



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

**Desenvolvimento de método analítico por CLAE-UV para
determinação do meloxicam**

Victor Oller Francischinelli

ARARAQUARA

2016

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia

**Desenvolvimento de método analítico por CLAE-UV para determinação
do meloxicam**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico

Orientador: Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara

2016

Agradecimentos:

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais pela minha formação. Sem eles não conseguiria ter chegado onde cheguei e não teria tido a oportunidade de estudar na UNESP. Um obrigado ao meu irmão Guilherme por todo apoio e suporte.

Gostaria de agradecer também os professores André Gonzaga Dos Santos e Ana Dóris Castro pela ajuda, compreensão, paciência, boa vontade e orientação ao longo dessa pesquisa. Vocês foram primordiais nessa etapa da minha formação.

Agradeço também aqueles que me ajudaram direta e indiretamente nesse processo: Matheus Pegoraro Faria, Elias Padilha, Flávio Carvalho, Gabriela Barrella Moura, Mariana Nucci e a todos da República Só Capim.

Um obrigado especial à Cris, à Silmara e a todos da Fármacia Escola por cederem a amostra da matéria prima para minha pesquisa e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Por fim gostaria de agradecer à minha namorada que está sempre comigo nas minhas conquistas, me apoiando com muito carinho e compreensão.

Sumário

1. Introdução	10
2. Conceitos teóricos e revisão bibliográfica	11
2.1 Medicamentos antiinflamatórios não esteroidais.....	11
2.2 MELOXICAM	15
2.3 CLAE-UV.....	16
3. PARÂMETROS E MÉTODOS ANALÍTICOS	17
3.1 Intervalo.....	19
3.2 Linearidade:	19
3.3 Exatidão:	20
3.4 Precisão:	21
4. Objetivos:	22
5. Materiais e métodos.....	23
5.1 Materiais:	23
5.2 Instrumentação:	23
5.3 Método cromatográfico:	24
5.4 Preparo das soluções:.....	24
5.5 Parâmetros Avaliados:.....	24
5.6 Análise estatística:	25
6. Resultados e discussão:	26
6.1 Curva analítica	26
6.2 Análise do teor da matéria-prima	29
6.3 Análise da linearidade da matéria-prima	30
6.4 Análise da precisão e exatidão do método.	31
7. Conclusões:.....	33
8. Referências:	35

RESUMO

A validação de métodos em busca de dados analíticos confiáveis e reprodutíveis está sendo cada vez mais reconhecida e exigida a fim de garantir a interpretação, segurança, eficácia e qualidade da metodologia empregada. É um processo complexo, trabalhoso e contínuo envolvendo diversas etapas. A estratégia a ser seguida no processo de validação depende da natureza e finalidade do método, bem como as características da amostra que será analisada. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) encontram-se entre os medicamentos mais prescritos mundialmente, sendo utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, bem como nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios musculoesqueléticos. O meloxicam é um fármaco que pertence a esta classe e é amplamente utilizado para o alívio da dor e inflamação, especialmente, em condições crônicas como em osteoartrites, na artrite reumatoide e em outras patologias musculoesqueléticas. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um novo método de identificação e determinação do meloxicam por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As condições de análise propostas foram: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel solução de acetato de amônio (0,5 mg/mL): metanol 40:60 (v/v) em modo isocrático; vazão de 0,5 mL/min; detecção em 270 nm; volume de injeção de 20 µL. Os parâmetros de validação avaliados incluíram linearidade, precisão, exatidão e repetibilidade. Os resultados encontrados apresentam-se dentro dos critérios exigidos pela Resolução RE ANVISA n. 899/2003. Comparando o método desenvolvido com outros descritos na literatura para o meloxicam, o novo método é mais simples, utiliza coluna mais acessível (C18), não utiliza tampões, tem menor tempo de análise.

Palavras Chave: meloxicam, AINE, CLAE-UV, validação

Lista de Tabelas:

Tabela 1 Classificação dos testes segundo sua finalidade	18
Tabela 2 Ensaios necessários para validação do método analítico.....	19
Tabela 3 Limites percentuais do teor do analito	20
Tabela 4 Concentrações das soluções do padrão USP do meloxicam.....	29
Tabela 5 Concentrações das soluções da matéria prima meloxicam.....	30
Tabela 6 Teor matéria prima meloxicam	30
Tabela 7 Resultados dos ensaios de precisão e exatidão	32

Lista de Figuras

Figura 1 Estrutura química do meloxicam.....	15
Figura 2 Cromatograma análise padrão meloxicam 0,02mg/mL.....	26
Figura 3 Cromatograma análise padrão meloxicam 0,04mgL.....	27
Figura 4 Cromatograma análise padrão meloxicam 0,08mgL.....	27
Figura 5 Cromatograma análise padrão meloxicam 0,10mgL.....	28
Figura 6 Cromatograma análise padrão meloxicam 0,12mgL.....	28
Figura 7 Curva analítica padrão meloxicam.....	29
Figura 8 Curva linearidade padrão meloxicam.....	31

Lista de Abreviações:

AINES	Antiinflamatório não esteroidais
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CHI	Conferencia Internacional de Harmonização
COX	Ciclo Oxigenase
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	International Organization Standarization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
USP	United States Phamacopeia

1. INTRODUÇÃO

Técnicas analíticas para determinação de substâncias são amplamente utilizadas na análise de amostras. São inúmeros testes, em diversas áreas, como química, biológica, agrônoma, que podem ser realizados, dependendo da finalidade do estudo.

O desenvolvimento, a adaptação ou a implementação de um método analítico, conhecido ou não, envolve uma avaliação prévia para estimar sua eficácia e eficiência em laboratório. Esse processo é denominado validação e seu objetivo consiste em demonstrar que o método analítico é adequado ao seu propósito, e deve ser considerado quando se desenvolvem ou efetuam-se adaptações em metodologias, como a inclusão de novas técnicas, uso de diferentes equipamentos ou reagentes (Van Zoonen et al., 1999).

A necessidade da validação de um método na análise de uma determinada substância é fundamental para que se obtenha uma eficácia nas medições químicas, garantindo confiabilidade e reprodutibilidade do método. Existem, na literatura, inúmeros trabalhos que relatam a validação dos mais diferentes métodos analíticos (Velpandian et al., 2000; Radi et al., 2001; Hansen e Sheribah, 2005) e definem critérios e condições que devem ser seguidos durante sua execução de acordo com sua área específica, buscando sempre atingir os parâmetros de exatidão, precisão e os limites de detecção e quantificação. Tais trabalhos atingem as mais diversas áreas como a farmacêutica (Bressolle et al., 1996; Vignaduzzo et al., 2008) biológica (Hubert et al., 1999) e química. (Feinberg; Raguènnès, 1999).

A validação de métodos em busca de dados analíticos confiáveis e reprodutíveis está sendo cada vez mais reconhecida e exigida a fim de garantir a interpretação, segurança e qualidade da metodologia empregada. É um processo complexo, trabalhoso e contínuo, envolvendo diversas etapas.

A estratégia a ser seguida no processo de validação depende da natureza e propósito do método, ou seja, sua finalidade, bem como as características da amostra que será empregada devem ser analisadas e precisam estar bem exploradas. A partir disso, com o plano do método traçado, inicia-se o processo de pesquisa dos

componentes envolvidos na metodologia; o procedimento a ser utilizado, seja ele qualitativo ou quantitativo, explorando suas vantagens, desvantagens e complexidade; os reagentes que serão utilizados, suas propriedades físicas e químicas, seu comportamento perante o procedimento escolhido, suas interações com a substância que está sendo analisada e também sua acessibilidade, facilidade de manuseio e relação custo-benefício (Walsh, 1999; Brito et al., 2003). A técnica de análise química pode ser vista como um processo cíclico, semelhante a uma corrente de decisões, ações e procedimentos (Van Zoonen et al., 1999), tendo como objetivo final a interpretação dos resultados da análise, deve eventualmente fornecer o resultado do propósito do seu método. Caso esse último passo da validação não forneça uma resposta satisfatória, o ciclo da análise poderá ser refeito após a alteração de um ou mais passos, podendo, inclusive, surgir um novo método ou procedimento.

Todo processo analítico para identificar ou quantificar substâncias, bem como sua validação, são regulados por diretrizes estipuladas pelos órgãos reguladores do país em questão. No caso do Brasil, na área farmacêutica, deve-se seguir as resoluções RE ANVISA n. 899 de 29 de maio de 2003 e RDC ANVISA n. 27 de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012) que estabelecem os requisitos mínimos para validação de métodos analíticos e bioanalíticos e também os critérios que devem ser utilizados.

2. CONCEITOS TEÓRICOS E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. São utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios musculoesqueléticos (Batlouni, 2010). Essa classe de medicamentos tem como mecanismo de ação terapêutica principal a inibição da ciclo-oxigenase (COX), enzima encontrada amplamente nas

células, predominantemente no retículo endoplasmático, responsável pela formação de importantes mediadores biológicos como as prostaglandinas (PGs), prostaciclina e tromboxano. Existem pelo menos duas isoformas conhecidas dessa enzima: COX-1 e COX-2; estas apresentam estruturas semelhantes, mesmo sendo codificadas por genes diferentes e são expressas nas células de forma distinta (Silva et al., 2014) .

A isoforma COX-1 é expressa de forma constitutiva, ou seja, constante na maioria dos tecidos e é fundamental para a manutenção do estado fisiológico normal de muitos tecidos, incluindo a proteção da mucosa gastrointestinal; controle do fluxo sanguíneo renal; homeostasia; respostas autoimunes; funções pulmonares, sistema nervoso central; cardiovasculares e reprodutivas (Vane e Botting, 1998; Grosser et al., 2006).

Também é responsável pela catálise de prostaglandinas e tromboxano. A COX-2, por sua vez, diferentemente da COX-1, é expressa, apenas, nas células vasculares endoteliais normais, e onde há processos inflamatórios, ou seja, é uma enzima induzida pelas inflamações; o que a torna um grande alvo terapêutico no tratamento dessa patologia (Schellack, 2006).

Os AINEs, ao inibirem essas enzimas, atuam impedindo a produção de prostaglandinas, responsáveis pelos sinais de inflamação como dor, rubor e edema, e podem ser distribuídos em classes de acordo com sua estrutura química. (Quadro 1)

Quadro 1. – Classificação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)
 – Fonte (Júnior et al., 2007; Monteiro et al., 2008; Carvalho, 2010)

INIBIDORES NÃO-SELETIVOS DA COX
Derivados do Ácido Salicílico (salicilatos) <i>Ácido Acetilsalicílico(Aspirina), Salicilato de Sódio, Salicilato de Metila, Difunisal, Flunfenisal Sulfassalazina, Olsalazina</i>
Derivados Pirazolônicos <i>Dipirona, Fenilbutazona, Apazona, Sulfimpirazona</i>
Derivados do Para-aminofenol <i>Paracetamol (Acetamminofeno)</i>
Derivados do Ácido Indolacético e Ácido Indenoacético <i>Indometacina, Sulindaco, Etodolaco</i>
Derivados do Ácido N-fenilantranílico (fenamatos) <i>Ácido Mefenâmico, Ácido Meclofenâmico, Ácido Flufenâmico, Ácido Tolfenâmico, Ácido Etofenâmico</i>
Derivados do Ácido Pirrolalcanoico <i>Tolmetino, Cetorolaco</i>
Derivados do Ácido Fenilacético <i>Diclofenaco de Sódio, Aceclofenaco</i>
Derivados do Ácido Propiônico <i>Ibuprofeno, Naproxeno, Flurbiprofeno, Cetoprofeno, Fenoprofeno, Oxaprozino, Indoprofeno, Ácido Tiaprofênico</i>
Derivado do Ácido Enólico (Oxicam) <i>Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Sudoxicam, Isoxicam, Ampiroxicam, Droxicam, Lornoxicam, Cinoxicam, Ampiroxicam, Pivoxicam</i>
Derivado do Ácido Naftilacético <i>Nabumetona, Proquazona</i>
Derivados do Ácido Carbâmico <i>Flupirtina</i>

INIBIDORES SELETIVOS DA COX-2
Derivado da Sulfonanilida <i>Nimesulida</i>
Derivado do Ácido Indolacético <i>Etodolaco</i>
Derivado FuranonaDiarilsubstituído <i>Rofecoxib</i>
Derivado PirazolDiarilsubstituído <i>Celecoxib</i>
Derivado BipiridínicoDiarilsubstituído <i>Etoricoxib</i>
Derivado IsoxazolDiarilsubstituído <i>Valdecoxib</i>

As diferenças nos efeitos terapêuticos dos inibidores da COX resultam do grau de seletividade para as duas isoenzimas, das variações teciduais específicas e de sua distribuição, criando dois subgrupos de AINEs: seletivos e não seletivos. Os AINES não seletivos ou tradicionais inibem as duas isoenzimas de forma reversível e não seletiva, embora existam alguns fármacos capazes de acetilar ambas de forma irreversível. A inibição não seletiva dessas enzimas acarreta em efeitos indesejáveis na ação terapêutica. Sabe-se que as ações anti-inflamatória, antipirética e analgésica decorrem da inibição sobre a COX-2, enquanto que os efeitos indesejáveis são resultantes da inibição da COX-1. Os principais efeitos colaterais são gastrite, disfunção plaquetária e comprometimento renal (Júnior et al., 2007; Monteiro et al., 2008; Carvalho, 2010).

Visando manter a eficácia anti-inflamatória e a redução de efeitos indesejáveis, foram introduzidos os AINEs seletivos para COX-2, fármacos responsáveis por um bloqueio mais eficaz dessa isoforma e, por sua vez, por uma melhor ação terapêutica. Um exemplo de fármaco seletivo para COX-2 é o meloxicam.

2.2 Meloxicam

O meloxicam (4-hidroxi-2-metil-*N*-(5-metil-2-tiazolil)-2*H*-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido) é um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) da classe dos oxicams (Figura 1). É amplamente utilizado para o alívio da dor e inflamação, especialmente, em condições crônicas como em osteoartrites, na artrite reumatoide e em outras patologias musculoesqueléticas (Merk, 1996; Korolkovas, 1999; Vade-Mécum, 1999)

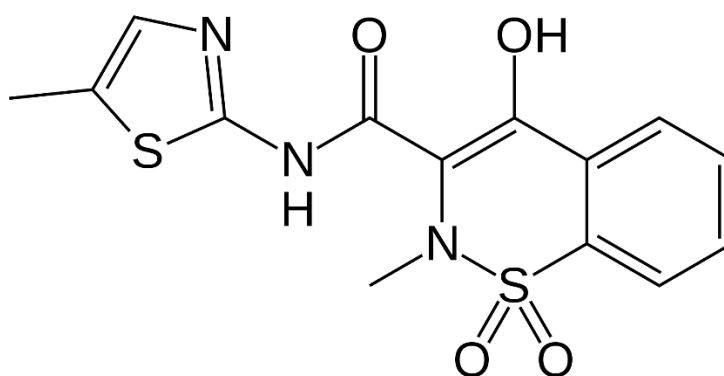


Figura 1: Estrutura química do meloxicam.

Tem como mecanismo de ação uma redução da formação de prostaglandinas a partir da inibição das COX-2. Os fármacos da classe dos oxicams são inibidores não seletivos da COX, com exceção do meloxicam, o qual possui uma preferência pela COX-2. A diminuição dessa síntese de PGs e sua leve seletividade são responsáveis pela sua potente ação terapêutica. A dosagem usualmente utilizada para o meloxicam é de 7,5 mg, uma vez ao dia, podendo ser dobrada para 15 mg por dia em condições agudas de dores intensas como na artrite reumatoide (Arayne et al., 2005; Martindale, 1996; British Pharmacopoeia 2003).

Vários procedimentos analíticos utilizados para determinação e identificação do meloxicam são descritos na literatura, utilizando das mais diversas técnicas, como por exemplo, método polarográfico (Wiesner et al., 2003; Zawilla et al., 2003), cromatografia líquida (Wiesner et al., 2003; Zawilla et al., 2003), eletroforese por capilaridade (Hansen e Sheribah, 2005),

espectrofotometria no UV (Wiesner et al., 2003) e oxidação eletroquímica (Radi et al., 2001).

O método mais comum para identificação e doseamento de fármacos, inclusive do meloxicam, é através do uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC), por se tratar de uma técnica precisa, capaz de reproduzir métodos sensíveis, confiáveis, seguros e com alta reprodutibilidade. Porém, os métodos presentes na literatura, muitas vezes utilizam condições cromatográficas complexas fazendo uso de reagentes difíceis de manusear (tampões), condições muito específicas, além de colunas cromatográficas particulares e procedimentos demorados (Bressolle et al., 1996; Vignaduzzo et al., 2008).

O desenvolvimento de um novo método analítico para determinação do meloxicam pode permitir simplificar o procedimento e reduzir o tempo de análise, e sua validação permite que se obtenha uma garantia da precisão e da exatidão dos resultados obtidos com o método.

2.3 CLAE-UV

Cromatografia líquida de alta eficiência é um método de separação de compostos químicos em solução, amplamente utilizado como ferramenta em bioquímica e análise de separação, identificação e quantificação de compostos ativos (Hayes et al., 2014).

Os principais componentes de um CLAE-UV são: a bomba de alta precisão, responsável por movimentar a fase móvel (em modo isocrático ou gradiente) e a amostra através da coluna a qual contém a fase estacionária, geralmente formada por partículas de sílica, porosas, esféricas e diâmetro em torno de 5 μm , o injetor e um detector que permite obter os cromatogramas com os respectivos tempos de retenção e áreas dos picos de cada substância. A separação cromatográfica é resultado de interações diferenciais entre os componentes da amostra com as fases estacionária e móvel (Malviya et al., 2010).

De maneira geral, o processo de análise de uma amostra por CLAE segue os seguintes passos: a amostra, primeiramente, é dissolvida em um solvente (após o pré-tratamento) e injetada através do injetor na coluna

cromatográfica preenchida com a fase estacionária (FE). A fase móvel (FM) é bombeada a uma vazão precisa, deslocando os componentes da mistura através da coluna. Esses se distribuem entre FM e FE de acordo com sua afinidade; sendo assim, as substâncias com maior afinidade com a FE movem-se mais lentamente, enquanto as com menor afinidade movem-se mais rapidamente.

Ao sair da coluna, os componentes da solução passam por um detector que emite um sinal elétrico o qual é registrado na forma de um gráfico, mais especificamente um cromatograma. Cada sinal representado no gráfico corresponde ao tempo de retenção que determinada substância tem, ou seja, é o tempo gasto por cada componente desde sua injeção até sua detecção no sistema. Cada componente tem seu tempo de retenção específico, baseado na afinidade com FM e FE, permitindo assim que se identifique a substância em questão. A informação utilizada na quantificação das substâncias são as áreas (ou alturas) dos picos que são proporcionais à concentração ou quantidade de massa para os detectores utilizados.

3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS CROMATOGRAFICOS

A validação é um processo que visa diminuir e controlar fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado geral. Consiste em garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas e que tenha capacidade de desempenho consistente, assegurando confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados, fornecendo evidências que comprovem que o método sugerido atende aos propósitos sugeridos (BRASIL, 2003).

Esse processo consiste em garantir o controle ou a redução de fatores que levam a imprecisão ou inexatidão dos dados gerados, como variações de temperatura, reagentes inadequados, eventual contaminação, descuidos na manutenção dos aparelhos utilizados, entre outros (Lanças, 2009).

Existem diversas razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos a fim de garantir a competência técnica do método utilizado.

Diversos órgãos reguladores são responsáveis por disponibilizar os parâmetros que devem ser seguidos e respeitados a fim de garantir a validação do método, como por exemplo a Conferencia Internacional de Harmonização (CHI), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), International Organization Standardization (ISO), e no caso do Brasil, a Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (Lança, 2009).

Infelizmente, ainda não há um consenso sobre quais parâmetros devem ser incluídos no processo de validação de um método analítico, porém os seguintes fazem parte da maioria dos processos de validação, mais conhecidos como parâmetros de desempenho analítico (Swartz e Krull, 1998; Thompson et al., 2002; Brasil, 2003).

- Exatidão
- Precisão
- Linearidade
- Sensibilidade
- Especificidade
- Robustez

Neste estudo, os parâmetros necessários para validação do método (Tabela 2) são descritos na Resolução RE ANVISA n. 899/2003 de acordo com a aplicação pretendida (Tabela 1) e a categoria na qual se encontra. Neste estudo enquadra-se na categoria I.

Tabela 1. Classificação dos testes segundo sua finalidade, para seleção dos parâmetros de validação.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas

III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Tabela 2. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

**se houver comprovação da reprodutividade não é necessária a comprovação da Precisão

3.1 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente, é derivado do estudo de linearidade. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicadas a amostras, contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado. (BRASIL, 2003).

3.2 Linearidade

É a demonstração que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise

de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, seguindo o intervalo específico para a aplicação pretendida do método (Tabela 3). Se houver relação linear aparente após visualização do gráfico, os resultados devem ser tratados por métodos estatísticos para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (BRASIL, 2003).

No caso deste presente estudo, seguimos o intervalo de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

Tabela 3. Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos (BRASIL, 2003).

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e +20% sobre o maior valor.

3.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida, o padrão de referência (BRASIL, 2003).

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis:

- Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

- Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias.

A precisão de um método analítico pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) ou pelo coeficiente de variação (CV%) a partir de uma série de medidas, segundo a fórmula abaixo:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método; não se admitindo valores superiores a 5%.

4. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi desenvolver e validar um método simples, de menor custo, eficiente e reprodutível para a determinação do meloxicam, utilizando como amostras a matéria-prima utilizada pela Farmácia-Escola “Prof. Dr. Antônio Alonso Martinez”, em comparação ao padrão referência USP do fármaco.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas das análises foram realizadas no Laboratório Didático de Toxicologia e no Laboratório de Farmacognosia, ambos do Departamento de Princípios ativos Naturais e Toxicologia (PANT) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

5.1 Materiais

Para o preparo das amostras e soluções padrão e na composição da fase móvel foram utilizados como solventes metanol e solução de acetato de amônio 99% grau HPLC, além de água ultrapura (18,2 MΩ.cm) obtida em sistema ultrapurificador Millipore® modelo Direct-Q3® UV. A matéria-prima analisada foi adquirida pela Farmácia-Escola da FCF-UNESP e o meloxicam padrão referência USP da Sigma-Aldrich® 99,8% de pureza (Lote M3935). Para filtração das soluções analisadas por CLAE-UV foram utilizados filtros de membrana de PVDF com poro de 0,22 µm (Millipore®). As pesagens foram realizadas em balança analítica Marte® modelo AY220.

5.2 Instrumentação

O cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE-UV) utilizado foi da marca ThermoScientific® modelo DionexUltiMate 3000 equipado com bomba binária, desgaseificador, injetor manual de seis pórticos, detector no UV/Vis de comprimento de onda variável e software de coleta e gerenciamento de dados Chromeleon®. Foi usada uma coluna C18 da marca Agilent® de 250x4,6mm e partículas de 5 µm de diâmetro. As amostras foram injetadas com seringa de 100 µL da marca Hamilton®.

5.3 Método cromatográfico

O método cromatográfico empregou como fase móvel solução de acetato de amônio (0,5 mg/mL): metanol 40:60 (v/v) em modo isocrático. A vazão utilizada foi de 0,5 mL/min, a detecção realizada em 270 nm e o tempo total de análise foi de 10 min. O volume de injeção das soluções da matéria-prima e do padrão foi de 20 µL.

5.4 Preparo das soluções de meloxicam padrão e meloxicam matéria-prima

No preparo das soluções, 10 mg do meloxicam padrão referência USP ou do meloxicam matéria-prima foram solubilizados em 10 mL de solução de acetato de amônio (0,5 mg/mL): metanol 55:45 (v/v), obtendo portanto duas soluções de concentração 1,0 mg/mL.

A partir destas soluções foram realizadas diluições utilizando balão volumétrico a fim de obter soluções nas concentrações de 0,02, 0,04, 0,08, 0,10 e 0,12 mg/mL de meloxicam padrão e meloxicam matéria-prima, as quais foram utilizadas nas análises. Para a determinação do teor da matéria-prima foi utilizada uma solução de concentração 0,1 mg/mL.

5.5 Parâmetros Avaliados

No método proposto foram avaliados os parâmetros de linearidade, exatidão, intervalo e repetibilidade e realizados os devidos tratamentos estatísticos com os dados obtidos.

A linearidade do método foi verificada a partir da análise de curvas analíticas do padrão referência e da matéria-prima nas concentrações de 0,02, 0,04, 0,08, 0,10 e 0,12 mg/mL. Os resultados obtidos foram empregados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com eixo Y, coeficiente

angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo.

A repetibilidade e a exatidão foram verificadas pela determinação em três concentrações diferentes (0,2, 0,8 e 0,12 mg/mL), todas em triplicata.

O intervalo de variação testado foi entre 20% e 120% da concentração inicial de 0,1 mg/mL

5.6 Análise Estatística

O software Microsof Excel foi empregado nas análises estatísticas e obtenção das curvas analíticas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as análises foram realizadas no mesmo equipamento pelo mesmo operador. Os resultados expressam a média das análises em triplicata.

6.1 Curva Analítica

O método do padrão externo foi utilizado na quantificação do meloxicam (teor da matéria-prima). Para a construção da curva analítica foram analisadas as cinco soluções obtidas e as áreas dos picos dos cromatogramas (Figuras 2-6) foram relacionadas graficamente com as concentrações das soluções (Lança, 2009). A Tabela 4 apresenta os valores médios das áreas dos picos em relação a sua concentração. A Figura 7 apresenta a curva analítica do meloxicam padrão USP.

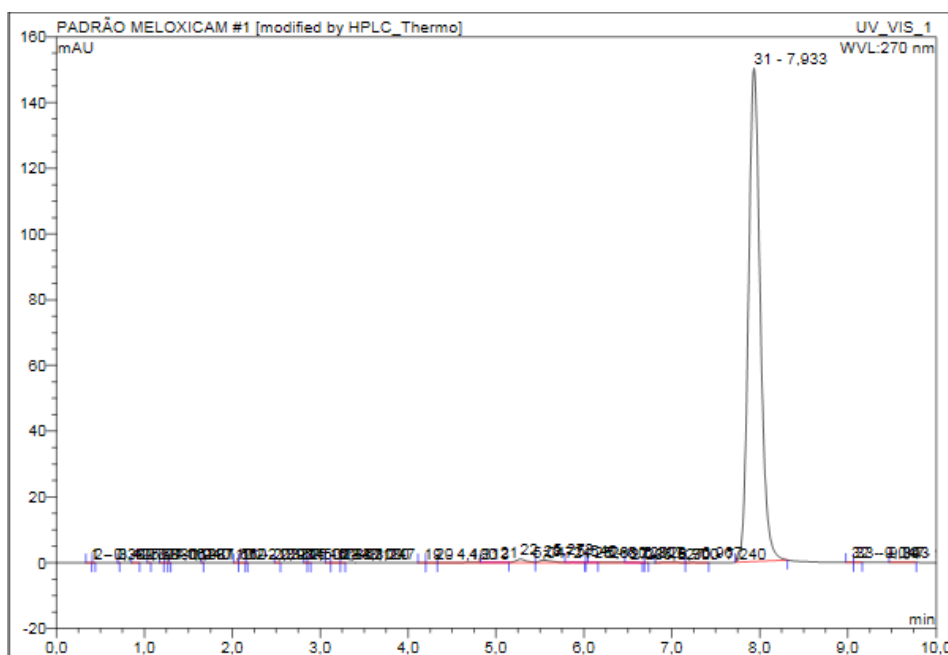


Figura 2. Cromatograma referente a análise do meloxicam padrão USP (0,02 mg/mL). Condições de análise: coluna Agilent® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel solução de acetato de amônio (0,5 mg/mL): metanol 40:60 (v/v) em modo isocrático; vazão de 0,5 mL/min; detecção em 270 nm; volume de injeção de 20 µL

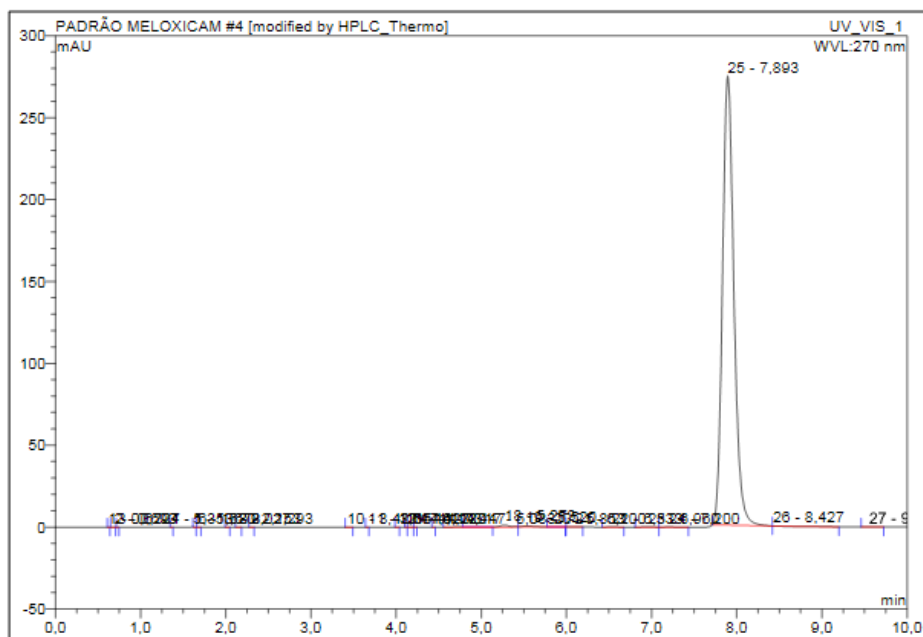


Figura 3 – Cromatograma referente a análise do meloxicam padrão USP (0,04 mg/mL).
Condições de análise: coluna Agilent® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel solução de acetato de amônio (0,5 mg/mL): metanol 40:60 (v/v) em modo isocrático; vazão de 0,5 mL/min; detecção em 270 nm; volume de injeção de 20 µL

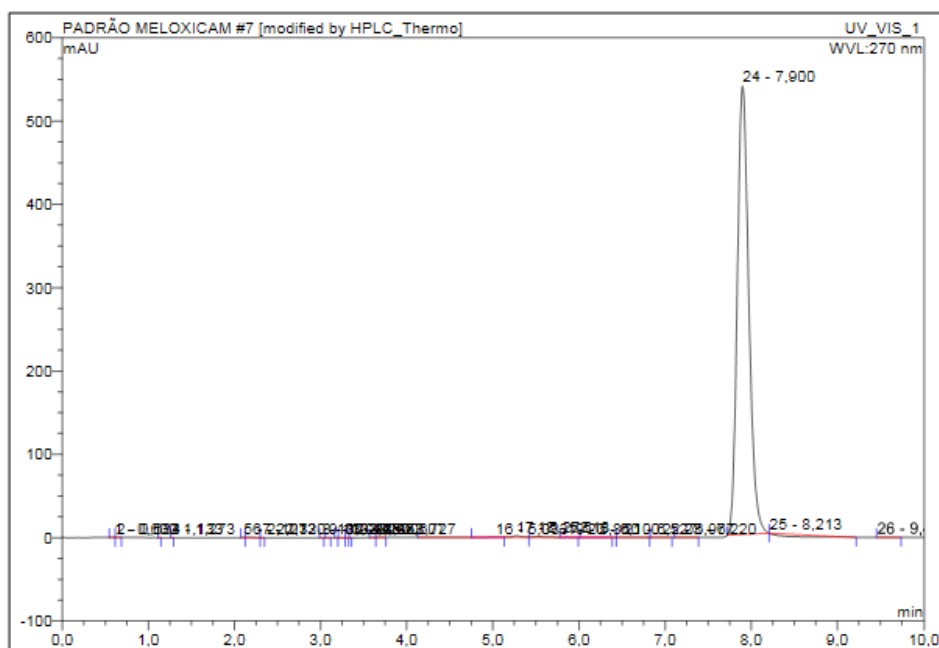


Figura 4 – Cromatograma referente a análise do meloxicam padrão USP (0,08 mg/mL).
Condições de análise: coluna Agilent® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel solução de acetato de amônio (0,5 mg/mL): metanol 40:60 (v/v) em modo isocrático; vazão de 0,5 mL/min; detecção em 270 nm; volume de injeção de 20 µL

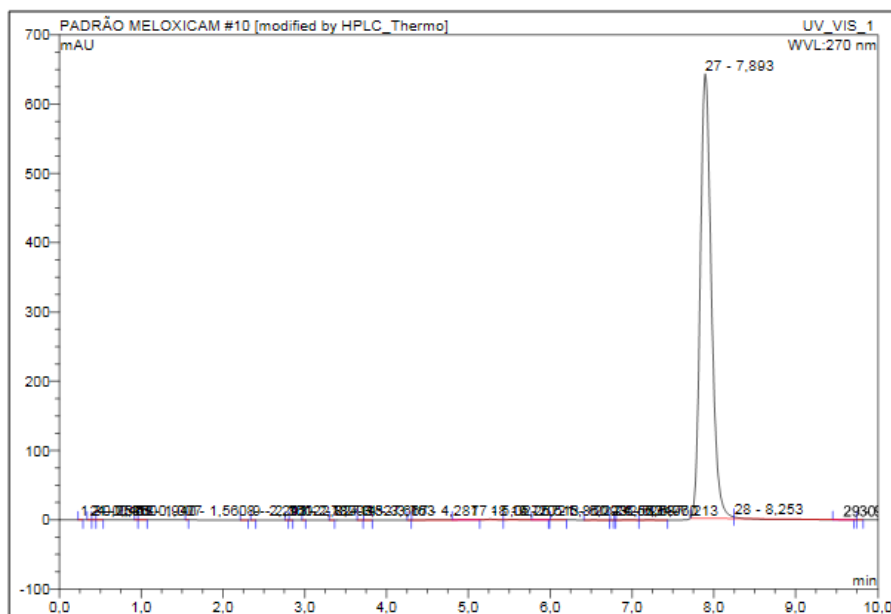


Figura 5 –Cromatograma referente a análise do meloxicam padrão USP (0,10 mg/mL).
Condições de análise: coluna Agilent® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel solução de acetato de amônio (0,5 mg/mL): metanol 40:60 (v/v) em modo isocrático; vazão de 0,5 mL/min; detecção em 270 nm; volume de injeção de 20 µL

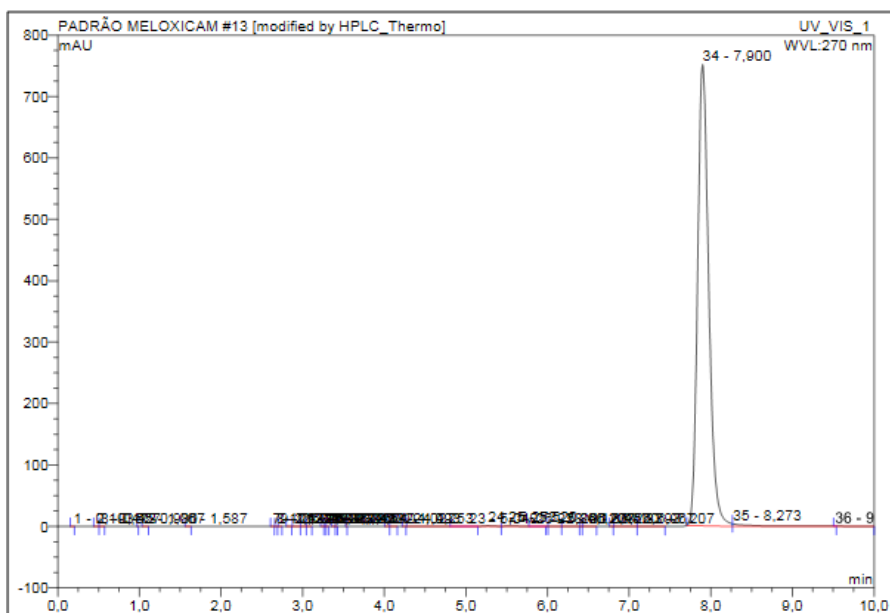


Figura 6 – Cromatograma referente a análise do meloxicam padrão USP (0,12 mg/mL).
Condições de análise: coluna Agilent® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel solução de acetato de amônio (0,5 mg/mL): metanol 40:60 (v/v) em modo isocrático; vazão de 0,5 mL/min; detecção em 270 nm; volume de injeção de 20 µL

Tabela 4: Concentrações das soluções do meloxicam padrão USP e suas respectivas áreas médias dos picos (triplicata) nos cromatogramas.

Concentração (mg/mL)	Área do Pico (UA)	Tempo Retenção (min)
0,12	117.326	7,90
0,1	100.382	7,89
0,08	83.044	7,90
0,04	423.055	7,89
0,02	23.115	7,93

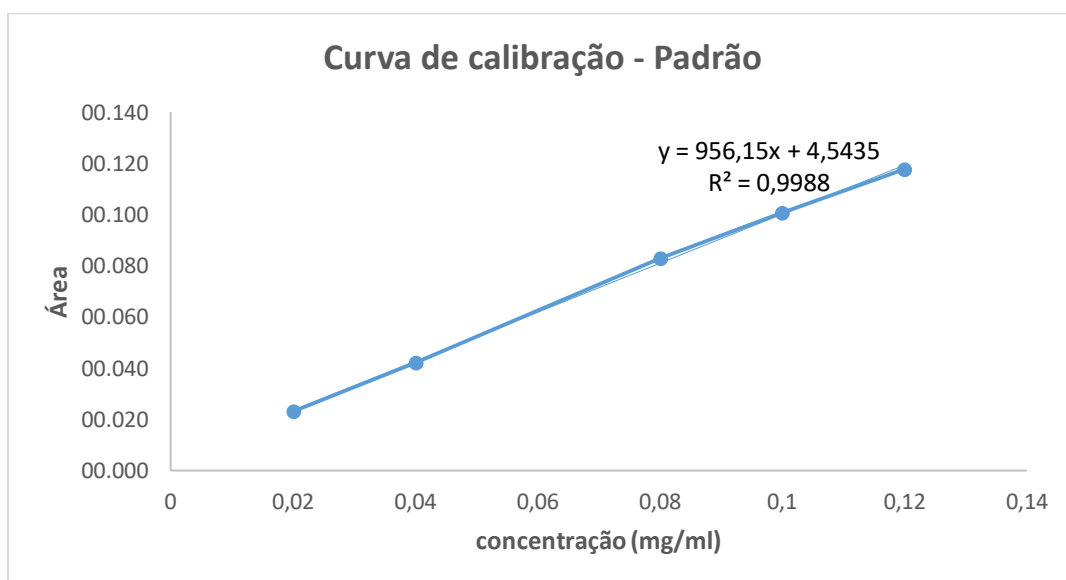


Figura 7: Curva analítica do meloxicam padrão USP.

6.2 Análise do teor da matéria-prima

A equação da reta de regressão linear da curva analítica construída a partir das análises das soluções do meloxicam padrão foi utilizada para determinar o teor da matéria-prima. A tabela 5 apresenta as concentrações das soluções de meloxicam matéria-prima e as respectivas áreas dos picos dos cromatogramas. O valor do teor foi determinado como 101,30 % e a precisão demonstrada pelo coeficiente de variação foi de 0,11 % (Tabela 6).

Tabela 5. Concentrações das soluções do meloxicam matéria-prima e respectivas áreas dos picos médias (triplicata) obtidos nos cromatogramas.

Concentração (mg/mL)	Área do Pico (U.A) $\pm$ dp	Tempo de Retenção (min)
0,101356	101,747 $\pm$ 0,03	7,95
0,101293	101,68 $\pm$ 0,03	7,93
0,101529	101,917 $\pm$ 0,03	7,95

Tabela 6: Teor de meloxicam matéria-prima.

Amostra	Teor (%)	Média (%) $\pm$ dp	C.V (%)
1	101,35	101,30 $\pm$ 0,001	0,11
2	101,29		
3	101,50		

Os resultados obtidos foram precisos, apresentando baixo coeficiente de variação percentual. O teor determinado da matéria-prima manteve-se dentro das especificações delineadas pela Farmacopeia Americana que é de 98 a 101,5% (USP, 2009).

6.3 Análise da linearidade

A linearidade do método foi verificada a partir da análise de curvas analíticas do meloxicam padrão 0,02, 0,04, 0,08, 0,10 e 0,12 mg/mL (Figura 8).

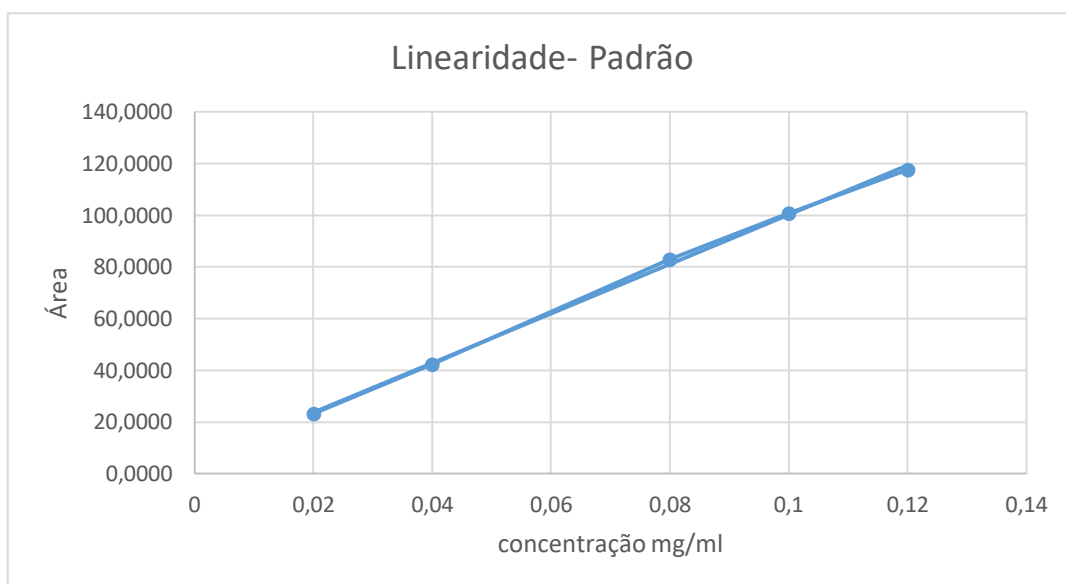


Figura 8. Linearidade Padrão

O coeficiente de correlação (R) obtido para a curva analítica teve um valor médio de 0,9994 que corresponde ao mínimo aceitável pela Resolução RE ANVISA n. 899/2003 (BRASIL, 2003) de 0,99 e indica a linearidade do método.

6.4 Análise da precisão e da exatidão do método

Nesse estudo, foi realizado, apenas, um nível de avaliação: a repetibilidade. A concordância entre os resultados obtidos em um curto período de tempo pelo mesmo analista foi avaliada, respeitando as quantidades de determinações e concentrações dispostas na Resolução RE ANVISA n. 899/200 (BRASIL, 2003).

A exatidão foi determinada a partir da concentração média experimental/concentração teórica (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados dos ensaios de precisão e exatidão.

Concentração teórica	Concentração média experimental	Desvio padrão	Precisão (C.V %)	Exatidão
Padrão				
0,12	0,118	0,0012	1,00	99%
0,10	0,101	0,0005	0,45	101%
0,08	0,082	0,0015	1,79	103%
Matéria Prima				
0,12	0,116	0,0025	2,16	97%
0,10	0,102	0,0016	1,56	102%
0,08	0,082	0,0016	1,99	103%

A exatidão ficou entre 99 e 103% para o padrão e entre 97 e 103% para a matéria-prima. A precisão ficou entre 0,45 e 1,79% para o padrão e entre 1,56 e 2,16% para a matéria-prima. Esses resultados sugerem que o método descrito apresenta uma exatidão e precisão satisfatórias, uma vez que a recomendação da Farmacopeia Americana ed. 32, 2009 admite valores menores ou iguais à 20% e 15% respectivamente.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho surgiu como uma proposta de criar um novo método analítico, simples e prático, para identificação do meloxicam, visto que muitos métodos apresentados na literatura são muito complexos e demorados, o que contribui com possíveis erros e ineficiência.

Várias metodologias foram analisadas na literatura com o objetivo de avaliar suas vantagens e desvantagens para então, elaborar um novo método que atendesse os objetivos propostos de uma maneira mais acessível e descomplicada.

O método desenvolvido apresenta uma metodologia simples, acessível, rápida e eficiente para determinação do fármaco em questão. O uso de uma fase móvel estacionária com poucos reagentes e de fácil manuseio, sem a necessidade do uso de tampões, bem como a utilização dessa mesma solução para a solubilização da amostra são um dos motivos que tornam esse método facilmente reproduzível. Além disso, o uso do CLAE-UV, nas condições descritas, é responsável pela praticidade, rapidez e eficiência na análise das amostras.

Neste trabalho, foram avaliados apenas alguns parâmetros exigidos pela legislação vigente para a validação de um método analítico, sendo necessária uma continuação do estudo e das análises, a fim de contemplar todos os critérios determinados, e assim garantir que o método realmente atenda às exigências, e assegure sua confiabilidade.

Os resultados apresentados, embora preliminares, foram satisfatórios tendo como ferramentas a análise estatística, fazendo média de todos os valores, desvio-padrão e coeficiente de variação ou desvio-padrão relativo, sempre sendo suportados pelas monografias das Farmacopeias Americana e Brasileira e por diversos trabalhos e artigos publicados.

Sendo assim, podemos concluir que o procedimento adotado nesse estudo mostra-se promissor, podendo ser considerado uma boa alternativa para análise e determinação do meloxicam.

Como sugestão para trabalhos posteriores fica a continuidade dos estudos, com o propósito de atender a todos os parâmetros de validação exigidos, para que assim possa-se validar o método e garantir que os resultados sejam cada vez mais precisos e exatos.

8. REFERÊNCIAS

ARAYNE, M. S.; SULTANA, N.; SIDDIQUI, F. A. A new RP-HPLC method for analysis of meloxicam in tablets. **Pak J Pharm Sci**, v. 18, n. 1, p. 58-62, Jan 2005. ISSN 1011-601X (Print) 1011-601X (Linking).

BATLOUNI, M. [Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects]. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 4, p. 556-63, Apr 2010. ISSN 1678-4170 (Electronic) 0066-782X (Linking).

BRASIL, I. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOC-CGCRE-008-revisão 01-março 2003.[<http://www.inmetro.gov.br>]. Acesso em: junho 2016.

BRASIL, Resolução ANVISA n. 899 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília 29 de maio de 2016.

BRASIL, Resolução ANVISA 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 pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília 17 de maio de 2012

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **J Chromatogr B Biomed Appl**, v. 686, n. 1, p. 3-10, Nov 8 1996. ISSN 1572-6495 (Print) 1572-6495 (Linking).

British Pharmacopeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 2008

BRITO, N. M. et al. **Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão**. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente. Curitiba: Schögel, E. M. 13: 129-146 p. 2003.

CARVALHO, W. A. Antiinflamatórios não esteroides, analgésicos, antipiréticos e drogas utilizadas no tratamento da gota. In: SILVA, P. (Ed.). **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro, 2010. cap. 45, p.439-466.

FEINBERG, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 239-252, 1999.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J Clin Invest**, v. 116, n. 1, p. 4-15, Jan 2006. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking).

HANSEN, S. H.; SHERIBAH, Z. A. Comparison of CZE, MEKC, MEEKC and non-aqueous capillary electrophoresis for the determination of impurities in bromazepam. **J Pharm Biomed Anal**, v. 39, n. 1-2, p. 322-7, Sep 1 2005. ISSN 0731-7085 (Print) 0731-7085 .

HAYES, R. et al. Core-shell particles: preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1357, p. 36-52, Aug 29 2014. ISSN 1873-3778 0021-9673

HUBERT, P. et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 135-148, 1999.

JÚNIOR, J. O. L. et al. **Os antiinflamatórios não hormonais**. Prática Hospitalar. São Paulo. 51: 173-8 p. 2007.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 21.6.

LANÇA, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

MALVIYA, R. et al. High performance liquid chromatography: a short review. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2, n. 5, p. 22-26, 2010.

MARTINDALE. In: REYNOLDS, J. E. F. (Ed.). **The Extra Pharmacopoeia**. 31st Edition. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. p.404-406.

MERK. **index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological**. 12.^a ed. New Jersey: Whitehouse Station, 1996. p. 582.

MONTEIRO, E. C. A. et al. **Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)**. Revista Temas de Reumatologia Clínica. São Paulo. 9 2008.

RADI, A. et al. Electrochemical oxidation of meloxicam and its determination in tablet dosage form. **Analytical Letters**, v. 34, n. 5, p. 739-748, 2001.

SHELLACK, G. In: (Ed.). **Farmacologia : uma abordagem didática**. São Paulo: Fundamento Educacional, 2006. p.190. ISBN 85-88350-70-X.

SILVA, J. M.; MENDONÇA, P. P.; PARTATA, A. K. **Aanti-Inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais** Revista Científica do ITPAC. Araguaína. 7 2014.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

United States pharmacopeia, 32nd. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2009. p. 234

VADE-MÉCUM. São Paulo: Soriak, 1999. p. 431.

VAN ZOONEN, P. et al. Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9-10, p. 584-593, 1999.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of antiinflammatory drugs. **Int J Tissue React**, v. 20, n. 1, p. 3-15, 1998. ISSN 0250-0868 (Print)
0250-0868

VELPANDIAN, T. et al. Development and validation of a new high-performance liquid chromatographic estimation method of meloxicam in biological samples. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 738, n. 2, p. 431-6, Feb 11 2000. ISSN 1387-2273

VIGNADUZZO, S. E.; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S. Method development and validation for the simultaneous determination of meloxicam and pridinol mesylate using RP-HPLC and its application in drug formulations. **J Pharm Biomed Anal**, v. 46, n. 2, p. 219-25, Jan 22 2008. ISSN 0731-7085.

WALSH, M. C. Moving from official to traceable methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9-10, p. 616-623, 1999.

WIESNER, J. L. et al. Sensitive and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of meloxicam in human plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 785, n. 1, p. 115-21, Feb 25 2003. ISSN 1570-0232

ZAWILLA, N. H. et al. Determination of meloxicam in bulk and pharmaceutical formulations. **J Pharm Biomed Anal**, v. 32, n. 6, p. 1135-44, Aug 21 2003. ISSN 0731-7085

Dados Finais:

Data: 15/01/2017

Victor Oller Francischinelli

Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos