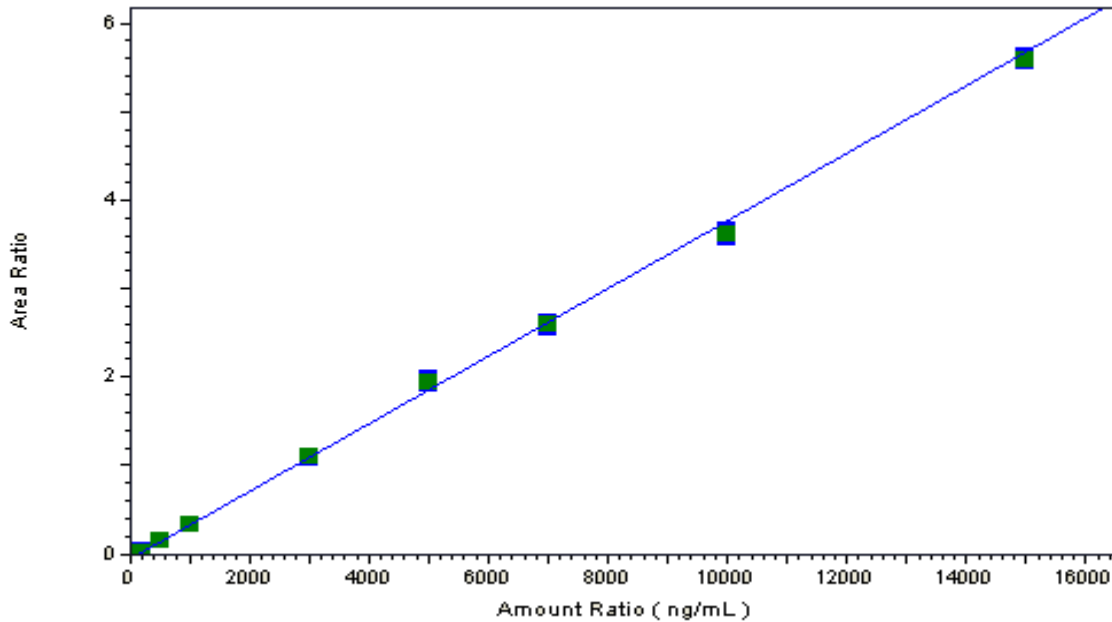
O LQ foi determinado mediante de concentrações decrescentes do fármaco na matriz biológica, até o menor nível quantificável com precisão e exatidão. O valor encontrado para o LQ foi de 200,0 ng/mL.

Os valores obtidos para determinação da curva de calibração estão apresentados na Tabela 5, observando-se a linearidade adequada na faixa de 200,0 a 15.000,0 ng/mL, conforme a Figura 5.

**Tabela 5:** Valores experimentais obtidos na determinação da linearidade do método bioanalítico para quantificação da Nimesulida no plasma por CLAE

<b>Padrão</b>	<b>Concentração nominal (ng/ml)</b>	<b>Concentração experimental (ng/mL)</b>	<b>Média da Concentração experimental (ng/mL)</b>	<b>Precisão CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
Nimesulida	200,0	197,899	195,500	1,335	97,745
	200,0	195,854			
	200,0	192,718			
Nimesulida	500,0	505,651	529,427	4,255	105,885
	500,0	532,174			
	500,0	550,456			
Nimesulida	1.000,0	1.040,607	999,006	3,568	100,099
	1.000,0	971,262			
	1.000,0	991,115			
Nimesulida	3.000,0	2.838,888	2927,681	3,350	97,589
	3.000,0	3.032,957			
	3.000,0	2.911,200			
Nimesulida	5.000,0	5.223,809	5.120,529	1,827	102,411
	5.000,0	5.041,445			
	5.000,0	5.096,334			
Nimesulida	7.000,0	7.133,176	7.079,906	1,694	101,142
	7.000,0	7.163,968			
	7000,0	6.942,574			
Nimesulida	10.000,0	9.694,747	9.660,761	0,338	96,608
	10.000,0	9.658,014			
	10.000,0	9.629,522			
Nimesulida	15.000,0	14.685,585	14.778,121	1,303	98,521
	15.000,0	14.649,282			
	15.000,0	14.999,497			

A equação obtida da reta foi:  $y = 0,000370984x - 0,01749797$ , com coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) de 0,9986986, indicando linearidade significativa do método.



**Figura 5:** Representação gráfica da curva de calibração da SQR da Nimesulida em plasma humano obtida por cromatografia líquida, na faixa de 200,0 a 15.000,0 ng/mL

### 5.5 Precisão e exatidão do método

Foram analisadas quatro concentrações distintas, na faixa esperada de concentrações, para avaliar a exatidão e precisão do método. A precisão e exatidão foram determinadas em um mesmo lote (precisão e exatidão intralotes) e em lotes diferentes (precisão e exatidão interlotes), sendo lote considerado conjunto completo de amostras em estudo, com um número apropriado de padrões e controles de qualidades para sua validação e que tem sua análise completa nas mesmas condições (ANVISA, 2003).

A avaliação da precisão e exatidão intralote apresentou os resultados conforme mostrado na Tabela 6.

**Tabela 6:** Determinação da precisão e exatidão intralote do método bioanalítico para quantificação da Nimesulida no plasma por CLAE

Concentração nominal da Nimesulida ng/mL	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
200,0	233,067 224,910 229,613 230,473 221,629	227,938	2,017	113,969
600,0	689,384 680,429 664,021 620,784 699,701	670,864	4,607	111,811
6.000,0	6.288,383 6.328,514 6.231,407 6.377,261 6.285,951	6.302,303	0,862	105,038
13.000,0	13.828,440 13.939,176 13.973,676 13.724,437 14.127,677	13.918,681	1,095	107,067

Avaliaram-se também a precisão e exatidão intralote do método analítico, utilizando plasmas lipêmico e hemolisado, conforme a Tabela 7 e 8.

**Tabela 7:** Análise intralote da Nimesulida

Concentração nominal de Nimesulida ng/mL	Plasma lipêmico			
	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)
600,0	640,532 665,370 550,913 612,577 562,932	606,532	8,098	101,077
6.000,0	6.602,305 6.530,244 6.394,589 6.484,817 6.506,271	6.503,645	1,158	108,394
13.000,0	12.836,816 13.347,530 13.298,360 12.379,620 12.380,733	12.848,612	3,672	98,835

**Tabela 8:** Análise intralote da Nimesulida

Concentração nominal de Nimesulida ng/mL	Plasma hemolisado			
	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)
600,0	628,166 686,172 634,422 686,700 577,273	642,547	7,126	107,091
6.000,0	6.442,596 6.303,069 6.110,392 5.874,880 6.203,851	6.186,958	3,451	103,116
13.000,0	14.650,060 14.725,620 14.811,988 14.857,055 14.902,175	14.789,380	0,687	113,764

Avaliou-se a precisão e exatidão interlotes através dos Lotes 1, 2 e 3, conforme a Tabela 9.

**Tabela 9:** Análise interlotes

	<b>Concentração nominal da Nimesulida ng/mL</b>	<b>600,0</b>	<b>6000,0</b>	<b>13000,0</b>
<b>Lote 1</b>	<b>Concentrações determinadas ng/mL</b>	689,384	6.288,383	13.828,440
		680,429	6.328,514	13.939,176
		664,021	6.231,407	13.973,676
		620,784	6.377,261	13.724,437
		699,701	6.285,951	14.127,677
	<b>Média</b>	670,864	6.302,303	13.918,681
<b>Precisão (%)</b>	4,607	0,862	1,095	
<b>Exatidão (%)</b>	111,811	105,038	107,067	
<b>Lote 2</b>	<b>Concentrações determinadas ng/mL</b>	538,254	5.739,309	14.459,516
		591,103	6.399,933	13.465,668
		654,459	6.070,837	14.129,485
		593,428	6.153,712	13.460,140
		547,359	6.897,299	13.955,828
	<b>Média</b>	584,921	6.252,218	13.894,127
<b>Precisão (%)</b>	7,897	6,896	3,118	
<b>Exatidão (%)</b>	97,487	104,204	106,878	
<b>Lote 3</b>	<b>Concentrações determinadas ng/mL</b>	683,643	5.407,654	14.481,320
		695,802	5.334,025	12.576,789
		670,658	5.594,724	12.182,896
		689,436	5.799,301	14.657,696
		693,208	6.228,573	14.655,167
	<b>Média</b>	686,549	5.672,855	13.710,774
<b>Precisão (%)</b>	1,455	6,332	8,935	
<b>Exatidão (%)</b>	114,425	94,548	105,467	
<b>Análise interlotes</b>	<b>Média</b>	647.444	6.075,792	13.841,194
	<b>Precisão (%)</b>	8,450	5.758	0,820
	<b>Exatidão (%)</b>	107,907	101,26	106,470

Observa-se que o método apresentou precisão, pois os valores do coeficiente de variação (%) para cada nível de concentração foram inferiores ao limite aceito de 15% e a exatidão correspondente, na faixa de 90 a 114% do valor nominal, cumprindo os parâmetros preconizados (ANVISA, 2003).

## 5.6 Estabilidade da Nimesulida no plasma humano

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. Assim, os ensaios foram planejados e executados com bases nas reais condições de manuseio e análise das amostras. Os resultados obtidos em cada etapa do estudo de estabilidade foram comparados com o de amostras recém-preparadas.

A estabilidade do fármaco em plasma analisada em três ciclos de congelamento e degelo apresentou os resultados obtidos nas Tabelas 10, 11 e 12. Após a comparação entre as variações das médias dos controles de qualidade (CQB, CQM e CQA) para amostras recém-preparadas e a média dos controles de qualidade em cada ciclo de congelamento e degelo, concluiu-se que a Nimesulida analisada no plasma humano permaneceu estável nos três ciclos de congelamento e degelo quando armazenadas a - 20° C.

**Tabela 10:** Determinação da estabilidade da Nimesulida em plasma submetida a ciclo de congelamento e degelo

Concentração nominal de Nimesulida ng/mL	Amostras recém-preparadas				Primeiro ciclo de degelo				Variação média (%)
	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	
600,0	673,099 668,322 675,448 668,884 683,406	673,832	0,908	112,305	685,236 652,744 689,247 607,857 629,486	652,914	5,385	108,819	-3,104
6.000,0	6.002,482 6.020,921 6.069,301 5.657,939 5.691,804	5.888,489	3,344	98,141	5.806,011 5.957,116 5.802,878 5.830,870 5.785,217	5.836,418	1,189	97,274	-0,884
13.000,0	12.485,845 12.985,058 12.698,993 12.823,414	12.883,867	2,745	99,107	13.093,189 12.793,422 12.675,085 12.828,030	12.868,89	1,245	98,991	-0,116

13.426,025

12.954,739

**Tabela 11:** Determinação da estabilidade de Nimesulida em plasma submetida a ciclo de congelamento e degelo.

Concentração nominal de Nimesulida ng/mL	Amostras recém-preparadas				Segundo ciclo de degelo				Variação média (%)
	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	
600,0	673,099 668,322 675,448 668,884 683,406	673,832	0,908	112,305	654,637 585,455 658,901 555,441 554,712	601,829	8,588	100,305	-10,680
6.000,0	6.002,482 6.020,921 6.069,301 5.657,939 5.691,804	5:888,489	3,344	98,141	5.919,446 5.827,601 5.914,091 5.846,877 5.832,694	5.868,142	0,767	97,802	-0,346
13.000,0	12.485,845 12.985,058 12.698,993 12.823,414 13.426,025	12.883,86	2,745	99,107	13.180,953 13.450,090 13.246,098 13.275,527 13.361,063	13.302,74	0,787	102,329	3,251

**Tabela 12:** Determinação da estabilidade de Nimesulida em plasma submetida a ciclo de congelamento e degelo.

Concentração nominal de Nimesulida ng/mL	Amostras recém-preparadas				Terceiro Ciclo de Degelo				Variação média (%)
	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	
600,0	673,099 668,322 675,448 668,884 683,406	673,832	0,908	112,305	677,818 682,676 596,743 633,643 614,481	641,072	5,944	106,845	-4,862
6.000,0	6.002,482 6.020,921 6.069,301 5.657,939 5.691,804	5888,489	3,344	98,141	5.763,698 5.824,012 6.145,375 5.776,072 5.894,121	5.880,656	2,663	98,011	-0,133



13.000,0	12.485,845 12.985,058 12.698,993 12.823,414 13.426,025	12883,86	2,745	99,107	13.190,454 13.188,667 13.240,608 13.363,215 13.105,630	13.217,715	0,716	101,675	2,591
----------	--	----------	-------	--------	--	------------	-------	---------	-------

A estabilidade de curta duração foi avaliada, mantendo-se as amostras dentro do autoinjeter, à temperatura ambiente, e cada amostra de controle de qualidade foi analisada em triplicata nos tempos de 0 a 24 horas, a cada 2 horas. Os resultados obtidos foram comparados com os valores médios de CQB, CQM e CQA obtidos no tempo 0 horas (amostra recém-preparada) com os valores médios de CQB, CQM e CQA obtidos no tempo de 24 horas, conforme a Tabela 13. Os resultados obtidos com desvios abaixo de 8,516 indicam que as amostras permaneceram estáveis dentro do autoinjeter no período de 24 horas.

**Tabela 13:** Médias e desvios obtidos no estudo de estabilidade da Nimesulida em plasma submetida à análise no autoinjeter

Concentração da nimesulida ng/mL	t = 0 horas		t = 24 horas		Variação média (%)
	Concentração determinada *ng/mL	Precisão(%)	Concentração determinada *ng/mL	Precisão(%)	
600,0	657,428	2,570	601,438	1,637	-8,516
6.000,0	5.834,712	2,247	5.823,451	1,523	-0,193
13.000,0	12.899,591	1,105	12.933,678	1,041	0,264

\*Média de três determinações.

A estabilidade das amostras de plasma não processadas foi analisada com amostras recém-preparadas e não processadas, mantidas durante seis horas à temperatura ambiente, e foi comparada com as variações das médias para os controles de qualidade (CQB, CQM e CQA) das amostras mantidas 6 horas à temperatura ambiente em relação às medidas obtidas para as amostras recém-preparadas. O resultado conclui que as amostras foram estáveis, com desvios inferiores a 3,474%, conforme a Tabela 14.

**Tabela 14:** Estabilidade de plasma dopado com solução padrão de Nimesulida, e variação entre as médias dos controles de qualidade para amostras em plasma mantidas à temperatura ambiente por 6 horas em relação às médias das amostras recém-preparadas

Concentração nominal de Nimesulida ng/mL	Amostras recém-preparadas				Amostras analisadas após 6 horas a temperatura ambiente				Variação média (%)
	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	
600,0	673,099 668,322 675,448 668,884 683,406	673,832	0,908	112,305	596,489 661,291 669,211 661,040 664,091	650,424	4,663	108,404	-3,474
6.000,0	6.002,482 6.020,921 6.069,301 5.657,939 5.691,804	5.888,489	3,344	98,141	5.839,547 5.747,996 5.738,249 5.818,102 5.868,292	5.802,437	0,984	96,707	-1,461
13.000,0	12.485,845 12.985,058 12.698,993 12.823,414 13.426,025	12.883,867	2,745	99,107	12.944,340 12.959,419 13.688,804 13.360,975 13.428,089	13.276,322	2,414	102,126	3,046

A estabilidade das soluções padrões foi realizada com solução padrão de Nimesulida 15,0 µg/mL e solução padrão Tolazamida 100,0 µg/mL. As soluções foram analisadas após serem mantidas durante seis horas à temperatura ambiente e depois de mantidas durante sete dias sob refrigeração. Os resultados foram comparados com as variações das médias para cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) das amostras recém-preparadas e mantidas sob refrigeração durante sete dias, conforme a Tabela 15.

**Tabela 15:** Resultado das análises de estabilidade das soluções padrão de Nimesulida e Tolazamida

	Recém-preparada (área)		Amostras analisadas 6 horas após preparo a temperatura ambiente (área)		Amostras analisadas após 7 dias de armazenamento em refrigeração	
	Nimesulida	Tolazamida	Nimesulida	Tolazamida	Nimesulida	Tolazamida
Área	209516	355825	224646	323538	221161	349120
	206964	359998	226225	322819	219721	347951
	206144	357493	225396	323123	221871	349996

	205698 205321	357225 357853	224412 225803	322520 323312	222463 222621	351361 348927
<b>Média</b>	206729	357679	225296	323062	221567	349471
<b>DP</b>	1674,085	1507,155	763,879	401,749	1180964	1282,309
<b>CV(%)</b>	0,810	0,421	0,339	0,124	0,533	0,367

A variação das médias dos controles de qualidade para a Nimesulida analisada 6 horas após o preparo foi de 8,982% e para Tolazamida foi de - 9,678%. Para as amostras mantidas sob refrigeração por 7 dias, obteve-se variação de 7,178% para Nimesulida e de - 2,295% para Tolazamida.

Pesquisou-se a estabilidade da Nimesulida em condições de luz e temperatura no local de desenvolvimento do método analítico. Um fármaco pode ser afetado quimicamente pela radiação de um comprimento de onda específico somente se ela absorver radiação naquele comprimento de onda e a energia exceder um limiar. Radiações ultravioletas, que têm um alto nível energético, são a causa de muitas reações de degradação (GENNARO, 2004).

Fallavena e Schapoval (2004) estudaram a fotodegradação da Nimesulida sob radiação ultravioleta, e os resultados obtidos não foram capazes de demonstrar nenhuma modificação na estrutura do fármaco quando colocado sob luz ultravioleta (254 nm) (FALLAVENA; SCHAPOVAL, 2004).

Se a molécula absorvente reage, diz-se que a reação é de natureza fotoquímica. Quando as moléculas absorventes não participam diretamente da reação, mas passam a sua energia para outras moléculas reativas, a substância absorvente é classificada como um fotossensibilizador (GENNARO, 2004).

A intensidade e o comprimento de onda da luz; e o tamanho, a forma, a composição e a cor do recipiente podem afetar a velocidade da reação (GENNARO, 2004).

Para evitar processos de fotodecomposição, devem-se manipular os fármacos fotossensíveis ou medicamentos baseados nesses fármacos à baixa luz e acondicioná-los em frascos âmbar ou opacos em ambientes escuros.

A estabilidade da solução foi analisada mediante o preparo da solução de Nimesulida (SQR) na concentração de 15 µg/mL, utilizando como solvente o metanol e acondicionada em 2 frascos, sendo 1 frasco cor âmbar (abrigo da luz) e outro transparente (exposição à luz), à temperatura ambiente (~20°C). A estabilidade das soluções em frascos âmbar e transparente foram determinadas por meio da quantificação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com

detecção por espectrofotometria no UV/VIS em 258 nm, usando coluna Phenomenex, Luna – CN (5,0 µm, 150 x 4,5 mm) mantida à temperatura ambiente (~20°C).

A quantificação das concentrações das soluções de Nimesulida foi determinada em quatro tempos, considerada no tempo inicial (tempo zero) como 100%. A segunda análise (tempo 2) foi realizada no oitavo dia; a terceira análise (tempo 3) no décimo oitavo dia e a quarta análise (tempo 4) no vigésimo oitavo dia. Os resultados estão apresentados na Tabela 16. A Figura 6a e Figura 6b apresentam os cromatogramas das análises efetuadas.

**Tabela 16:** Determinação da Nimesulida ao abrigo da luz e em condições normais

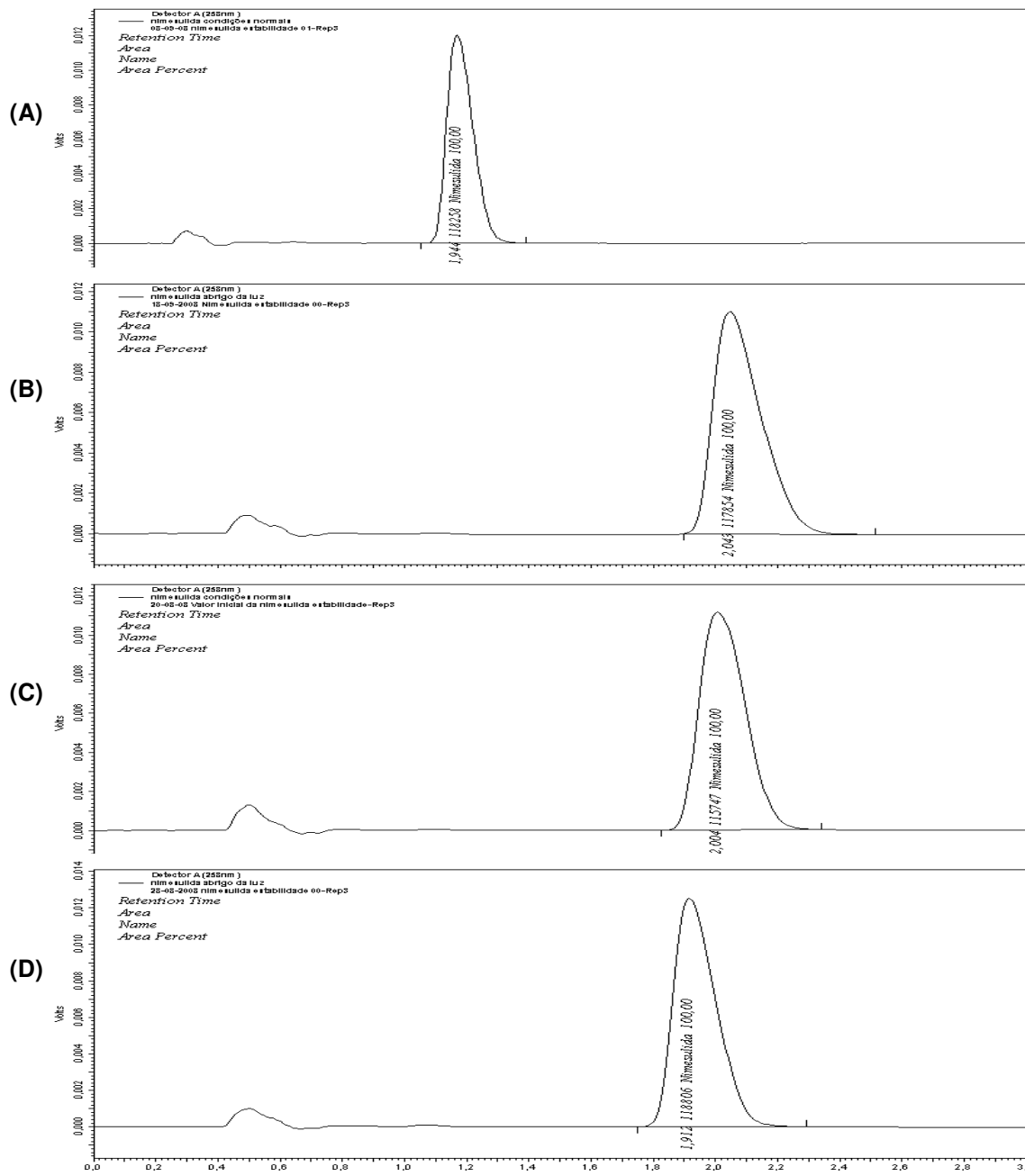
Nimesulida	Abrigo da luz		Exposição à luz	
	Área*	%	Área*	%
Tempo 0	115020	100,00	115020	100,00
Tempo 2	119122	103,56	116596	101,37
Tempo 3	118744	103,23	117924	102,52
Tempo 4	118561	103,07	119372	103,78

\* média de cinco áreas.

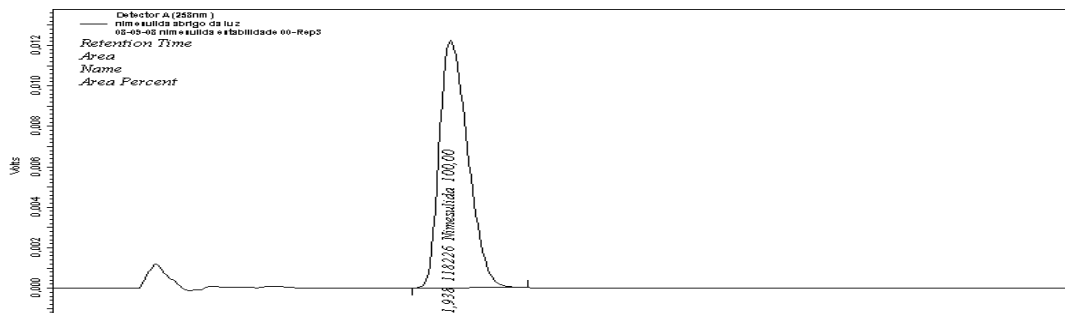
Fallavena e Schapoval (2004) durante seu trabalho observaram que a Nimesulida apresentava modificação de coloração sob luz ultravioleta, e que o fenômeno somente acontecia no fármaco em forma sólida (matéria-prima e comprimido), não em soluções.

Os resultados encontrados durante a quantificação das soluções mostraram que não houve alteração na concentração da solução de Nimesulida, tanto para a solução acondicionada em frasco âmbar, como para a acondicionada em frasco transparente (condições normais).

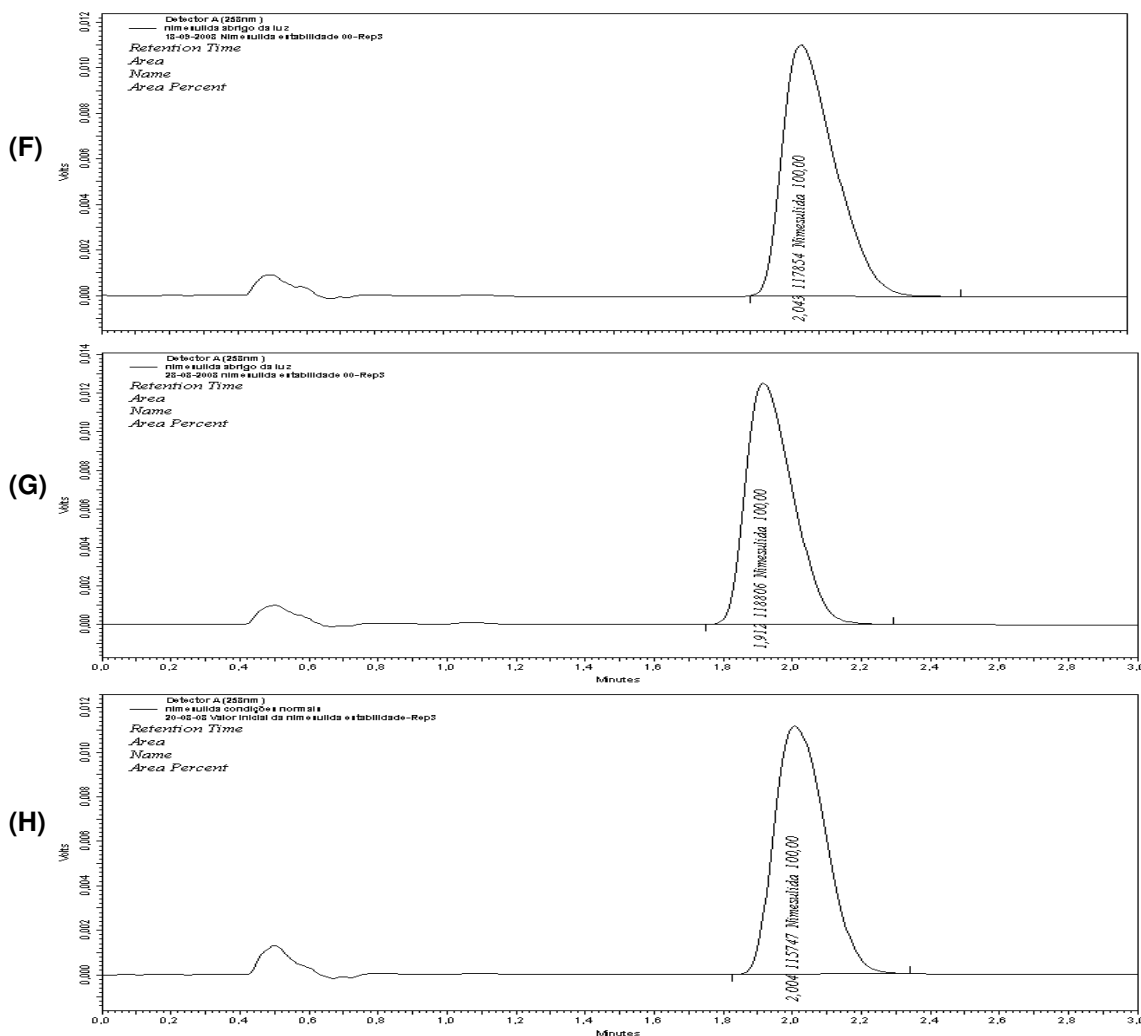
A solução de Nimesulida acondicionada em frasco transparente não teve alteração na coloração em comparação com a acondicionada em frasco âmbar (ao abrigo da luz).



**Figura 6a:** Cromatogramas da Nimesulida 15 µg/mL exposição a luz: (A) tempo zero, (B) tempo 2, (C) tempo 3 e (D) tempo 4. Condições cromatográficas: coluna analítica Phenomenex®, Luna-CN (5,0 µm, 150 x 4,6 mm); fase móvel Tampão fosfato 0,05M, pH 5,5; Metanol:Acetonitrila ( 4:2,5:3,5 , v/v/v); vazão 3,0 mL/min; detecção 258 nm.



(E)



**Figura 6b:** Cromatogramas da Nimesulida 15 µg/mL ao abrigo da luz: (E) tempo zero, (F) tempo 2, (G) tempo 3 e (HD) tempo 4. Condições cromatográficas: coluna analítica Phenomenex®, Luna-CN (5,0 µm, 150 x 4,6 mm); fase móvel Tampão fosfato 0,05M, pH 5,5: Metanol:Acetonitrila (4:2,5:3,5 , v/v/v); vazão 3,0 mL/min; detecção 258 nm.

Avaliou-se também a estabilidade do fármaco em plasma, em condições de estabilidade de longa duração, tendo sido 3 diferentes concentrações (CQB – 600,0 ng/mL, CQM – 6.000,0 ng/mL e CQA – 13.000,0 ng/mL) em quintuplicata. As amostras foram analisadas em tempo inicial e após 63 dias estocadas nas mesmas condições que as amostras de plasma dos voluntários analisados (-20°C), conforme a Tabela 17.

**Tabela 17:** Estabilidade de longa duração para a Nimesulida em fluido biológico e variação das médias dos controles de qualidade para as amostras de longa duração em relação às médias das amostras recém-preparadas

Concentração nominal de Nimesulida ng/mL	Amostras recém-preparadas				Amostras de longa duração				Variação média (%)
	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	Concentrações determinadas ng/mL	Média	Precisão (%)	Exatidão (%)	
600,0	673,099 668,322 675,448 668,884 683,406	673,832	0,908	112,305	642,074 639,800 641,509 659,949 683,210	653,308	2,849	108,885	-3,046
6.000,0	6.002,482 6.020,921 6.069,301 5.657,939 5.691,804	5.888,489	3,344	98,141	5.992,154 6.096,899 5.965,861 5.653,688 5.564,042	5.854,529	3,958	97,575	-0,577
13.000,0	12.485,845 12.985,058 12.698,993 12.823,414 13.426,025	12.883,867	2,745	99,107	13.255,132 13.304,493 13.408,718 13.156,104 13.431,194	13.311,121	0,850	102,393	3,316

A comparação dos valores médios dos controles de qualidade para as amostras no tempo inicial com os valores médios dos controles de qualidade para as amostras armazenadas durante 63 dias estão abaixo dos desvios permitidos para os três controles analisados, podendo-se concluir que a Nimesulida analisada em plasma humano permaneceu estável durante o período de tempo que ficou armazenada.

Os testes realizados para avaliar a estabilidade do fármaco em plasma forneceram resultados dentro dos limites especificados, indicando que as condições de manuseio e análises das amostras são adequadas.

Os resultados obtidos durante os testes realizados demonstraram que o método apresentou precisão, exatidão, linearidade, limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise (ANVISA, 2003).

## VI. CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por fase reversa permitiu uma rápida detecção e quantificação da Nimesulida em plasma humano. O método desenvolvido utilizando fase móvel constituída de Tampão Fosfato (0,05 mol/L):Metanol:Acetonitrila (4:2,5:5,5; v/v/v), extração líquido-líquido usando diclorometano como solvente extrator e detecção no ultravioleta em comprimento de onda a 258 nm, mostrou-se sensível, preciso, exato e linear em faixa de concentração de 200 a 15.000 ng/mL.

O método desenvolvido apresentou grandes vantagens em comparação a outros trabalhos desenvolvidos, principalmente, comparando-se ao tempo de corrida da amostra, quantidade de amostra injetada e quantidade de amostra biológica utilizada.

As amostras analisadas mostraram-se estáveis durante o período de tempo que ficou armazenada, indicando que as condições de manuseio e análises são adequadas.

O método mostrou-se eficaz, confiável e apropriado para determinações quantitativas de Nimesulida em plasma humano.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei n.9.787, de 10 de fevereiro de 1999. **Medicamento Genérico**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 24 de setembro de 1999.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: Diário Oficial da União, 2003.

ASTIGARRAGA, R. E. B.; VANNUCHI, Y. B.; SUCUPÍRA, M.; MORENO, R. A.; MUSCARÁ, M. N.; NUCCI, G. D. Quantification of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence studies. **Journal of Mass Spectrometry**, v.36, p.128, 2001.

BEDOR, D. C. G. **Desenvolvimento e validação de metodologias bioanalíticas para estudo de dosagem de antibióticos em plasma humano**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 2007.

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



BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M.; MARASCA, J. Antiinflamatórios não hormonais convencionais. **Rev. Bras. Medicina**, v. 57, p. 33-40, 2000.

CARINI, M.; ALDINI, G.; STEFANI, R.; MARINELLO, C.; FACINO, R. M. Mass spectrometric characterization and HPLC determination of the main urinary metabolites of nimesulide in main. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 18, p. 201-211, 1998.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; SANTOS, F. R. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Rev. Bras. Anestesiol.**, v. 54, p. 448-464, 2004.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC, fundamentos, estratégia e validação**. Séries Apontamentos, edição revista em dezembro. Ed. da Universidade Federal de São Carlos, 2001.

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

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

CHOW, S. C.; LIU, J. P. **Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies**. New York, Marcel Dekker: 2000.

CODEX Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling. **Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes**, CX/MAS 95/3, 1995.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 4. Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1988. p. 356-361.

DRUMMER, O. H. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. **Journal of Chromatogr. B**, v. 733, p. 27, 1999.

FALLAVENA, P. R. B.; SCHAPOVAL, E. E. Um radical livre na fotodegradação da Nimesulida sob radiação ultravioleta. **Química Hoje**, v. 5, p. 9-12, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

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

FERRARIO, P.; BIANCHI, M. J. Chromatography, B: **Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 785, p. 227, 2003.

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

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica - fundamentos da terapêutica racional**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 296-305.

GENNARO, A. R.; **A ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.1023-1041.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; SERRANO, S. H. P.; FISCHER, D. C. H.; MACHADO, S. A.S.; MATIAS, R.; BARA, M. T. F.; CIRILO, H. N. C.; FIGUEIREDO, G.; BARBOSA, W. G. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p. 41-51.

HAGESTAM, H.; PINKERTON, T. C. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 57, p. 1757-1763, 1985.

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

HUBERT, Ph.; CECCATO, A.; CHIAP, P.; TOUSSAINT, B.; CROMMEN, J. **STP Pharma Prt.** 1999. v. 9, p. 160.

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

JUNIOR, B. L. **Desenvolvimento e validação de metodologias para avaliação do Etoricoxibe por Cromatografia Líquida e Espectrofotometria de Massas**. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacuticas) – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Rio Grande do Sul, 2006.

KHAKSA, G.; UDUPA, N. Rapid and sensitive method for determination of nimesulid in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 727, p. 241-244, 1999.

KULCARNI, S. K. On the safety of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor. *Current Science*, v. 83, n. 12, p. 1442-1443, 2002.

KUMAR, V. V. P.; VINU, M. C. A.; RAMANI, A. V.; MULLANGI, R.; SRINIVAS, N. R. Simultaneous quantitation of etoricoxib, salicylic acid, valdecoxib, ketoprofen, nimesulide and celecoxib in plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Biomedical Chromatography**. v. 20, p.125-132, 2006.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LAGES, A. S.; ROMEIRO, N. C.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Inibidores seletivos de prostaglandina endoperóxido sintase-2 (PGHS-2). **Química Nova**, Brasil, v. 21, n. 6, p. 761-771, 1998.

LAMM, W.; VORMITTAG, L.; TURHANI, D.; EROVIC, B. M.; CZEMBIREK, C.; CZEMBIREK, E. ; THURNHER, D. The effect of Nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on ETs-1 and ETs-2 expression in head and neck cancer cell lines. **Head & Neck**, DOI: 10.1002/hed. 20285, 1068-1072, 2005.

LEONE, R.; CONFORTI A.; GHIOTTO E.; MORETTI U.; VALVO, E.; VELO, G. P. Nimesulide and renal impairment. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 151-154, 1999.

LOPES, A. C. **Tratado de Clínica Médica**. Volume 1. São Paulo: Roca, 2006. v. 1, p.1816-1823.

MALTESE, A.; MAUGERI, F.; BUCOLO, C. **J.Chromatography B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, 804, 441, 2004.

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

MOREIRA, C.; CARVALHO, M. A. P. **Reumatologia-diagnóstico e tratamento**. 2. ed. Belo Horizonte: Medsi, 2001. p. 703-715.

NETO & NUNES. **Cromatografia** – Princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. p. 30.

OLIVEIRA, J. J. O.; SERRANO, S. C.; TEODORO, A. L.; DANA, B. A. Os antiinflamatórios não hormonais. **Prática hospitalar**, v.9, n. 51, n. 173-8, 2007.

PIEL, G.; PIROTTE, B.; DELNEUVILLE, I.; NEVEN, P.; LLABRES, G.; DELARGE, J.; DELATTRE, L. Study of the influence of both cyclodextrins and l- lysine on the aqueous solubility of nimesulide; isolation and characterization of nimesulide-l-lysine-cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86 n. 4,p. 475-480, 1997.

POLETTINI, A. Fully-automated systematic toxicological analysis of drugs, poisons, and metabolites in whole blood, urine, and plasma by gas chromatography-full scan mass spectrometry. **Journal Chromatogr. B.**, v. 733, p. 47, 1999.

PTACEK, P.; MACEK, J.; KLÍMA, J. Rapid and simple high-performance liquid chromatographic determination of nimesulide in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 758, p. 183-188, 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68; 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods, **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 236-247.

RAO, R. N.; MEENA, S.; NAGARAJU, D.; RAO A. R. R. Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for separation and simultaneous determination of COX-2 inhibitors in pharmaceuticals and its application to biological fluids. **Biomedical Chromatography**, v. 19, p. 362-365, 2005.

ROMEU, G. A.; KANO, E. K.; ROLIM, C. M. B.; SERRA, C. H. R.; FERRAZ, H. G.; Porta, V. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de doxicilina em plasma humano. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 20, n. 3, p. 193-198, 2007.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação *in vitro*. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 165-168, 2009.

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

SHUMACHER, H. R.; KLIPPEL, J. H.; KOOPMAN, W. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: **KLIPPEL, J. H. Primer in the rheumatic disease**. 12. ed. Georgia: Arthritis Foudation, 2001. p. 583.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 431-455.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 641-661.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J.J. **Practical HPLC method development**”, 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 1997. p. 100-173.

SORA, I.; GALAON, T.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A. Determination of nimesulide and its active metabolite in plasma samples based on solvent deproteinization and HPLC-DAD analysis. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 52, n. 5, p. 449-507, 2007.

STEVENSON, D. Sample preparation In: **High performance liquid chromatography, fundamental principles and practice**. Wainer, I.W. and Lough, W.J., Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 168-185.

TUBIC', B.; IVKOVIC', B.; ZECEVIC', M. VLADIMIROV, S. Simultaneous determination of nimesulide and its impurities in pharmaceutical formulations by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Acta Chim. Slov.**, v. 54, p. 583-590, 2007.

WHO-World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. *Thirty-second report*, **WHO Technical Report Series**, n.823, Geneva, 1992.