

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

**ALEXANDRE CAVENATTI DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA  
ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE RIVAROXABANA EM  
PLASMA HUMANO UTILIZANDO LC-MS/MS COM APLICAÇÃO  
EM ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA / BIODISPONIBILIDADE**

Bragança Paulista  
2019

**ALEXANDRE CAVENATTI DE OLIVEIRA – R.A. 001201806609**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE RIVAROXABANA EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO LC-MS/MS COM APLICAÇÃO EM ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA / BIODISPONIBILIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para qualificação como Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de Concentração:** Farmacologia Geral e Clínica.

**Orientador:** Dra. Andréia de Melo Porcari

**Coorientador:** Dra. Márcia Aparecida Antônio

Bragança Paulista  
2019

QV 38  
O45d

Oliveira, Alexandre Cavenatti de  
Desenvolvimento e validação de uma metodologia  
analítica para quantificação de Rivaroxabana em plasma  
humano utilizando LC-MS/MS com aplicação em estudos  
de bioequivalência/biodisponibilidade / Alexandre Cavenatti de  
Oliveira. – Bragança Paulista, 2019.  
94 p.

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

Orientação de: Andréia de Melo Porcari.

Coorientação de: Márcia Aparecida Antônio.

1. Rivaroxabana. 2. Cromatografia a líquido.  
3. Espectrometria de massas. 4. Validação analítica.  
I. Porcari, Andréia de Melo. II. Antônio, Márcia Aparecida.  
III. Título.

**OLIVEIRA, Alexandre Cavenatti de** "*Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia Analítica para Quantificação de Rivaroxabana em Plasma Humano Utilizando LC-MS/MS com Aplicação em Estudos de Bioequivalência/ Biodisponibilidade*". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 28 de outubro de 2019 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



---

**Andréia de Melo Porcari (Orientadora)**  
**Universidade São Francisco**



---

**Patrícia de Oliveira Carvalho**  
**Universidade São Francisco**



---

**Daniel Rossi de Campos**  
**Membro Externo**

## AGRADECIMENTOS

A fonte de inspiração para realização desse trabalho vem do Grande Mistério, essa força complexa e profunda que nos move, que dá sentido às nossas escolhas e nos faz evoluir nessa jornada extraordinária chamada vida.

Primeiramente, a minha querida esposa Caroline Helena, ao meu filho Heitor e a minha gatinha Kyrara, que são a minha razão e os amores da minha vida e que sem o incondicional apoio, compreensão e carinho não teria meios de concluir essa importante etapa. A minha mãe Rosângela e meu irmão Rodrigo por serem minha base. Ao meu pai, José Rubéns, que mesmo já tendo partido, está presente em meus pensamentos e em meu coração todos os dias.

A **Universidade São Francisco** que me acolheu desde o início da minha formação acadêmica, me concedeu um trabalho digno e que me proporcionou conquistar grande parte dos meus sonhos e realizações na minha vida profissiona e que neste momento, mais uma vez, possibilitou a realização desse passo fundamental para o início da minha carreira acadêmica.

A **UNIFAG** e aos colegas e amigos que me deram suporte técnico e emocional para prosseguir com os desafios desse trabalho, em especial, Danilo Berton, Edvaldo Coelho, Maira Zanin, Márcia Aparecida Antônio e todos os demais que foram importantes nessa trajetória.

Ao colega Daniel Rossi de Campos que, gentilmente, concedeu a autorização para utilização dos dados dos estudos para demonstração de aplicação da metodologia, sem o qual, este trabalho não teria sido completo.

Ao colega Marcelo Davanço, pela sua disponibilidade e contribuições técnicas.

A minha orientadora, Andréia de Melo Porcari, sempre compreensiva e disposta a me ajudar e auxiliar nesse caminho, por compartilhar da sua experiência e conhecimentos comigo e me possibilitar desenvolver da melhor forma esse trabalho.

Aos membros da banca examinadora por dedicar seu tempo e compartilhar seus conhecimentos para melhoria e aperfeiçoamento deste trabalho e dos meus conhecimentos.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para essa realização.

E por fim, **a vida**, que me trouxe até aqui...

## EPÍGRAFE

*“A ciência é, portanto, uma perversão de si mesma, a menos que tenha como fim último, melhorar a humanidade”.*

**Nikola Tesla**

## RESUMO

A bioequivalência é um importante parâmetro da qualidade dos medicamentos que correlaciona o desempenho *in vivo* de um produto de referência a uma formulação de teste, contribuindo para evidências de segurança e eficácia. Esta é uma etapa crucial para composição do dossiê técnico para submissão conjunta com os demais ensaios *in vitro* que corroboram para liberação da comercialização do medicamento genérico. Neste trabalho, foi desenvolvida e validada metodologia analítica para quantificação de rivaroxabana em plasma humano em concordância com a normativa RDC 27/2012 da ANVISA e demais legislações aplicáveis. A rivaroxabana é um anticoagulante, fabricado pela Bayer HealthCare AG e vendido sob o nome comercial Xarelto®, sendo que sua fabricação está protegida por patente até 2022 no Brasil, fato que propulsiona estudos de bioequivalência desse fármaco. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) é a técnica de escolha para estudos de bioequivalência devido ao seu alto grau de sensibilidade e seletividade, sendo consolidada e referência para estudos com fármacos em matrizes complexas. O método LC-MS foi desenvolvido e validado utilizando cromatografia em fase reversa, num tempo total de corrida de 4 minutos, empregando um equipamento do tipo triplo-quadrupolo equipado com fonte de ionização por electrospray. O limite inferior de quantificação obtido para o método foi de 1 ng/mL e faixa linear foi de 1 a 600 ng/mL, na presença de padrão interno (Rivaroxabana-D<sub>4</sub>) com um método de extração líquido-líquido, partindo de 200 µL de plasma. Foram avaliados e comparados dois estudos de bioequivalência, ambos realizados nas instalações da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia com subsídio da indústria farmacêutica, nas seguintes condições de administração em voluntários sádios: (i) jejum (n = 48) e (ii) pós-prandial (n = 36). O fármaco foi administrado na dose de 20 mg, sendo que a amostra biológica (sangue) foi coletada durante as 48 horas seguintes após sua administração, em intervalos de tempo pré-estabelecidos. O sangue foi centrifugado e o plasma coletado foi encaminhado para extração e análise, utilizando a metodologia bionalítica desenvolvida e validada neste projeto. Os limites de precisão e exatidão encontraram-se em concordância com aqueles dispostos na normativa RDC 27/2012 da ANVISA e a aplicação da metodologia foi demonstrada através das curvas farmacocinéticas do medicamento referência em dois estudos distintos (jejum e pós-prandial) e o perfil farmacocinético observado corroborou com o disposto na literatura.

**PALAVRAS-CHAVE:** Rivaroxabana. Cromatografia a líquido. Espectrometria de massas. Validação analítica.

## ABSTRACT

Bioequivalence is an important drug quality parameter that correlates the *in vivo* performance of a reference product with a test formulation, contributing to evidence of safety and efficacy. This is a crucial step for the composition of the technical dossier for joint submission with the other *in vitro* tests that corroborate to the commercialization of the generic drug. In this work, analytical methodology for the quantification of rivaroxaban in human plasma was developed and validated in accordance with RDC 27/2012 (ANVISA) and other applicable laws. Rivaroxaban is an anticoagulant manufactured by Bayer HealthCare AG and sold under the tradename Xarelto®, and its manufacture is protecting by patent until 2022 in Brazil, a fact that promotes bioequivalence studies of this drug. High performance liquid chromatography coupled with sequential mass spectrometry (LC-MS/MS) is the technique of choice for bioequivalence studies due to its high degree of sensitivity and selectivity, being consolidated and reference for studies with drugs in complex matrices. The LC-MS method was developed and validated, using reverse phase chromatography over a total run time of 4 minutes employing a triple-quadrupole type equipment equipped with an electrospray ionization source. The lower limit of quantification obtained for the method was 1 ng/mL and the linear range was 1 to 600 ng/mL, in the presence of internal standard (Rivaroxabana-D<sub>4</sub>) with a liquid-liquid extraction method, starting from 200 µL of plasma. Two bioequivalence studies were evaluated and compared, both performed at the facilities of the Integrated Pharmacology and Gastroenterology Unit with subsidies from the pharmaceutical industry under the following conditions of administration to healthy volunteers: (i) fasting (n = 48) and (ii) fed (n = 36). The drug was administered at a dose of 20 mg, and the biological sample (blood) was collected within 48 hours of administration at pre-established time intervals. The blood was centrifuged and the collected plasma was sent for extraction and analysis, using the bionalitic methodology developed and validated in this project. The limits of precision and accuracy were in agreement with those established by ANVISA and the application of the methodology was demonstrated through the pharmacokinetic curves of the reference drug in two different studies (fasting and fed) and the profile pharmacokinetics observed corroborated the literature.

**KEYWORDS:** Rivaroxaban. Liquid chromatography. Mass spectrometry. Analytical Validation.

## PÁGINA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC - Área sob a curva

B – Amostra Branco

C<sub>máx</sub> - Concentração Plasmática Máxima

CQ - Controle de Qualidade

CQA - Controle de Qualidade Alto

CQB - Controle de Qualidade Baixo

CQD - Controle de Qualidade Diluído

CQM - Controle de Qualidade Médio

CRM - *charged residue mode*

CV% - Coeficiente de Variação

DP - Desvio Padrão

DRP - Desvio Padrão Relativo

EMA - *European Medicines Agency*

ESI - Ionização por *Electrospray*

FDA - *Food and Drug Administration*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HUSF - Hospital Universitário São Francisco

IEM - *ion evaporation mode*

LC-MS/MS - *Liquid chromatography coupled to mass spectrometry*

LID - Limite Inferior de Detecção

LIQ - Limite Inferior de Quantificação

*m/z* - razão massa/carga

MeCN - Acetonitrila

MeOH - Metanol

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas

MS - *Mass spectrometry*

MS/MS - *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*

NBR - Norma Brasileira de Regulamentação

°C - graus Celsius

OH - Hidroxila

OMS - Organização Mundial de Saúde  
PK - Farmacocinética  
PI - Padrão Interno  
R - Coeficiente de Correlação  
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada  
RE - Resolução (Legislação)  
RF - Radio Frequência  
Rs - Resolução  
T<sub>0</sub> - Tempo Zero  
T<sub>1/2</sub> - Tempo de meia vida  
T<sub>máx</sub> - Tempo máximo  
Tr - Tempo de Retenção  
UNIFAG - Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia  
UPLC - *Ultra Performance Liquid Chromatography*  
USP - *United States Pharmacopeia*  
Z - Zero

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. Representação esquemática do sistema de HPLC.</b> O sistema é composto por duas bombas, auto injetor, coluna cromatográfica, sistema de detecção e um microcomputador. Fonte: Figura adaptada de YASSINE MRABET (2018, pág. 4).....	25
<b>FIGURA 2. Estrutura molecular da rivaroxabana.</b> É uma molécula orgânica, de característica básica em função dos grupos funcionais nitrogenados (amidas) e com predominância apolar. Fonte: Acervo pessoal. ....	32
<b>FIGURA 3. Resumo esquemático diferencial entre farmacocinética e farmacodinâmica.</b> Esquematização do processo de absorção, distribuição e eliminação do fármaco no organismo. Fonte: NETO & MARTINS (2015, pág. 1). ....	34
<b>FIGURA 4. Demonstração de uma curva farmacocinética.</b> Curva de concentração <i>versus</i> tempo em plasma, destacando as fases de absorção e eliminação, assim como, os parâmetros farmacocinéticos de $T_{máx}$ , $C_{máx}$ e ASC. Fonte: Figura adaptada de CHOW (2014, pág. 306). ....	35
<b>FIGURA 5. Representação do espectro na função MS.</b> Espectro de identificação do íon precursor no modo de varredura (full scan). Fonte: Acervo pessoal. ....	51
<b>FIGURA 6. Representação do espectro na função MS/MS.</b> Espectro de identificação do íon precursor e íon produto no modo MRM ( <i>multiple reaction monitoring</i> ). Fonte: Acervo pessoal. ....	52
<b>FIGURA 7. Representação do cromatograma analítico.</b> Cromatograma dos picos do analito (1) e padrão interno (2) conforme MRM ( <i>multiple reaction monitoring</i> ) definido. Fonte: Acervo pessoal. ....	52
<b>FIGURA 8. Fluxograma representando os métodos de extração avaliados.</b> Esquematização dos processos de extração avaliados com as variações de tipo (desproteínização e líquido-líquido) e dos reagentes aplicados em cada método. Fonte: Acervo pessoal. ....	54
<b>FIGURA 9. Cromatograma branco normal.</b> Referente ao lote de plasma normal PLS 455/2017 em EDTA. Fonte: Acervo pessoal. ....	57
<b>FIGURA 10. Cromatograma branco lipêmico.</b> Referente ao lote de plasma lipêmico PLS 34/2017 em EDTA. Fonte: Acervo pessoal. ....	58
<b>FIGURA 11. Cromatograma branco hemolisado.</b> Referente ao lote de plasma hemolisado PLS 34/2017 em EDTA. Fonte: Acervo pessoal. ....	58
<b>FIGURA 12. Cromatograma de plasma extraído.</b> Referente ao plasma extraído dopado na concentração do LIQ com PI. Fonte: Acervo pessoal. ....	58

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1: Representação gráfica da Linearidade 1.</b> Observou-se a correlação proporcional entre os resultados de cada ponto, demonstrando assim, a linearidade do método. ....	61
<b>GRÁFICO 2: Representação gráfica da Exatidão Intracorrida 1.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	64
<b>GRÁFICO 3: Representação gráfica da Exatidão Intracorrida 2.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	64
<b>GRÁFICO 4: Representação gráfica da Exatidão Intracorrida 3.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	65
<b>GRÁFICO 5: Representação gráfica da Exatidão Intercorrida.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	67
<b>GRÁFICO 6: Representação gráfica da Exatidão Intercorrida.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	71
<b>GRÁFICO 7: Representação gráfica da Estabilidade Pós Processamento.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	72
<b>GRÁFICO 8: Representação gráfica da Estabilidade de Curta Duração.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	74
<b>GRÁFICO 9: Representação gráfica da Estabilidade de Ciclos de Degelo.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	76
<b>GRÁFICO 10: Representação gráfica da Estabilidade de Longa Duração.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	77

<b>GRÁFICO 11: Representação gráfica da Estabilidade de Solução em Bancada.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	79
<b>GRÁFICO 12: Representação gráfica da Estabilidade de Solução em Dias de Preparo.</b> Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.....	80
<b>GRÁFICO 13: Representação gráfica do perfil farmacocinético da Rivaroxabana.</b> Administração do medicamento referência, nas condições jejum <i>versus</i> pós-prandial.....	81

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Descrição de equipamentos e materiais utilizados no processo. ....	39
<b>Tabela 2:</b> Componentes do sistema LC-MS/MS utilizado nas análises. ....	39
<b>Tabela 3:</b> Padrões de referência do analito, padrão interno e dos fármacos de uso concomitante utilizados no preparo das soluções. ....	41
<b>Tabela 4:</b> Reagentes e solventes utilizados nas análises. ....	42
<b>Tabela 5:</b> Preparo da curva de calibração utilizada nas análises de rivaroxabana. ....	44
<b>Tabela 6:</b> Preparo dos controles de qualidade utilizados nas análises de rivaroxabana. ....	45
<b>Tabela 7:</b> Exames laboratoriais vinculados ao processo de seleção dos voluntários. ....	50
<b>Tabela 8:</b> Condições cromatográficas utilizadas na metodologia analítica. ....	56
<b>Tabela 9:</b> Condições de detecção utilizadas na metodologia analítica. ....	56
<b>Tabela 10:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Seletividade. ....	57
<b>Tabela 11:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Efeito Residual. ....	59
<b>Tabela 12:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Efeito de Matriz. ....	60
<b>Tabela 13:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Linearidade. ....	60
<b>Tabela 14:</b> Análise intracorrída dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de rivaroxabana. ....	63
<b>Tabela 15:</b> Análise intracorrída do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) para rivaroxabana. ....	63
<b>Tabela 16:</b> Análise intracorrída do controle de qualidade LIQ de rivaroxabana. ....	63
<b>Tabela 17:</b> Análise intercorrídas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de rivaroxabana. ....	66
<b>Tabela 18:</b> Análise intercorrídas do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) de rivaroxabana. ....	66
<b>Tabela 19:</b> Análise intercorrídas do controle de qualidade LIQ de rivaroxabana. ....	66
<b>Tabela 20:</b> Validação da reinjeção de Rivaroxabana. ....	68
<b>Tabela 21:</b> Variação das médias dos controles de qualidade para rivaroxabana na reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção. ....	68
<b>Tabela 22:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Seletividade na presença de fármacos de uso concomitante. ....	69
<b>Tabela 23:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Efeito de Matriz na presença de fármacos de uso concomitante. ....	70

<b>Tabela 24:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Exatidão e Precisão na presença de fármacos de uso concomitante para rivaroxabana. ....	70
<b>Tabela 25:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade Pós Processamento (auto-injetor) de Rivaroxabana. ....	72
<b>Tabela 26:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de amostras recém-preparadas utilizadas no estudo de estabilidade de rivaroxabana. ....	73
<b>Tabela 27:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade de curta duração de Rivaroxabana.....	74
<b>Tabela 28:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade de Rivaroxabana submetida à três ciclos de congelamento e degelo.....	75
<b>Tabela 29:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade de Longa Duração de Rivaroxabana.....	77
<b>Tabela 30:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade das soluções padrão de rivaroxabana. ....	78
<b>Tabela 31:</b> Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade das soluções padrão de rivaroxabana-D <sub>4</sub> . ....	78
<b>Tabela 32:</b> Parâmetros farmacocinéticos dos estudos JPJ 32/17 (jejum) e JPJ 33/17 (pós-prandial).....	82
<b>Tabela 33:</b> Fator de comparação nas condições jejum e pós prandial. ....	82
<b>Tabela 34:</b> Parâmetros PK. Administração de 20 mg de rivaroxabana em Jejum e Pós-Prandial (n = 24). ....	82
<b>Tabela 35:</b> Biodisponibilidade Pós-prandial <i>versus</i> Jejum após administração de 20 mg de rivaroxabana. ....	82
<b>Tabela 36:</b> Relação das principais características e variáveis dos estudos. ....	83
<b>Tabela 37:</b> Teste-t de duas amostras presumindo variâncias diferentes para C <sub>máx</sub> . ....	84
<b>Tabela 38:</b> Teste-t de duas amostras presumindo variâncias diferentes para ASC. ....	84

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 O medicamento genérico e seu impacto no mercado brasileiro</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Bioequivalência e Biodisponibilidade</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3 Aplicação da Metodologia Bionalítica</b> .....	<b>22</b>
1.3.1 <i>Métodos Cromatográficos</i> .....	23
1.3.2 <i>Espectrometria de Massas</i> .....	25
<b>1.4 Validação de Métodos Bioanalíticos</b> .....	<b>26</b>
1.4.1 <i>Seletividade / Especificidade</i> .....	27
1.4.2 <i>Efeito Residual</i> .....	27
1.4.3 <i>Efeito de Matriz</i> .....	28
1.4.4 <i>Linearidade</i> .....	28
1.4.5 <i>Exatidão e Precisão</i> .....	29
1.4.6 <i>Estabilidades na Matriz Biológica e em Solução</i> .....	30
<b>1.5 Rivaroxabana</b> .....	<b>31</b>
<b>1.6 Parâmetros Farmacocinéticos em Estudos de Bioequivalência</b> .....	<b>33</b>
1.6.1 <i>Perfil Farmacocinético da Rivaroxabana</i> .....	35
1.6.1.1 <i>Absorção e biodisponibilidade</i> .....	35
1.6.1.2 <i>Distribuição</i> .....	37
1.6.1.3 <i>Metabolismo e eliminação</i> .....	37
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>38</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Materiais</b> .....	<b>39</b>
3.1.1 <i>Equipamentos e Materiais</i> .....	39
3.1.2 <i>Padrões Analíticos</i> .....	40
3.1.3 <i>Reagentes e Solventes</i> .....	41
3.1.4 <i>Material Biológico</i> .....	42
<b>3.2 Métodos</b> .....	<b>42</b>
3.2.1 <i>Preparo das soluções padrão</i> .....	42
3.2.1.1 <i>Solução padrão da Rivaroxabana (analito)</i> .....	42

3.2.1.1.1 Solução padrão do Rivaroxabana-D <sub>4</sub> (padrão interno) .....	43
3.2.2 Preparo dos padrões da curva de calibração e das amostras controle de qualidade.....	43
3.2.3 Preparo da curva de calibração e controles de qualidade da Rivaroxabana .....	44
3.2.4 Desenvolvimento da Metodologia Analítica .....	45
3.2.5 Validação Pré-Estudo .....	47
3.2.6 Aplicação da Metodologia Analítica .....	48
3.2.6.1 População do Estudo .....	48
3.2.6.2 Cálculos das Concentrações de Amostras.....	50
3.2.6.3 Desenho e Modelo Estatístico Aplicado ao Estudo .....	50
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Desenvolvimento da Metodologia Analítica .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Validação da Metodologia Analítica.....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Seletividade.....	57
4.2.2 Efeito Residual .....	59
4.2.3 Efeito de Matriz .....	59
4.2.4 Linearidade / Curva de Calibração .....	60
4.2.5 Exatidão e Precisão .....	61
4.2.5.1 Validação Intracorrída .....	62
4.2.5.2 Validação intercorridas.....	65
4.2.5.3 Validação da reinjeção.....	67
4.2.6 Validação da análise de fármacos de uso concomitante.....	68
4.2.6.1 Seletividade na presença de fármacos de uso concomitante .....	68
4.2.6.2 Efeito de Matriz na presença de fármacos de uso concomitante .....	69
4.2.6.3 Exatidão e Precisão na presença de fármacos de uso concomitante .....	70
4.2.7 Estudo de Estabilidade do Fármaco .....	71
4.2.7.1 Estabilidade Pós Processamento (Auto-Injetor) .....	71
4.2.7.2 Amostras Recém-Preparadas em Plasma .....	73
4.2.7.2.1 Estabilidade de Curta Duração .....	73
4.2.7.2.2 Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo .....	75
4.2.7.2.3 Estabilidade de longa duração .....	76
4.2.7.3 Estabilidade de soluções padrão.....	78
<b>4.3 Aplicação da Metodologia Analítica em Estudos de Bioequivalência .....</b>	<b>81</b>
<b>4.4 Comparação dos Perfis Farmacocinéticos.....</b>	<b>82</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>93</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O medicamento genérico e seu impacto no mercado brasileiro

Desde a criação do Ministério da Saúde em 1953, as políticas de saúde têm alcançado importantes avanços visando a consolidação do entendimento da importância da saúde pública no Brasil; entretanto foi somente em 1986, durante a 8ª Conferência Nacional de Saúde que foram lançadas as diretrizes para a construção de um sistema descentralizado e único, ao qual foi atribuída, conforme previsto no inciso I do Art. 200 da Constituição Federal do Brasil (1988), a competência de controlar e fiscalizar procedimentos, produtos e substâncias de interesse para a saúde e participar da produção de medicamentos, equipamentos, imunobiológicos, hemoderivados e outros insumos.

Já em 1990, através da Lei Orgânica de Saúde (Lei 8080/90), foi criado o Sistema Único de Saúde (SUS), marcando o entendimento de que a saúde é um dever do Estado e um direito do cidadão. Assim, a partir da criação do SUS, é ampliado o conceito de saúde no Brasil, tendo como preocupação não apenas com o tratamento de doenças, mas também sua prevenção, com ações de promoção, proteção e recuperação da saúde, adotando-se os seguintes princípios doutrinários: universalidade, equidade e integralidade.

É a partir destes princípios que as estratégias de ação pública são pensadas e, especificamente com relação à garantia ao acesso dos cidadãos aos serviços de saúde, aos medicamentos e à qualidade de vida, sendo disposto no § 1º do art. 2º da Lei Orgânica da Saúde (Lei nº 8.080/90) que é "... dever do Estado de garantir a saúde consiste na formulação e execução de políticas econômicas e sociais que visem à redução de riscos de doenças e de outros agravos e no estabelecimento de condições que assegurem acesso universal e igualitário às ações e aos serviços para a sua promoção, proteção e recuperação", assim como no inciso VI do Art. 6º que faz parte do campo de atuação do SUS a formulação de política de saúde destinada a promover, nos campos econômico e social, a observância do disposto acima.

Tendo como pressupostos a ampliação e qualificação das ações de promoção da saúde nos serviços e na gestão do Sistema Único de Saúde, em 30 de outubro de 1998, foram publicadas a Portaria n.º 3.916/98, aprovando a Política Nacional de Medicamentos, considerando a necessidade do estabelecimento de uma política devidamente expressa relacionada à questão de medicamentos e a Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, que definiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Neste âmbito, tendo como enfoque a adoção de medicamentos genéricos no Brasil,

em 10 de fevereiro de 1999 foi promulgada a Lei 9787/99, que estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos, estabelecendo normas para sua produção, a comercialização, a prescrição e o uso, mediante ação intersetorial.

A Lei 9.787/99 foi regulamentada pela Resolução 391/99 e pela RDC 10/2001; já em 13 de maio de 2003, a ANVISA publicou a RDC nº 135/03, que substituiu as anteriores e estabeleceu preceitos e procedimentos técnicos para registro de medicamentos genéricos no Brasil. Nesta legislação, estão descritos os requisitos e critérios técnicos para registro de genéricos, incluindo os procedimentos referentes à sua intercambialidade (SHARGEL, 2005).

Os medicamentos genéricos foram regulamentados através do Decreto 3.181, de 23 de setembro de 1999. A legislação brasileira de medicamentos genéricos foi estabelecida com base em legislações mais apuradas, normas internacionais adotadas por países da Comunidade Européia (EMEA), dos Estados Unidos (FDA) e do Canadá (Health Canada), além da OMS (Organização Mundial da Saúde). Nos países mencionados os genéricos estão consolidados e detém, além de uma parcela significativa do mercado de medicamentos, a confiança da população e da classe médica.

A partir desta alteração na legislação, todos os medicamentos passaram a ser denominados pela Denominação Comum Brasileira (DCB), que especifica o nome do fármaco ou princípio farmacologicamente ativo aprovada pelo órgão federal responsável pela vigilância sanitária, a ANVISA. Foram estabelecidas as seguintes tipologias de medicamentos (MORETTO & MASTELARO, 2013):

- **Medicamento Referência:** produto inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro;

- **Medicamento Similar:** é aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, e que é equivalente ao medicamento registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículo, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca.

- **Medicamento Genérico:** Contém o mesmo princípio ativo, na mesma dose e forma farmacêutica, é administrado pela mesma via e com a mesma posologia e indicação terapêutica do medicamento de referência, apresentando eficácia e segurança equivalentes à do

medicamento de referência podendo, com este, ser intercambiável. Os medicamentos genéricos podem ser identificados pela tarja amarela na qual se lê “Medicamento Genérico”. Além disso, deve constar na embalagem a frase “Medicamento Genérico Lei nº 9.787/99”. Como os genéricos não têm marca, o que você lê na embalagem é o princípio ativo do medicamento.

- **Produto Farmacêutico Intercambiável:** A intercambialidade, ou seja, a segura substituição do medicamento de referência pelo seu genérico, é assegurada por testes de equivalência terapêutica, que incluem comparação *in vitro*, através dos estudos de equivalência farmacêutica e *in vivo*, com os estudos de bioequivalência apresentados à Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Um medicamento genérico é bioequivalente a um medicamento referência no uso pretendido, dosagem, eficácia e segurança. Para que um medicamento genérico seja aprovado, ele deve atender aos mesmos padrões de qualidade que o medicamento referência. Muitos genéricos são produzidos na mesma fábrica que suas contrapartes de marca (BRASIL, 2007). A principal diferença entre um medicamento genérico e o referência é o valor comercial. A maioria dos genéricos custa 70% a 90% menos do que o referência, gerando uma economia de bilhões por ano nas farmácias, os quais são economizados pelos hospitais quando são utilizados os medicamentos genéricos. Um medicamento genérico também pode diferir de um medicamento referência em termos de forma, cor ou embalagem, mas essas diferenças afetam apenas a aparência do medicamento e não seus perfis de equivalência e bioequivalência farmacêuticas (NISHIJIMA et al., 2014).

Entre 2012 e 2016, o número total de produtos registrados na ANVISA passou de 490 a 882, o que representa um aumento de 80%. Este crescimento se deve, em grande parte, aos medicamentos genéricos e similares que, somados, correspondem a 80% do total de registros entre 2012 e 2016, e a 82% no último ano do período. Atualmente, o consumidor brasileiro conta com 6.300 produtos diferentes no mercado de medicamentos. Considerando o volume de produtos sintéticos comercializados no Brasil, há predominância de genéricos e similares, chegando a um percentual de 75,7% em 2016. Esse dado representa aumento de dois pontos percentuais em relação a 2012 (73,7%) (ANVISA, 2018).

A entrada e a disponibilidade de medicamentos genéricos após a expiração de patentes em produtos inovadores têm sido associadas ao aumento da acessibilidade de medicamentos e economias notáveis em vários países. No entanto, para garantir um fornecimento contínuo e disponibilidade de medicamentos genéricos, devem existir políticas que permitam essa demanda complementar, assim como, práticas colaterais de prescrição genérica e conscientização genérica. Essas medidas promovem uma ampliação no consumo de medicamentos genéricos e,

assim, criam um ambiente de mercado propício para a produção eficiente desses medicamentos (BRASIL, 2013).

De acordo com a legislação brasileira vigente, medicamentos genéricos não podem ser comercializados até que a patente do medicamento referência expire, o que pode levar 10 anos ou mais. Portanto, geralmente, os medicamentos referência são prescritos nos casos em que versões genéricas ainda não estão disponíveis.

Do ponto de vista da política nacional de saúde, ainda há muito para se avançar. Em termos gerais, no Plano Nacional de Saúde, há uma clara deficiência na interface entre a política de desenvolvimento de medicamentos genéricos e a política de assistência farmacêutica. A Política Nacional de Medicamentos Genéricos desarticulada com a Política Nacional de Saúde, pode atender apenas à lógica e ao interesse, legítimo, das estratégias empresariais, não havendo um direcionamento mais consistente que procure induzir a produção nacional para os produtos de maior impacto nas condições de saúde. Ademais, esta política se mostrou acertada, permitindo ganhos no aumento da oferta e redução de preços, mas ainda precisa evoluir sua contribuição para a superação das duas lacunas centrais: a base empresarial local de inovação e o comprometimento com as condições de saúde da população brasileira (QUENTAL et al., 2008).

## 1.2 Bioequivalência e Biodisponibilidade

A bioequivalência é um importante parâmetro da qualidade dos medicamentos que correlaciona o desempenho *in vivo* de um produto de referência a uma formulação de teste, contribuindo com as evidências de segurança e eficácia. Os parâmetros farmacocinéticos que devem ser estabelecidos para comprovação da bioequivalência são a concentração máxima ( $C_{máx}$ ) e extensão representada pela área sob a curva farmacocinética (AUC) da absorção sistêmica e da meia-vida de eliminação ( $T_{1/2}$ ), os quais são obtidos através de estudos clínicos com voluntários saudáveis. Assim, quando duas formulações são bioequivalentes, com a mesma taxa e extensão de absorção, presume-se que a eficácia clínica e o perfil de segurança desses medicamentos sejam semelhantes.

De modo geral, a biodisponibilidade significa a velocidade e extensão em que a substância ativa ou a porção terapêutica de uma forma farmacêutica é absorvida e torna-se disponível no local da ação ou é distribuída para a circulação geral. (BRASIL, 2012).

Para a realização dos estudos *in vivo* que compõem um estudo de bioequivalência existem algumas exigências que devem ser atendidas conforme abaixo:

- o estudo *in vivo* deve passar previamente pela avaliação e aprovação por um Comitê de Ética de Pesquisa (CEP) registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP);
- o estudo de bioequivalência recomenda-se que seja realizado em medicamentos que não apresentem diferenças superiores a 5% de teor (obtido através do ensaio de equivalência farmacêutica) e devem estar dentro do período de validade, sob os critérios de Boas Práticas de Fabricação e demais normativas da ANVISA;
- o método utilizado para determinar equivalência farmacêutica deve estar descrito em compêndios oficiais ou o fabricante do medicamento genérico deve desenvolver tais métodos e estes devem ser validados ou co-validados por laboratórios de equivalência com certificação REBLAS (Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos de Saúde) concedida pela ANVISA;
- para medicamentos isentos de estudos de bioequivalência (conforme IN Nº 10, de 29 de Setembro de 2016), a equivalência farmacêutica é o principal requisito que sustenta a intercambiabilidade.

Ademais, é necessário a realização e a aprovação da equivalência farmacêutica entre os medicamentos teste e referência e a análise do seu perfil de dissolução, porém não é necessária a demonstração da similaridade entre os medicamentos para que o ensaio de bioequivalência seja conduzido (BRASIL, 2006; PIOTO, 2006).

Os estudos de bioequivalência devem ser planejados conforme o guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos publicado pela ANVISA, assim como, por normativas específicas e harmonizadas internacionalmente dentro dos conceitos de Boas Práticas Clínicas (BPC) e Boas Práticas de Laboratório (BPL), contemplando três etapas: clínica, analítica e estatística (BRASIL, 2006). O patrocinador é a empresa, instituição ou organização responsável pela implementação, gerenciamento e/ou financiamento de um estudo clínico.

Os estudos clínicos para avaliação do perfil de biodisponibilidade são organizados em três etapas distintas, denominadas Etapa Clínica, Etapa Analítica e Etapa Estatística.

A etapa clínica compreende a elaboração do protocolo clínico e sua submissão ao CEP, assim como execução do processo de confinamento, sendo responsável pela seleção e recrutamento dos voluntários que farão parte do estudo sob todos os aspectos éticos e de

conformidade clínica. Nesta etapa, os voluntários são confinados para coleta das amostras biológicas (geralmente sangue total) dentro dos tempos de coleta, conforme previamente estabelecidos no protocolo clínico. Tais amostras são processadas para separação do plasma, acondicionadas em tubos devidamente identificados em ordem sequencial de tempo e armazenadas em freezers conforme temperatura adequada até o seu encaminhamento para a etapa analítica.

Na etapa analítica, as amostras biológicas são quantificadas conforme a metodologia bioanalítica desenvolvida e validada previamente ao início do estudo, segundo os requisitos normativos da RDC 27/12 da ANVISA. Para tal, as amostras biológicas são dopadas com um padrão interno (PI) que irá corrigir possíveis perdas e variações no processo de extração e análise do ativo de interesse. Em seguida, as amostras são extraídas e os extratos são encaminhados para análise instrumental através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) para obtenção da curva farmacocinética, que relaciona a concentração do ativo em função do tempo (ZAMAN et al., 2016). Esta metodologia é empregada na quantificação das amostras desconhecidas (matriz biológica dos voluntários) para geração do resultado analítico do estudo.

Por fim, na etapa estatística os dados adquiridos na etapa anterior são avaliados por um estatístico em um software específico para determinação da conformidade dos parâmetros farmacocinéticos comparativos entre o medicamento teste e referência conforme estabelecido na legislação 1170 da ANVISA para determinação da bioequivalência entre as formulações (BRASIL, 2006).

### **1.3 Aplicação da Metodologia Bionalítica**

Para que a metodologia analítica seja aplicada, ela precisa ser devidamente desenvolvida e validada segundo os critérios vigentes para a normativa do seu escopo de execução. Além disso, o LIQ deve ser estabelecido considerando a dose do medicamento, meia-vida de eliminação e último tempo de coletas.

O desenvolvimento do método de quantificação do ativo em matriz biológica é determinante para os estudos de bioequivalência, visto que assegura a qualidade dos resultados desses estudos. O método de quantificação deve apresentar sensibilidade, especificidade / seletividade para cada analito, precisão e exatidão além de ser relativamente simples, de modo a minimizar os erros (GONÇALVES, 2005). Neste processo inicial, é fundamental uma avaliação criteriosa dos aspectos técnicos que podem interferir na metodologia analítica, assim como, sua otimização

para que a validação ocorra da forma mais fluente possível, assim minimizando tempo e custos desnecessários.

Um aspecto muito importante na quantificação de amostras é o processo de extração, que visa retirar o analito de sua matriz complexa de forma que seja viável sua análise pela técnica analítica escolhida, com o mínimo de interferentes possíveis. Os principais tipos de extração utilizados são precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida sendo que cada qual, possui suas vantagens e desvantagens dependendo da sensibilidade de detecção do analito necessária para o método, características da molécula do ativo, taxa de recuperação desejada, custo, entre outros fatores (GONÇALVES, 2005; BORGES et al., 2015; ALNOUTI et al., 2005).

A principal técnica analítica utilizada para quantificação de compostos em matrizes biológicas é a técnica de LC-MS por se tratar de uma técnica robusta, versátil, com alta sensibilidade e seletividade, possibilitando os melhores resultados em sua aplicação. A resolução da ANVISA (RDC 27/2012) e outras normativas internacionais do FDA e EMA, preconizam a utilização de métodos cromatográficos para condução de estudos bioanalíticos de bioequivalência/biodisponibilidade. Todavia, outros métodos são permitidos desde que, devidamente justificados.

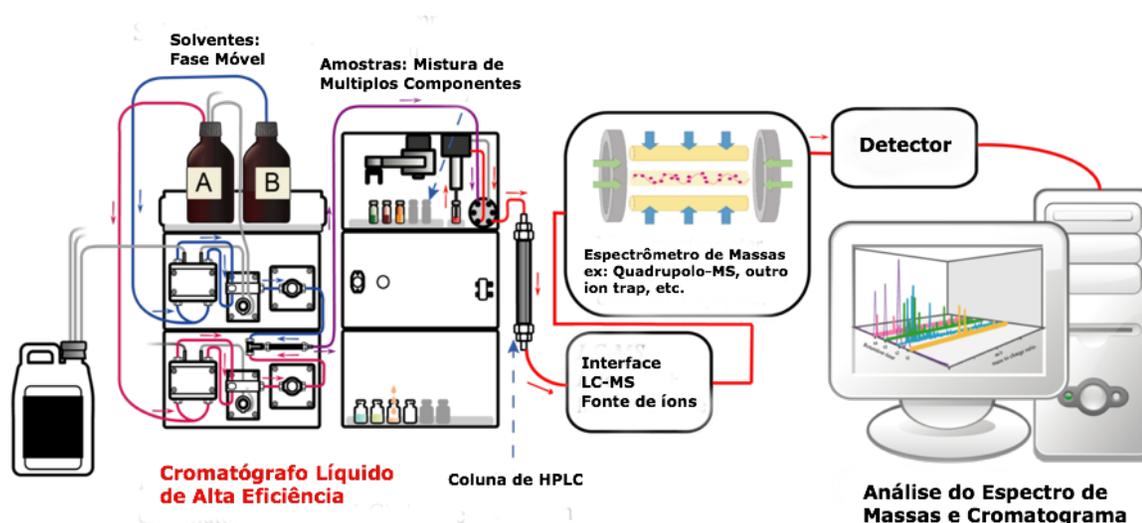
### **1.3.1 Métodos Cromatográficos**

A cromatografia é um método físico-químico para a separação e purificação de misturas complexas que foi desenvolvido no início do século XX pelo botânico russo-italiano M. S. Tswett. Na cromatografia, as moléculas em uma mistura são aplicadas sobre uma fase estacionária e separadas enquanto se movem, com o auxílio de uma fase móvel. A afinidade das moléculas pela fase móvel ou estacionária é que permitirá sua separação de acordo com características como massa molar, polaridade, carga, estrutura, entre outras. Essa separação pode se dar através de mecanismos de afinidade, exclusão, troca-iônica, adsorção ou partição (COLLINS, 1993).

Dentre os tipos de cromatografia, a cromatografia líquida é uma técnica de separação na qual a fase móvel é um líquido. A cromatografia líquida pode ser realizada em uma coluna ou em um plano. A cromatografia líquida que geralmente utiliza partículas de empacotamento muito pequenas e uma pressão relativamente alta é referida como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*).

Na técnica de HPLC, a amostra é impulsionada por um líquido (fase móvel) à alta pressão, através de uma coluna que é empacotada com partículas de forma irregular ou esférica ou uma camada monolítica porosa (fase estacionária) (TONHI et al., 2002) e é hoje uma das ferramentas mais poderosas da química analítica. Tem a capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos que estão presentes em amostras que possam ser dissolvidas em um líquido e é compatível com vários detectores como espectrômetro de massas, detector por índice de refração, detector de fluorescência e ultravioleta. Hoje, os compostos em concentrações mínimas como partes por trilhão (ppt) podem ser facilmente identificados. A técnica de HPLC tem sido aplicada a uma ampla gama de amostras como análise de produtos farmacêuticos, alimentícios, nutracêuticos, cosméticos, matrizes ambientais, amostras forenses e produtos químicos industriais (RIBANI et al., 2004; SRIKARA, 2013).

Um sistema HPLC, como mostra a Figura 1, é composto por alguns componentes essenciais (NETO & NUNES, 2003; NASCIMENTO, 2004; GONÇALVES, 2005) que são responsáveis pela separação cromatográfica. Um reservatório contém o solvente (fase móvel) sendo que a vazão e mistura desses solventes é gerenciado através de um software e impulsionado através de uma bomba ou mais bombas. Em seguida, um injetor (gerenciador de amostras ou amostrador automático) é capaz de introduzir (injetar) a amostra no fluxo de fase móvel de fluxo contínuo que transporta a amostra para a coluna de HPLC. A coluna contém o material interno (por exemplo: sílica C<sub>18</sub>) necessário para efetuar a separação e fica armazenada em um forno, cuja temperatura pode ser controlada. É necessário um detector para que seja possível a identificação dos compostos conforme a sua identidade química, bem como um sistema de aquisição de dados. Como as características dos compostos de amostra podem ser muito diferentes, vários tipos de detectores foram desenvolvidos (ex: espectrometria de massas, UV-Vis, fluorescência, entre outros).



**FIGURA 1. Representação esquemática do sistema de HPLC.** O sistema é composto por duas bombas, auto injetor, coluna cromatográfica, sistema de detecção e um microcomputador. Fonte: Figura adaptada de YASSINE MRABET (2018, pág. 4).

### 1.3.2 Espectrometria de Massas

Durante a última década, a espectrometria de massas sofreu enormes melhorias tecnológicas, permitindo sua aplicação a proteínas, peptídeos, carboidratos, DNA, drogas e muitas outras moléculas relevantes para a química de materiais e biologia química. Devido aos métodos de ionização como a ionização por *electrospray* (ESI) e a dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *matrix-assisted laser desorption ionization*), a espectrometria de massas tornou-se uma ferramenta insubstituível nas ciências moleculares e da vida. Os espectrômetros de massas podem ser divididos em três partes fundamentais, a saber, a fonte de ionização, o analisador e o detector (MORAES & LAGO, 2001).

As fontes de ionização mais aplicadas são ionização por *electrospray* (ESI), ionização química por pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e dessorção / ionização por laser assistida por matriz (MALDI). Na espectrometria de massas, a introdução da amostra pode ser feita de várias formas, inclusive através da cromatografia líquida. A partir daí a amostra é levada à fonte de ionização onde são gerados íons. Esses íons são então separados num analisador, com base em suas diferentes trajetórias em campos elétricos e / ou magnéticos em função de suas razões massa/carga ( $m/z$ ). Os íons separados são detectados e este sinal enviado a um sistema de dados onde as razões  $m/z$  são relacionadas a sua abundância relativa para apresentação no formato de um espectro de massas (URBAN, 2016).

Um espectrômetro de massas sequencial (MS/MS) possui mais de um evento de seleção da razão  $m/z$ . Esses eventos podem estar separados no espaço, através do uso de dois analisadores sequenciais, ou no tempo, num único analisador. Entre os eventos de seleção de  $m/z$  podem ser aplicadas condições que levem à fragmentação controlada dos íons, através da admissão de um gás inerte, por exemplo. Os analisadores podem ser do mesmo tipo ou de tipos diferentes, sendo as combinações mais comuns o triplo quadrupolo (QqQ) e o quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) (LAGERWERF et al., 2000 PEREIRA & CASS, 2005). A utilização da espectrometria de massas sequencial permite tornar o método analítico amplamente seletivo e específico, já que um analito de interesse pode ser monitorado através da detecção de sua razão  $m/z$  e confirmado através da detecção da razão  $m/z$  de seus fragmentos, após fragmentação induzida por colisão com gás inerte (CID, do inglês *collision induced dissociation*) (URBAN, 2016).

Por esse motivo, o espectrômetro de massas é escolhido em estudos de bioequivalência, a fim de assegurar a detecção e quantificação inequívoca da molécula em estudo.

#### **1.4 Validação de Métodos Bioanalíticos**

A validação de um procedimento analítico é o processo pelo qual é verificado, por estudos de laboratório, se as características de desempenho do método atendem aos requisitos para seu uso pretendido. Todos os métodos analíticos que se destinam para analisar quaisquer amostras devem ser validados para assegurar a confiabilidade analítica. A validação de métodos analíticos é uma atividade essencial, porém demorada, para a maioria dos laboratórios de desenvolvimento analítico. Portanto, é importante entender os requisitos da validação do método em mais detalhes e as opções disponíveis para permitir a utilização ideal dos recursos analíticos em um laboratório de desenvolvimento. (BRASIL, 2002; BRASIL, 2007; EMA, 2011; FDA, 2013).

O principal objetivo da validação do método é demonstrar a confiabilidade de um método particular para a determinação de uma concentração de analito em uma matriz biológica específica, como sangue, soro, plasma, urina ou saliva. Além disso, se um anticoagulante for empregado, a validação deve ser realizada usando o mesmo anticoagulante que as amostras do estudo. Geralmente, uma validação completa deve ser realizada para cada espécie e matriz em questão. Em alguns casos, pode ser problemático para fins de validação obter uma matriz idêntica em comparação com a matriz das amostras do estudo (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012; FDA, 2013). Quando um método analítico é aplicado na quantificação de amostras biológicas ele é denominado como um método bioanalítico.

Os principais parâmetros avaliados em um método bioanalítico a fim de validá-lo são: seletividade, limite inferior de quantificação, faixa de calibração (desempenho da curva de calibração), exatidão, precisão, efeitos matriciais, estabilidade do(s) analito(s) na matriz biológica e estabilidade do(s) analito(s) e do padrão interno nas soluções de estoque, de trabalho e nos extratos sob todo o período de armazenamento e condições de processamento. (CAUSON, 1997; FDA, 2001; BRASIL, 2012).

Atualmente, no Brasil, a validação bioanalítica é normatizada pela RDC 27/12 da ANVISA, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos (LA ROCA et al., 2007; BRASIL, 2012).

#### **1.4.1 Seletividade / Especificidade**

A especificidade descreve a capacidade do método bioanalítico de produzir apenas um sinal para o analito de interesse e não para outros componentes interferentes. Já a seletividade, descreve a capacidade de um método de diferenciar analito de interesse de outros analitos ou impurezas endógenas presentes nas amostras (KOLLIPARA et al., 2011).

Já o termo especificidade, outrora adotado pela RE 899/03 da ANVISA, foi alterado para seletividade através da revisão dessa resolução pela RDC 27/12 desta mesma agência, por ser considerado mais adequado a finalidade do ensaio executado. Segundo a definição da resolução, a seletividade é capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e PI na presença de outros componentes da amostra.

Este ensaio é conduzido avaliando-se diferentes tipos de plasma (normal, lipêmico e hemolisado) e comparando-se as respostas obtidas para o analito e padrão interno em comparação com uma amostra do limite inferior de quantificação (LIQ) dopada com padrão interno. As respostas de picos interferentes nos tempos de retenção devem ser inferiores à 20% para o LIQ e 5% para o padrão interno (BRASIL, 2012).

#### **1.4.2 Efeito Residual**

O efeito residual (*carryover*) é visto como um grande problema que influencia a precisão de qualquer método bioanalítico e também é de grande importância nos métodos bioanalíticos baseados em LC-MS/MS, onde a faixa dinâmica é muito alta. Geralmente, é causado devido a resíduos do analito da amostra de alta concentração analisada anteriormente a amostras de concentrações baixas. A extensão do *carryover* deve ser investigada durante o desenvolvimento do método e deve ser eliminado ou minimizado (FDA, 2019).

Este ensaio é conduzido através da avaliação de de três injeções de amostras branco sendo uma antes e duas após à injeção do limite superior da curva (LSC), comparado aos resultados do LIQ processado na mesma corrida analítica (BRASIL, 2012).

As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ e 5% para PI (BRASIL, 2012).

### 1.4.3 Efeito de Matriz

O efeito de matriz é definido como a alteração ou interferência direta ou indireta na resposta analítica devido à presença de analitos não intencionais ou outras substâncias interferentes na amostra. Geralmente isso é causado pelos componentes da matriz, outros ativos e metabólitos concomitantes eluindo junto com o analito, influenciando assim a abundância de analito na fonte do espectrômetro de massas, afetando a detecção do analito (KING et al., 2000).

Segundo a RDC 27/2012 da ANVISA, este ensaio deve ser conduzido pela adição do analito de interesse e do padrão interno nas concentrações de CQB e CQA e seu respectivo padrão interno nas amostras previamente processadas sendo o plasma de 8 fontes distintas dentre elas, 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas (BRASIL, 2012). Adicionalmente, quando aplicável, são adicionados nesse ensaio os fármacos de uso concomitante ou comedicações.

Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

Para descarta o efeito de matriz o coeficiente de variação (CV) dos FMN relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15% (BRASIL, 2012).

### 1.4.4 Linearidade

A linearidade ou concentração-resposta de um método analítico refere-se à capacidade do método de produzir um sinal que seja, diretamente ou por transformação matemática, proporcional à concentração do analito presente na amostra. É geralmente recomendado analisar um mínimo de seis níveis de concentração para a construção da curvade calibração, incluindo uma amostra em branco (amostra de matriz processada sem padrão de fármaco e PI) e uma

amostra zero (amostra de matriz processada com PI) na mesma matriz biológica que as amostras em estudo. Uma vez obtida a resposta (Y) em vários níveis de concentração (X) dos padrões de calibração, é realizada uma análise de regressão por mínimos quadrados, assumindo que os erros em Y estão normalmente distribuídos em torno de um valor médio de zero (BOLTON & BON, 2009).

A ANVISA recomenda o uso de o modelo matemático simples, ou seja, modelo linear para a avaliação. Quando um modelo não linear é proposto deve-se demonstrar matematicamente que o modelo linear não é apropriado.

Para condução do ensaio de Linearidade devem ser construídas e avaliadas, no mínimo, três curvas de calibração que incluam a análise da amostra branco, da amostra zero e de, no mínimo, 6 amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de PI (BRASIL, 2012). A equação da curva não deve incluir padrões de calibração que não atendam aos critérios de aprovação.

Quando um padrão de calibração não for aprovado, a curva de calibração deve ser recalculada sem este padrão. Quando um padrão de calibração atender aos critérios de aprovação, este não deve ser excluído da equação da curva. Os padrões de calibração estão aprovados quando atenderem aos seguintes critérios:

- ✓ desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ e
- ✓ desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.

A curva de calibração deve atender aos seguintes critérios para ser aprovada:

- ✓ no mínimo 75% dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores e
- ✓ no mínimo 6 padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores.

#### **1.4.5 Exatidão e Precisão**

A exatidão de qualquer método bioanalítico depende da proximidade entre o valor observado e verdadeiro da concentração (reprodutibilidade), enquanto a precisão se refere a capacidade do método em produzir resultados reproduzíveis (repetibilidade) entre séries de medições de amostras homogêneas. Esses parâmetros são determinados usando amostras de

controle de qualidade preparados em níveis de concentração cobrindo a faixa dinâmica do método, ou seja, limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM) e controle qualidade alto (CQA). O LIQ é preparado no limite inferior de quantificação; o CQB está acima de LIQ, mas não mais que 3 vezes; o CQM está preparado no meio do intervalo dinâmico, idealmente deve ser o valor médio entre o CQB e CQA e o CQA deve estar próximo da fração superior limite de quantificação (LSQ) e não deve ser superior a 85% do LSQ. Cada lote de precisão e exatidão geralmente contém uma amostra em branco, uma amostra zero e padrões de calibração, ou seja, LIQ e LSQ em duplicatas seguidas por cinco ou seis conjuntos de amostras de controle de qualidade (KARNES et al., 2011).

A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, 3 corridas diferentes (precisão intercorridas).

A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, segundo a fórmula a seguir:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de  $\pm 15\%$  do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de  $\pm 20\%$  do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

O CV e o EPR da precisão e exatidão, intracorrída e intercorridas, devem ser calculados com base em todos os valores obtidos (BRASIL, 2012).

#### **1.4.6 Estabilidades na Matriz Biológica e em Solução**

A estabilidade tem sido sempre considerada como um parâmetro importante durante análises tanto químicas quanto biológicas. A estabilidade de um fármaco depende de suas propriedades físico-químicas e os ensaios de estabilidade de amostras e soluções na validação do método deve refletir as situações que provavelmente serão encontrados durante o manuseio das amostras em análises.

O principal objetivo de avaliar a estabilidade na validação de métodos é detectar qualquer degradação do analito de interesse durante todo o período de coleta, armazenamento, extração e análise de amostras. Recomenda-se confirmar a estabilidade a cada passo da preparação e análise das amostras, bem como nas condições usadas para o armazenamento a longo prazo. Deve-se notar que a estabilidade numa determinada matriz e recipiente não deve ser extrapolada para outras matrizes e recipientes. Os procedimentos de estabilidade devem avaliar a estabilidade dos analitos durante a coleta de amostras e manuseio, armazenamento a curto prazo, armazenamento a longo prazo e passando por ciclos de congelamento e descongelamento (ROSING et al., 2000).

As agências regulatórias (ANVISA, FDA e EMA) recomendam os ensaios de estabilidade nas seguintes situações:

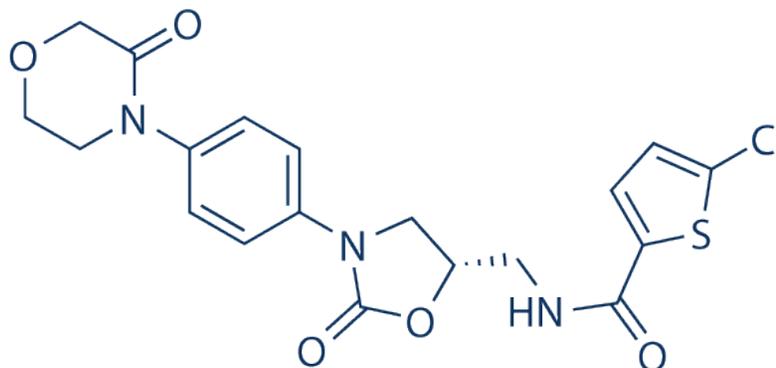
- ✓ ciclos de degelo;
- ✓ curta duração ou em bancada;
- ✓ longa duração
- ✓ pós-processamento ou auto-injetor e,
- ✓ em solução nas condições de curta duração e dias de preparo.

A amostras de estabilidade devem ser comparadas com amostras recém-preparadas (estabilidade em plasma) ou soluções recém-preparadas (estabilidade em solução) e, pelo menos, três repetições de cada uma das concentrações alta e baixa do analito deve ser avaliadas (BRASIL, 2012; FDA, 2019).

A estabilidade em matriz é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. As soluções serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 10% de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém preparadas (BRASIL, 2012).

## 1.5 Rivaroxabana

A rivaroxabana (RIV), (S)-5-cloro-N-[[2-oxo-3-[4-(3-oxomorfolin-4-il) fenil]oxazolidin-5-il]metil] tiofeno-2-carboxamida, possui fórmula molecular  $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$  e massa molar de 435,9 g mol<sup>-1</sup>. É solúvel em solventes orgânicos, tal como DMSO (dimetilsulfóxido) e moderadamente solúvel em tampões aquosos. Sua fórmula estrutural segue na Figura 2.



**FIGURA 2. Estrutura molecular da rivaroxabana.** É uma molécula orgânica, de característica básica em função dos grupos funcionais nitrogenados (amidas) e com predominância apolar. Fonte: Acervo pessoal.

A RIV atua como anticoagulante ao inibir seletivamente, direta e reversivelmente o fator Xa livre associado ao coágulo no plasma humano, sem se ligar à antitrombina. Isso resulta na inibição da conversão do fator II (protrombina) em fator IIa (trombina). Conforme afirmado por Morell et al. (2010), a inibição do FXa demonstra ser um alvo de ação mais importante quando comparado com a trombina, uma vez que uma molécula de FXa é capaz de ativar mais de mil moléculas de trombina. A rivaroxabana é bem tolerada, com um perfil farmacocinético bem estabelecido, sem a necessidade de monitoramento laboratorial (KAMATA et al., 1998; AGNELLI & BECATTINI, 2016).

A RIV foi o primeiro inibidor do fator de coagulação Xa a ser aprovado no Canadá e na União Europeia (MORELL et al., 2010). No Brasil, a RIV foi aprovada pela ANVISA no final de 2009, sendo comercializada com o nome Xarelto®, sob forma de comprimidos revestidos com dosagens de 10, 15 ou 20 mg, desenvolvido e fabricado pela Bayer HealthCare AGe distribuído pela Bayer S.A. O medicamento genérico ainda está em vias de liberação devido a proteção de patente que ainda vigora até 2022.

Conforme a bula do medicamento Xarelto®, a RIV possui diversas aplicações clínicas relevantes, sendo que é indicado para a profilaxia de tromboembolismo venoso (TEV) após cirurgia eletiva de substituição do quadril ou joelho, e para a profilaxia de trombose venosa profunda recorrente (TVP) e embolia pulmonar recorrente (EP). Também é indicado para a

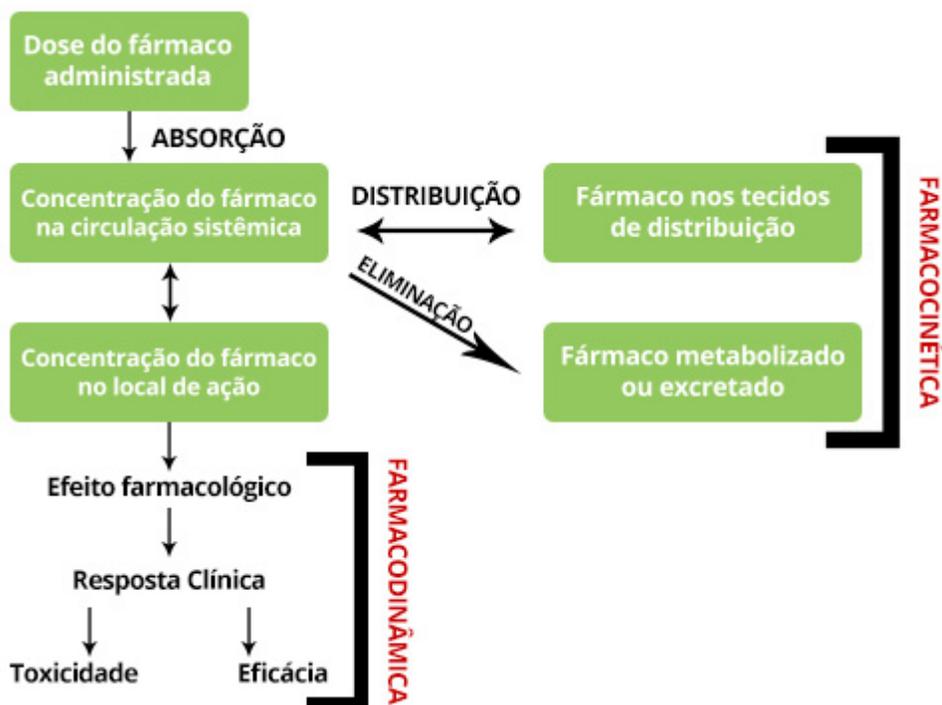
profilaxia de acidente vascular cerebral e embolia sistêmica em pacientes com fibrilação atrial não valvular (FA) que são considerados de alto risco (XARELTO, 2019).

### **1.6 Parâmetros Farmacocinéticos em Estudos de Bioequivalência**

Desde a administração de um dado medicamento até a obtenção do efeito farmacológico desejado, várias fases estão envolvidas, como: (1) fase farmacêutica, que está intimamente ligada à forma farmacêutica do medicamento e sua via de administração; (2) fase farmacocinética, que envolve a absorção do fármaco do local da administração até a circulação sanguínea, sua distribuição nos diferentes compartimentos do organismo, além dos processos de biotransformação do fármaco e finalmente sua eliminação do organismo e (3) fase farmacodinâmica, a qual está relacionada à interação do fármaco com os diferentes órgãos alvo, sejam eles enzimas, ácidos nucleicos, carreadores de membrana ou receptores e os efeitos decorrentes dessa interação. Importante destacar que em todas essas fases diferentes fatores podem interferir com o efeito dos fármacos, o que pode levar desde à ineficácia de um dado tratamento até o aparecimento de efeito tóxico (BRUNTON et al., 2012).

A fase farmacocinética (PK) corresponde aos processos envolvidos no movimento de fármacos no organismo biológico, envolvendo absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), incluindo a taxa e a extensão de cada um dos processos. A ciência da farmacocinética diz respeito a como o corpo converte uma molécula de droga ativa em metabólitos, o curso do tempo das drogas no corpo e o que o corpo faz com a droga. Os dados farmacocinéticos são frequentemente derivados de amostras de sangue (soro ou plasma) em conjuntos de dados de tamanho pequeno a médio de indivíduos ao longo do tempo (CHOW, 2014).

Na Figura 3, é possível observar, de maneira simplificada, a diferença entre a farmacocinética (processos que o organismo exerce sobre o fármaco) e a farmacodinâmica (processos que o fármaco faz com o organismo) que são processos fisiológicos que definem a interação entre o medicamento e o nosso organismo.



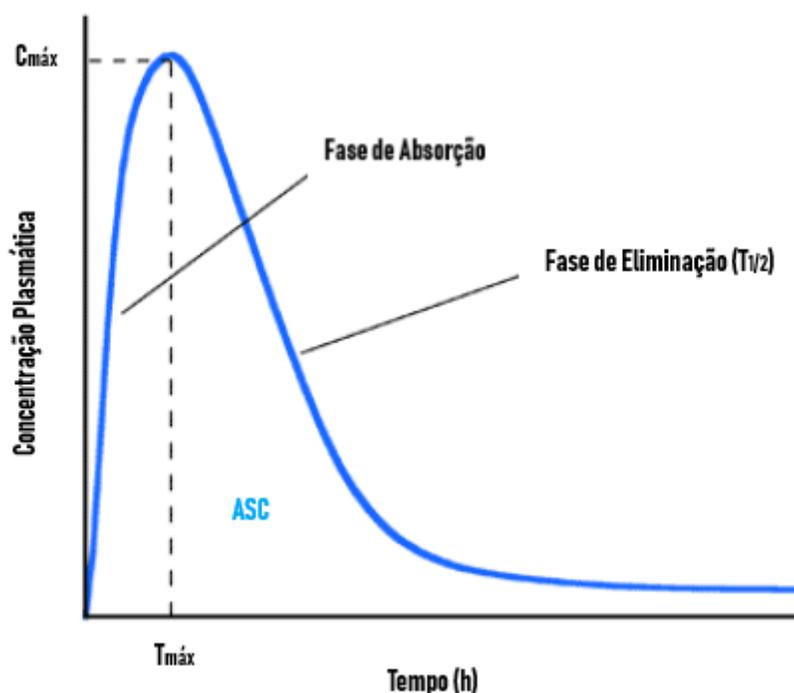
**FIGURA 3. Resumo esquemático diferencial entre farmacocinética e farmacodinâmica.** Esquematização do processo de absorção, distribuição e eliminação do fármaco no organismo. Fonte: NETO & MARTINS (2015, pág. 1).

A partir de um perfil farmacocinético, os parâmetros farmacocinéticos podem ser estimados, como a área sob a curva (ASC), concentração máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), tempo para concentração máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ ), meia-vida de eliminação ( $T_{1/2}$ ), entre outros. Estes parâmetros farmacocinéticos são muito úteis na otimização do regime posológico de um medicamento (CHOW, 2014).

O parâmetro de área sob a curva (ASC) tem unidades de concentração  $\times$  tempo ( $\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e é uma medida da exposição total sistêmica de uma droga integrada ao longo do tempo. A ASC é geralmente estimada a partir da correlação de dados de tempo e concentração. Existem duas abordagens principais para a estimativa da ASC: a primeira, que corresponde àquela exigida pelo FDA, é a análise não compartimental (NCA, do inglês *non-compartmental analysis*), que calcula a ASC seguindo a regra trapezoidal, somando a área sob a curva entre pontos de tempo consecutivos; a segunda é a análise de modelagem compartimental, utilizado quando o modelo anterior não for adequado (FDA, 2014).

A  $C_{m\acute{a}x}$  refere-se à concentração sanguínea máxima (ou pico) que um fármaco atinge na corrente sanguínea e posteriormente em um local específico ou área de teste do organismo após este ter sido administrado e antes da administração de uma segunda dose, isto é,  $C_{m\acute{a}x}$  é a

concentração máxima observada após uma administração única (CHOW, 2014). Em estudos de bioequivalência, os principais parâmetros farmacocinéticos são a ASC e  $C_{m\acute{a}x}$  e  $T_{m\acute{a}x}$  (FDA, 2001). O  $T_{m\acute{a}x}$  é o tempo em que é observada  $C_{m\acute{a}x}$  após a administração do medicamento. A Figura 4 mostra o esquema de ASC,  $C_{m\acute{a}x}$  e  $T_{m\acute{a}x}$  na curva de concentração plasmática vs tempo após uma dose oral única de medicamento A comparado com uma dose oral única do medicamento B (CHOW, 2014).



**FIGURA 4. Demonstração de uma curva farmacocinética.** Curva de concentração *versus* tempo em plasma, destacando as fases de absorção e eliminação, assim como, os parâmetros farmacocinéticos de  $T_{m\acute{a}x}$ ,  $C_{m\acute{a}x}$  e ASC. Fonte: Figura adaptada de CHOW (2014, pág. 306).

## 1.6.1 Perfil Farmacocinético da Rivaroxabana

### 1.6.1.1 Absorção e biodisponibilidade

Estudos anteriores revelaram que a rivaroxabana é rapidamente absorvida após administração oral, atingindo concentrações máximas 2 a 4 horas após a ingestão de um comprimido regular. Em estudo para avaliação da influência da alimentação na absorção de rivaroxabana, a  $C_{m\acute{a}x}$  após administração em jejum ocorreu em torno de 1,5 horas. A absorção

oral da rivaroxabana é quase completa e a biodisponibilidade oral é alta (80-100%) para a dose de 10 mg, independentemente das condições de jejum/alimentação. A ingestão do medicamento com alimentos não afeta a ASC ou a  $C_{m\acute{a}x}$  da rivaroxabana na dose de 10 mg. O comprimido regular na dose de até 10 mg de rivaroxabana pode ser tomado com ou sem alimento (STAMPFUSS et al., 2013).

Devido ao grau reduzido de absorção, uma biodisponibilidade oral de 66% foi determinada para o comprimido de 20 mg sob condições de jejum. Quando um comprimido de rivaroxabana 20 mg é administrado em conjunto com alimentos, aumento na ASC média ao redor de 39% foram observados quando comparados a ingestão sob condições de jejum, indicando absorção quase completa e elevada biodisponibilidade oral. Segundo a bula do medicamento, a rivaroxaban de 15 mg e 20 mg devem ser tomados em conjunto com alimentos (XARELTO, 2019).

A rivaroxabana é uma substância de classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (Biopharmaceutics Classification System - BCS), o que significa que este medicamento possui alta permeabilidade e baixa solubilidade (EMA, 2011), sendo a dissolução *in vivo* fator determinante para sua absorção, a qual pode variar de acordo com os fatores associados à formulação e às condições *in vivo* que possam afetar a dissolução (GONÇALVES & STORPIRTIS, 2011).

A variabilidade da farmacocinética, ou seja, dependência de fatores fisiológicos, para a rivaroxabana é moderada, com variabilidade interindividual (CV%) de 30% a 40% (XARELTO, 2019).

A absorção da rivaroxabana é dependente do local de liberação do princípio ativo no trato gastrointestinal. Foi relatada uma diminuição de 29% e 56% na ASC e  $C_{m\acute{a}x}$  quando o granulado de rivaroxabana é liberado no intestino delgado proximal em comparação com o comprimido regular. A exposição é ainda mais reduzida quando o princípio ativo é liberado no intestino delgado distal ou no cólon ascendente. A literatura recomenda evitar sua administração distante ao estômago, o que pode resultar em redução da absorção e da exposição ao princípio ativo. A biodisponibilidade (ASC e  $C_{m\acute{a}x}$ ) de um comprimido íntegro de rivaroxabana (20 mg) apresentou-se equivalente àquela obtida quando o ativo foi administrados por via oral como comprimido triturado misturado a purê de maçã, ou suspensão em água e administrada por sonda gástrica seguido por uma refeição líquida. Como o perfil farmacocinético da rivaroxabana é previsível e dose-proporcional, os resultados de biodisponibilidade desse estudo podem ser considerados para suas doses mais baixas, como 10 e 15 mg, por exemplo (STAMPFUSS et al., 2013).

### 1.6.1.2 Distribuição

A ligação da rivaroxabana às proteínas plasmáticas em humanos é alta, com taxas de aproximadamente de 92% a 95%, sendo a albumina sérica o principal componente de ligação. O volume de distribuição é moderado, sendo volume de distribuição em estado de equilíbrio (V<sub>ss</sub>) aproximadamente 50 L (XARELTO, 2019).

Destaca-se que o volume de distribuição de um fármaco reflete a extensão em que este está presente nos tecidos extravasculares, podendo variar amplamente, dependendo dos graus relativos de ligação às proteínas plasmáticas e teciduais, bem como do coeficiente de partição lipídica do fármaco.

### 1.6.1.3 Metabolismo e eliminação

Aproximadamente 2/3 da dose administrada de rivaroxabana sofre biotransformação (degradação metabólica), com metade sendo eliminada via renal e a outra metade, via fecal. Os demais 1/3 da dose administrada são diretamente excretados como fármaco inalterado na urina, principalmente por secreção renal ativa (XARELTO, 2019).

A rivaroxabana é metabolizada por meio das isoformas das enzimas do citocromo P450 (CYP) CYP3A4, CYP2J2, assim como por mecanismos independentes do CYP. A degradação oxidativa da fração morfolinona e a hidrólise das ligações amida são os principais sítios de biotransformação. Com base em investigações *in vitro*, a rivaroxabana é um substrato das proteínas transportadoras glicoproteína-P (gp-P) e proteína de resistência ao câncer de mama (Bcrp) (XARELTO, 2019).

A rivaroxabana inalterada é o composto mais importante no plasma humano, não estando presentes metabólitos maiores ou ativos circulantes. Com uma depuração sistêmica de cerca de 10 L/h, pode ser classificada como um fármaco de baixa depuração. Sua eliminação plasmática ocorre com meias-vidas terminais de 5 a 9 horas em indivíduos jovens e com meias-vidas terminais de 11 a 13 horas em idosos. Stampfuss e colaboradores encontraram, após administração em jejum, T<sub>1/2</sub> em torno de 8,4 horas para rivaroxabana (STAMPFUSS et al., 2013).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e validar um método bioanalítico por LC-MS que atenda aos critérios estabelecidos pelos guias nacionais e internacionais e que possa ser aplicado na análise de matriz biológica (plasma) para a quantificação do ativo Rivaroxabana em plasma humano.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Demonstrar a aplicação da metodologia bioanalítica para quantificação de dois estudos de bioequivalência com Rivaroxabana (sendo um em jejum e outro pós-prandial) através da apresentação da curva farmacocinética média do medicamento referência.

Confirmar através do perfil farmacocinético (biodisponibilidade) do medicamento referência obtido nos estudos (jejum e pós-prandial), a diferença descrita em literatura para os parâmetros de ASC (área sobre a curva) e  $C_{m\acute{a}x}$  (concentração máxima).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado visando o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico por HPLC-MS/MS, seguindo as recomendações da RDC 27/2012 com a finalidade de aplicação em estudos de bioequivalência / biodisponibilidade. Os experimentos foram realizados na Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG – Bragança Paulista/SP) com o suporte e assessoria da equipe técnica do laboratório.

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Equipamentos e Materiais

Para o desenvolvimento e validação do método bioanalítico de Rivaroxabana foram utilizados diferentes tipos de equipamentos e materiais. Os equipamentos, materiais e os componentes do sistema LC-MS/MS estão descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1:** Descrição de equipamentos e materiais utilizados no processo.

Descrição	Fabricante
Pipeta de volume variável	HTL / Gilson
Pipeta eletrônica	Brand
Microtubo	Eppendorf
Mesa agitadora	Finemixer PCR
Centrífuga	Eppendorf
Dispensador	Brand
Banho termostatizado	Logen Scientific
Purificador de água (Milli-Q)	Merck Millipore
Pré concentrador de amostras (Dryblock)	Techne Cole Parmer / Oxidcamp
Misturador (vortex)	Phoenix
Balança Analítica	Sartorius

**Tabela 2:** Componentes do sistema LC-MS/MS utilizado nas análises.

Descrição	Fabricante / Modelo
-----------	---------------------

---

Espectrômetro de Massas	Waters / Quattro Premier XE
Software	Waters / MassLynx 4.1
Bomba Analítica	Shimadzu / LC 20AD
Auto Injetor	Shimadzu / SIL 20A
Controladora	Shimadzu / SCL 10A VP

---

### 3.1.2 Padrões Analíticos

Os padrões analíticos utilizados no desenvolvimento, validação dos métodos bioanalíticos e quantificação das amostras desconhecidas de RIV foram padrões primários com certificados rastreáveis, conforme Tabela 3.

Estes padrões possuem alto teor de pureza, assim como comprovação de identidade através de ensaios de caracterização por MS e ressonância magnética nuclear (RMN). No caso do analito, o padrão é utilizado no processo de dopagem, isto é, para contaminação do plasma branco (sem ativo) em concentrações específicas para composição da curva de calibração e dos controles de qualidade, enquanto o padrão interno é utilizado para que seja possível reduzir as variáveis do processo de extração da amostra contida do ativo. O resultado analítico se dará pela razão das áreas do analito e do padrão interno (denominado como resposta).

**Tabela 3:** Padrões de referência do analito, padrão interno e dos fármacos de uso concomitante utilizados no preparo das soluções.

<b>Padrão</b>	<b>Finalidade</b>	<b>Fabricante</b>
Rivaroxabana	Analito	Purity Grade Standards (PGS)
Rivaroxabana-D <sub>4</sub>	Padrão interno	Purity Grade Standards (PGS)
Cloridrato de 4-MAA	Fármaco concomitante	Purity Grade Standards (PGS)
Dimenidrinato	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia (USP)
Paracetamol	Fármaco concomitante	Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)
Cloridrato de metoclopramida	Fármaco concomitante	Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)
Butilbrometo de escopolamina	Fármaco concomitante	Purity Grade Standards (PGS)
Cloridrato de piridoxina	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia (USP)
Cafeína	Fármaco concomitante	U.S.Pharmacopeia (USP)
Cloridrato de ondansetrona dihidrato	Fármaco concomitante	European Pharmacopoeia

### 3.1.3 Reagentes e Solventes

Em todos os testes para o desenvolvimento, validação do método bioanalítico e quantificação das amostras desconhecidas foram utilizados reagentes e solventes de grau analítico, conforme a Tabela 4.

**Tabela 4:** Reagentes e solventes utilizados nas análises.

Descrição	Fabricante	Finalidade
Metanol	J. T. Baker	Preparo das soluções de rivaroxabana, rivaroxabana-d4, dimenidrinato, paracetamol, piridoxina, cafeína, ondansetrona e lavagem da agulha
Água (Milli – Q)	Merck Millipore	Preparo das soluções de 4-MAA, escopolamina, metoclopramida e cafeína, preparo da fase móvel e lavagem da agulha
Acetonitrila	J. T. Baker	Preparo da solução de rivaroxabana-d4 e preparo da fase móvel
Ácido fórmico concentrado	Merck Millipore	Preparo da fase móvel
Diclorometano	Merck Millipore	Preparo das amostras (extração)

### 3.1.4 Material Biológico

O material biológico usado para o estudo foi plasma humano coletado de diferentes indivíduos pela Etapa Clínica da UNIFAG, com a devida aplicação de um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (número 2.969.992 – CAAE: 00343018.4.0000.5514) específico e estes plasmas foram utilizados no preparo da matriz para construção das curvas de calibração e controles de qualidade. Na seletividade foi avaliado o plasma nas condições normal, lipêmico e hemolisado para verificação da não interferência de compostos dessas matrizes no tempo de retenção dos ativos.

Durante o processo de conferência e previamente a quantificação das amostras dos voluntários, as amostras foram avaliadas qualitativamente em função do padrão visual do seu grau hemólise de forma a verificar se as mesmas estavam dentro do grau previamente validado.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparo das soluções padrão

#### 3.2.1.1 Solução padrão da Rivaroxabana (analito)

Uma massa correspondente a 0,00105 g de rivaroxabana (marca PGS - 99,6% de teor) foi cuidadosamente pesada, colocada em um balão volumétrico (10,0 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração 104,6 µg/mL de rivaroxabana. A partir desta solução foi feita uma diluição na concentração de 100,0 µg/mL que foi utilizada para as demais diluições dos ensaios específicos.

#### **3.2.1.1.1 Solução padrão do Rivaroxabana-D<sub>4</sub> (padrão interno)**

Uma massa correspondente a 0,00105 g de rivaroxabana-d4 (marca PGS - 99,4% de teor) foi pesada, colocada em um balão volumétrico (10,0 mL) e preparada em metanol para a obtenção de uma solução de concentração de 104,4 µg/mL de rivaroxabana-d4. A partir desta solução foram feitas diluições nas concentrações de 100,0 µg/mL e 1,0 µg/mL que foram utilizadas para as demais diluições dos ensaios específicos.

#### **3.2.2 Preparo dos padrões da curva de calibração e das amostras controle de qualidade**

As concentrações dos padrões da curva de calibração e das amostras controles de qualidade foram definidas em função da faixa prevista das concentrações das amostras a serem analisadas. Assim, estas concentrações correlacionam-se com a dose para qual o método foi desenvolvido.

A curva de calibração incluiu a análise de uma amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), uma amostra zero (matriz biológica com adição de padrão interno) e de amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno contemplando a faixa prevista de concentrações que se pretendeu analisar. Os padrões da curva de calibração foram preparados adicionando-se o analito ao plasma humano. Para isso, foi transferido uma alíquota de 0,100 mL da solução de Rivaroxabana 100000 ng/mL em metanol para um balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com plasma branco para obtenção de uma solução de rivaroxabana 2000 ng/mL em plasma e partir dela, foi diluída uma solução de 50 ng/mL que foi utilizada para dopagem dos pontos mais baixos da curva. Os dados referentes ao preparo dos padrões da curva de calibração estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Preparo da curva de calibração utilizada nas análises de rivaroxabana.

Nível	Amostra	Concentração em plasma (ng/mL)	Volume pipetado (mL) / concentração da solução de rivaroxabana preparada em plasma em (ng/mL)	Volume final (mL)	Fator de diluição
B	Branco	-	-	-	-
Z	Zero	-	-	-	-
1	Rivaroxabana	1	0,040 (50)	2,0	1:50,00
2	Rivaroxabana	5	0,100 (50)	1,0	1:10,00
3	Rivaroxabana	10	0,200 (50)	1,0	1:5,00
4	Rivaroxabana	50	0,050 (2000)	2,0	1:40,00
5	Rivaroxabana	100	0,050 (2000)	1,0	1:20,00
6	Rivaroxabana	200	0,100 (2000)	1,0	1:10,00
7	Rivaroxabana	400	0,200 (2000)	1,0	1:5,00
8	Rivaroxabana	600	0,300 (2000)	1,0	1:3,33

Os padrões da curva de calibração foram fracionados em alíquotas de 200 µL e transferidos para tubos tipo *ependorf* devidamente identificados.

### 3.2.3 Preparo da curva de calibração e controles de qualidade da Rivaroxabana

Todas as amostras dos controles de qualidade – amostras em concentração conhecida e cuja finalidade é monitorar a conformidade da resposta do equipamento durante a corrida analítica – foram preparadas adicionando-se o analito ao plasma humano. Para isto, transferiu-se uma alíquota de 0,100 mL da solução de rivaroxabana 100000 ng/mL em metanol para um balão volumétrico de 5,0 mL e completou-se o volume com plasma branco para obtenção de uma solução de rivaroxabana 2000 ng/mL em plasma. Os dados referentes ao preparo das amostras dos controles de qualidade estão apresentados na Tabela 6.

Conforme estabelecido pela RDC 27/2012 da ANVISA, os padrões de calibração foram considerados aprovados quando atenderam aos seguintes critérios:

I - desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ; e

II - desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.

A curva de calibração atendeu aos seguintes critérios para ser aprovada:

I - no mínimo 75% (setenta e cinco por cento) dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores; e

II - no mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios anteriores.

Os controles de qualidade foram avaliados não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento).

**Tabela 6:** Preparo dos controles de qualidade utilizados nas análises de rivaroxabana.

CQ	Analito	Concentração em plasma (ng/mL)	Volume pipetado (mL)/ concentração da solução de rivaroxabana preparada em plasma	Volume final (mL)	Fator de diluição
LIQ	rivaroxabana	1	0,040 (50 ng/mL)	2,0	1:50,00
CQB	rivaroxabana	3	0,120 (50 ng/mL)	2,0	1:16,67
CQM	rivaroxabana	300	0,300 (2000 ng/mL)	2,0	1:6,67
CQA	rivaroxabana	480	0,480 (2000 ng/mL)	2,0	1:4,17
CQD	rivaroxabana	1020	0,510 (2000 ng/mL)	1,0	1:1,96

As amostras dos controles de qualidade foram fracionadas em alíquotas de 200  $\mu$ L e transferidos para tubos tipo *ependorf* devidamente identificados.

### 3.2.4 Desenvolvimento da Metodologia Analítica

O desenvolvimento foi iniciado com uma pesquisa bibliográfica para obtenção do maior número de informações sobre o fármaco, tais como, concentração máxima do fármaco em matriz biológica ( $C_{m\acute{a}x}$ ), o tempo da maior concentração ( $T_{m\acute{a}x}$ ), o tempo de meia vida, além da solubilidade, polaridade, pH, pKa.

A amplitude da curva de calibração aplicada ao método foi estabelecida considerando dados observados na literatura e/ou dados internos. A determinação do limite inferior de quantificação (LIQ) foi feita dentro dos limites de 1 a 5% do  $C_{m\acute{a}x}$  esperado, sendo este determinado como 1 ng/mL (baseado em dados internos de estudos anteriores).

A determinação do limite superior da curva (LSC) foi feita levando em consideração o valor médio do  $C_{m\acute{a}x}$  acrescido de uma margem de segurança de 80 a 100%, sendo este determinado como 600 ng/mL (baseado em dados internos de estudos anteriores). Os demais pontos da curva de calibração foram distribuídos adequadamente na extensão da curva, levando-se em

consideração o intervalo entre o LIQ e o LSC, sendo estes 5, 10, 50, 100, 200 e 400 ng/mL, totalizando assim 8 pontos de calibração.

A técnica HPLC-MS/MS sequencial é complexa e cada desenvolvimento de metodologia tem sua particularidade, além da sintonia de todos os parâmetros do equipamento, foi necessário escolher os solventes para preparo de soluções, a coluna cromatográfica, fase móvel e o fluxo.

A primeira etapa do desenvolvimento ocorreu através da escolha do solvente de preparo da solução do analito e do padrão interno onde foi observada sua solubilidade. Foram preparadas as soluções do analito e do padrão interno e o desenvolvimento foi iniciado através de infusão direta por uma bomba manual com um fluxo de 10 a 50  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  de cada solução que pode variar de 100 a 1000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O fluxo, assim como a concentração, não deve ser superior ao citado acima, pois nesta fase ainda não é infundida fase móvel e as soluções são infundidas diretamente no equipamento, podendo resultar em uma contaminação, dificultando o desenvolvimento da metodologia. O fluxo e as concentrações também não devem ser inferiores a faixa acima, pois o fluxo e concentrações muito baixas podem ocasionar baixa sensibilidade, que é outro parâmetro fundamental para o início do desenvolvimento.

Desta forma, procedeu-se com a confirmação de massa teórica do composto de interesse contida na solução infundida utilizando a função de *scan MS*. Para isso, foi selecionada uma faixa de massas que compreenda a massa nominal (0 a 700  $m/z$ ), obtendo assim o espectro de MS. Com a confirmação da massa teórica foi realizada uma pré-otimização das condições de equipamento, onde são variados os valores do capilar, cone, RF lens, temperatura do bloco, temperatura dessolvatação, gás do cone.

A segunda etapa do desenvolvimento compreendeu a obtenção do espectro de MS/MS. Com a massa do íon precursor selecionada no primeiro quadrupolo, o gás de colisão foi aberto para fragmentação da molécula que ocorre no segundo quadrupolo. No terceiro quadrupolo foi feita uma varredura de massas com a finalidade de selecionar os fragmentos mais intensos do íon precursor. Assim o primeiro objetivo foi de selecionar o íon precursor e em seguida, através do seu fragmento obter a *função MRM* (do inglês, *multiple reaction monitoring*), que é um dos modos de aquisição do triplo quadruplo que permite o monitoramento de múltiplos precursores e de seus fragmentos.

Todo procedimento realizado para o analito foi repetido para o padrão interno (PI). O PI, quando adicionado na extração, tem como função corrigir algum erro que possa ocorrer durante a extração e processo de ionização, pois este tem sempre a mesma concentração e estrutura idêntica (divergindo pela presença de átomos marcados).

A terceira etapa é a otimização da *função MRM*, utilizando a massa selecionada para o íon precursor no primeiro quadrupolo e para o fragmento no terceiro quadrupolo, a energia do cone e a energia de colisão são otimizadas. Para isso, foram feitas três *funções MRM* variando os fragmentos mais intensos para o analito e para o PI, com o objetivo de aumentar a seletividade do equipamento, sendo escolhido o melhor entre eles, ou seja, o que obteve maior sensibilidade e com menor número de interferentes.

A quarta etapa envolveu o HPLC e não mais infusão manual, que tem por objetivo a otimização da fase móvel e da fase estacionária. Para otimização da coluna cromatográfica, o teste foi iniciado com uma Luna 5  $\mu$  C18-100A 100x4,6 mm em fase reversa, sendo avaliadas as separações cromatográficas e a simetria das bandas. Nesta etapa também foi otimizada a composição fase móvel, variando as proporções de solvente orgânico e aquoso.

Desta forma, foram iniciados os testes através de diferentes proporções de solvente orgânico (acetonitrila) e aquoso (água Milli-Q), sendo a melhor condição escolhida observando o tempo de retenção, altura da linha base, altura da banda e área do pico.

Após a escolha das proporções de solventes orgânicos e aquoso, foi adicionado o modificador ácido fórmico de acordo com as características ácido-base da molécula. O intuito de adicionar os modificadores é facilitar a protonação de sítios básicos da molécula.

Com as condições dos equipamentos otimizadas, foram feitos os testes de contaminação cruzada através da injeção de soluções do analito e do PI para verificar se existe interferente de PI no canal do analito e do analito no canal do padrão interno.

Em seguida, foram iniciados os testes de extração das amostras, sendo testados vários solventes (acetonitrila, metanol, diclorometano, éter dietílico, acetato de etila), avaliando-se o mais adequado de acordo com a recuperação do analito. Foram testados os volumes das alíquotas de matriz, os tempos de agitação, a concentração dos modificadores de reações, o volume do solvente e a temperatura da centrífuga para obter uma melhor separação das fases.

As condições definidas pelo desenvolvimento da metodologia analítica foram devidamente validadas conforme os critérios da RDC 27/2012 da ANVISA para que sua aplicação em estudos de bioequivalência / biodisponibilidade fosse realizada.

### **3.2.5 Validação Pré-Estudo**

Previamente a quantificação das amostras em um estudo, a metodologia analítica desenvolvida deve ser submetida à uma validação prévia.

A validação foi conduzida conforme os requisitos da RDC 27/2012 da ANVISA, compreendendo os ensaios de seletividade, efeito residual, efeito de matriz, linearidade, precisão e exatidão, avaliação de medicamentos concomitantes e estabilidade do analito e seu padrão interno em solução e na matriz biológica.

### 3.2.6 Aplicação da Metodologia Analítica

A metodologia analítica previamente desenvolvida e validada foi aplicada na quantificação de amostras biológicas de dois estudos de Rivaroxabana conduzidos na UNIFAG, sendo um em jejum (JPJ 32/17) e outro pós-prandial (JPJ 33/17), conforme as especificações do protocolo clínico que foi devidamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade São Francisco sob os números 2.351.615 e 2.351.613, respectivamente. Importa informar que, para demonstrar a aplicação da metodologia analítica, dadas as questões de confidencialidade dos estudos, somente serão apresentados os resultados referentes às curvas farmacocinéticas médias, as quais foram obtidas através da avaliação das concentrações plasmáticas dos voluntários em que foi administrado o **medicamento referência** (vide Carta de Autorização do Patrocinador no Anexo A).

O número de voluntários estabelecido e previsto para cada estudo foi 48 e 36, respectivamente. A forma farmacêutica, administrada por via oral na dose de 20 mg, foi comprimido revestido para ambos os estudos. A quantidade de amostra coletada por tempo foi de 8,5 mL. Os tempos de coleta das amostras seguiram a seguinte cronologia, de acordo com cada estudo:

- ✓ Tempos de 0:00, 0:20, 0:40, 1:00, 1:20, 1:40, 2:00, 2:20, 2:40, 3:00, 3:20, 3:40, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00, 10:00, 12:00, 16:00, 24:00, 36:00 e 48:00 para o estudo em jejum (JPJ 32/17) e,
- ✓ Tempos de 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 4:30, 5:00, 5:30, 6:00, 7:00, 8:00, 10:00, 12:00, 16:00, 24:00, 36:00 e 48:00 para o estudo pós-prandial (JPJ 33/17).

#### 3.2.6.1 População do Estudo

O grupo de voluntários foi composto por indivíduos sadios, adultos, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos. Os voluntários foram criteriosamente selecionados e uma população o mais homogênea possível foram admitidas aos estudos.

A seleção de voluntários foi realizada na UNIFAG (Bragança Paulista / SP), diretamente da população da região.

O processo de recrutamento seleção de voluntários ocorreu da seguinte forma: após terem sido prestadas as informações relativas aos estudos clínicos de biodisponibilidade / bioequivalência, durante reunião realizada na UNIFAG (Bragança Paulista / SP) e, esclarecidas todas as dúvidas, foi agendada consulta médica. Nesta ocasião, os voluntários assinaram um Termo de Recrutamento para que se inicie o processo de seleção e participação no estudo. Após a assinatura, os voluntários foram avaliados clinicamente, para a obtenção do histórico médico e exame físico. Caso este histórico tenha sido obtido há mais de 90 dias da data prevista para o primeiro período do estudo, os exames serão refeitos e as restrições cuidadosamente verificadas através de questionamento posterior ao voluntário. Por ocasião da obtenção do histórico clínico, os voluntários já também serão informados sobre as restrições de uso de medicamentos e demais quesitos (diretrizes ou restrições) constantes no protocolo específico do estudo. Após a consulta médica, foi coletado material para os exames subsidiários. Os voluntários foram aceitos no estudo somente se considerados saudáveis, a juízo de profissionais legalmente habilitados, com base na história médica, exame físico e os exames laboratoriais que antecedem a admissão no estudo.

Após esclarecidas todas as dúvidas restantes, os voluntários considerados aptos para participação no estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Para fins de avaliação das condições de saúde, durante o processo de seleção os voluntários realizaram os seguintes exames laboratoriais apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Exames laboratoriais vinculados ao processo de seleção dos voluntários.

<b>Categoria</b>	<b>Exames</b>
ECG	ECG padrão com 12 derivações
Análise Hematológica	Hemoglobina, hematócrito, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas
Análise Bioquímica	Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa), <i>Clearance</i> de Creatinina, ácido úrico, ureia, colesterol total e triglicérides, aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGP), fosfatase alcalina, bilirrubina total e frações, proteína total, albumina, creatinina, glicemia de jejum
Urina	Sumário de Urina (urina I)
Sorologia	Análise Sorológica para: hepatite B, hepatite C e HIV, $\beta$ HCG para mulheres.

### 3.2.6.2 Cálculos das Concentrações de Amostras

Os cálculos foram baseados em função da curva de calibração construída para o fármaco analisado, no sistema de dados do MassLynx 4.1, utilizando os padrões de calibração. As funções de calibração foram calculadas através da razão entre as áreas dos picos de Rivaroxabana e do padrão interno, Rivaroxabana-d4. As concentrações do analito nas amostras foram calculadas a partir da equação de regressão linear ponderada ( $1/x^2$ ), obtida com a curva de calibração (concentração de rivaroxabana em função das razões das áreas). Tal modelo de regressão ( $1/x^2$ ) foi utilizado devido a amplitude da curva de calibração (1,0 a 600,0 ng/mL) e por apresentar o menor valor para a soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração *versus* seus valores obtidos pela equação da curva.

### 3.2.6.3 Desenho e Modelo Estatístico Aplicado ao Estudo

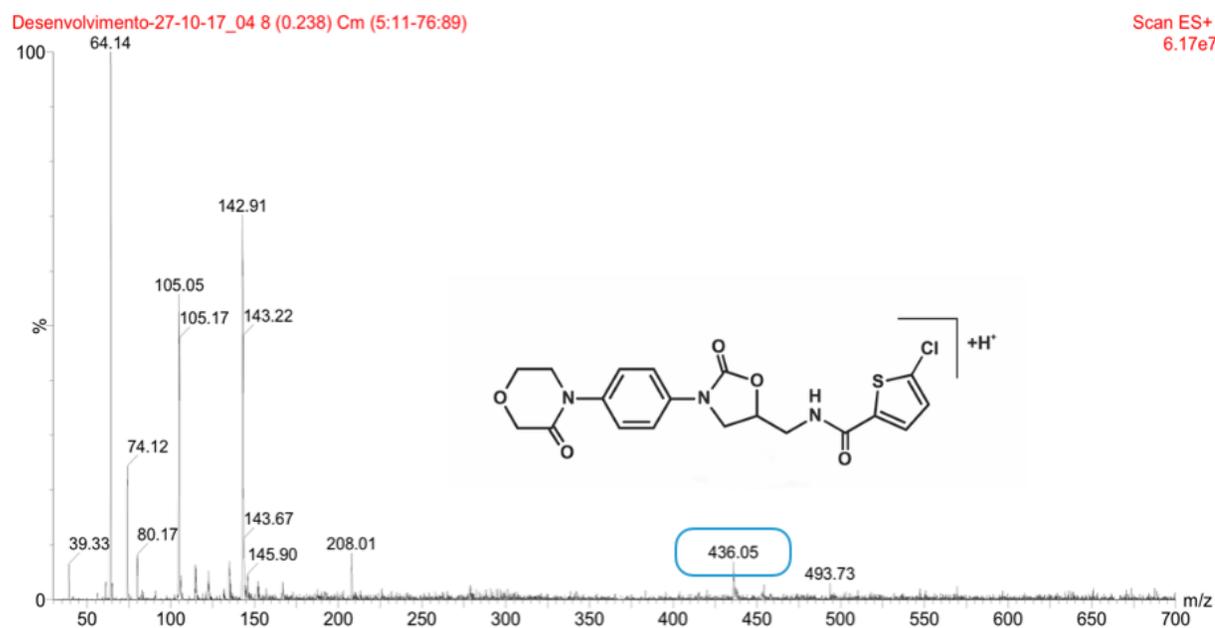
Um delineamento com duas sequências e quatro períodos foi utilizado no estudo jejum. Este é um delineamento cruzado replicado (2x4) com duas formulações, quatro períodos de confinamento, duas sequências (TRTR e RTRT – T = medicamento teste e R = medicamento referência) quando cada indivíduo foi aleatoriamente alocado para uma dessas sequências. Já para o estudo pós-prandial foi utilizado um modelo convencional (2x2).

A análise estatística seguiu a Resolução RE 1170/06 da ANVISA, intitulada “Guia GUIA PARA PROVAS DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA / BIOEQUIVALÊNCIA”. Os parâmetros farmacocinéticos primários avaliados foram  $C_{m\acute{a}x}$  e  $ASC_{0-t}$ , sendo que os modelos estatísticos adotados foram intervalo de confiança paramétrico, análise de variância (ANOVA) e poder do teste. Neste trabalho, apenas será feito uso dos dados de  $C_{m\acute{a}x}$  e  $ASC_{0-t}$  de ambos os estudos para correlação e avaliação através de um teste T variável das diferenças observadas entre esses parâmetros nas condições de jejum *versus* pós-prandial apenas para o medicamento referência.

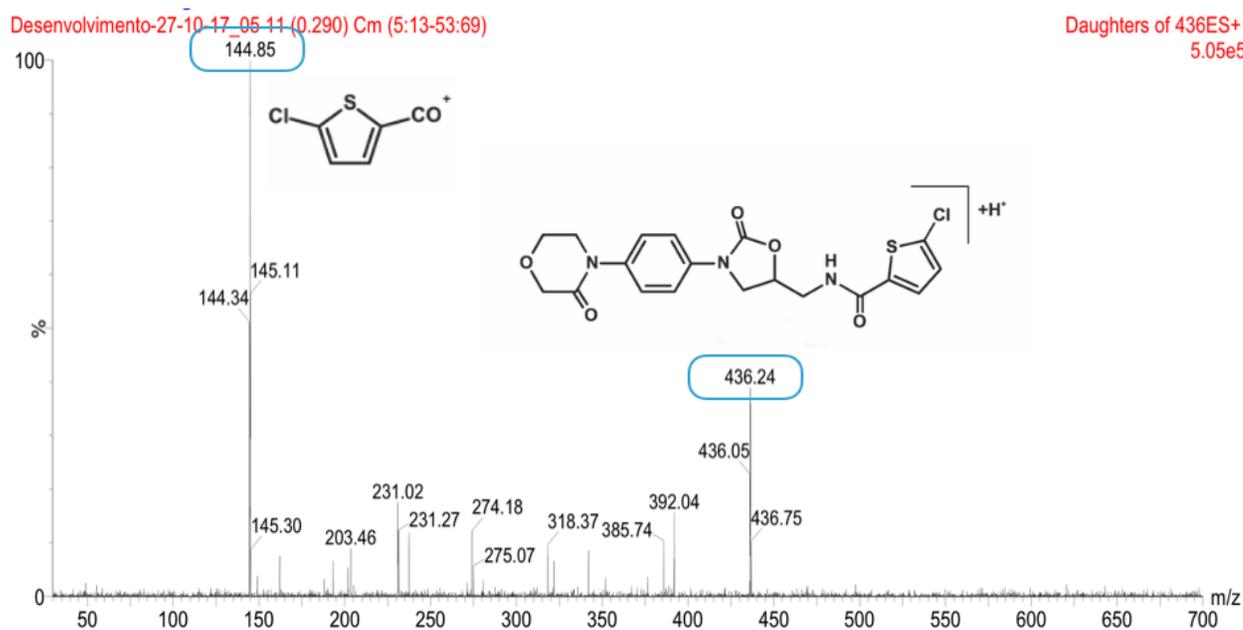
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desenvolvimento da Metodologia Analítica

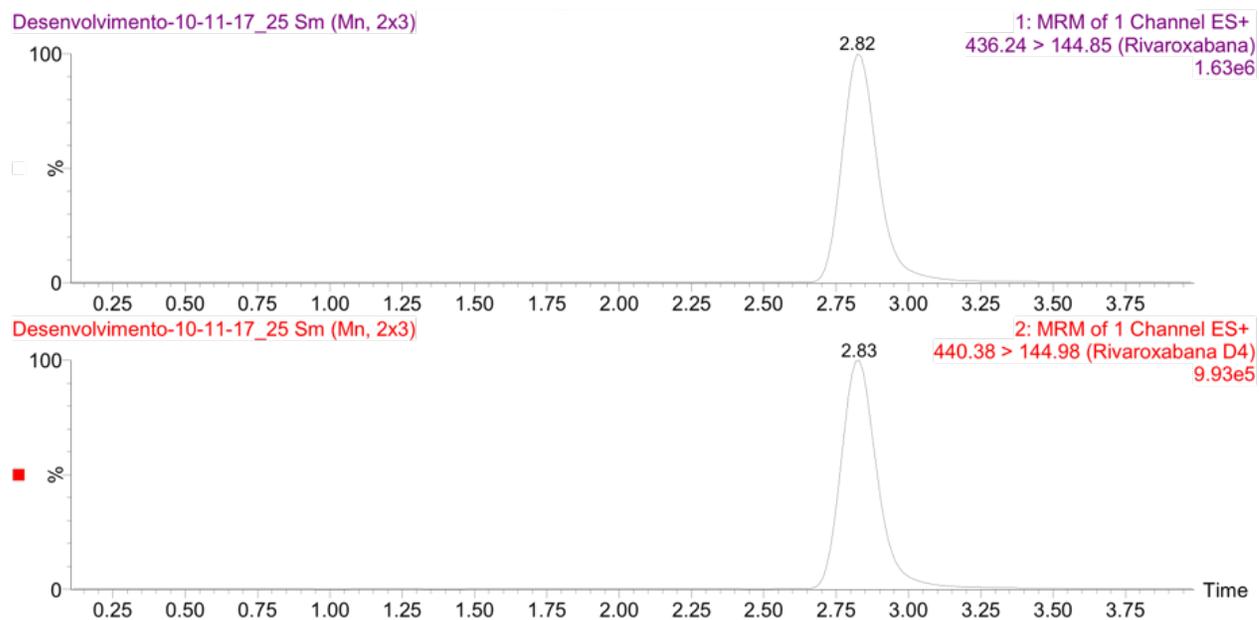
Inicialmente, foi preparada uma solução de 100 µg/mL de Rivaroxabana, que foi diluída para uma solução de 1 µg/mL no diluente MeCN/H<sub>2</sub>O (80:20 v/v). Através de repetidas injeções destas soluções no espectrômetro de massas, foi possível selecionar as transições de fragmentação do íon precursor (436,24 – Figura 5 para o analito e 440,38 para o PI) e do íon produto (144,85 – Figura 6 para o analito e 144,98 para o PI) e conseqüentemente, determinou-se o canal de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*) nas transições de 436,24 > 144,85 e 440,38 > 144,98 (Figura 7).



**FIGURA 5. Representação do espectro na função MS.** Espectro de identificação do íon precursor no modo de varredura (full scan). Fonte: Acervo pessoal.



**FIGURA 6. Representação do espectro na função MS/MS.** Espectro de identificação do íon precursor e íon produto no modo MRM (*multiple reaction monitoring*). Fonte: Acervo pessoal.

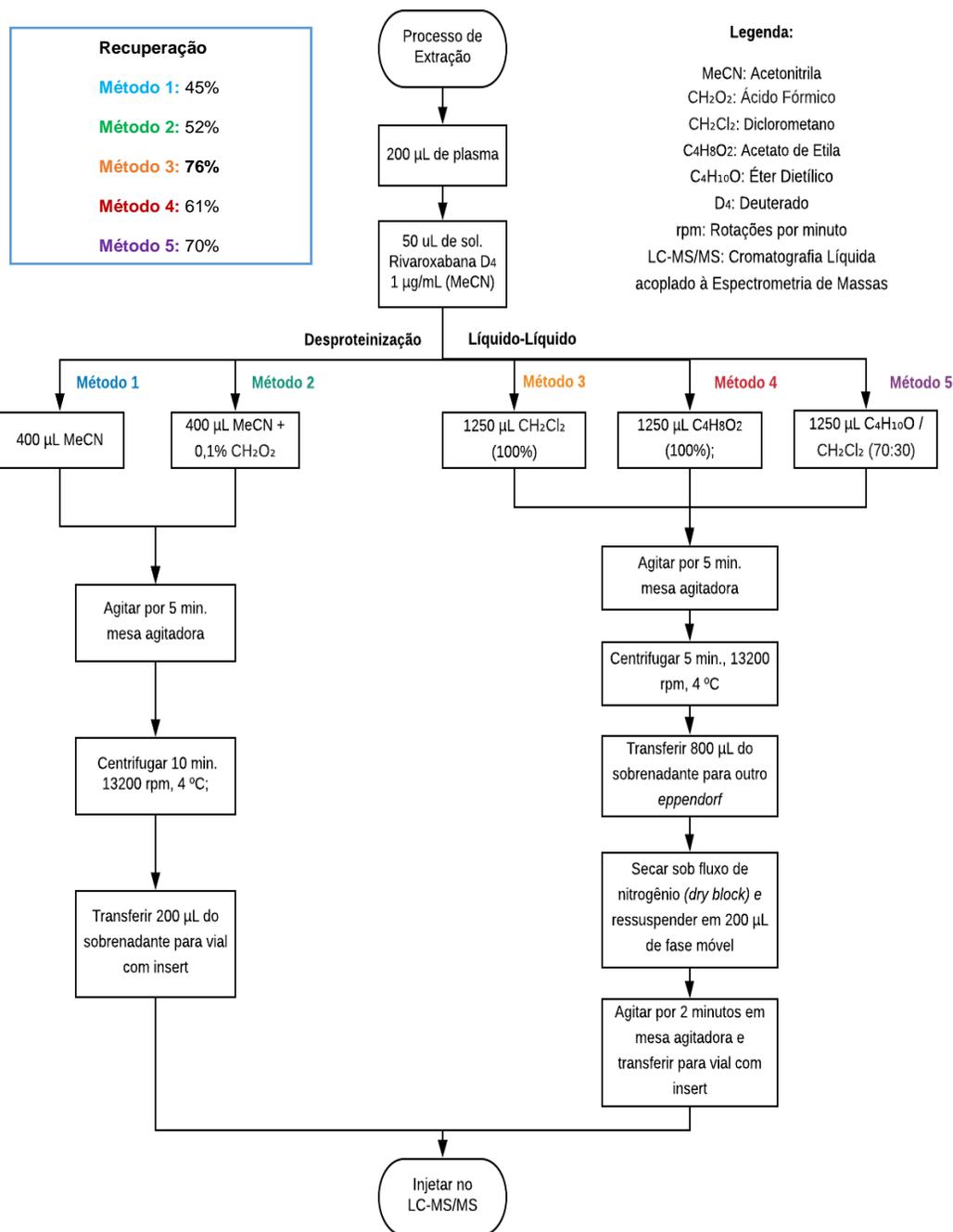


**FIGURA 7. Representação do cromatograma analítico.** Cromatograma dos picos do analito (1) e padrão interno (2) conforme MRM (*multiple reaction monitoring*) definido. Fonte: Acervo pessoal.

Assim, foram definidos os canais de monitoramento do analito e do padrão interno (PI), sendo o PI monitorado para verificar a ocorrência de algum problema no processo de extração, já que o método de quantificação considera a razão da área do analito pela área do padrão interno para gerar a resposta analítica. O PI deve ser escolhido de acordo com sua solubilidade, função orgânica e polaridade, que deverão ser similares às características do analito.

Após essa etapa, acoplou-se uma coluna HPLC Polaris C18-A 50mm x 2,0mm 5  $\mu$ m (AGILENT) e preparou-se uma fase móvel MeCN:H<sub>2</sub>O:ácido fórmico (80:20:0,1 v/v/v). Em seguida, diluiu-se uma solução de RIV 1  $\mu$ g/mL em fase móvel para se iniciar os testes com o sistema. Através de sucessivas injeções da solução preparada, os parâmetros de detecção do espectrômetro de massas foram otimizados.

Com estes parâmetros determinados, iniciou-se os testes de extração do analito na matriz biológica (plasma). Para a otimização do método de extração, foram testadas variações de qualidade e quantidade de solventes, tempos de centrifugação e inserção ou não de etapa de secagem em Dry Block, conforme representado no fluxograma da Figura 8. Os diferentes processos foram avaliados através dos parâmetros de recuperação do analito, resposta analítica e minimização de interferentes.



**FIGURA 8. Fluxograma representando os métodos de extração avaliados.** Esquematisação dos processos de extração avaliados com as variações de tipo (desproteínização e líquido-líquido) e dos reagentes aplicados em cada método. Fonte: Acervo pessoal.

A análise dos resultados revelou que os métodos de extração 3 e 5, apresentaram melhores resultados de resposta analítica e recuperação com leve vantagem para a extração 3. A base conceitual da performance de cada método se estabelece na polaridade dos solventes orgânicos utilizados. As extrações 1 e 2 não se mostraram adequadas em função da característica predominantemente apolar da molécula em análise e portanto, tais extrações por fazerem uso de solventes orgânicos polares, não obtiveram recuperação satisfatória. A extração 4 faz uso de um solvente (acetato de etila) com maior polaridade do que as demais que obtiveram um melhor desempenho na extração do analito de interesse.

Desta forma, realizou-se a análise de uma exatidão teste composta de amostra branco, branco + PI, curva de calibração e controles de qualidade com o método de extração 3. Apesar dos ótimos resultados obtidos para os desvios de concentração tanto na injeção quanto na reinjeção, observou-se um sutil interferente eluindo posteriormente ao pico de interesse, prejudicando a resolução cromatográfica, principalmente dos picos de concentrações inferiores. Portanto, realizou-se um novo teste de exatidão fazendo uso do método de extração 5 e verificou-se que, embora apresentou-se excelentes resultados quanto aos desvios, ocorreu o mesmo problema de interferência.

Para uma possível solução na separação do interferente, foram realizados teste com uma coluna com maiores dimensões e variando as proporções de fase móvel. Para tanto, foram testadas as seguintes composições de Fase Móvel: MeCN:H<sub>2</sub>O (60/40, v/v, 0,1% de ácido fórmico); MeCN/H<sub>2</sub>O/AF (70/30 v/v, 0,1% de ácido fórmico); MeCN/H<sub>2</sub>O (85/15 v/v, 0,1% de ácido fórmico) e a coluna foi alterada para uma Luna 5u C<sub>18</sub> 100 x 4,6 mm. Em seguida, procedeu-se com a injeção de exatidões teste com as variações mencionadas e foram obtidos melhores resultados analíticos nesta coluna com a fase móvel MeCN/H<sub>2</sub>O/AF (60/40 v/v, 0,1% de ácido fórmico). Desta forma, foram realizadas exatidões teste adicionais para se garantir que os resultados apresentados se manteriam robustos e satisfatórios e através desta confirmação, foi possível concluir o processo de desenvolvimento do método de quantificação de Rivaroxabana em plasma humano conforme os parâmetros cromatográficos descritos na Tabela 8 e as condições de detecção descritos na Tabela 9.

**Tabela 8:** Condições cromatográficas utilizadas na metodologia analítica.

<b>Fase Móvel</b>	Acetonitrila / Água Milli-Q / Ácido fórmico concentrado (600:400:1 v/v/v) – pH 3,0
<b>Coluna</b>	Phenomenex Luna 5 $\mu$ C18-100A 100x4,6 mm
<b>Fluxo</b>	0,500 mL.min <sup>-1</sup> .
<b>Volume de injeção</b>	10 $\mu$ L
<b>Temperatura do autoinjeter</b>	$\cong$ 22° C
<b>Tempo total de corrida</b>	4,00 minutos
<b>Tempo de retenção</b>	Rivaroxabana: 2,82 minutos Rivaroxabana-d4: 2,83 minutos

**Tabela 9:** Condições de detecção utilizadas na metodologia analítica.

<b>MRM</b>	Rivaroxabana: 436,24 > 144,85 Rivaroxabana-d4: 440,38 > 144,98
<b>Ionização</b>	ES+
<b>Temperatura da fonte</b>	110 °C
<b>Temperatura de dessolvatação</b>	500 °C
<b>Fluxo dos gases do cone</b>	nulo
<b>Fluxo dos gases de dessolvatação</b>	850 L/h
<b>Capilar</b>	3,00 KV
<b>Cone</b>	Rivaroxabana: 40,0 V Rivaroxabana-d4: 40,0 V
<b>Energia de colisão</b>	Rivaroxabana: 25,0 V Rivaroxabana-d4: 25,0 V
<b>Pressão de Argônio</b>	2,89e <sup>-3</sup> mbar

## 4.2 Validação da Metodologia Analítica

A validação dos procedimentos experimentais para a determinação de Rivaroxabana em plasma humano utilizando Rivaroxabana-D<sub>4</sub> como PI foi realizada através dos procedimentos laboratoriais utilizados para demonstrar que o método analítico descrito neste trabalho é adequado e confiável para as análises propostas, assim como, os resultados obtidos.

Os seguintes aspectos foram avaliados durante a validação conforme as finalidades descritas abaixo:

- Validação pré-estudo, incluindo os parâmetros: seletividade, efeito residual, efeito de matriz, linearidade, precisão e exatidão.
- Definição dos parâmetros do estudo: limite inferior de quantificação, concentração dos padrões de calibração e das amostras de controle de qualidade.
- Validação de análise de fármacos de uso concomitante: seletividade, efeito matriz e precisão e exatidão.
- Determinação da estabilidade das amostras.

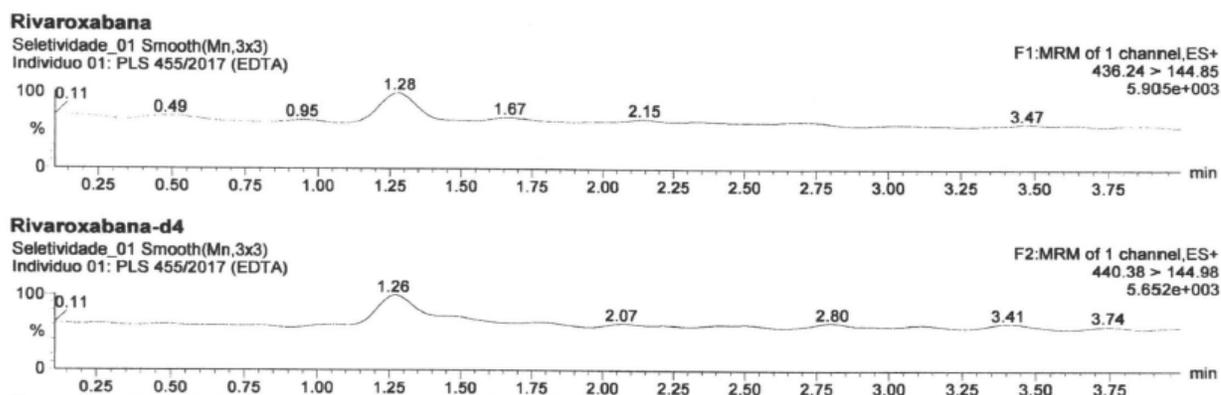
### 4.2.1 Seletividade

Para confirmar a seletividade do método – a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz – foram analisadas amostras branco de plasma humano obtidas de 6 indivíduos sendo 4 amostras normais, 1 lipêmica e 1 hemolisada conforme condições descritas na Tabela 10.

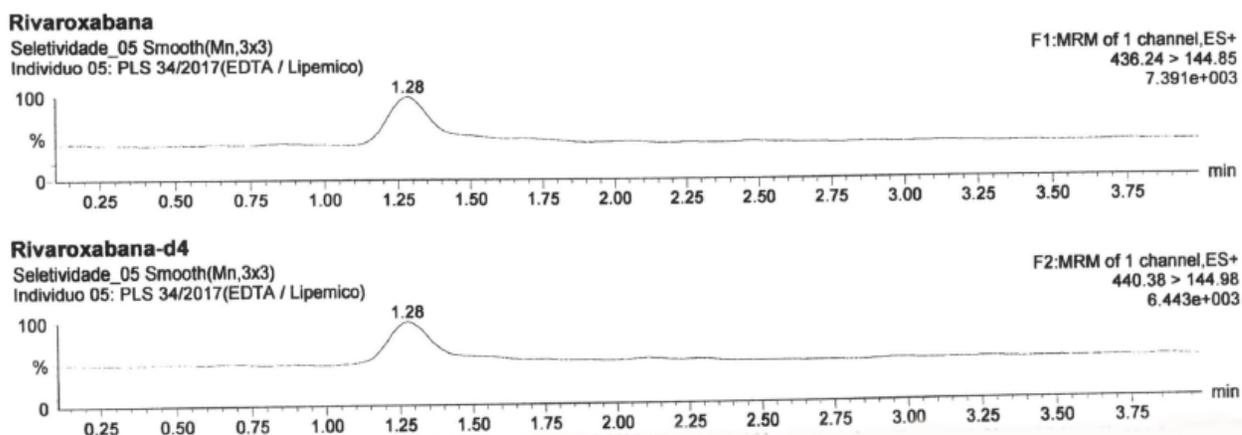
**Tabela 10:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Seletividade.

Indivíduo	Descrição	Lote	Área do fármaco	Área do padrão interno	Resultado
01	Indivíduo 1: EDTA	PLS 455/2017	Nenhuma	Nenhuma	Sem interferência significativa
02	Indivíduo 2: EDTA	PLS 456/2017	Nenhuma	Nenhuma	Sem interferência significativa
03	Indivíduo 3: EDTA	PLS 457/2017	Nenhuma	Nenhuma	Sem interferência significativa
04	Indivíduo 4: EDTA	PLS 458/2017	Nenhuma	Nenhuma	Sem interferência significativa
05	Indivíduo 5: EDTA/Lipêmico	PLS 34/2017	Nenhuma	Nenhuma	Sem interferência significativa
06	Indivíduo 6: EDTA/Hemolisado	PLS 381/2017	Nenhuma	Nenhuma	Sem interferência significativa
07	LIQ 1,0 ng/mL	PLS 455/2017	749	156710	Não se aplica

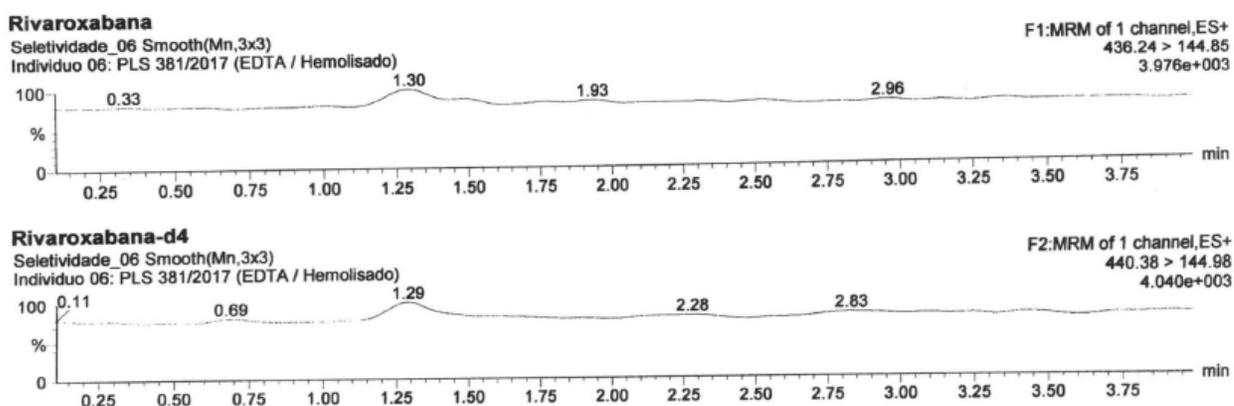
Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com amostra processada do LIQ e conforme pode ser observado, não houve interferência significativa nos tempos de retenção tanto do analito como do PI. Os cromatogramas para evidenciar os resultados obtidos neste ensaio, se encontram-se nas Figuras 9, 10, 11 e 12.



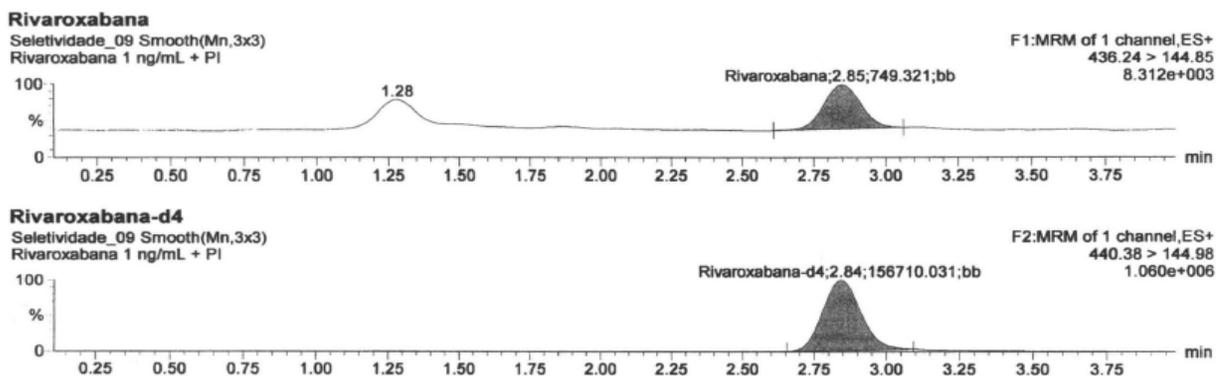
**FIGURA 9. Cromatograma branco normal.** Referente ao lote de plasma normal PLS 455/2017 em EDTA. Fonte: Acervo pessoal.



**FIGURA 10. Cromatograma branco lipêmico.** Referente ao lote de plasma lipêmico PLS 34/2017 em EDTA. Fonte: Acervo pessoal.



**FIGURA 11. Cromatograma branco hemolisado.** Referente ao lote de plasma hemolisado PLS 34/2017 em EDTA. Fonte: Acervo pessoal.



**FIGURA 12. Cromatograma de plasma extraído.** Referente ao plasma extraído dopado na concentração do LIQ com PI. Fonte: Acervo pessoal.

#### 4.2.2 Efeito Residual

Este parâmetro foi demonstrado através da comparação entre os cromatogramas de três amostras do branco, uma obtida antes e duas depois da injeção do LSQ acrescido do PI, conforme apresentado na Tabela 11. Este ensaio permitiu observar a ausência de picos residuais do analito e do PI nas duas amostras branco injetadas após o LSQ nos tempos de retenção do analito e do PI, atendendo ao exigido pela normativa da ANVISA.

**Tabela 11:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Efeito Residual.

Amostra	Área do fármaco	Área do padrão interno
Rivaroxabana 1 ng/mL (LIQ)	814	158323
Branco	Nenhuma	Nenhuma
Rivaroxabana 600 ng/mL (LSC)	468609	154616
Branco	Nenhuma	Nenhuma
Branco	Nenhuma	Nenhuma

O efeito residual pode ser reduzido pela otimização da composição do solvente de lavagem de agulha do amostrador automático liberando o volume de forma a remover traços da droga residual que pode ficar na agulha que realiza o processo de injeção. No caso de remoção de um analito básico, a adição de ácido fórmico à lavagem solvente é recomendada junto com um aumento na porcentagem de solvente orgânico no solvente de lavagem.

#### 4.2.3 Efeito de Matriz

Para avaliar se existe efeito de matriz foram analisadas amostras de 8 fontes distintas, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas, adicionando-se posteriormente analito e PI nas mesmas concentrações de CQB e CQA.

As amostras hemolisadas dos lotes utilizados nesse ensaio devem apresentar o grau de hemólise mais alto (grau 4) para que, desta forma, os demais níveis inferiores de hemólise sejam compreendidos. Caso este nível resulte em um efeito de matriz, os níveis inferiores devem ser avaliados e caso um nível inferior não gere interferência, as amostras em estudo com nível superior à este não deverão ser analisadas.

As respostas obtidas foram comparadas com as respostas em solução e os resultados foram avaliados a partir do cálculo do fator de matriz normalizado (FMN) e estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Efeito de Matriz.

Parâmetros Avaliados	FMN	
	CQB	CQA
Média	1,017	1,006
DP	0,032	0,014
CV (%)	3,138	1,343
<b>Média FMN de todos Controles (n=16)</b>	<b>1,011</b>	
<b>DP (n=16)</b>	<b>0,024</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>2,417</b>	

DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e FMN= Fator de Matriz Normalizado.

Conforme pode ser observado, os resultados se mantiveram dentro do desvio (CV) esperado de 15% para o FMN nas concentrações de CQB e CQA, portanto não foi verificado efeito de matriz significativo para as amostras nestas condições.

#### 4.2.4 Linearidade / Curva de Calibração

A curva de calibração foi utilizada para determinação das concentrações das amostras desconhecidas em estudo através da razão entre as áreas do analito e do padrão interno. Para tanto, concentrações distribuídas de forma proporcional dentro faixa definida (1 – 600 ng/mL) e os seus resultados foram avaliados em função dos critérios de aceitação estabelecidos.

Os dados referentes às 3 curvas de calibração estão apresentados na Tabela 13 e a representação gráfica de uma das curvas no Gráfico 1. Os resultados se mostraram adequados, uma vez que, cumpriram com os critérios de desvio menor do que 20% para o LIQ e menor do que 15% para as demais concentrações da curva de calibração.

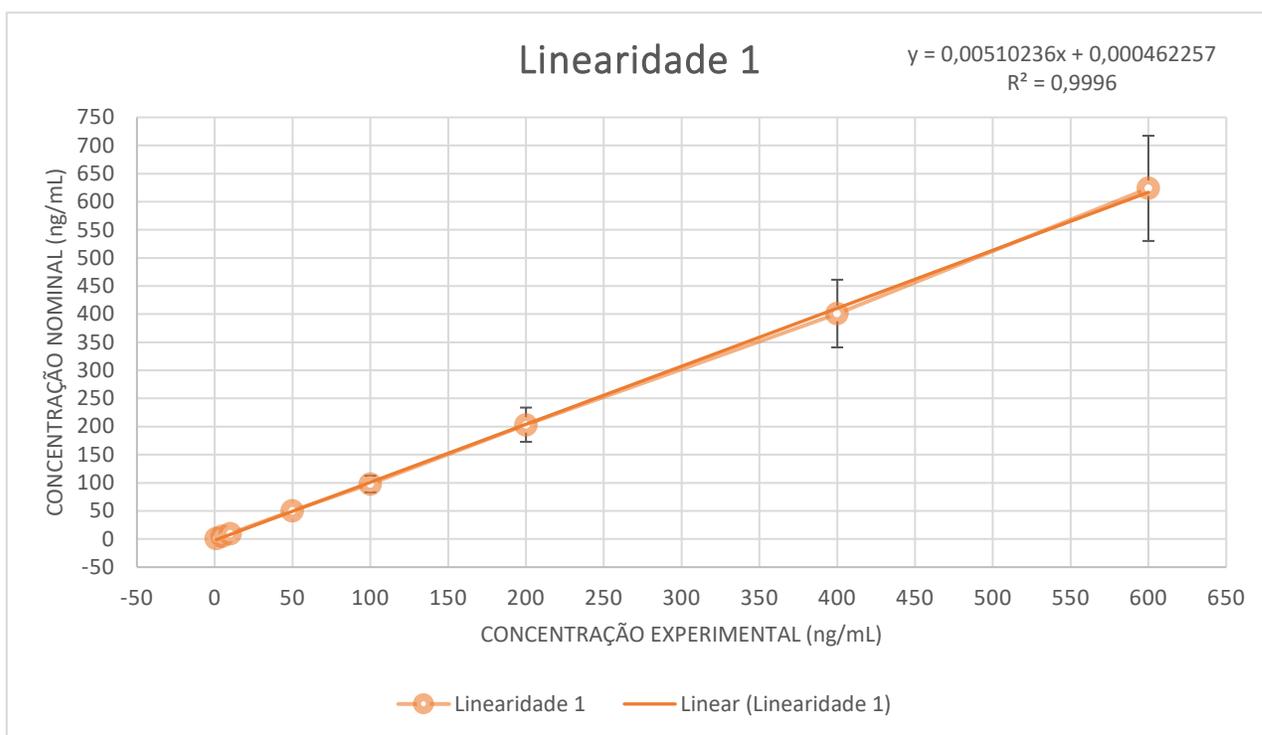
De acordo com a literatura, são esperados valores de concentração plasmática de 1 a 600 ng/mL sendo que, portanto, a curva apresentada atende a necessidade do método. Além disso, as concentrações estão distribuídas adequadamente na curva de calibração, fato que é desejável na concepção de um método analítico.

**Tabela 13:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Linearidade.

Conc. nominal (ng/mL)	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	Conc. Experimental (ng/mL)	Desvio (%)	Conc. Experimental (ng/mL)	Desvio (%)	Conc. Experimental (ng/mL)	Desvio (%)

1	1,006	0,64	1,000	0,00	1,011	1,11
5	4,921	-1,57	6,861	37,21*	4,734	-5,33
10	9,667	-3,33	10,026	0,26	9,923	-0,77
50	50,28	0,56	48,947	-2,11	50,645	1,29
100	97,829	-2,17	101,132	1,13	98,934	-1,07
200	203,306	1,65	199,553	-0,22	203,115	1,56
400	401,045	0,26	396,022	-0,99	406,375	1,59
600	623,73	3,96	611,542	1,92	609,661	1,61
<b>Equação</b>	$y = 0,00510236x + 0,000462257$		$y = 0,00512826x + 0,000487143$		$y = 0,00512081x + 0,000442987$	

\* Desvios acima do limite permitido de 15%, este valor não foi incluído no cálculo da equação da curva.



**GRÁFICO 1. Representação gráfica da Linearidade 1.** Observou-se a correlação proporcional entre os resultados de cada ponto, demonstrando assim, a linearidade do método.

#### 4.2.5 Exatidão e Precisão

Para avaliar a precisão e exatidão do método, 5 concentrações distintas (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), na faixa esperada de concentrações foram analisadas, utilizando-se determinações por concentração. A precisão e exatidão foram determinadas em uma mesma corrida

(intracorrída) e em corridas diferentes (intercorrídas). A precisão (expressa por CV) e exatidão (expressa por EPR) intracorrída e intercorrídas foram calculadas segundo as equações abaixo:

$$\text{CV (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100$$

**Equação 1:** Fórmula para cálculo da precisão expressa em CV.

$$\text{EPR (\%)} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal})}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

**Equação 2:** Fórmula para cálculo da exatidão expressa em EPR.

Nos próximos itens, os critérios de validação e respectivos resultados são apresentados.

#### 4.2.5.1 Validação Intracorrída

A precisão e exatidão intracorrída foram determinadas utilizando-se um lote contendo as seguintes amostras:

- a) Uma curva de calibração contendo os padrões definidos anteriormente.
- b) No mínimo 5 réplicas de cada controle de qualidade definido acima.

Os seguintes critérios foram seguidos, para que a precisão e exatidão intracorrída fosse considerada aprovada:

- a) Precisão: para os controles CQB, CQM, CQA e CQD o coeficiente de variação (CV) não deveria exceder  $\pm 15\%$  e para o LIQ não deveria exceder  $\pm 20\%$ .
- b) Exatidão: o valor da exatidão (expresso pelo Erro Padrão Relativo – EPR) para as amostras CQB, CQM, CQA e CQD deveria estar dentro do desvio de  $\pm 15\%$  do valor nominal e para o LIQ, admitiu-se valores dentro do desvio de  $\pm 20\%$ .

Os resultados das análises intracorrída estão apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16 e de forma sintetizada nos Gráficos 2, 3 e 4. Todos os resultados se mantiveram dentro dos desvios permitidos e portanto, considerados adequados conforme estabelecido pela resolução RDC 27/2012 da ANVISA, demonstrando assim, a repetibilidade e reprodutibilidade intra corrida da metodologia.

**Tabela 14:** Análise intracorrida dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de rivaroxabana.

Réplicas	CQB (lote 1)	CQB (lote 2)	CQB (lote 4)	CQM (lote 1)	CQM (lote 2)	CQM (lote 4)	CQA (lote 1)	CQA (lote 2)	CQA (lote 4)
<b>Média</b>	2,972	2,914	3,254	311,374	314,857	312,496	492,952	499,077	499,508
<b>DP</b>	0,067	0,084	0,361	3,057	1,967	2,591	9,307	4,725	5,896
<b>CV (%)</b>	2,263	2,867	11,107	0,982	0,625	0,829	1,888	0,947	1,180
<b>EPR(%)</b>	-0,928	-2,867	8,472	3,791	4,952	4,165	2,698	3,974	4,064

Concentração Nominal: CQB = 3,0 ng/mL, CQM = 300,0 ng/mL e CQA = 480,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

**Tabela 15:** Análise intracorrida do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) para rivaroxabana.

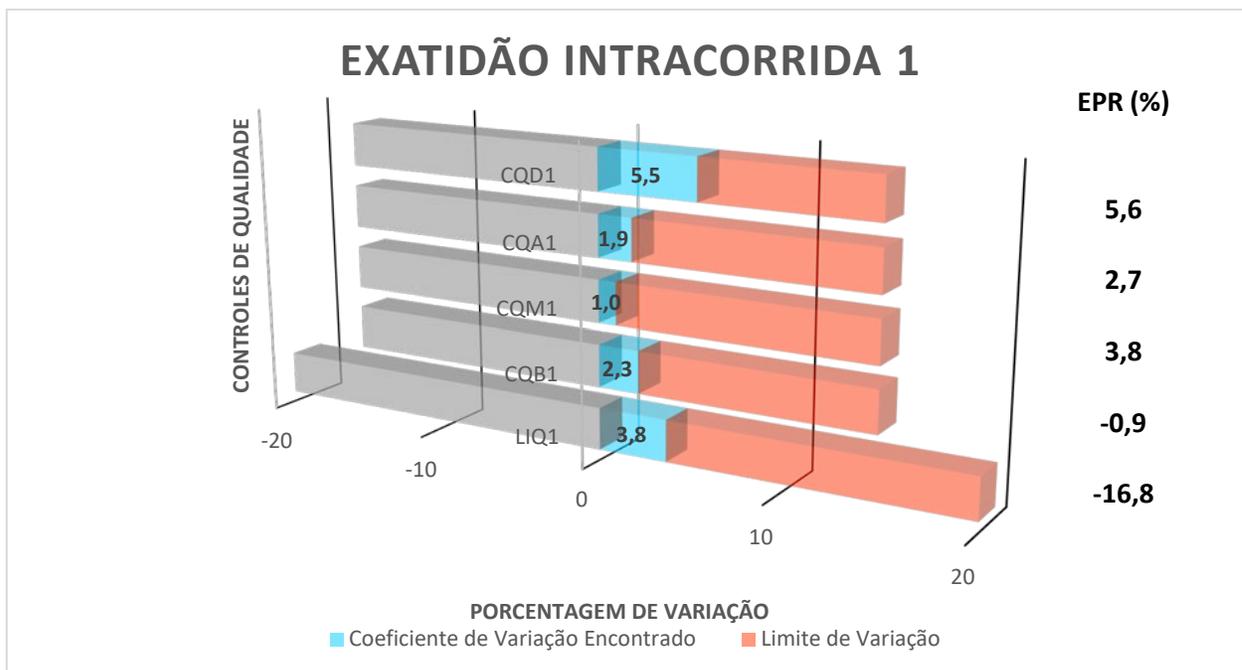
Replicatas	CQD (lote 1)	CQD (lote 2)	CQD (lote 4)
<b>Média</b>	269,376	268,729	266,296
<b>DP</b>	14,776	2,141	2,030
<b>CV (%)</b>	5,485	0,797	0,762
<b>EPR(%)</b>	5,638	5,384	4,430

Concentração Nominal Diluída: CQD = 255,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

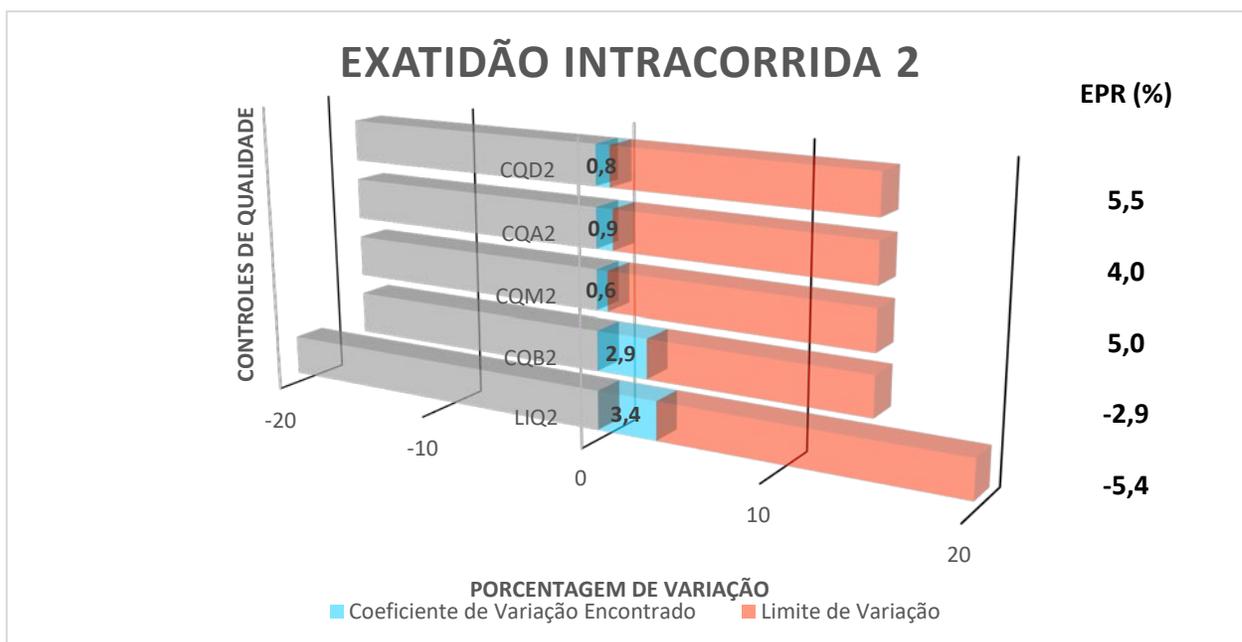
**Tabela 16:** Análise intracorrida do controle de qualidade LIQ de rivaroxabana.

Replicatas	LIQ (lote 1)	LIQ (lote 2)	LIQ (lote 4)
<b>Média</b>	0,832	1,054	1,172
<b>DP</b>	0,032	0,036	0,119
<b>CV (%)</b>	3,818	3,416	10,193
<b>EPR (%)</b>	-16,800	5,400	17,167

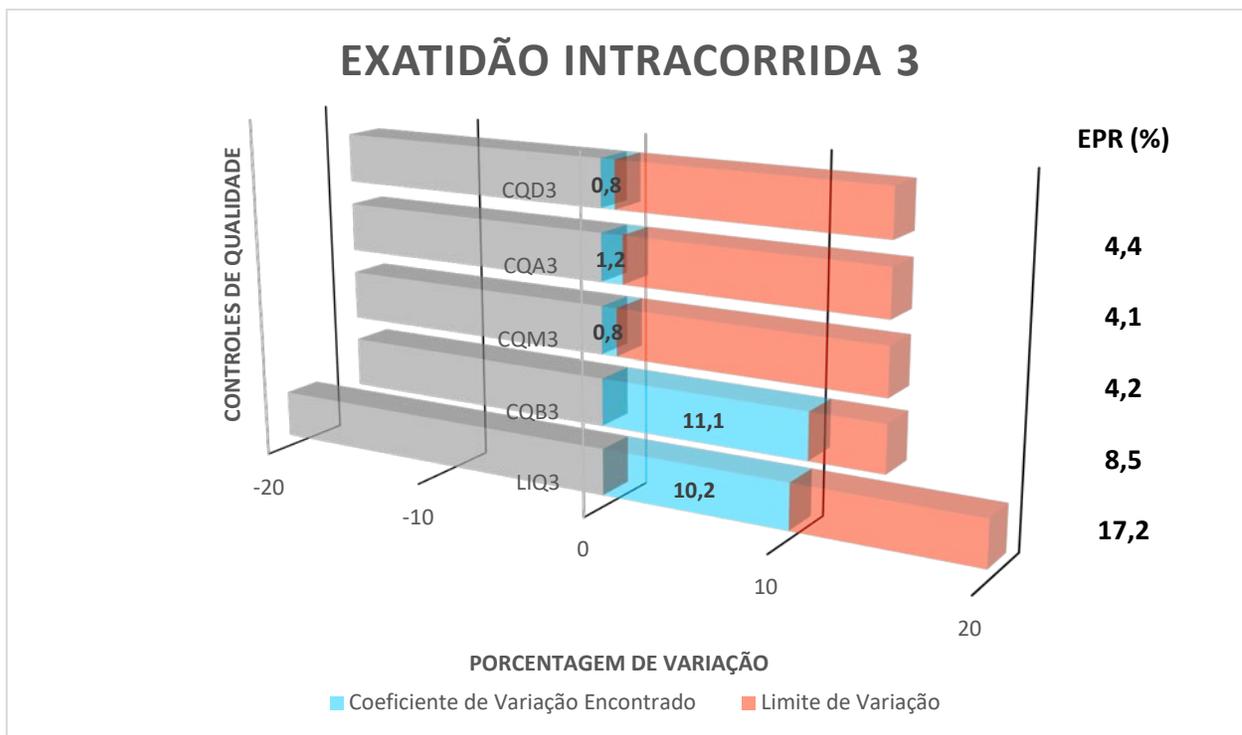
Concentração Nominal: LIQ = 1,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.



**GRÁFICO 2: Representação gráfica da Exatidão Intracorrída 1.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.



**GRÁFICO 3: Representação gráfica da Exatidão Intracorrída 2.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.



**GRÁFICO 4: Representação gráfica da Exatidão Intracorrida 3.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.

#### 4.2.5.2 Validação intercorridas

Nas Tabelas 17, 18 e 19 e no Gráfico 5 estão apresentados os resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão intercorridas utilizando-se todos os valores obtidos de concentração dos controles de qualidade (LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD).

Os seguintes critérios foram seguidos para considerar a precisão e exatidão intercorridas aprovadas:

- a) Precisão: para os controles CQB, CQM, CQA e CQD o coeficiente de variação (CV) não deveria exceder  $\pm 15\%$  e para o LIQ não deveria exceder  $\pm 20\%$ .
- b) Exatidão: o valor da exatidão (expresso pelo Erro Padrão Relativo – EPR) para as amostras CQB, CQM, CQA e CQD dentro do desvio de  $\pm 15\%$  do valor nominal e para o LIQ, admitiu-se valores dentro do desvio de  $\pm 20\%$ .

Todos os resultados se mantiveram dentro dos desvios permitidos e portanto, considerados adequados conforme estabelecido pela resolução RDC 27/2012 da ANVISA, demonstrando assim, a repetibilidade e reprodutibilidade inter corrida da metodologia.

**Tabela 17:** Análise intercorridas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA de rivaroxabana.

	<b>CQB</b>	<b>CQM</b>	<b>CQA</b>
<b>Média</b>	3,047	312,909	497,179
<b>DP</b>	0,255	2,845	7,194
<b>CV (%)</b>	8,379	0,909	1,447
<b>EPR (%)</b>	1,559	4,303	3,579

Concentração Nominal: CQB = 3,0 ng/mL, CQM = 300,0 ng/mL e CQA = 480,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

**Tabela 18:** Análise intercorridas do controle de qualidade CQD (diluído com plasma branco, usando uma diluição de 1:3) de rivaroxabana.

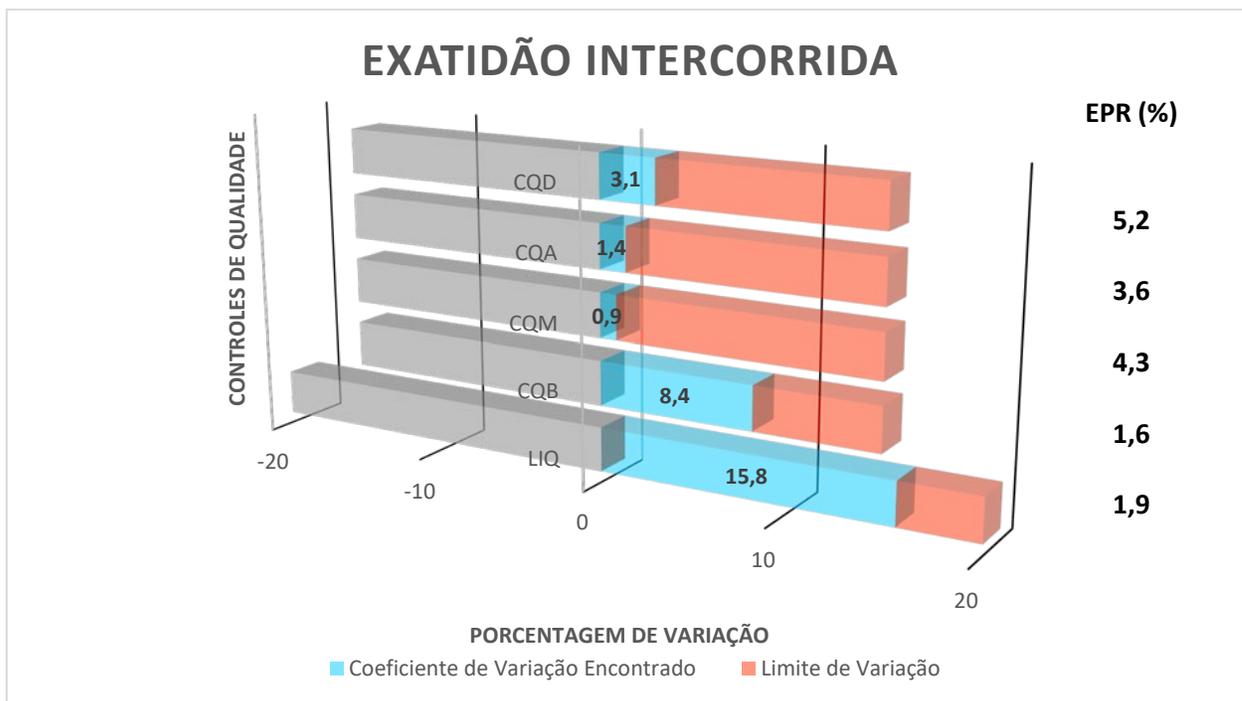
	<b>CQD</b>
<b>Média</b>	268,134
<b>DP</b>	8,285
<b>CV (%)</b>	3,090
<b>EPR (%)</b>	5,150

Concentração Nominal Diluída: CQD = 255,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

**Tabela 19:** Análise intercorridas do controle de qualidade LIQ de rivaroxabana.

	<b>LIQ</b>
<b>Média</b>	1,019
<b>DP</b>	0,161
<b>CV (%)</b>	15,782
<b>EPR (%)</b>	1,922

Concentração Nominal: LIQ = 1,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.



**GRÁFICO 5: Representação gráfica da Exatidão Intercorrida.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.

#### 4.2.5.3 Validação da reinjeção

Foram consideradas como amostras reinjetadas, aquelas quantificadas mais de uma vez. A validação da reinjeção tem como objetivo avaliar a conformidade deste procedimento, quando necessário pois durante a quantificação das amostras podem ocorrer situações quando se faz necessário realizar reinjeção das amostras como, por exemplo, quando há algum problema temporário no sistema cromatográfico. A validação da reinjeção pode ser demonstrada através dos resultados obtidos de exatidão e precisão.

Os resultados da 1ª injeção e a reinjeção estão apresentados na Tabela 20.

**Tabela 20:** Validação da reinjeção de Rivaroxabana.

Réplicas	1ª Injeção*			Reinjeção		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
<b>Média</b>	2,914	314,857	499,077	3,003	314,483	505,095
<b>DP</b>	0,084	1,967	4,725	0,098	4,691	2,535
<b>CV(%)</b>	2,867	0,625	0,947	3,270	1,492	0,502
<b>EPR(%)</b>	-2,867	4,952	3,974	0,083	4,828	5,228

Concentração Nominal: CQB = 3,0 ng/mL, CQM = 300,0 ng/mL e CQA = 480,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

\*Referente a Exatidão 02.

Na Tabela 21 são apresentadas as variações das médias para cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) da reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção.

**Tabela 21:** Variação das médias dos controles de qualidade para rivaroxabana na reinjeção em relação às médias obtidas para as amostras da primeira injeção.

Reinjeção			
Variação (%)	CQB	CQM	CQA
		3,037	-0,119

Dessa forma, é possível observar que os resultados se mantiveram dentro dos desvios permitidos, portanto, assegurando a repetibilidade e reprodutibilidade em casos de reinjeção das amostras em estudo.

#### 4.2.6 Validação da análise de fármacos de uso concomitante

##### 4.2.6.1 Seletividade na presença de fármacos de uso concomitante

A análise de seletividade na presença de fármacos de uso concomitante tem como objetivo avaliar a interferência dos fármacos que podem ser usados durante a etapa clínica do estudo de Rivaroxabana. Assim, para confirmar a seletividade do método, foram analisadas amostras branco (isentas do analito) de plasma humano obtidas de 6 indivíduos sendo 4 amostras normais, 1 lipêmica e 1 hemolisada contaminados com os fármacos de uso concomitante descritos da Tabela 3.

Na Tabela 22 estão apresentados os resultados das análises em áreas da seletividade na presença de fármacos de uso concomitante para rivaroxabana.

**Tabela 22:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Seletividade na presença de fármacos de uso concomitante.

Indivíduo	Descrição	Lote	Área do fármaco	Área do padrão interno	Resultado
01	Indivíduo 1: EDTA	PLS 455/2017	-	-	Sem interferência significativa
02	Indivíduo 2: EDTA	PLS 456/2017	-	-	Sem interferência significativa
03	Indivíduo 3: EDTA	PLS 457/2017	-	-	Sem interferência significativa
04	Indivíduo 4: EDTA	PLS 458/2017	-	-	Sem interferência significativa
05	Indivíduo 5: EDTA/Lipêmico	PLS 34/2017	-	-	Sem interferência significativa
06	Indivíduo 6: EDTA/Hemolisado	PLS 381/2017	-	-	Sem interferência significativa
07	LIQ 1,0 ng/mL	PLS 455/2017	778	157977	-

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com amostra processada do LIQ e conforme pode ser observado, não houve interferência significativa nos tempos de retenção tanto do analito como do PI na presença de fármacos de uso concomitante.

#### 4.2.6.2 Efeito de Matriz na presença de fármacos de uso concomitante

O uso de fármacos concomitantes durante a etapa clínica deve ser avaliado para investigar a interferência dos mesmos na metodologia analítica proposta. Com este objetivo avaliou-se a interferência dos fármacos apresentados na Tabela 3.

Para avaliar se existe efeito de matriz, foram analisadas amostras de 8 fontes distintas, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas, adicionando-se posteriormente soluções de analito e PI nas mesmas concentrações de CQB e CQA contaminados com os fármacos de uso concomitante. As amostras hemolisadas dos lotes utilizados nesse ensaio, devem apresentar o grau de hemólise mais alto (grau 4) para que desta forma, os demais níveis inferiores de hemólise sejam compreendidos.

Os resultados foram avaliados a partir do cálculo do fator de matriz normalizado (FMN) e estão apresentados na Tabela 23.

**Tabela 23:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Efeito de Matriz na presença de fármacos de uso concomitante.

Parâmetros Avaliados	FMN*	
	CQB	CQA
Média	1,026	1,005
DP	0,024	0,010
CV (%)	2,377	0,951
Média FMN de todos Controles (n=16)	1,016	
DP (n=16)	0,021	
CV (%)	2,047	

DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e FMN= Fator de Matriz Normalizado.

\*Este parâmetro (FMN) foi obtido utilizando Resposta em Matriz Individual / Média da Resposta em Solução.

Conforme pode ser observado, os resultados se mantiveram dentro do desvio (CV) esperado de 15% para o FMN nas concentrações de CQB e CQA, portanto não foi verificado efeito de matriz significativo para as amostras nestas condições.

#### 4.2.6.3 Exatidão e Precisão na presença de fármacos de uso concomitante

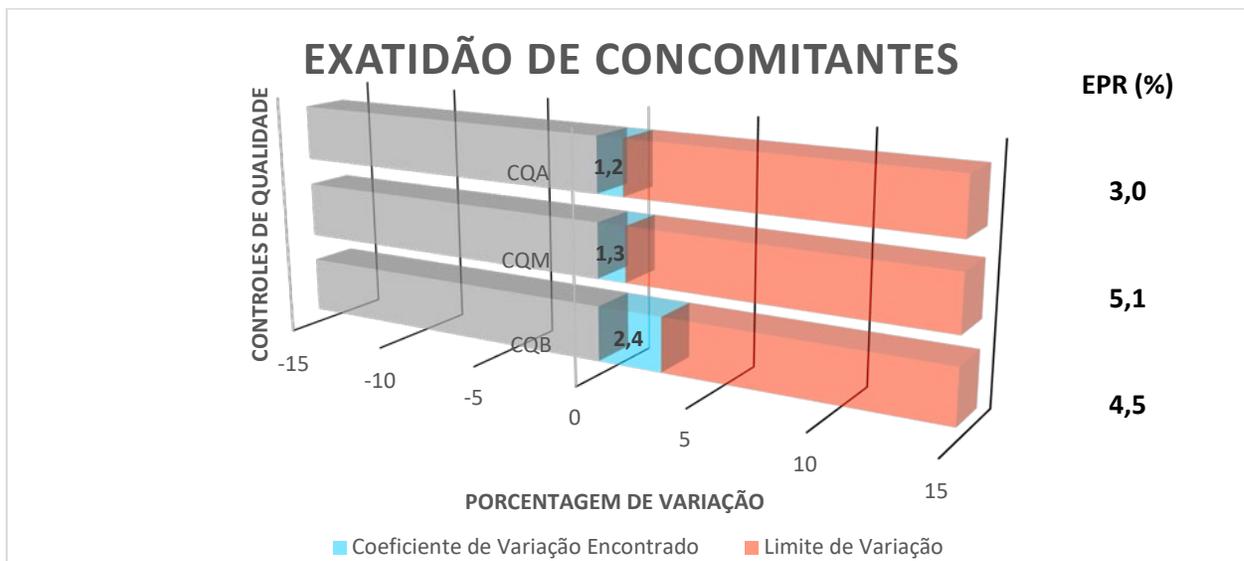
Para avaliar a Exatidão e Precisão do método na presença de fármacos de uso concomitante, 6 réplicas distintas (CQB, CQM, CQA), foram analisadas após a adição dos fármacos apresentados na Tabela 3 na faixa de concentração máxima esperada para cada um destes fármacos avaliados.

Na Tabela 24 estão apresentados os resultados da avaliação da precisão e exatidão expressa pelo coeficiente de variação (CV) e pelo erro padrão relativo (EPR), respectivamente e de forma sintetizada no Gráfico 6.

**Tabela 24:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Exatidão e Precisão na presença de fármacos de uso concomitante para rivaroxabana.

Replicatas	CQB	CQM	CQA
Média	3,136	315,228	494,128
DP	0,091	4,022	5,876
CV (%)	2,899	1,276	1,189
EPR (%)	4,533	5,076	2,943

Concentração Nominal: CQB = 3,0 ng/mL, CQM = 300,0 ng/mL e CQA = 480,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.



**GRÁFICO 6: Representação gráfica da Exatidão Intercorrida.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.

Todos os resultados se mantiveram dentro dos desvios permitidos e portanto, considerados adequados conforme estabelecido pela resolução RDC 27/2012 da ANVISA, demonstrando assim, a repetibilidade e reprodutibilidade intercorrida da metodologia na presença de fármacos de uso concomitante.

#### 4.2.7 Estudo de Estabilidade do Fármaco

Esta etapa da validação é de extrema importância para assegurar que não haverá degradação das amostras em estudo e das soluções mediante a exposição em condições de stress tais como, na bancada de trabalho, nos ciclos de congelamento e degelo, no auto-injetor do equipamento e durante o armazenamento em médio (dias) e longo (meses) prazo.

##### 4.2.7.1 Estabilidade Pós Processamento (Auto-Injetor)

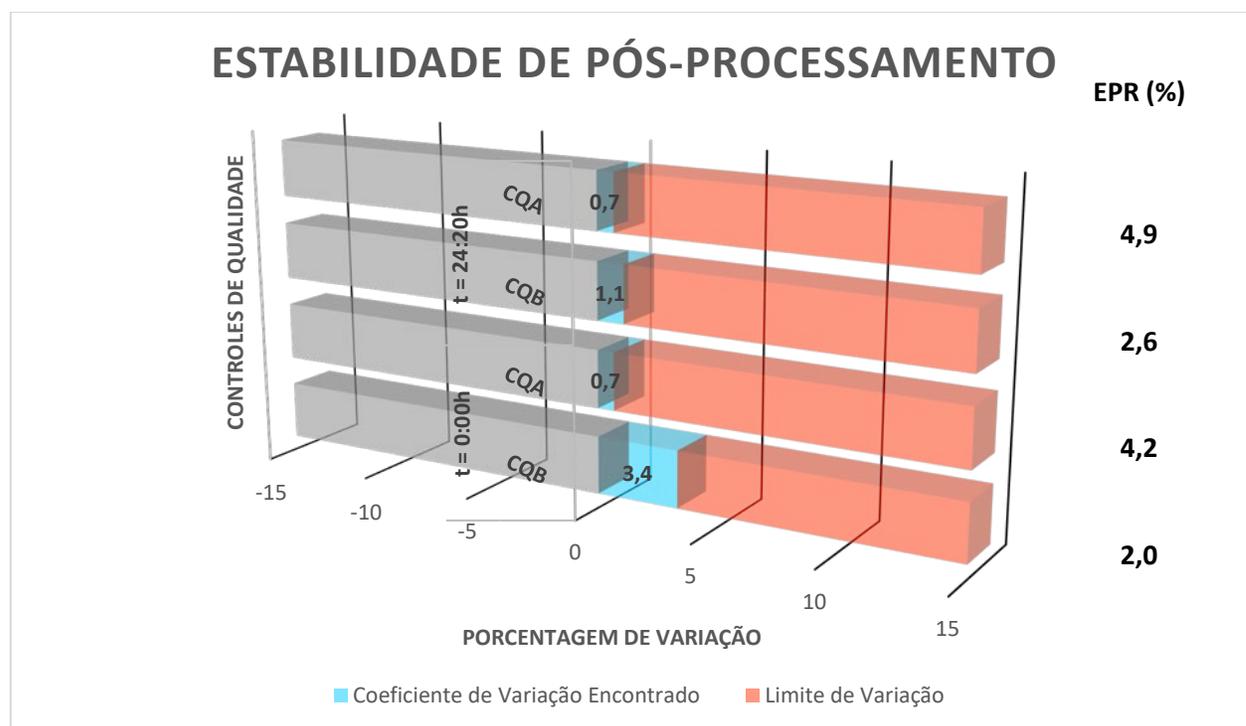
Para avaliar a estabilidade da rivaroxabana no tempo e condições de análise, as amostras processadas foram mantidas dentro do auto injetor, numa temperatura de aproximadamente 22 °C e cada amostra de controle de qualidade foi analisada em 6 réplicas nos tempos 00:00 e 24:20 horas. Os resultados apresentados na Tabela 25 e plotados no Gráfico 7, mostram que as

variações estão dentro da faixa permitida  $\pm 15\%$  até o tempo de 24:20 horas em relação ao valor nominal.

**Tabela 25:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade Pós Processamento (auto-injetor) de Rivaroxabana.

Réplicas	t (0:00 h)		t (24:20 h)	
	CQB	CQA	CQB	CQA
Média	3,061	500,274	3,078	503,502
DP	0,106	3,520	0,035	3,659
CV (%)	3,458	0,704	1,140	0,727
EPR (%)	2,039	4,224	2,583	4,896

Concentração Nominal: CQB = 3,0 ng/mL e CQA = 480,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.



**GRÁFICO 7: Representação gráfica da Estabilidade Pós Processamento.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB e CQA para amostras de t (0:00 h) com relação ao valor nominal e as médias dos CQB e CQA para amostras de t (24:20 h) com

relação ao valor nominal, conclui-se que a rivaroxabana analisada no plasma humano foi estável por 24:20 horas, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

#### 4.2.7.2 Amostras Recém-Preparadas em Plasma

Este ensaio teve por finalidade demonstrar a adequabilidade das amostras recém dopadas para que estas possam passar pelos processos de exposição descritos nos itens subsequentes.

Na Tabela 26, estão apresentados os resultados obtidos para os controles de qualidades (CQB e CQA) para as amostras recém-preparadas utilizadas nos testes de estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo, estabilidade de curta duração e estabilidade de longa duração.

**Tabela 26:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de amostras recém-preparadas utilizadas no estudo de estabilidade de rivaroxabana.

Amostras Recém-Preparadas		
Réplicas	CQB	CQA
Média	3,261	499,704
DP	0,070	7,669
CV (%)	2,159	1,535
EPR (%)	8,689	4,105

Concentração Nominal: CQB = 3,0 ng/mL e CQA = 480,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.

Comparando-se os valores obtidos para os controles de qualidade CQB e CQA das amostras recém-preparadas e analisadas, com relação ao valor nominal, concluiu-se que as amostras podem ser utilizadas nos estudos de estabilidade, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

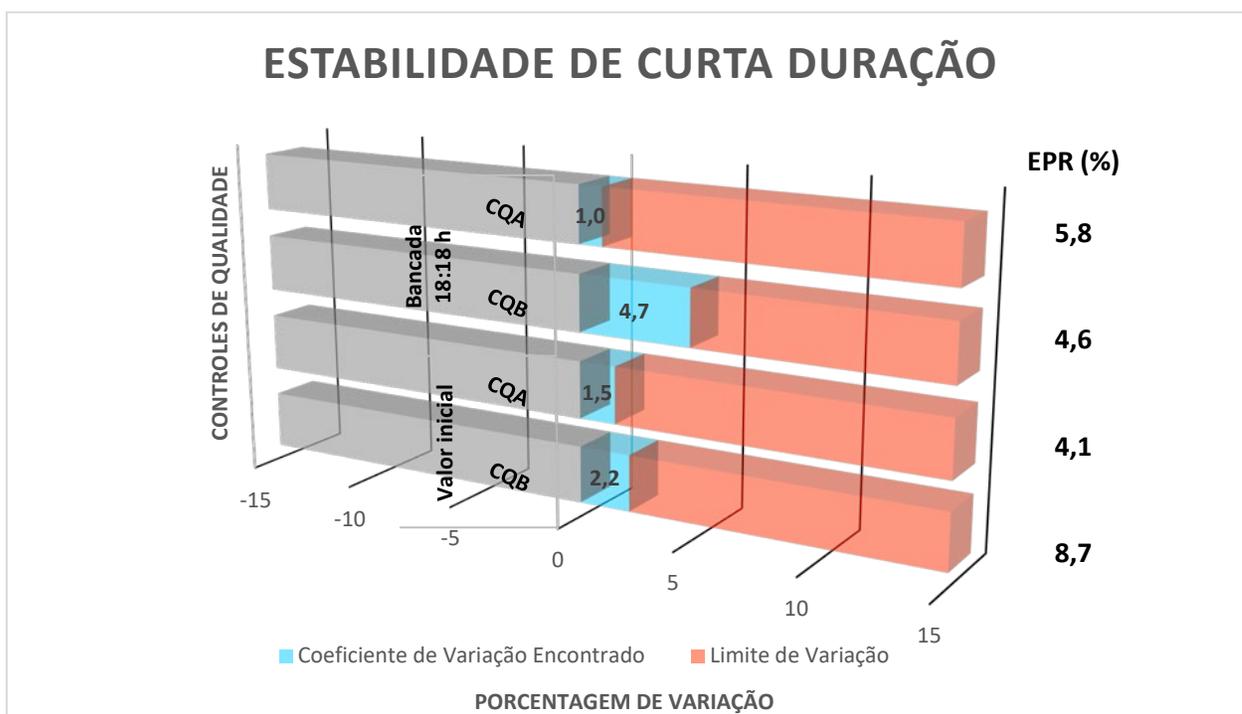
##### 4.2.7.2.1 Estabilidade de Curta Duração

Baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas em bancada na temperatura ambiente, foram analisadas 6 amostras de 2 diferentes concentrações (CQB e CQA). Na Tabela 27 e no Gráfico 8, apresenta os resultados obtidos para cada controle de qualidade (CQB e CQA) para as amostras que se mantiveram estáveis até 18:18 horas à temperatura ambiente em relação ao valor nominal.

**Tabela 27:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade de curta duração de Rivaroxabana.

Amostras analisadas após 18:18 horas à temperatura ambiente		
Réplicas	CQB	CQA
Média	3,137	507,627
DP	0,148	5,083
CV (%)	4,724	1,001
EPR (%)	4,567	5,756

Concentração Nominal: CQB = 3,0 ng/mL e CQA = 480,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.



**GRÁFICO 8: Representação gráfica da Estabilidade de Curta Duração.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.

Comparando-se os valores médios obtidos para os controles de qualidade CQB e CQA mantidos durante 18:18 horas à temperatura ambiente com relação ao valor nominal, conclui-se que a rivaroxabana analisada no plasma humano foi estável no tempo em que permaneceu na bancada, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

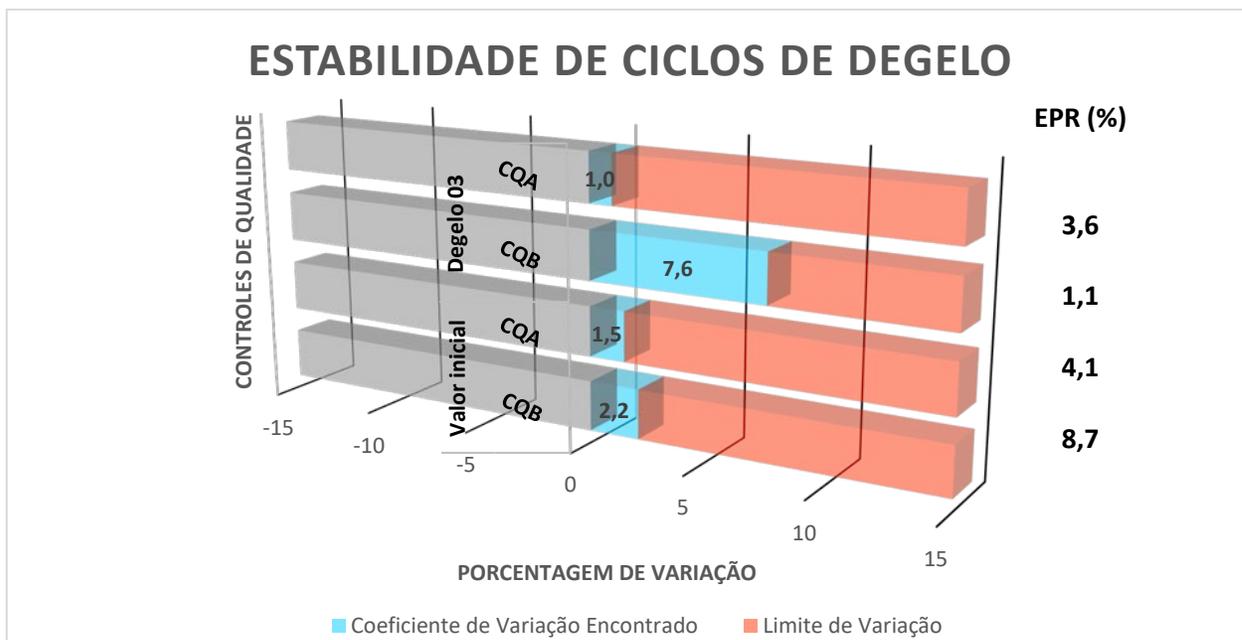
#### 4.2.7.2.2 Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

Para avaliar a estabilidade de rivaroxabana durante três ciclos de congelamento e degelo, foram analisadas 6 amostras de 2 diferentes concentrações (CQB e CQA), nas seguintes condições; amostras CQB e CQA (degelo 1): as amostras foram congeladas à -70 °C e mantidas nesta temperatura por no mínimo 12 horas. Após este tempo, as amostras foram submetidas ao degelo natural, à temperatura ambiente. Depois de completamente degeladas, as amostras foram novamente congeladas à -70 °C, mantidas nesta temperatura (por no mínimo 12 horas) e então submetidas ao degelo natural, (degelo 2). Para completar os degelos as amostras foram novamente congeladas à -70 °C, mantidas nesta temperatura (por no mínimo 12 horas) e então submetidas ao degelo natural (degelo 3) e após este tempo, as amostras foram extraídas e quantificadas. A Tabela 28 e o Gráfico 9, apresentam os resultados obtidos para cada controle de qualidade (CQB e CQA) após o terceiro ciclo de congelamento e degelo.

**Tabela 28:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade de Rivaroxabana submetida aos três ciclos de congelamento e degelo.

Degelo 03		
Réplicas	CQB	CQA
Média	3,033	497,362
DP	0,231	5,034
CV (%)	7,604	1,012
EPR (%)	1,100	3,617

Concentração Nominal: CQB = 3,0 ng/mL e CQA = 480,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.



**GRÁFICO 9: Representação gráfica da Estabilidade de Ciclos de Degelo.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB e CQA do terceiro ciclo de congelamento e degelo com relação ao valor nominal, conclui-se que a rivaroxabana analisada no plasma humano foi estável nos três ciclos de congelamento e degelo quando armazenada à  $-70^{\circ}\text{C}$ , uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

#### 4.2.7.2.3 Estabilidade de longa duração

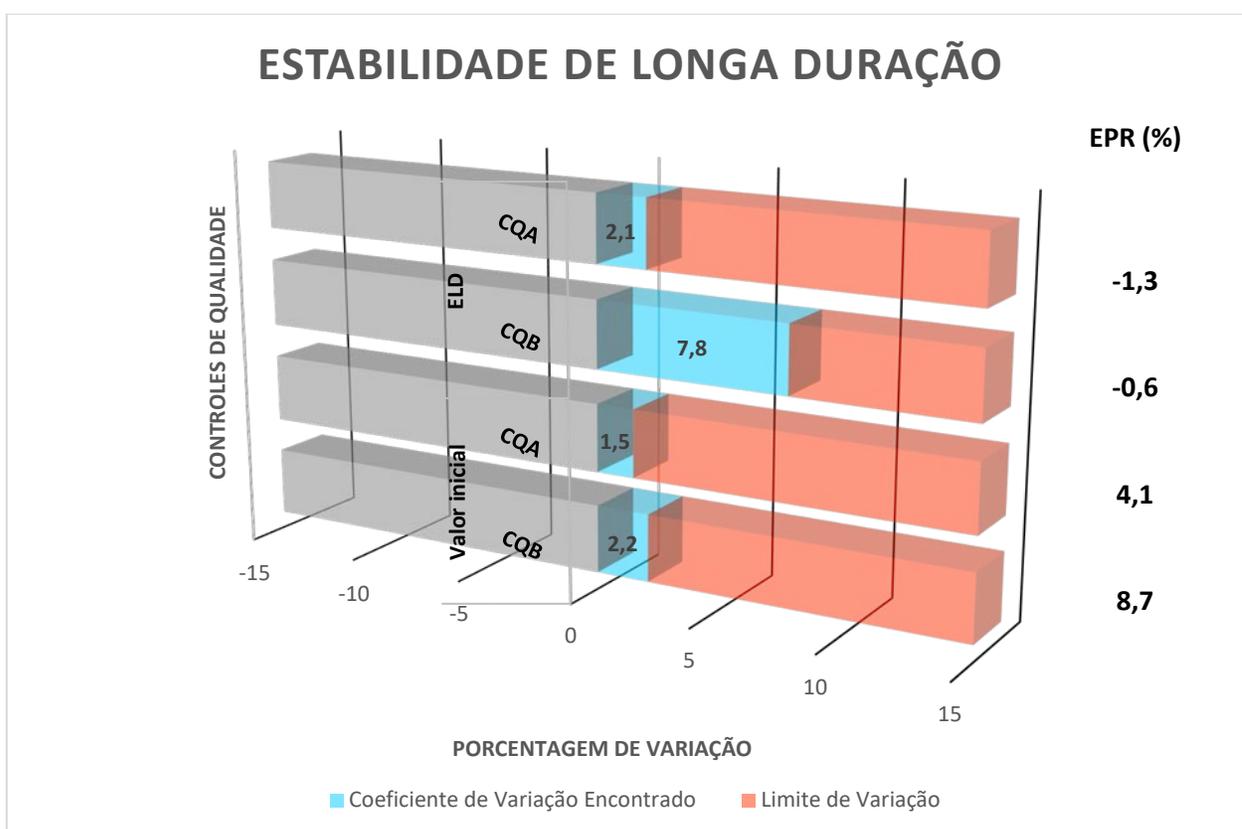
Para avaliar a estabilidade da rivaroxabana em plasma, em condições de longa duração, o tempo de armazenamento deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra (18/03/2018) e a análise da última amostra dos voluntários (18/04/2018).

Foram preparadas seis amostras de duas diferentes concentrações (CQB e CQA) no tempo inicial (21/11/2017), sendo estas amostras estocadas nas mesmas condições que as amostras de plasma dos voluntários analisados ( $-70^{\circ}\text{C}$ ). As amostras armazenadas foram analisadas após 147 dias (18/04/2018) em plasma humano conforme os resultados apresentados na Tabela 29 e no Gráfico 10.

**Tabela 29:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade de Longa Duração de Rivaroxabana.

Estabilidade de longa duração (18/04/2018)		
Réplicas	CQB	CQA
Média	2,983	473,531
DP	0,233	9,831
CV (%)	7,794	2,076
EPR (%)	-0,561	-1,348

Concentração Nominal: CQB = 3,0 ng/mL e CQA = 480,0 ng/mL, DP= Desvio Padrão, CV= Coeficiente de Variação e EPR= Erro Padrão Relativo.



**GRÁFICO 10:** Representação gráfica da Estabilidade de Longa Duração. Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.

Comparando-se as variações entre as médias dos CQB e CQA para as amostras armazenadas durante 147 dias com relação ao valor nominal, conclui-se que a Rivaroxabana analisada no plasma humano (armazenadas nas mesmas condições dos controles analisados),

permaneceu estável durante o período em que ficou armazenada (31 dias), uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 15%.

#### 4.2.7.3 Estabilidade de soluções padrão

Nas Tabelas 30 e 31 e nos Gráficos 11 e 12, estão apresentados os resultados das análises realizadas com solução primária da maior concentração de rivaroxabana (600 ng/mL) e rivaroxabana-D<sub>4</sub> (1000 ng/mL) e solução de trabalho da menor concentração de rivaroxabana (300 ng/mL) e rivaroxabana- D<sub>4</sub> (250 ng/mL). Os resultados estão apresentados comparando as áreas individuais do analito (rivaroxabana) e as áreas individuais do padrão interno (rivaroxabana-D<sub>4</sub>).

**Tabela 30:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade das soluções padrão de rivaroxabana.

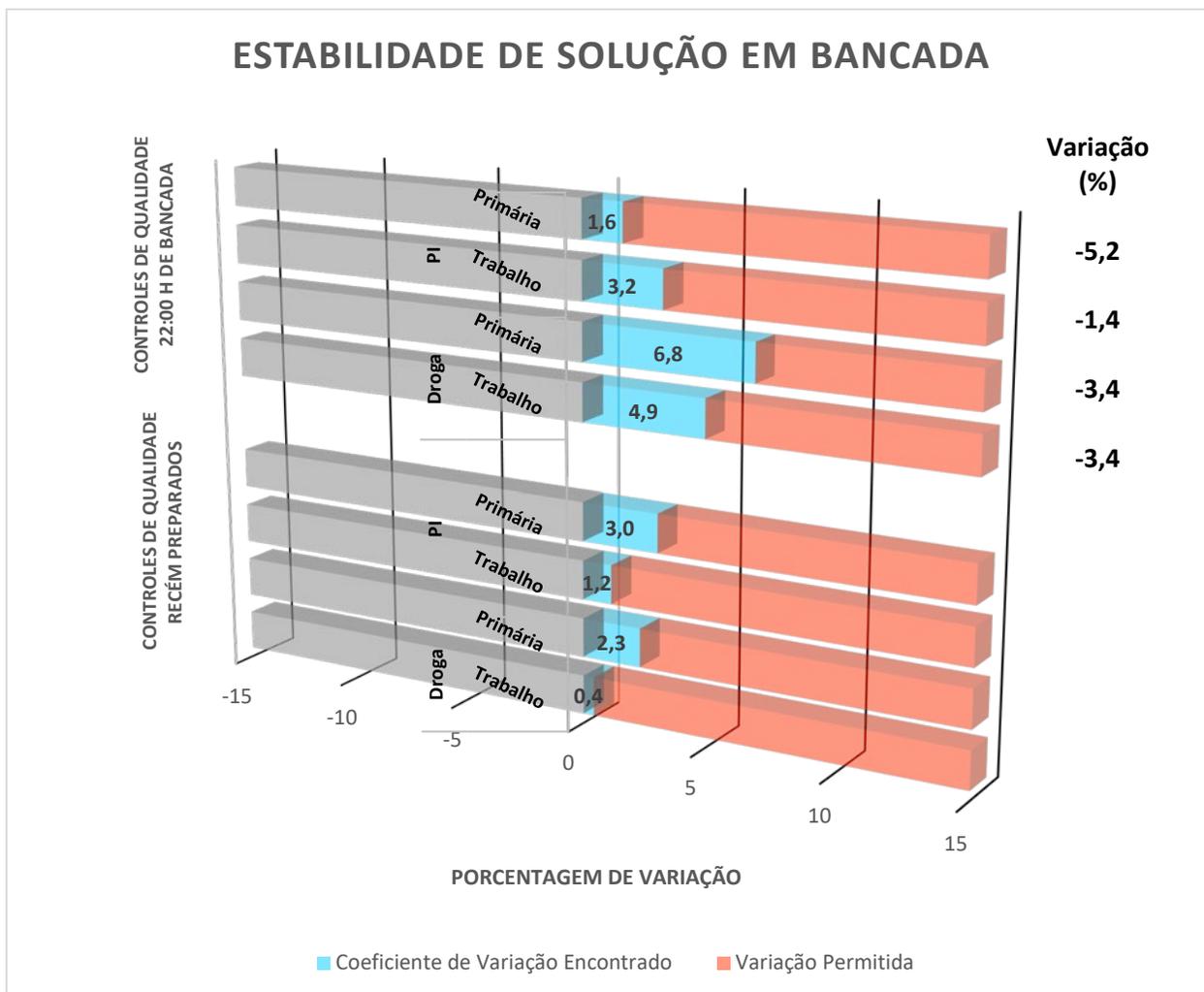
Réplicas	Recém Preparada		Amostras analisadas após 22:00 horas de preparo à temperatura ambiente		Amostras analisadas após 18 dias de armazenamento em refrigeração	
	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária
Média	426161	833473	411726	804744	434799	862268
DP	1815,580	19375,571	20088,017	54501,008	4404,933	3897,403
CV (%)	0,426	2,325	4,879	6,772	1,013	0,452
Variação (%)			-3,387	-3,447	2,027	3,455

DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação.

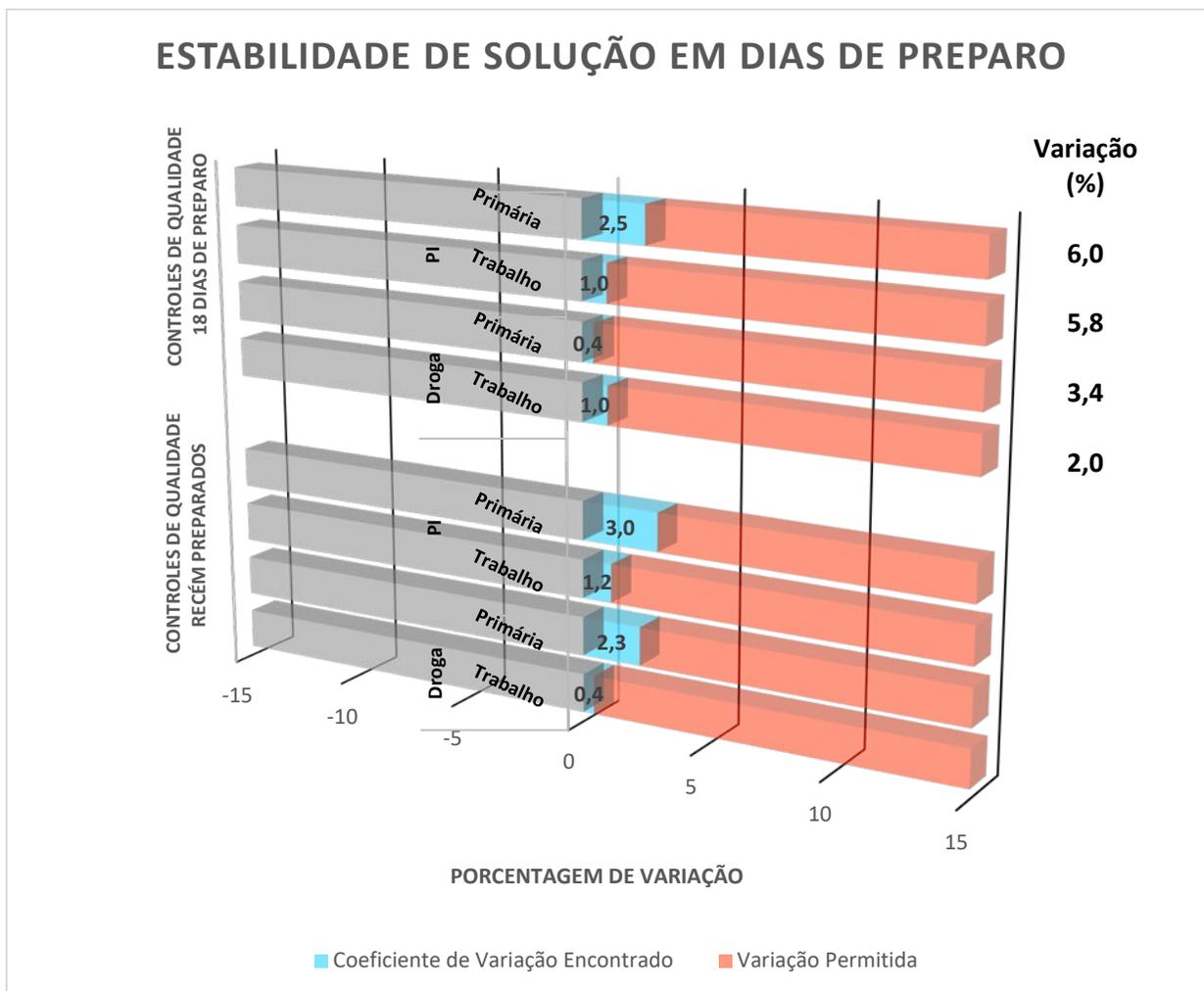
**Tabela 31:** Resultados obtidos através das análises no ensaio de Estabilidade das soluções padrão de rivaroxabana-D<sub>4</sub>.

Réplicas	Recém Preparada		Amostras analisadas após 22:10 horas de preparo à temperatura ambiente		Amostras analisadas após 18 dias de armazenamento em refrigeração	
	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária	Trabalho	Primária
Média	300060	1108619	295926	1050852	317556	1175180
DP	3451,278	33554,787	9502,616	17072,294	3132,485	29491,351
CV (%)	1,150	3,027	3,211	1,625	0,986	2,510
Variação (%)			-1,378	-5,211	5,831	6,004

DP = Desvio Padrão e CV = Coeficiente de Variação.



**GRÁFICO 11: Representação gráfica da Estabilidade de Solução em Bancada.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.



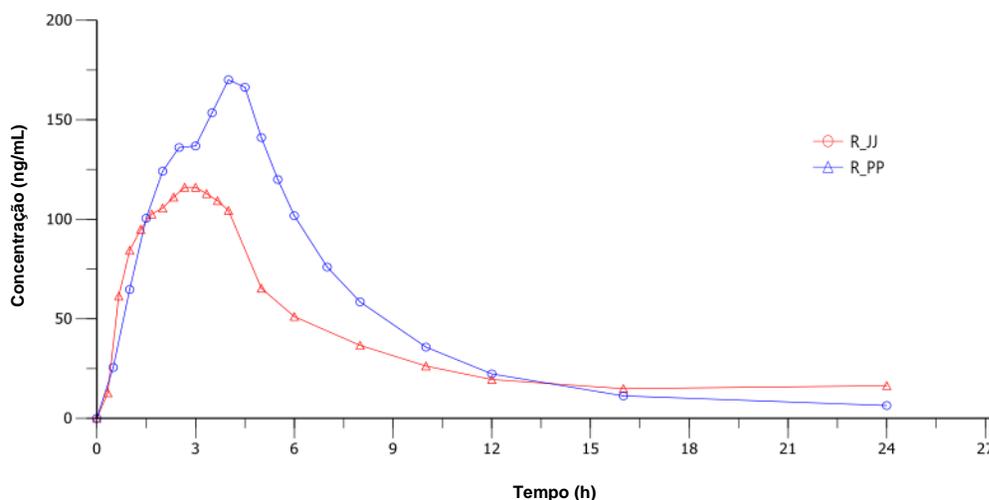
**GRÁFICO 12: Representação gráfica da Estabilidade de Solução em Dias de Preparo.** Foi observado que todos os desvios (CV e EPR) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para o método.

Comparando-se as variações das médias das respostas do analito e do padrão interno para as soluções analisadas após 22:00 horas de preparo para rivaroxabana e 22:10 horas para rivaroxabana-d4 mantidas à temperatura ambiente e amostras analisadas após 18 dias mantidas sob refrigeração, em relação às médias obtidas para as soluções recém preparadas, pode-se concluir que as soluções de rivaroxabana e rivaroxabana-d4 foram estáveis, uma vez que os desvios encontrados foram inferiores a 10%.

### 4.3 Aplicação da Metodologia Analítica em Estudos de Bioequivalência

O método bioanalítico previamente desenvolvido e validado foi aplicado em dois estudos para quantificação de Rivaroxabana em plasma humano.

No intuito de demonstrar a aplicabilidade da metodologia em pauta neste trabalho, os resultados obtidos para o perfil farmacocinético do medicamento referência na condição jejum (JPJ 32/17) e na condição pós-prandial (JPJ 33/17) está apresentado no Gráfico 13.



**GRÁFICO 13: Representação gráfica do perfil farmacocinético da Rivaroxabana.** Administração do medicamento referência, nas condições jejum *versus* pós-prandial.

Os dados utilizados para construção do Gráfico 13 são referentes aos valores médios obtidos de concentração por cada tempo de coleta pré-estabelecido em protocolo. Assim, os valores observados não necessariamente correspondem aos valores médios absolutos para os respectivos parâmetros farmacocinéticos. Ademais, para efeito de comparação com os dados da literatura, o período de tempo das coletas foi limitado à 24 h.

Nas Tabelas 32 e 33, são mostrados os principais resultados estatísticos do estudo para os parâmetros farmacocinéticos  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{0-inf}$  do medicamento referência na condição jejum (JPJ 32/17) e na condição pós-prandial (JPJ 33/17), respectivamente.

**Tabela 32:** Parâmetros farmacocinéticos dos estudos avaliados nas condições de jejum e pós-prandial.

Resultados Estatísticos por Parâmetro Farmacocinético		
Parâmetro	Jejum	Pós Prandial
ASC <sub>0-t</sub> (ng*h/mL)	893,28	1141,41
C <sub>máx</sub> (ng/mL)	146,662	207,169

**Tabela 33:** Fator de comparação nas condições jejum e pós prandial.

Parâmetro	Pós-Prandial / Jejum Taxa Estimada (IC90%)
ASC	1,278
C <sub>máx</sub>	1,412

#### 4.4 Comparação dos Perfis Farmacocinéticos nas Condições Jejum *versus* Pós-Prandial

Para avaliar o efeito da alimentação na biodisponibilidade da rivaroxabana, Auspar et al. realizou um estudo randomizado, aberto, cruzado, com dois períodos foi conduzido em 24 voluntários sadios do sexo masculino, com administração oral de 20 mg de rivaroxabana comprimido com tempos de coleta até 24 horas. A alimentação aumentou a ASC em 39% e a C<sub>máx</sub> em 76% (Tabelas 34 e 35) (AUSPAR, 2012).

**Tabela 34:** Parâmetros farmacocinéticos reportados. Administração de 20 mg de rivaroxabana em Jejum e Pós-Prandial (n = 24).

Parâmetro	Jejum	Pós-Prandial
ASC <sub>0-t</sub> (ng*h/mL)	1457	2031
C <sub>máx</sub> (ng/mL)	159,9	281,4

Adaptado de AUSPAR, 2012 (Estudo nº 011938).

**Tabela 35:** Biodisponibilidade Pós-prandial *versus* Jejum após administração de 20 mg de rivaroxabana reportados.

Biodisponibilidade	rivaroxabana Pós-Prandial / rivaroxabana Jejum Taxa Estimada (IC90%)
ASC	1,386 (1,293 - 1,486)
C <sub>máx</sub>	1,760 (1,549 - 1,999)

Adaptado de AUSPAR, 2012 (Estudo nº 011938).

Stampfuss et al. realizaram um levantamento de 6 estudos de Fase I com administração de rivaroxabana a voluntários sadios do sexo masculino, quando os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados nas doses de 10 mg, 15 mg e 20 mg comprimido, além de uma suspensão oral

contendo 1 mg/mL de rivaroxabana, nas doses de 10 mg e 20 mg. O efeito da alimentação na biodisponibilidade nas doses de 10 mg e 20 mg foram avaliados nesse levantamento. Os parâmetros para a dose de 10 mg foram similares nas duas condições, entretanto, para a dose de 20 mg com administração com alimentos indica um aumento na ASC e  $C_{m\acute{a}x}$  (STAMPFUSS et al., 2013).

Os autores concluíram que independentemente da formulação (comprimido ou suspensão oral) e da administração (jejum ou pós-prandial) as doses até 10 mg são proporcionais e têm alta biodisponibilidade oral. Para as doses de 15 mg e 20 mg, biodisponibilidade acima de 80% foi atingida após administração junto com alimento.

Referente aos estudos internos (conduzidos na UNIFAG) na condição jejum e na condição pós-prandial, foram realizados com a administração de uma dose de 20 mg. Desta forma, com base nos dados da literatura, se esperava um aumento significativo nos parâmetros de ASC e  $C_{m\acute{a}x}$  para o estudo na condição pós-prandial. Na Tabela 36, estão descritas as principais características destes estudos em que a população dos voluntários foi selecionada com base nos mesmos critérios de inclusão.

**Tabela 36:** Relação das principais características dos estudos conduzidos na UNIFAG.

Condição	Tratamento	Tempos de Coleta	Número de Voluntários	Tempo da última coleta (h)
Jejum	2x4	22	48	48
Pós-prandial	2x2	21	36	48

Devido as variáveis observadas e ao disposto na literatura, optou-se pela aplicação de um teste T de duas amostras presumindo variâncias diferentes. Portanto, estão apresentados nas Tabelas 37 e 38 os resultados das diferenças observadas entre as principais medidas farmacocinéticas  $C_{m\acute{a}x}$  e ASC.

**Tabela 37:** Teste-t de duas amostras presumindo variâncias diferentes para  $C_{m\acute{a}x}$ .

Análise Estatística	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL) Pós Prandial	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL) Jejum
Média	207,1685	146,6623125
Variância	3206,54238	3583,996907
Observações	34	48
Hipótese de diferença de média		0
gl		61
Stat t		5,273516283
P(T<=t) uni-caudal		9,3122E-07
t crítico uni-caudal		1,670219484
<b>P(T&lt;=t) bi-caudal</b>		<b>1,86244E-06</b>
t crítico bi-caudal		1,999623585

**Tabela 38:** Teste-t de duas amostras presumindo variâncias diferentes para ASC.

Análise Estatística	ASC (ng/mL) Pós Prandial	ASC (ng/mL) Jejum
Média	1141,409735	893,28
Variância	141454,0796	121226,0831
Observações	34	48
Hipótese de diferença de média		0
gl		54
Stat t		3,369392231
P(T<=t) uni-caudal		0,000698166
t crítico uni-caudal		1,673564906
<b>P(T&lt;=t) bi-caudal</b>		<b>0,001396332</b>
t crítico bi-caudal		2,004879288

Baseado nos resultados dos testes estatísticos entre os parâmetros farmacocinéticos dos estudos na condição jejum e pós-prandial, foi possível observar uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os valores tanto para o  $C_{m\acute{a}x}$  como para o ASC, em concordância com o disposto na literatura para este parâmetro nessas condições. As variações observadas para os valores absolutos dos parâmetros de  $C_{m\acute{a}x}$  e ASC podem estar relacionadas às características da população em estudo, do desenho utilizado ou até mesmo, a dieta aplicada.

Ademais, embora o estudo não tenha sido conduzido com um desenho específico para avaliar o efeito da alimentação, foi possível realizar a comparação dos parâmetros farmacocinéticos ao considerar-se um valor semelhante para o intervalo de tempo da curva conforme o disposto na literatura (24 horas).

## 5. CONCLUSÃO

Concluiu-se que o método analítico foi desenvolvido e validado com sucesso, uma vez que cumpriu os seguintes critérios:

- ✓ **Seletividade:** Não ocorreu interferência no tempo de retenção do fármaco ou esta foi menor que 20% da resposta do padrão LIQ. Não houve interferência no tempo de retenção do padrão interno ou esta foi menor que 5% da resposta na concentração utilizada no estudo.
- ✓ **Sensibilidade:** a menor concentração da curva de calibração foi aceita como LIQ uma vez que apresentou  $CV \leq 20\%$ .
- ✓ **Efeito residual (*Carryover*):** o método não apresentou a existência de efeito residual.
- ✓ **Efeito de matriz:** o método não apresentou a existência de efeito de matriz.
- ✓ **Precisão:** os coeficientes de variação (CV) calculados para os controles de qualidade CQB, CQM, CQA e CQD foram menores ou iguais a  $\pm 15\%$  e menores ou iguais a  $\pm 20\%$  para o controle de qualidade LIQ.
- ✓ **Exatidão:** a exatidão (expressa pelo Erro Padrão Relativo - EPR) calculado para os controles de qualidade CQB, CQM, CQA e CQD e para o controle de qualidade LIQ apresentaram valores compreendidos dentro de  $\pm 15\%$  e  $\pm 20\%$ , respectivamente, em relação ao valor nominal.
- ✓ **Estabilidades em solução e na matriz biológica:** Os desvios de todos os ensaios conduzidos se mantiveram menores ou iguais a  $\pm 15\%$  de variação demonstrando a preservação do ativo exposto nas condições de armazenamento e manuseio.

A metodologia bioanalítica desenvolvida e validada foi utilizada com sucesso em dois estudos de bioequivalência demonstrando a sua aplicabilidade.

Por meio da comparação dos principais parâmetros farmacocinéticos ( $C_{m\acute{a}x}$  e ASC) do medicamento referência dos estudos de bioequivalência conduzidos, foi possível corroborar com os dados da literatura, as diferenças significativas para tais parâmetros nas condições jejum e alimentado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNELLI, G.; BECATTINI, C. **Treatment of venous thromboembolism with new anticoagulant agents.** J Am Coll Cardiol. 67(16):1941-55, 2016.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. An Introduction,** Wiley: Huddersfield, 2003.

AUSPAR, **Australian Public Assessment Report for Rivaroxaban.** 2012. Disponível em: <http://www.tga.gov.au/auspar/auspar-rivaroxaban-1>. Acessado em: 01 de Setembro de 2019.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. **Solid-phase extraction (Spe) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water.** Química Nova, v.24, n. 2, p.172-175, 2001.

BARROS-SENA, M. A.; GENESTRA, M. **Profílatia da trombose venosa profunda em pós-operatório de cirurgias ortopédicas em um hospital de traumatologia-ortopedia.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; v. 30, p. 29-35, 2008.

BERMUDEZ, J. A. Z. **Indústria farmacêutica, estado e sociedade: crítica à política de medicamentos.** São Paulo: Editora HUCITEC, 1995.

BERMUDEZ, J. **Medicamentos genéricos: uma alternativa para o mercado brasileiro.** Cadernos de Saúde Pública, v. 10, n. 3, p. 368-379, 1994.

BOLTON, S.; BON, C. **Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications.** fourth ed., CRC Press, New York, Basel, 2009.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1999.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria MS/GM nº 3.916, de 30/10/1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1998.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 16 Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 196 Diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1996.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 391 de 09/08/1999. Aprova o regulamento técnico para registro de medicamentos genéricos no Brasil.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1999.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 893 de 29/05/2003. Guia para realizações de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de medicamentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 310 de 1º/09/2004. Guia para elaboração do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regulamenta direitos e obrigações à propriedade industrial.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 16, de 2 de março de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n. 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pósregistro de medicamentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº. 35, de 15 de Junho de 2012. Dispõe sobre os critérios de indicação, inclusão e exclusão de medicamentos na Lista de Medicamentos de Referência.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 31, de 11 de Agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº 60, de 10 de Outubro de 2014. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2014.

BRASIL. ANVISA. Legislação. **Resolução nº. 1170, de 19 de Abril de 2006. Guia para Provas de Biodisponibilidade Relativa / Bioequivalência.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2006.

BRASIL. ANVISA. Legislação. **Resolução nº. 894, de 29 de Maio de 2003. Guia para Protocolo e Relatório Técnico de Bioequivalência.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 17, de 2 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de Medicamento**

**Similar e dá outras providências.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência.** 1 ed., v.1., 146 p., Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 17, de 2 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2007.

BRASIL. **Constituição Federal de 1988.** Promulgada em 5 de outubro de 1988. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/constituicao/constituicao.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm)>. Acesso em 17 de Setembro de 2019.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. **Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics.** Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Amsterdam, v. 686, n. 1, p. 3-10, 1996.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, A. B.; KNOLLMANN, C. B. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman,** 12ª edição, 2: 20-38, 2012.

CASSONE, A.; VIEGAS, A.; SGUIZZATTO, G. T.; CABRITA, H. A.; AQUINO, M.; FURLANETO, M. E.; REIFF, L.; LEME, L. E.; AMATUZZI, M. **Trombose venosa profunda em artroplastia total de quadril.** Revista Brasileira de Ortopedia; 2002.

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

CHOW S. C. **Bioavailability and Bioequivalence in Drug Development.** Wiley interdisciplinary reviews. Computational statistics, 2014.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

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

FDA – Food and Drug Administration, **Guidance for Industry - Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs - General Considerations,** 2014.

FDA. **Guidance for Industry - Draft Guidance on Rivaroxaban.** 2011. Disponível em <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/appletter/2011/202439s000ltr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2011/202439s000ltr.pdf)> Acesso em: 13 de Janeiro de 2019.

FDA. **Guidance for Industry - Guidance on Warfarin Sodium.** 2012. Disponível em <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/psg/Warfarin\\_Sodium\\_tab\\_09218\\_RC12-12.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Warfarin_Sodium_tab_09218_RC12-12.pdf)>. Acesso em: 13 de Janeiro de 2019.

GONÇALVES, J. E.; STORPIRTIS, S. **O Sistema de Classificação Biofarmacêutica: Conceitos, Determinação da Solubilidade e Permeabilidade e Aplicações na Área**

**Farmacêutica** – In VIEIRA e CAMPOS, Manual de Bioequivalência – Série Pesquisa Clínica – Ed Dendrix, pg.137- 169, 2011.

GONÇALVES, T. M. **Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para estudo farmacocinético comparativo de duas classes de fármacos (Anti-retroviral e penicilínico) em indivíduos sadios**. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 2005.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica de Guyton e Hall**; Ed: Elsevier, 11a ed, cap. 36, p. 339-344, 2006.

INFARMED. **Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. Medicamentos uso humano. Avaliação técnico científica. Avaliação de Biodisponibilidade/Bioequivalência (BD/BE)**. 2009. Disponível em: <[http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS\\_USO\\_HUMANO/AVALIACAO\\_TECNICO\\_CIENTIFICA/AVALIACAO\\_DISPONIBILIDADE\\_EQUIVALENCIA](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AVALIACAO_TECNICO_CIENTIFICA/AVALIACAO_DISPONIBILIDADE_EQUIVALENCIA)>. Acessado em: 13 de Janeiro de 2019.

ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. **Thrombosis: a major contributor to the global disease burden**. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 12, p. 1580–1590, 2014.

JARDIM, P. C. B. V. S.; LIMA, A. L. **Historical aspects and current tendencies in blood pressure measurement**. Revista Brasileira de Hipertensão, 7(1): p. 6, 2000.

BORGES, K.; FIGUEIREDO, E.; QUEIROZ, M. **PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANALISE DE COMPOSTOS ORGANICOS**, LTC, 2015.

KAMATA, K.; KAWAMOTO, H.; HONMA, T.; IWAMA, T.; KIM, S.H. **Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa**. Proceedings of the National Academy of Sciences USA; v 95, p. 6630-6635, 1998.

KARNES, H.T.; SHIU, G.; SHAH, V. P. **Validation of bioanalytical methods**, Pharm.Res. v. 8 p. 421–426, 1998.

KING R., R.; BONFIGLIO, C.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, T.; OLAH, T. **Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization**, J. Am. Soc. Mass Spectrometry, v. 11, p. 942–950, 2000.

KOLLIPARA, S.; BENDE G.; AGARWAL, N.; VARSHNEY, B.; PALIWAL, J. **International guidelines for bioanalytical method validation: a comparison and discussion on current scenario**, Chromatographia, v. 73 p. 201–217, 2011.

LA ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira Farmacologia**, Recife, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

LAGERWERF, F. M.; VAN DONGEN, W. D.; STEENVOORDEM, R. J. J. M.; HONING, M.; JONKMAN, J. H. G. **Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS-MS**. Trends in analytical chemistry, v.19, n. 7, p. 418-426, 2000.

MAJERUS, P. W.; TOLLEFSEN, D. M.; **Anticoagulantes, trombolíticos e fármacos antiplaquetários.** In: Hardman, J.G. (Ed), Limbird, L.E. (Ed), Goodman e Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica, 10a ed, cap 55, p. 1141, 2005.

MIDHA, K. K.; RAWSON, M. J.; HUBBARB, J. W. **Bioequivalence: switchability and scaling.** Eur J Pharm Sci. v. 6(2), p. 1–91, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 3.916 de 30 de outubro de 1998.** Aprova e define a Política Nacional de Medicamentos. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt3916\\_30\\_10\\_1998.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt3916_30_10_1998.html)>. Acesso em 17 de Setembro de 2019.

MORAES, M. C. B.; BRITO, J. G. A.; LAGO, C. L.; J. Anal. At. Spectrom. v. 16, p. 1259, 2001.

MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L.D. **Electrospray ionization mass spectrometry applied to study inorganic and organo-metallic species.** Química Nova, v.26, n.4, p.556-563, 2003.

MORELL, J.; SULLIVAN, B.; KHALABUDA, M.; McBRIDE, B.F. **Role of orally available antagonists of Factor Xa in the treatment and prevention of thromboembolic disease: focus on rivaroxaban.** The Journal of Clinical Pharmacology; v. 50, p. 986-1000, 2010.

MORETTO D. L.; MASTELARO R. **MDCB: Manual das Denominações Comuns Brasileiras.** São Paulo, SINDUSFARMA, 2013.

MUECK, W.; STAMPFUSS, J.; KUBITZA, D.; BECKA, M. **Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban.** Clinical pharmacokinetics, v. 53(1), p. 1–16, 2014.

NASCIMENTO, T. G. **Desenvolvimento e Validação de Métodos Bioanalíticos para quantificação simultânea de fármacos em plasma humano.** 2004. 254 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, 2004.

NETO, A. F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia - Princípios básicos e técnicas afins.** Interciência, Rio de Janeiro, 2003.

NETO, F.; MARTINS, J. **Farmacodinâmica e Farmacocinética.** 2015. Disponível em: <<https://ares.unasus.gov.br/acervo/handle/ARES/2559>>. Acessado em: 01 de Setembro de 2019.

NISHIJIMA, M.; BIASOTO, G.; LAGROTERIA, E. **A competição no mercado farmacêutico brasileiro após uma década de medicamentos genéricos: uma análise de rivalidade em um mercado regulado.** Economia e Sociedade, Campinas, v. 23, n. 1 (50), p. 155-186, 2014.

OKUHARA, A.; NAVARRO, T. P.; PROCÓPIO, R. J.; BERNARDES, R. C.; OLIVEIRA, L. C.; NISHIYAMA, M. P. **Incidência de trombose venosa profunda e qualidade da profilaxia para tromboembolismo venoso.** Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, v. 41, p. 2-6, 2014.

OLIVEIRA, M. **O impacto das importações no setor produtivo químico-farmacêutico do Brasil.** Rio de Janeiro: Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades, 2003.

PEREIRA, A. V.; CASS, Q. B. **High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column.** Journal Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Science, v.826, n.1-2, p.139-46, 2005.

PIOTO, L. R. **Estudo de biodisponibilidade relativa entre duas formulações de metotrexato em plasma humano utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série.** 2006. 94 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, 2006.

QUENTAL, C.; ABREU, J. C.; BOMTEMPO, J. V.; GADELHA, C. A. G. **Medicamentos genéricos no Brasil: impactos das políticas públicas sobre a indústria nacional.** Ciências da Saúde Coletiva, vol.13, p. 619-628, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang and Dale's Pharmacology.** 6a ed. Elsevier, London, UK, 2008.

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

ROSING, H.; MAN, W.; DOYLE, E.; BULT, A.; BEIJNEN J. **Bioanalytical liquid chromatographic method validation.** J. Liq. Chromatogr. Related Technology, v. 23, 2000.

SANTOS, S. C. M. **Melhoria da equidade no acesso aos medicamentos no Brasil: os desafios impostos pela dinâmica de competição extra-preço.** 2001. 201 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

SHARGEL, L.; KANFER I. **Generic Drug Development Solid Oral Dosage Forms.** Marcel Deker, New York, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J., J.; GLAJCH, J. L.; **Practical HPLC Method Development,** John Wiley and Sons, New York, p. 110. 636, 2008.

SRIKARA, M. **A REVIEW ON LC-MS/MS IN BIOANALYTICAL STUDIES.** World Journal of Pharmaceutical research WJPR. 2. 2754-2780, 2013.

STAMPFUSS, J.; KUBITZA, D.; BECKA, M.; MUECK, W. **The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxabana.** Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. v. 51, p. 549-61, 2013.

STORPIRTIS, S.; BALDUÍNO, J.; BUENO, M. M.; FREITAS, S. T.; GATTO, R. C.; LIMA, F. P.; MARCOLONGO, R.; VALENTE, V. R. **Aspectos técnicos ao registro de medicamentos genéricos no Brasil.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambiabilidade de medicamentos.** São Paulo, 1999.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F. S.; VILANOVA, C. M. **A equivalência farmacêutica no contexto da intercambiabilidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas.** 2004. Disponível em:

<[http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/78/14-equivalencia\(1\).pdf](http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/78/14-equivalencia(1).pdf)>. Acesso em: 19 de Setembro de 2019.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. **Stationary phases for reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) based on functionalized inorganic oxide surfaces**. Química Nova, v.25, n.4, p.616-623, 2002.

URBAN, P. L. **Quantitative mass spectrometry: an overview**. Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences, 2016.

XARELTO®: Rivaroxabana. Responsável técnico Dra. Dirce Eiko Mimura. São Paulo: Bayer S.A., 2019. **Bula do medicamento**.

YASSINE, M. **HPLC System Care and Troubleshooting**. 2018. Disponível em: <<https://www.atlanticlabequipment.com/blog/hplc-system-care-and-troubleshooting-like-a-boss/>>. Acessado em: 01 de Setembro de 2019.

YASSINE, M. **Simple functional diagram of an LCMS system with increased clarity**. 2018. Disponível em: [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Liquid\\_Chromatography\\_Mass\\_Spectrometer](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Liquid_Chromatography_Mass_Spectrometer) Acesso em: 26 de Janeiro de 2019.

ZAMAN, M. **A Comprehensive Review on Bioequivalence Studies in Human Subjects**. British Journal of Pharmaceutical Research, 2016.

## 7. ANEXOS

### Anexo A – Carta de Autorização do Patrocinador



Medley Farmacêutica Ltda.  
Rua Macedo Costa 55  
13080-180 Campinas SP Brasil  
www.medley.com.br

**Ref.: Autorização de uso dos dados do medicamento de referencia dos estudos de JPJ 32/17 e JPJ 33/17**

Campinas, 22 de Agosto de 2019.

A/C

**Alexandre Cavenatti de Oliveira**

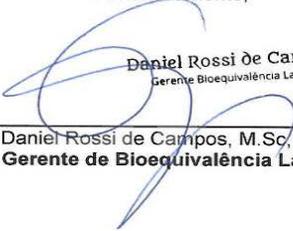
UNIFAG - Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José, CEP: 12916-900 - Bragança Paulista/SP

Autorizo por meio dessa, o uso dos dados de concentrações plasmáticas e dos parâmetros farmacocinéticos dos estudos JPJ 32/17 e JPJ 33/17, para a confecção da versão final da Dissertação de Mestrado intitulada: "*Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia Analítica para Quantificação de Rivaroxabana em Plasma Humano por LC-MS/MS com Aplicação em Estudos de Bioequivalência / Biodisponibilidade*".

Por meio dessa, também autorizo o uso de tais dados na confecção de artigo científico para publicação em Revista Indexada, desde que a versão final do manuscrito seja revisada pela equipe de Bioequivalência da Medley.

Atenciosamente,

  
Daniel Rossi de Campos  
Gerente Bioequivalência LatAm

\_\_\_\_\_  
Daniel Rossi de Campos, M.Sc, Ph.D  
Gerente de Bioequivalência LatAm

  
UMA EMPRESA SANOFI