

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE
APIXABANA E SUAS IMPUREZAS**

JÉSSICA BAUER ELLWANGER

Porto Alegre, 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE
APIXABANA E SUAS IMPUREZAS**

Dissertação apresentada por **Jéssica Bauer
Ellwanger** para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe
Co-Orientadora: Dr^a. Nathalie Wingert

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de março de 2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Diogo dos Santos Miron

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Juliana Maria de Mello Andrade Fasolo

Universidade Federal do Rio de Janeiro

CIP - Catalogação na Publicação

Ellwanger, Jéssica Bauer
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
AVALIAÇÃO DE APIXABANA E SUAS IMPUREZAS / Jéssica
Bauer Ellwanger. -- 2018.
139 f.
Orientador: Martin Steppe.

Coorientadora: Nathalie Ribeiro Wingert.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. apixabana. 2. impurezas. 3. quality by design.
4. caracterização. 5. estudo toxicológico. I. Steppe,
Martin, orient. II. Wingert, Nathalie Ribeiro,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

“Forever trusting who we are and nothing else matters.”

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Martin Steppe pela oportunidade, pela confiança e pela orientação sempre serena.

À co-orientadora Nathalie Ribeiro Wingert pelos ensinamentos, pela disponibilidade de sempre tirar minhas dúvidas e, principalmente, por toda atenção e paciência.

Às professoras Dra. Nádia Volpato e Dra Cássia Garcia pelas contribuições ao trabalho e à Dra. Elfrides E. S. Schapoval pelo exemplo de pesquisadora e ser humano.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia e do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A todos colegas do laboratório de Controle de Qualidade pela carinhosa acolhida, pelas divertidas conversas e verdadeira amizade ao longo destes dois anos. Em especial à Mari pela simpatia, e às meninas das impurezas pelas trocas de conhecimentos (ou de dúvidas) e companheirismo.

À doutorando Vanessa Pittol, pelo acompanhamento nas análises de DSC.

Ao Farmacêutico Fabiano Barreto pela gentileza e disponibilidade de ceder seu espaço e seu tempo para realização de algumas análises no LANAGRO.

Ao professor Dr. Marcelo Arbo do LaTox, pela parceria na realização dos ensaios toxicológicos, bem como à estudante Shanda Cattani pela dedicação a este estudo.

Ao professor Dr. Diogo Pilger pela ajuda e conhecimentos hematológicos.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro a este projeto.

À UFRGS por ter sido minha segunda casa por tantos anos, possibilitando meu desenvolvimento técnico, científico e humano.

Aos “migos” Fernanda, Lucas, Eduarda e Ágata que, mesmo com rotinas diferentes, seguem sempre me apoiando, em especial à Fê pelos dramas compartilhados via áudios, cheios de conselhos e mensagens esperançosas.

Aos tricoamigos, pelos momentos de conversa fiada ou de desabafo, pelas constantes revisões de inglês (Momô poliglota), pelo carinho e incentivo de sempre.

E finalmente à minha família, pelo apoio incondicional nessa nova empreitada. Aos manis, pela confiança e compreensão, e à minha maravilhosa mamadi, pelo amor e por novamente possibilitar que eu me dedicasse aos estudos.

RESUMO

Apixabana é um novo fármaco da classe dos anticoagulantes orais utilizado na prevenção e no tratamento de eventos de tromboembolismo venoso em pacientes submetidos à cirurgia de quadril e joelho, além de reduzir os riscos de acidente vascular cerebral e fibrilação arterial. Uma vez que impurezas e contaminantes podem estar presentes no produto farmacêutico final, as agências regulatórias preveem leis para monitorar essas substâncias. O conceito de *Quality by Design* (*QbD*), uma abordagem sistemática que inicia com objetivos pré-definidos e análise de risco, está sendo amplamente utilizado no âmbito farmacêutico para desenvolver formulações e metodologias analíticas. Sendo assim, este trabalho almejou desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade simples, rápido e sensível utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação simultânea da apixabana e três impurezas sintéticas aplicando a abordagem *QbD*. O desenho experimental foi feito através do software MODDE® 11 (Umetrics, Suíça) e executado utilizando um cromatógrafo Shimadzu® LC-20A Prominence CLAE-DAD com detecção a 220 nm. O método cromatográfico foi estabelecido utilizando uma coluna Inertsil® CN-3 (150 × 4,6 mm, 5,0 µm) com temperatura do forno de 30°C e volume de injeção de 10 µL. A constituição da fase móvel foi metanol e água (50,2:49,8) com fluxo de 1,015 mL/min sem ajuste de pH. O método foi validado seguindo as guias do ICH e da ANVISA, sendo considerado específico, sensível, linear ($r > 0,999$), preciso (DPRs < 10% para as impurezas) e exato. Para especificidade, foi realizada busca de produtos de degradação submetendo os comprimidos de apixabana a condições de estresse (radiação UVC, temperatura, oxidação e hidrólise). As substâncias envolvidas no presente trabalho também foram caracterizadas quimicamente e avaliadas quanto ao seu perfil toxicológico *in vitro* através dos ensaios de MTT e vermelho neutro. A mistura da APX e suas impurezas demonstrou toxicidade aguda, porém este resultado não se manteve durante a exposição prolongada, sugerindo um mecanismo de compensação mitocondrial. Já a impureza 3 apresentou danos significativos em 96 horas de exposição, de modo que mais estudos devem efetuados para avaliar sua toxicidade.

Palavras-chave: apixabana, CLAE, *Quality by Design*, validação, impurezas, produtos de degradação.

ABSTRACT

Apixaban is a novel anticoagulant agent used to prevent and treat venous thromboembolic events in adults who have undergone total hip or knee replacement surgery and to lower the risk of stroke in patients with atrial fibrillation. As impurities and contaminants may be present in the pharmaceutical product, current regulatory guidelines recommend monitoring such substances. The concept of Quality by Design (QbD), a systematic approach that begins with predefined objectives and risk management, is being widely used in the pharmaceutical field to develop new formulations and analytical methods. Thus, the aim of this work was to develop and validate a simple, fast and sensitive stability indicating method by high-performance liquid chromatography (HPLC) for the simultaneous determination of apixaban and three synthesis impurities using QbD approach. Experiments were designed and assessed on MODDE[®] 11 (Umetrics, Sweden) software and carried out in a Shimadzu[®] LC-20A Prominence HPLC-DAD at 220 nm. The HPLC method was established using an Inertsil[®] CN-3column (150 × 4.6 mm, 5.0 μm) at the temperature of 30°C and injection volume of 10 μL. The mobile phase consisted of methanol and water (50.2:49.8) at a flow rate of 1.015 mL/min with no pH adjustment. Validation of the method was conducted according to ICH and ANVISA Guidelines, which was considered specific, sensitive, linear ($r > 0,999$), precise (RSD < 10% for impurities) and accurate. For specificity, a degradation study was performed by exposing apixaban tablets to stress conditions (UVC radiation, temperature, oxidation and hydrolysis). The related substances in the present study were also chemically characterized and toxicological profile was evaluated by *in vitro* tests MTT and neutral red. The mixture of APX and its impurities showed acute toxicity, but this result did not persist during prolonged exposure, suggesting a mitochondrial compensation mechanism. Yet, impurity 3 presented significant damages in 96 hours of exposure and further studies should be considered to evaluate its toxicity.

Keywords: apixaban, HPLC, Quality by Design, validation, impurities, degradation products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais eventos na formação do trombo arterial.	39
Figura 2. Cascata de coagulação sanguínea.	40
Figura 3. Locais de ação dos fármacos anticoagulantes.	42
Figura 4. Estrutura química da apixabana.	44
Figura 5. Representação da rota sintética da apixabana proposta por Xu e colaboradores.	46
Figura 6. Estruturas químicas das impurezas sintéticas a serem investigadas. (A) impureza 1, (B) impureza 2 e (C) impureza 3.	47
Figura 7. Esquema sequencial de aplicação dos passos da abordagem <i>QbD</i> no desenvolvimento de um método analítico otimizado.	57
Figura 8. Representação de Sweet Spot Plot (TERZIC, 2016). Neste gráfico, a zona de atendimento dos critérios é representada pela cor verde, enquanto a cor azul representa inconformidade em pelo menos um dos CQAs estabelecidos.	58
Figura 9. Representação de Design Space (TUMPA, 2016). A escala de cores escolhida vai do vermelho (maior chance de risco) até o verde (zona de maior confiança para alcance simultâneo dos CQAs).	58
Figura 10. Gráfico referente às publicações científicas que utilizaram a abordagem <i>QbD</i> de 2009 até o presente momento, indexadas à base de dados Science Direct. A busca foi realizada com a palavra-chave “Quality by Design” ou “ <i>QbD</i> ” no título, sendo o número acima de cada barra referente a quantidade de publicações para aquele ano (https://www.sciencedirect.com/ , acesso em 18 de janeiro de 2018)	59
Figura 11. Espectro na região do ultravioleta da solução de apixabana SQR a 20 ug/mL em metanol obtido em espectrofotômetro Shimadzu.	69
Figura 12. Espectro na região do ultravioleta da solução SQR da Impureza 1 apixabana a 50 ug/mL em metanol obtido em espectrofotômetro Shimadzu.	70
Figura 13. Espectro na região do ultravioleta da solução SQR da Impureza 2 apixabana a 50 ug/mL em metanol obtido em espectrofotômetro Shimadzu.	70
Figura 14. Espectro na região do ultravioleta da solução SQR da Impureza 3 apixabana a 50 ug/mL em metanol obtido em espectrofotômetro Shimadzu.	71
Figura 15. Curva obtida para a SQR de apixabana realizada por DSC, adquirida em fluxo de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min.	72

Figura 16. Curva obtida para a SQR da Impureza 1 realizada por DSC, adquirida em fluxo de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min.	73
Figura 17. Curva obtida para a SQR da Impureza 2 realizada por DSC, adquirida em fluxo de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min.	73
Figura 18. Curva obtida para a SQR da Impureza 3 realizada por DSC, adquirida em fluxo de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min.	74
Figura 19. Espectro de RMN 1H da apixabana obtido a partir de 20 mg de amostra em Bruker Ascend	75
Figura 20. Espectro de RMN 1H da impureza 1 obtido a partir de 20 mg de amostra em Bruker Ascend.	76
Figura 21. Espectro de RMN 1H da impureza 2 obtido a partir de 20 mg de amostra em Bruker Ascend	77
Figura 22. Espectro de RMN 1H da impureza 3 obtido a partir de 20 mg de amostra em Bruker Ascend	78
Figura 23. Espectro de massas da apixabana a partir de solução a 100 ng/mL e dados adquiridos pelo software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems).	79
Figura 24. Espectro de massas da impureza 1 a partir de solução a 100 ng/mL e dados adquiridos pelo software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems).	80
Figura 25. Espectro de massas da impureza 2 a partir de solução a 100 ng/mL e dados adquiridos pelo software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems).	80
Figura 26. Espectro de massas da impureza 3 a partir de solução a 100 ng/mL e dados adquiridos pelo software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems).	81
Figura 27. The chemical structures of investigated substances a) APX, b) IMP 1, c) IMP 2 and d) IMP 3	91
Figura 28. Fishbone diagram with the method possible critical factors to be evaluated. The chosen ones for screening DoE are in bold.	96
Figura 29. Graphic analysis of the effects of critical process factors on critical quality attributes on the knowledge space investigation.	98
Figura 30. (a) Sweet spot plot results for CN column is predominantly green, demonstrating the possibilities of achieving all the CQAs simultaneously in the established range. (b) Sweet spot plot results for the C8 column resulted only in blue areas, showing no satisfactory simultaneous response.	99
Figura 31. (a) Fit plot for all CQAs. R ² shows the model fit, Q2 represents an estimate of the future prediction precision, model validity tests diverse model problems, and reproducibility is the variation of the replicates compared to overall variability. (b) Sweet spot plot (flow 0.9 – 1.1 and methanol % 48 –	101

53) for the temperature of 30 °C (c) Design space prediction demonstrated a low risk of failure, since there is predominance of green colour, where the risk of the method does not meet the stipulated criteria is minimal. The risk of error increases gradually from yellow to red (d) Experimental chromatogram employing the optimized method. (1) IMP 1, (2) Apixaban, (3) IMP 3, (4) IMP 2.

Figura 32. Representative chromatogram of apixaban in stress conditions at 220 nm. (a) 1 M NaOH (b) 1 M HCl (c) 60 °C (d) UVC radiation and (e) 3% H₂O₂. 104

Figura 33. Representação do cromatograma referente à hidrólise básica sobreposto à mistura de apixabana e impurezas sintéticas adquirido pelo software LabSolutions. Produto básico majoritário (1), impureza 1 (2), produto básico (3), apixabana (4a), apixabana após hidrólise (4b), impureza 3 (5), impureza 2 (6). 109

Figura 34. Representação dos cromatogramas obtidos para análise da apixabana e suas impurezas sintéticas antes (a) e depois (b) da aplicação da abordagem *QbD*. No primeiro cromatograma, a análise tem tempo total de 10 minutos e todos compostos estão na concentração de 25 µg/mL. Já no cromatogramas (b), as substâncias estão a 100% da concentração de trabalho (25 µg/mL para apixabana e 5 µg/mL par as impurezas), totalizando 6 minutos de análise. 110

Figura 35. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à apixabana (a) e à impureza 1 (b) pelo ensaio do vermelho neutro por 24h. 119

Figura 36. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à impureza 2 (a) e à impureza 3 (b) pelo ensaio do vermelho neutro por 24h 119

Figura 37. Resultados da avaliação citotóxica por vermelho neutro de células HepG2 frente à mistura da apixabana contaminada com as impurezas 1, 2 e 3 a 1% da sua concentração por 24h. 120

Figura 38. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à apixabana (a) e à impureza 1 (b) pelo ensaio do MTT por 24h. 120

Figura 39. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à impureza 2 (a) e à impureza 3 (b) pelo ensaio do MTT por 24h. 121

Figura 40. Resultados da avaliação citotóxica por MTT de células HepG2 frente à mistura da apixabana contaminada com as impurezas 1, 2 e 3 a 1% da sua concentração por 24h. 121

Figura 41. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à apixabana (a), à impureza 1 (b) e à impureza 2 (c) pelo ensaio do VN por 96h. 122

Figura 42. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à impureza 3 (b) pelo ensaio do VN por 96h. 122

Figura 43. Resultados da avaliação citotóxica por vermelho neutro de células HepG2 frente à mistura da apixabana contaminada com as impurezas 1, 2 e 3 a 1% da sua concentração por 96h. 123

Figura 44. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à apixabana (a), à impureza 1 (b) e à impureza 2 (c) pelo ensaio do MTT por 96h. 123

Figura 45. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à impureza 3 pelo ensaio do MTT por 94h. 124

Figura 46. Resultados da avaliação citotóxica MTT de células HepG2 frente à mistura da apixabana contaminada com as impurezas 1, 2 e 3 a 1% da sua concentração por 96h. 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de análise de apixabana e suas impurezas por cromatografia líquida encontrados na literatura.	48
Tabela 2. Limites de notificação, identificação e qualificação de impurezas em substâncias ativas.	53
Tabela 3. Limites de notificação, identificação e qualificação para produtos de degradação.	54
Tabela 4. Atribuição dos sinais obtidos no espectro de RMN 1H da apixabana	75
Tabela 5. Atribuição dos sinais obtidos no espectro de RMN 1H da Impureza 1.	76
Tabela 6. Atribuição dos sinais obtidos no espectro de RMN 1H da Impureza 2.	77
Tabela 7. Atribuição dos sinais obtidos no espectro de RMN 1H da Impureza 3	78
Tabela 8. Critical process factors elected and their ranges for screening DoE runs	97
Tabela 9. CPFs and CQAs values for optimization DoE.	99
Tabela 10. Validation parameters. a – slope, b – intercept, r – correlation coeficiente.	103
Tabela 11. Concentrações contidas na mistura a ser avaliado por VN e MTT em 24 e 96 horas.	117

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APX	Apixabana
ATP	<i>Analytical target profile</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
CDTF	Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico
CFS	Cromatografia de fluido supercrítico
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CPFs	<i>Critical process factors</i>
CQAs	<i>Critical quality attributes</i>
DCVs	Doenças cardiovasculares
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DoE	<i>Design of experiments</i>
DS	<i>Design space</i>
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EC	Eletroforese capilar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Espectrometria de massas
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
F_x	Fator X ativado
ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazolio
NAODs	Anticoagulantes orais diretos
OMS	Organização Mundial da Saúde
QbD	<i>Quality by Desing</i>
QRA	<i>quality risk assessment</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RSD	Desvio padrão relativo
SQR	Substância química de referência
TEV	Tromboembolismo venoso
UV	Ultravioleta
VN	Vermelho neutro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	31
		32
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	REVISÃO DE LITERATURA	35
		36
3.1	Trombose: uma doença cardiovascular	37
3.2	Tratamentos farmacológicos	41
3.3	Apixabana	43
3.3.1	Síntese	45
3.3.2	Análise quantitativa da apixabana	47
3.3.3	Estudos de estabilidade da apixabana	48
3.3.4	Análise de impurezas da apixabana	50
3.4	Análise e controle de impurezas em produtos farmacêuticos	51
3.5	Técnicas analíticas aplicadas na análise de impurezas	55
3.6	Quality by Design	56
3.7	Validação da metodologia analítica	59
3.8	Avaliação da Toxicidade	60
4	CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO DA SQR DA APIXABANA E SUAS IMPUREZAS SINTÉTICAS	63
		64
4.1	Introdução	65
4.2	Materiais	66
4.2.1	Substâncias químicas de referência de apixabana e impurezas sintéticas	66
4.3	Métodos	67
4.3.1	Espectroscopia na região do UV	67
4.3.2	Calorimetria Exploratória Diferencial	67
4.3.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	67
4.3.4	Espectrometria de Massas	68
4.4	Resultados e Discussão	68
4.4.1	Resultados para espectroscopia na região do UV	68
4.4.2	Resultados para Calorimetria Exploratória Diferencial	71
4.4.3	Resultados para Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	74
4.4.4	Resultados para Espectrometria de Massas	79

5	Conclusões	81
6	CAPÍTULO II. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE APIXABANA E SUAS IMPUREZAS	83
6.1	Introdução	85
6.2	ARTIGO CIENTÍFICO: Quality by Design approach for a stability-indicating method to determine apixaban and its related impurities	87
	87
6.3	Estudo preliminar de estabilidade OU de degradação forçada	109
6.4	Aplicação do <i>QbD</i>	109
6.5	Conclusão	111
7	CAPÍTULO III. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS IMPUREZAS DA APIXABANA	113
7.1	Introdução	115
7.2	Materiais e Métodos.....	116
7.2.1	Linhagem.....	116
7.2.2	Planejamento dos ensaios.....	116
7.2.3	Preparo de amostra	117
7.3	Resultados e discussão	118
7.4	Conclusão	125
8	CONCLUSÕES.....	127
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são um grupo de males que acometem o coração e os vasos sanguíneos e, representam hoje as principais causas de morte no Brasil e no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 17 milhões de pessoas morreram devido a DCVs no ano de 2015, enquanto a Sociedade Brasileira de Cardiologia estima em torno de 400 mil mortes em 2016, (OMS, 2016; SBC, 2017; WHO, 2017).

As DCV são geralmente acarretadas por alguma falha na irrigação sanguínea de órgãos como coração e cérebro, bem como membros inferiores e superiores. Apesar de serem uma importante causa de mortes, as DCVs poderiam ser prevenidas por meio da abordagem de fatores comportamentais de risco, tais como má alimentação, tabagismo, sedentarismo e alcoolismo (WHO, 2011).

A trombose é uma DCV associada à formação de coágulos decorrentes da inadequada ativação dos mecanismos hemostáticos – responsáveis pela interrupção do sangramento de vasos sanguíneos lesados. Um quadro trombótico pode ter como consequência clínica isquemia por obstrução vascular local ou embolia à distância. Além disso, pode causar infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC) (HOFFBRAND, 2013).

A terapia farmacológica utilizada para tratar ou prevenir a trombose ou o tromboembolismo é bastante frequente, uma vez que estas doenças são bastante prevalentes e podem levar a óbito. Estes fármacos podem atuar na coagulação sanguínea, na função plaquetária ou na remoção da fibrina (fibrinólise) (RANG, 2012).

A apixabana é um inibidor potente, oral, direto e altamente seletivo que se liga reversivelmente ao sítio de ativação do Fator Xa (FXa). Ela inibe o FXa livre e ligado ao coágulo, e a atividade da pro-trombinase. A apixabana não tem efeitos diretos na agregação plaquetária, mas indiretamente inibe a agregação plaquetária induzida pela trombina. Ao inibir o FXa, a apixabana previne a geração de trombina e o desenvolvimento do trombo (LASSEN, 2007; TURPIE, 2007).

O medicamento foi desenvolvido através da parceria dos laboratórios Bristol-Myers Squibb e Pfizer, recebendo o nome comercial de Eliquis[®]. Ele se apresenta na forma de comprimidos revestidos, disponível nas dosagens de 2,5 ou 5 mg de apixabana, devendo ser administrado no máximo duas vezes ao dia.

A apixabana foi aprovada em maio de 2011 pela *European Medicines Agency* (EMA), em abril de 2012 pela *Health Canada* e, em dezembro de 2012, pelo *Food*

and Drug Administration (FDA) para prevenção de eventos de tromboembolismo venoso (TEV) e acidente vascular cerebral (EMA, 2011; FDA, 2012; Health Canada, 2012).

No Brasil, a apixabana tem aprovação desde julho de 2011 para prevenção de eventos de TEV em pacientes adultos que foram submetidos à artroplastia eletiva de quadril ou de joelho e, para prevenção de acidente vascular cerebral em adultos com fibrilação atrial não valvular desde 2013 (ANVISA, 2013).

No que se refere à segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos, o controle de qualidade de medicamentos é peça fundamental para comprovação da qualidade dos mesmos. Tendo em vista a competitividade no setor farmacêutico, a qualidade constitui uma importante ferramenta na conquista da credibilidade para destaque no mercado consumidor.

Atualmente, as agências regulatórias tem aumentado o rigor das legislações e as exigências relacionadas às análises que devem ser realizadas nos produtos farmacêuticos. As análises solicitadas englobam desde estudos iniciais de desenvolvimento e pré-formulação, como também avaliações do processo produtivo (síntese e manufatura) e da estabilidade. Há também a necessidade de constante monitoramento da pureza e integridade do medicamento durante toda sua vida de prateleira.

Dentre as demandas mais atuais, encontra-se a preocupação com fornecimento de estudos de estabilidade e controle de impurezas dos produtos farmacêuticos, seja matéria-prima ou produto acabado.

Isto se dá porque que os ativos farmacêuticos presentes em formulações podem não estar absolutamente puros. A *International Conference of Harmonization* (ICH) define como impureza toda substância presente que não seja o próprio insumo farmacêutico (ou excipientes, no caso do produto acabado). Estas podem ser oriundas da síntese (intermediários ou resíduos de solventes utilizados), do processo de produção do medicamento ou de degradações do fármaco devido a inúmeros fatores, incompatibilidade de embalagem e excipientes, ou até mesmo pela ação de fatores extrínsecos (ICH Q3A(R2), 2006; ICH Q3B(R2), 2006).

Deste modo, faz-se necessária a investigação mais aprofundada de tais substâncias, visto que podem afetar não apenas características intrínsecas ao fármaco, como solubilidade e eficácia terapêutica, mas principalmente a segurança do paciente, provocando efeitos adversos e toxicidade.

Como a gama de classes químicas dos contaminantes pode ser muito variada e, principalmente nos casos de degradação, as substâncias são desconhecidas, a caracterização do perfil de impurezas representa um desafio analítico considerável. No entanto, ainda devido à diversidade destas substâncias, o entendimento das impurezas é bastante importante para os fabricantes, pois informações estruturais podem auxiliar na identificação de sua origem e buscar alternativas para eliminá-las.

Por ser um medicamento novo, não há monografias farmacopeicas ou em compêndios oficiais para análise da apixabana (matéria-prima e produto acabado). Na literatura científica pesquisada, são poucos os trabalhos que descrevem métodos para análise de impurezas do fármaco aplicáveis à forma farmacêutica comprimido e à matéria-prima.

Tendo em vista o exposto, o desenvolvimento de ferramentas analíticas seletivas para a detecção, separação e quantificação do fármaco e potenciais impurezas nos produtos farmacêuticos mostra-se extremamente necessário dentro do controle de qualidade, bem como a validação destas metodologias, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar metodologia analítica para avaliação da apixabana na forma farmacêutica comprimido, bem como de suas impurezas, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando *Quality by Design*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a substância química de referência (SQR) de apixabana pelas técnicas analíticas de espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Desenvolver e validar um método por CLAE, indicativo de estabilidade, para identificação e determinação quantitativa de apixabana nos comprimidos na presença de impurezas sintéticas;
- Utilizar a técnica de *Quality by Design* durante o desenvolvimento analítico, com intuito de obter um método reprodutível com controle estratégico efetivo, redução do número de análises e de tempo no desenvolvimento.
- Aplicar o método proposto para a detecção e quantificação das impurezas de síntese da apixabana;
- Realizar avaliação da estabilidade do fármaco frente a condições drásticas de luz, temperatura, e estresse químico segundo as guias de estabilidade, a fim de conhecer os produtos formados;
- Avaliar a toxicidade aguda e subcrônica das impurezas de síntese por metodologia *in vitro*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Trombose: uma doença cardiovascular

As DCVs são a principal causa de mortalidade, morbidade e hospitalização no mundo desenvolvido. Segundo a OMS, estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2015, o que representou 31% das mortes em todo mundo (WHO, 2017).

No Brasil, segundo dados do DATASUS, as DCVs foram responsáveis por 11% das internações hospitalares e cerca de 19,5% dos recursos gastos pelo SUS com internações em geral. De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia, as DCVs representaram em torno de 29% dos óbitos no país de 2004 a 2013. Estima-se, também, que só no ano de 2016, 400 mil brasileiros foram vitimados por alguma DCV (SERRANO, 2009; SBC, 2013).

Alguns fatores de risco podem contribuir para o desenvolvimento de DCVs, sendo estes tanto de origem metabólica - como dislipidemia, hipertensão, diabetes e sobrepeso/obesidade - quanto comportamental (tabagismo, alcoolismo e sedentarismo) e, até mesmo sociais, como qualidade de vida e baixa escolaridade. Apesar dos números alarmantes, as DCVs podem ser evitadas com medidas relativamente simples, tais como dieta balanceada incluindo frutas e verduras, redução da ingestão de sal e prática regular de exercícios físicos. Ainda, o incentivo de políticas de saúde que promovam campanhas antitabagismo e consumo moderado de álcool, bem como acesso a medicamentos para tratamento da hipertensão e diabetes também controlaria estes potenciais riscos (WHO, 2011).

A trombose é uma DCV que leva à obstrução do lúmen de artérias ou veias, resultante da inadequada ativação dos mecanismos hemostáticos – responsáveis pela interrupção do sangramento de vasos sanguíneos lesados. A formação de trombos está associada à presença da tríade: estase venosa, lesão endotelial e hipercoagulabilidade. A doença trombótica e tromboembólica tem como principais consequências infarto do miocárdio, AVC, trombose venosa profunda e embolia pulmonar (RANG, 2012; BRAUNWALD, 2013).

Muitos são os fatores associados ao aumento no risco de desenvolvimento de tromboembolismo, tais como cirurgia venosa ou ortopédica prévias, idade avançada, insuficiência cardíaca congestiva e edema crônico de membros inferiores, imobilização, obesidade, uso de contraceptivos orais e hormônios, e perda excessiva de sangue e transfusão (CASSONE, 2002; RANG, 2012).

A contração muscular é importante para manutenção adequada da fluidez sanguínea. Casos de imobilização prolongada podem levar ao acúmulo de sangue nas pernas, provocando inchaço e desconforto. Esta imobilidade é um dos fatores que podem levar a um quadro de trombose venosa profunda. Estudos epidemiológicos da OMS apontaram que viagens aéreas superiores a 4 horas aumentam de 2 a 3 vezes o risco de eventos tromboembólicos. A trombose venosa pode fazer com que os tecidos drenados pela veia tornem-se edematosos e inflamados, podendo ser agravada por embolia. Sem profilaxia, a trombose venosa profunda pode ocorrer em 40% a 70% dos submetidos à artroplastia (CASSONE, 2002; GOODMAN, 2010; WHO, 2017).

Comumente, os coágulos são pequenos e não geram sintomas, visto que o organismo saudável é capaz de dissolvê-los sem prejuízos. Já coágulos maiores podem provocar dor e inchaço dos membros. É possível que o coágulo migre, através da corrente sanguínea, para os pulmões, levando a um quadro de embolia pulmonar. Esta, por sua vez, tem como sintomas dor torácica, falta de ar e, em casos graves, morte súbita. Este deslocamento pode ocorrer horas ou até dias após a formação do coágulo na perna (WHO, 2017).

Os trombos podem ser divididos em arterial e venoso. Um trombo arterial, como ilustrado na Figura 1, consiste principalmente em plaquetas numa rede de fibrina e geralmente estão associados à aterosclerose, podendo interromper o fluxo sanguíneo, causando isquemia ou falência do tecido à distância. Já um trombo venoso tem composição parecida com a de um coágulo sanguíneo e aspecto gelatinoso. O trombo pode desprender-se do local ao qual está aderido e deslocar-se pela circulação formando um êmbolo, podendo se alojar nos pulmões, artéria, cérebro, entre outros. Entre as consequências mais graves estão AVC e morte (RANG, 2012).

A hemostasia é a interrupção do sangramento de vasos sanguíneos lesados, sendo um mecanismo essencial à vida. O sistema hemostático é basicamente composto por endotélio vascular – que atua como uma barreira dinâmica – plaquetas e pelos sistemas de coagulação e de fibrinólise, responsáveis pela formação e degradação de coágulos respectivamente (RANG, 2012; BRAUNWALD, 2013).

Fisiologicamente, o endotélio dos vasos sanguíneos inibe a aderência das plaquetas e dos leucócitos, evitando assim a formação de trombos. Em um caso de

lesão vascular, o primeiro mecanismo é a vasoconstrição, diminuindo o lúmen do vaso para redução do fluxo sanguíneo. Com a liberação do fator de von Willebrand, as plaquetas formam um tampão, a fim de minimizar a hemorragia (BRAUNWALD, 2013).

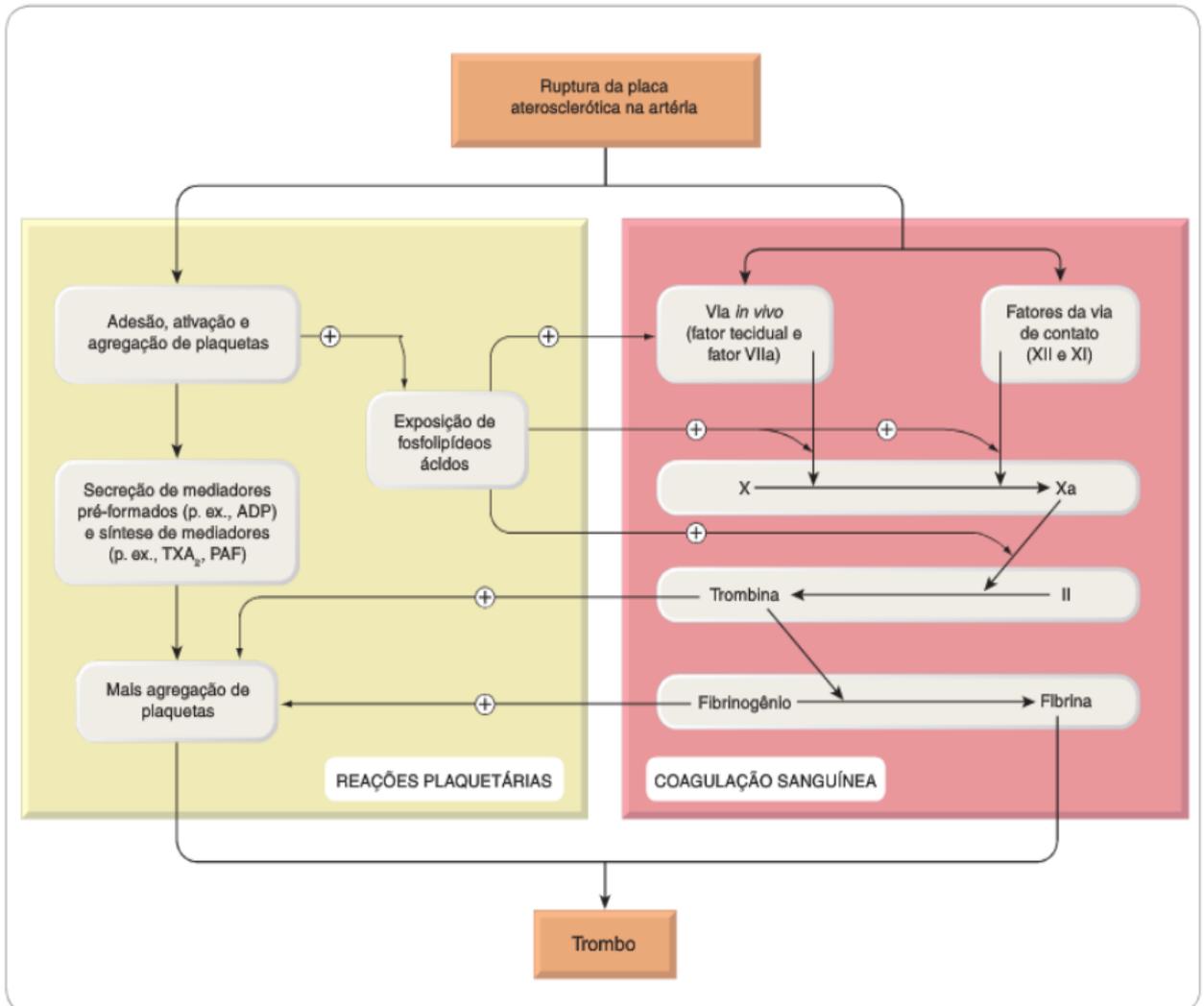


Figura 1. Principais eventos na formação do trombo arterial (RANG, 2012).

A cascata da coagulação consiste em um sistema biológico de amplificação que envolve uma cascata de enzimas proteolíticas e cofatores. Nela, precursores iniciais são consecutivamente ativados por proteólise, culminando na formação do coágulo. A atividade dos fatores de coagulação II, VII, IX e X é dependente de vitamina K para sua síntese e de cálcio para sua ativação. (RANG, 2012; HOFFBRAND, 2013).

A cascata de coagulação pode ser ativada por duas vias, como consta na Figura 2. A via intrínseca é acionada após uma lesão tecidual, em que há rompimento entre o endotélio e o vaso sanguíneo, expondo o sangue ao colágeno da parede vascular. Os fatores envolvidos nesta via são XII, XI, IX e VIII. A via extrínseca é iniciada por uma lesão vascular, de modo que o sangue tem contato com a tromboplastina tecidual. Relacionadas a esta via estão a liberação de fator tecidual e a ativação do fator VII. A ativação do fator X a Xa é importante sítio para amplificação da cascata, além de ser o ponto de convergência entre as vias intrínseca e extrínseca, constituindo assim a via comum (RANG, 2012; BRAUNWALD, 2013; HOFFBRAND, 2013).

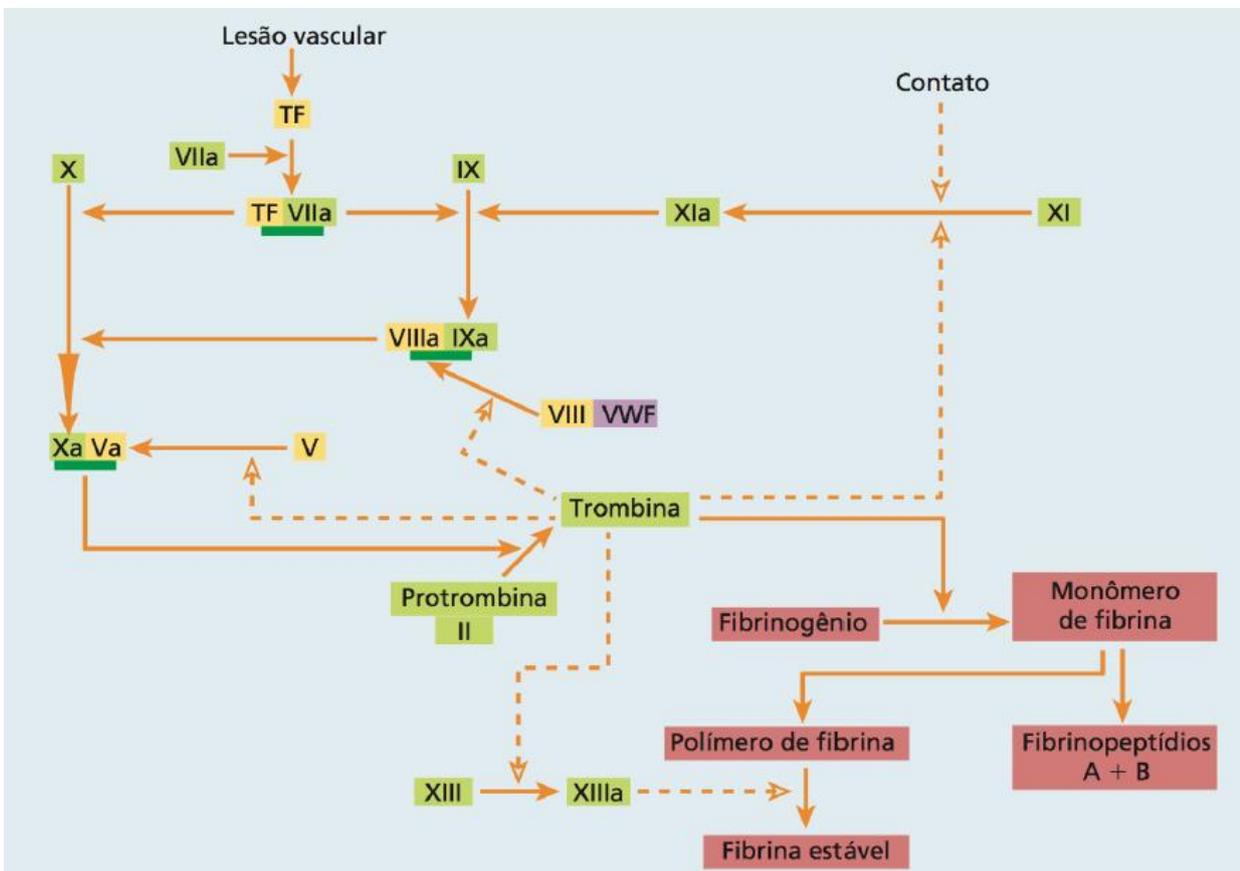


Figura 2. Cascata de coagulação sanguínea (HOFFBRAND, 2013).

O fator X ativado liga-se ao seu cofator Va, formando o complexo da protrombinase, que resulta na formação da trombina. Derivada da protrombina (II), ela é a última enzima da cascata, responsável pela conversão do fibrinogênio (I) solúvel do plasma em redes de fibrina polimerizada, que constituem o coágulo sanguíneo (HOFFBRAND, 2013).

Tal como a ativação da cascata de coagulação, o processo de lise do coágulo também é uma resposta hemostática normal à lesão. Na fibrinólise, através da lise da fibrina pela plasmina, ocorre a degradação do coágulo em pequenos produtos solúveis. Estes são liberados na corrente sanguínea, onde são eliminados pelos macrófagos. Além da fibrinólise, a coagulação sanguínea é modulada por inibidores enzimáticos, como a antitrombina III (RANG, 2012; HOFFBRAND, 2013).

3.2 Tratamentos farmacológicos

Durante décadas, a terapia para tratamento e prevenção de eventos trombóticos com anticoagulante foi baseada na administração de duas classes diferentes: os antagonistas da vitamina K (como a varfarina), e as heparinas (FAVALORO, 2015; HUYNH, 2017).

A varfarina é o anticoagulante oral mais utilizado no mundo e atua como antagonista da vitamina K, elemento essencial para a cascata de coagulação. Embora a varfarina tenha demonstrado ser altamente eficaz para a prevenção do tromboembolismo, seu uso é limitado pela necessidade de constante monitoramento dos pacientes devido ao risco de sangramento e estreita janela terapêutica. Além disso, o fármaco apresenta diversas interações, tanto medicamentosas quanto com alimentos (GOODMAN, 2013; MAKARYUS, 2013; HUYNH, 2017).

A heparina é um mucopolissacarídeo ácido, negativamente carregado e de elevado peso molecular. Seu mecanismo está relacionado com a inibição da cascata de coagulação através da potencialização da atividade da antitrombina III. Em razão de sua carga e peso molecular, a heparina não é absorvida no intestino, de modo que sua administração se dá pelas vias intravenosa ou subcutânea. As heparinas ainda podem ser de baixo peso molecular, essas sendo administradas unicamente pela via subcutânea, porém, não são tão potentes, levando à diminuição no intervalo de dose (RANG, 2012; HOFFBRAND, 2013).

Na última década, pôde-se observar um crescimento exponencial de novos agentes anticoagulantes e antiagregantes plaquetários desenvolvidos para uso clínico, com intuito de substituir os tratamentos antigos. A literatura científica tem trazido cada dia novas evidências de aplicações desses fármacos, sendo alguns deles já aprovados pela ANVISA para uso no Brasil como a dabigatrana, a rivaroxabana e a apixabana. Esse fato traz alternativas ao tratamento, porém impõe

tanto recomendações quanto restrições específicas e riscos associados a cada medicamento que devem ser observados antes de utilizá-los (SBC, 2013; HUYNH, 2017).

Uma estratégia chave para descoberta e desenvolvimento de novos anticoagulantes tem como foco enzimas específicas da cascata de coagulação sanguínea, conforme ilustrado na Figura 3. Uma abordagem interessante é a inibição da geração de trombina, por inibição do fator Xa (FXa) de coagulação. Isto porque o FXa é o primeiro local de amplificação da cascata, uma vez que uma molécula de FXa catalisa a formação de aproximadamente 1000 moléculas de trombina (PINTO, 2007; TURPIE, 2007).

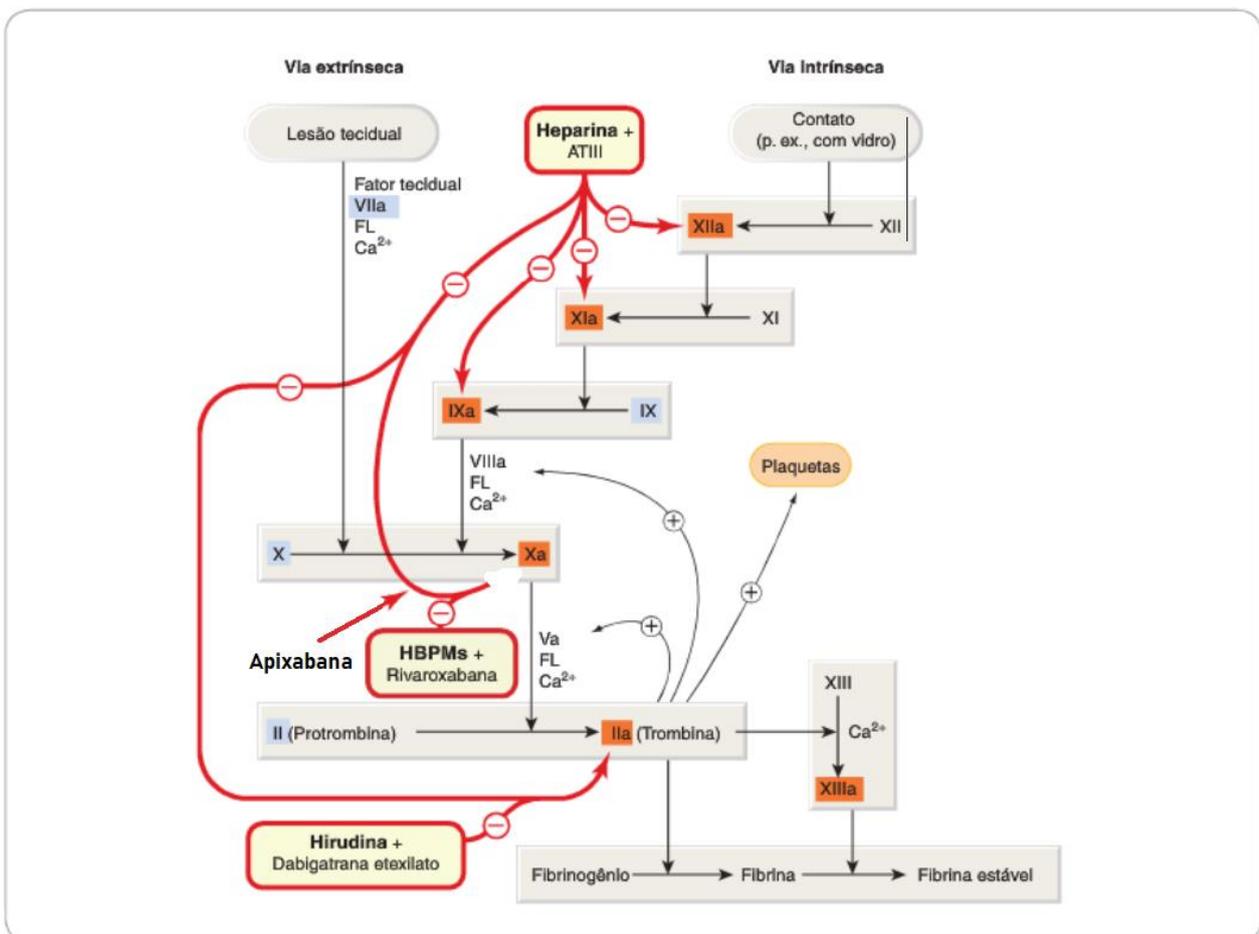


Figura 3. Locais de ação dos fármacos anticoagulantes (adaptado de RANG, 2012).

Desta forma, os novos anticoagulantes orais diretos (NAODs) estão sendo desenvolvidos para proporcionar inibição direta dos fatores IIa (trombina) ou Xa. Além da administração oral, os fármacos desta classe tem como principais vantagens o fato de serem utilizados em doses fixas, o que teoricamente

proporciona um perfil farmacocinético mais homogêneo, além de não necessitarem de monitoramento laboratorial, sendo assim mais seguros (MAKARYUS, 2013; FAVALORO, 2015).

A dabigatrana foi o primeiro representante da classe dos NAODs a obter aprovação, tendo como mecanismo de ação a inibição competitiva da trombina. Já a rivaroxabana foi o primeiro inibidor direto do FXa comercialmente disponível. A apixabana é um inibidor direto do FXa mais novo e mais potente que a rivaroxabana. Em termos de utilização, os agentes inibidores do FXa já ultrapassaram os inibidores da trombina (BONAR, 2016; HUYNH, 2017).

3.3 Apixabana

Apixabana é um potente inibidor reversível do fator Xa livre e do complexo protrombinase com elevada seletividade. Ela não requer antitrombina III para desempenhar sua atividade antitrombótica. Apesar de não possuir efeito direto sobre a agregação plaquetária, a apixabana inibe a agregação plaquetária induzida pela trombina (FROST, 2012; AUSTRÁLIA, 2015).

As atividades antitrombóticas e anti-Xa foram demonstradas em ensaios *in vitro* e em espécies animais *in vivo*. Os pacientes tratados com apixabana demonstraram redução de 21% no risco de sofrer AVC em relação àqueles que receberam o tratamento padrão com varfarina. Além disso, houve redução relativa de 31% do risco de hemorragia, especialmente no cérebro, e em 11% no risco de morte. A apixabana também se destaca como superior à enoxaparina na profilaxia primária da TEV e à varfarina na prevenção de AVC e redução de eventos hemorrágicos (LASSEN, 2007; LASSEN, 2010; GRANGER, 2011).

O fármaco apresenta baixo volume de distribuição, *clearance* total reduzido, boa biodisponibilidade oral (acima de 50%) e é eliminado por várias vias, incluindo hepática, renal e excreção biliar. Apesar da via renal, o medicamento pode ser o mais indicado para pacientes com insuficiência renal. Ele é rapidamente absorvido oralmente, com concentrações máximas aparecendo entre 1 e 3 h após a administração e possui meia-vida de 8 a 15 horas (LASSEN, 2007; ROMUALDI, 2011; FROST, 2012; MAKARYUS, 2013).

Da dose administrada de apixabana em humanos, aproximadamente 25% é recuperada como metabólitos. A apixabana inalterada é o principal componente

relacionado ao fármaco presente no plasma humano sem metabólitos ativos circulantes presentes. O metabólito majoritário é O-desmetil apixabana sulfato, que não é farmacologicamente ativo. A ligação às proteínas plasmáticas em humanos é de aproximadamente 87%. Sua eliminação ocorre principalmente pelas fezes – em torno de 50% - e, em menor proporção, metabolizado pelo citocromo 450 e excretado pelo fígado e urina (AUSTRÁLIA, 2011; MAKARYUS, 2013).

A denominação da apixabana conforme a IUPAC é 1-(4-metil fenil)-7-oxo-6-[4-(2-oxo piperidina-1-il)fenil]-4,5-dihidropirazol[5,4-c]piridina-3-carboxamida, e sua fórmula molecular é $C_{25}H_{25}N_5O_4$. Possui massa molar de 459,48 g/mol e sua estrutura química está representada na Figura 4. A apixabana é uma molécula não-quiral, sem polimorfismo conhecido e com classificação biofarmacêutica classe III, apresentando alta solubilidade e baixa permeabilidade (PINTO, 2007; AUSTRÁLIA, 2015).

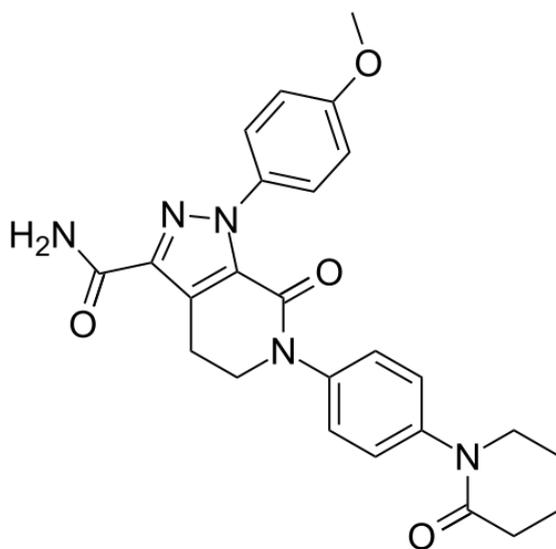


Figura 4. Estrutura química da apixabana.

No Brasil, a apixabana é vendida comercialmente sob o nome Eliquis[®], que se apresenta na forma de comprimidos revestidos contendo o equivalente a 2,5 ou 5 mg de apixabana. O medicamento foi desenvolvido através da parceria dos laboratórios Bristol-Myers Squibb e Pfizer e obteve sua aprovação em julho de 2011 para prevenção de eventos de tromboembolismo venoso em pacientes adultos que foram submetidos à artroplastia eletiva de quadril ou de joelho e, desde 2013, para

prevenção de acidente vascular cerebral em adultos com fibrilação atrial não valvular (ANVISA, 2013).

3.3.1 Síntese

A síntese registrada pela Bristol-Myers Squibb se mantém sob proteção patentária até 2021 no Brasil. Somente após este período farmoquímicas poderão produzir o fármaco. Desta forma, é importante atentar-se não apenas a uma forma de preparo específica, mas sim adotar um olhar global, principalmente tendo em vista que o Brasil não possui muitas indústrias farmoquímicas capazes de sintetizar matérias-primas de fármacos em larga escala, demandando sua importação.

Na literatura científica, é possível encontrar rotas de preparo deste insumo oriundas de diversos países. A síntese proposta por Xu e colaboradores (2015), apresentada na Figura 5, ocorre em 3 etapas (XU, 2015).

Dentre as moléculas apresentadas, os três intermediários finais, representados na Figura 6, chamam atenção, pois, embora estejam presentes em várias outras propostas de síntese, não possuem informações quanto à atividade farmacológica ou toxicidade. Com exceção do último passo, não há métodos na literatura científica que contemplem a análise das impurezas oriundas desta rota sintética para produção de apixabana (PINTO, 2007; MAXWELL, 2011; AGRAWAL, 2012; NEVULURI, 2017; SUN, 2017).

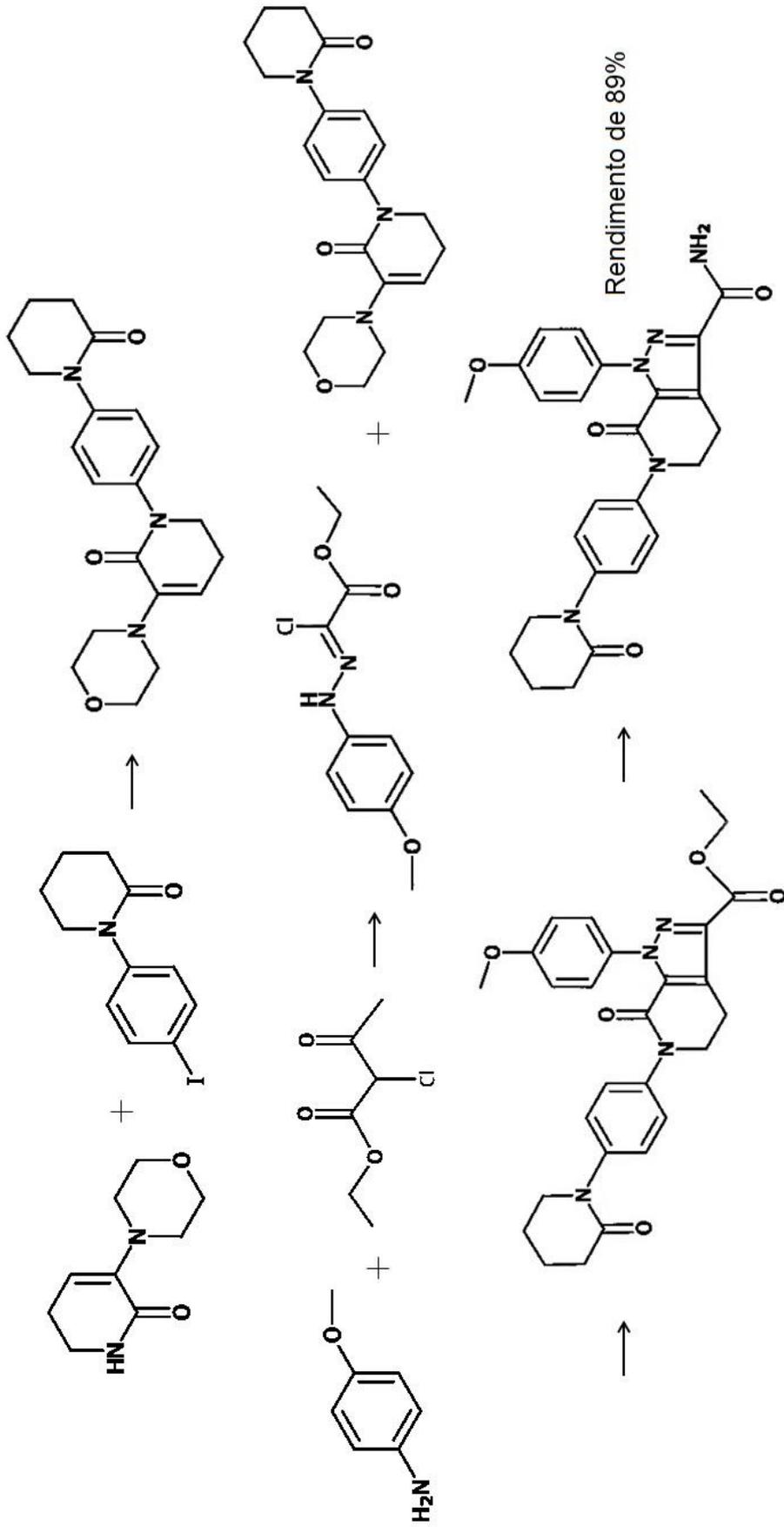


Figura 5. Representação da rota sintética da apixabana proposta por Xu e colaboradores (XU, 2015).

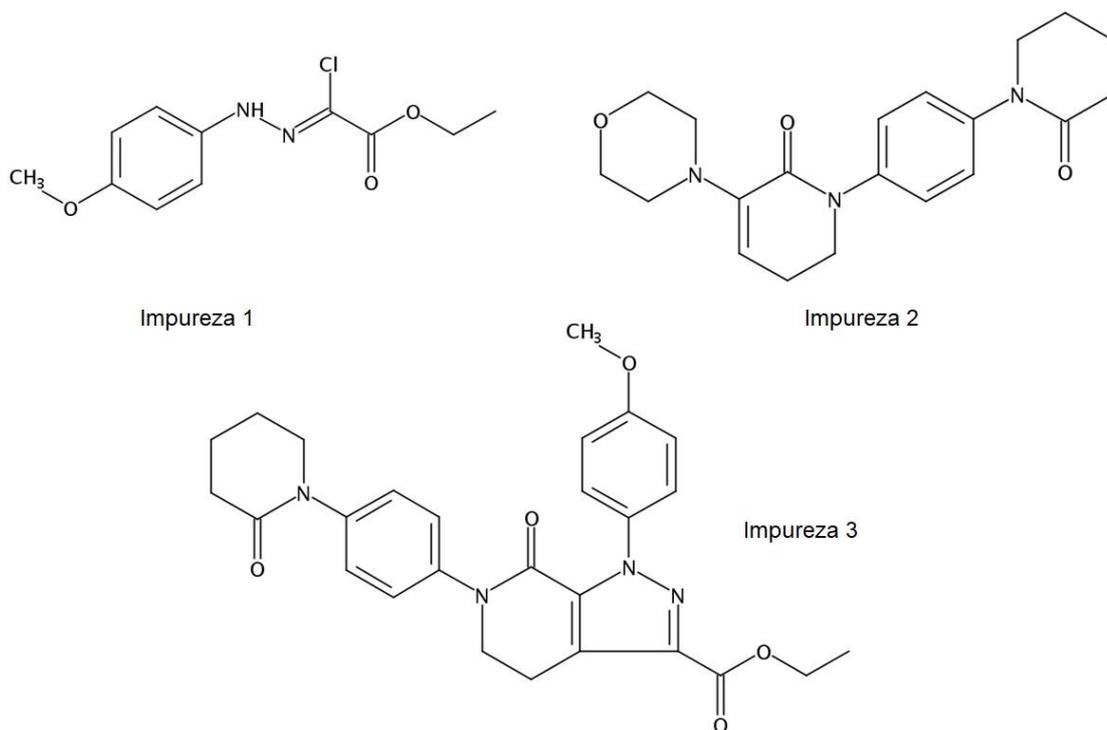


Figura 6. Estruturas químicas das impurezas sintéticas a serem investigadas.

3.3.2 Análise quantitativa da apixabana

Na literatura científica, constam alguns estudos para quantificação da apixabana voltada para estudos farmacocinéticos e avaliação de impurezas. Zhang e colaboradores (2016) desenvolveram um método hifenado CLAE-EM para avaliação simultânea de três anticoagulantes orais em plasma de ratos. Também propondo acoplamento destas técnicas, Delavenne e colaboradores (2013) realizaram a separação e quantificação da apixabana em plasma humano por método gradiente, seguida por identificação dos analitos através do monitoramento de transições.

Ainda em plasma humano, Pursley e colaboradores (2014) utilizaram coluna Chromolith[®] monolítica e modo isocrático para quantificar apixabana e seu principal metabólito. Os demais métodos estão relacionados com determinação da apixabana matéria-prima e suas impurezas (sintéticas e de degradação), detalhados na Tabela 1.

Tabela 1: Métodos de análise de apixabana e suas impurezas por cromatografia líquida encontrados na literatura.

Coluna/Detecção	Fase móvel	Tempo de análise	Referência
C18 25 cm / CLAE 220 nm	Tampão fosfato e metanol Modo gradiente	60 min	PRABHUNE <i>et al.</i> , 2014
Zorbax Bonus® 25 cm / CLAE 270 nm	Acetonitrila e água (90:10) Modo isocrático	35 min	GOTTAPU <i>et al.</i> , 2015
Core shell C18 10 cm / CLAE 225 nm	Tampão fosfato e acetonitrila Modo gradiente	40 min	LANDGE <i>et al.</i> , 2015
C18 25 cm / CLAE/EM-EM 220 nm	Acetonitrila e água Modo gradiente	25 min	SECRETÁN <i>et al.</i> , 2015
C18 25 cm / CLAE 275 nm	Tampão fosfato, acetonitrila e trietanolamina (53:47:0,03) Modo isocrático	7 min	TANTAWY <i>et al.</i> , 2016

3.3.3 Estudos de estabilidade da apixabana

Até o momento, os principais estudos envolvendo método de determinação da apixabana estão relacionados à sua estabilidade e a presença de produtos de degradação. Prabhune e colaboradores (2014) conduziram estudo para avaliar a estabilidade do insumo farmacêutico, submetendo apixabana a hidrólise ácida e básica (HCl M e NaOH 5 M, respectivamente), oxidação (H₂O₂ 1%), fotólise (radiação UV) e alta temperatura (105 °C). O grupo encontrou degradação superior a 12% quando o fármaco foi submetido ao meio ácido, mantido a 60 °C por 3,5 horas. Nas demais condições, não se observou decréscimo no teor da apixabana. A análise foi conduzida em CLAE, utilizando equipamento da Waters®, coluna C18 de 25 cm a 30 °C e detecção em 220 nm. Em modo gradiente, a fase móvel contendo tampão fosfato pH 4,5 e metanol foi eluída na vazão de 1,0 mL/min, totalizando 60 minutos de análise.

Durante a validação do método analítico, Landge e colaboradores (2015) promoveram a degradação dos comprimidos de apixabana, que foram sujeitos à câmara de fotoestabilidade por 1,2 milhões de *lux hours*, estufa a 105 °C durante 7 dias, oxidação com H₂O₂ 15% por 24 horas e hidrólises ácida (24 horas em HCl 1 M) e básica (2 horas em NaOH 1 M). Como resultados, foram encontrados um produto majoritário ácido e um básico, representando 3,2% e 20,06% da área total de seus respectivos cromatogramas. A análise, com duração de 40 minutos, foi realizada em CLAE Agilent com detector de fotodiodos a 225 nm, equipado com coluna C18 de 10 cm. A fase móvel era constituída por tampão fosfato e acetonitrila, em modo gradiente, na vazão de 1,0 mL/min.

Também em CLAE, mas utilizando detector EM, Secretán e colaboradores (2015) estudaram o comportamento dos comprimidos de apixabana frente a condições de estresse. Nas condições fotolíticas (UVA e UV visível por 36 horas), térmicas (7 dias a 80 °C) e oxidativas (H₂O₂ 3% por 72 horas) não ocorreu degradação. Já na hidrólise, os pesquisadores encontraram dois produtos oriundos da degradação básica (NaOH 0,1 M por 3 horas) e 6 produtos da degradação ácida (HCl 0,1 M por 24 horas). O método cromatográfico fez uso de coluna Zorbax[®] C18 de 25 cm a 25 °C, tendo analisado as amostras a 220 nm e tempo total de 25 minutos. A fase móvel, composta por água e acetonitrila em modo gradiente, foi eluída numa vazão de 1,0 mL/min. A espectrometria de massas possibilitou a elucidação estrutural dos produtos de degradação, utilizando um triplo quadrupolo íon trap com ionização por *electrospray* em modo positivo. Através dessa análise, foi possível propor a rota de formação das impurezas, bem como identificar que um dos produtos formados era comum às condições ácidas e básicas.

Com uma abordagem diferenciada, Tantawy e colaboradores (2016) foram capazes de determinar a presença de produtos de degradação hidrolítica utilizando um método espectrofotométrico indicativo de estabilidade. Para o estudo, comprimidos triturados de apixabana foram expostos a HCl 5 M a 100 °C por 5 horas ou NaOH 5 M a 120 °C durante 7 horas, até sua completa degradação. Após ressuspensão em metanol, o solubilizado das degradações foi avaliado por meio das técnicas de infravermelho e cromatografia gasosa acoplada a detector de massas. Uma mistura do pó dos comprimidos íntegros e do produto originado da hidrólise foi analisada em espectrofotômetro Shimadzu[®]. Foi feita varredura de 200 a 400 nm e, através das análises de primeira derivada, derivada da razão, razão da diferença e

centralização na média da razão espectral, ficou evidenciada a presença do produto como contaminante da apixabana. No estudo, as amostras de apixabana também foram testadas a temperatura de 120 °C, luz UV e H₂O₂ 30%, todas por 10 horas, mantendo-se estáveis. Em paralelo ao método proposto, foi feita análise cromatográfica de todas as condições de estresse, onde pôde-se confirmar o resultado espectrofotométrico.

Em todos os estudos, a apixabana se mostrou suscetível à degradação ácida e estável frente à luz, à temperatura e ao peróxido de hidrogênio. Os resultados quanto à degradação básica se mostraram divergentes, carecendo maiores investigações.

3.3.4 Análise de impurezas da apixabana

Dentre os trabalhos que investigam impurezas sintéticas da apixabana, dois já foram citados anteriormente, pois também estão relacionados à estabilidade. Prabhune e colaboradores (2014) elegeram dois intermediários de síntese para avaliar em seu método. Estas foram caracterizadas com espectrometria de massas, infravermelho e RMN de hidrogênio. O tempo de retenção para apixabana foi de 13,6 minutos e os limites de quantificação encontrados para as impurezas foram 0,024 µg/mL e 0,026 µg/mL. No entanto, os cromatogramas apresentados no trabalho não mostram picos bem definidos para as impurezas.

Já o estudo desenvolvido por Landge e colaboradores (2015) envolveu nove impurezas sintéticas doadas por um laboratório indiano. Os limites de quantificação para as impurezas ficaram em torno de 0,01 µg/mL. Após a validação analítica, o método foi aplicado para a busca destas impurezas em amostras de comprimidos e da matéria-prima. Das nove substâncias propostas, seis foram encontradas, sendo três no insumo farmacêutico e três no produto acabado.

Gottapu e colaboradores (2015) optaram por investigar uma impureza denominada como “di-hidro”, cuja estrutura é a mesma da apixabana, porém com uma insaturação entre os carbonos 8 e 9, portanto, com dois hidrogênios a menos em relação à molécula original. Para as análises, foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção UV a 270nm e coluna Zorbax Bonus RP[®] de 25 cm a 40°C. Constituída por acetonitrila e água (90:10) v/v, a fase móvel teve vazão de 1,2 mL/min. O tempo total de análise foi de 35 minutos, com tempos de retenção de 8,52

minutos para apixabana e 9,69 para a impureza. O limite de quantificação para a impureza em questão foi de 2,34, no entanto, os pesquisadores não especificaram a unidade desta concentração. Ainda, os resultados apresentados referentes à validação do método são apenas da impureza, embora as soluções utilizadas no processo contivessem apixabana.

Dentre as impurezas tratadas nestas publicações, uma estrutura é comum a várias sínteses, estando tanto nos trabalhos de Prabhune (impureza 2) e de Landge (impureza 6), como na presente dissertação (impureza 3). Conforme o exposto, fica evidenciada também a falta de um método analítico que seja capaz de analisar apixabana e suas impurezas de maneira rápida, a ser incorporado na rotina do laboratório, e que tenha simples preparo de amostra e fase móvel.

3.4 Análise e controle de impurezas em produtos farmacêuticos

Para que um produto farmacêutico esteja apto a ser utilizado, é necessário garantir sua qualidade, bem como atestar que o mesmo não colocará em risco seus usuários em virtude de inconformidades quanto à segurança. O fabricante é responsável pela qualidade de seus medicamentos, devendo assegurar que estes sejam apropriados aos fins a que se destinam, além de cumprir com os requisitos estabelecidos em seu registro, como eficácia e estabilidade (BRASIL, 2010).

É atribuição do controle de qualidade a aprovação dos produtos farmacêuticos, bem como a realização das atividades referentes aos ensaios, à organização, à documentação e aos procedimentos de liberação dos mesmos. Já a garantia da qualidade está associada à totalidade de ações sistemáticas necessárias para assegurar com confiança adequada que um produto cumpre seus requisitos de qualidade (BRASIL, 2010).

O cumprimento das boas práticas de fabricação está orientado primeiramente à diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, os quais não podem ser detectados somente pela realização de ensaios nos produtos terminados. Para tanto, são elaborados estudos quanto à compatibilidade do insumo e dos excipientes da formulação e testes de estabilidade com a finalidade de prever o comportamento dos mesmos frente a determinadas condições de temperatura e umidade a que possam ser submetidos durante a vida de prateleira (BRASIL, 2010).

Da mesma maneira, há cada vez mais preocupação por parte dos fabricantes com relação às análises e ao controle de impurezas nos produtos farmacêuticos, não apenas por essas substâncias poderem alterar características fundamentais dos produtos, mas também pelo aumento das exigências regulatórias. A ANVISA, assim como outros órgãos, tem demonstrado - através de novas normas, como a RDC 53/2015 - a importância e necessidade da investigação do perfil de impurezas ao qual devem ser submetidos produtos novos ou que já estão no mercado e irão sofrer alterações pós-registro (BRASIL, 2015).

A determinação do perfil de impurezas é um conjunto de atividades analíticas para detecção, quantificação, identificação e elucidação estrutural das impurezas presentes em um insumo ou produto farmacêutico. Este perfil pode ser alterado mesmo com pequenas mudanças, seja na tecnologia de produção, na origem dos materiais de partida, nas condições de purificação e até mesmo no modo de armazenamento. O farmacêutico deve conhecer o perfil de impurezas do fármaco utilizado no desenvolvimento de suas formulações, para que as informações químicas acerca do contaminante ajudem a diferenciar impurezas relacionadas à síntese e produtos de degradação. Isto é importante no desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade, tanto do ponto de vista regulatório, como para buscar a origem da impureza e tentar eliminá-la (GOROG, 2017).

No que tange a temática de impurezas, as referências mais importantes mundialmente e que direcionam as ações a serem tomadas são os guias Q3A e Q3B do ICH. O primeiro, denominado *Impurities in New Drug Substances*, aborda questões relacionadas ao insumo farmacêutico, norteador estudos acerca do perfil de impurezas, além de estabelecer os limites para notificação, identificação e qualificação destas (Tabela 2). O guia é dividido em aspectos químicos – classificação de impurezas, como reportá-las e efetuar as análises – e de segurança, trazendo informações específicas quanto à qualificação de impurezas presentes, além de fluxograma para auxiliar na tomada de decisão (ICH Q3A(R2), 2006).

Tabela 2. Limites de notificação, identificação e qualificação de impurezas em substâncias ativas (ICH Q3A (R2), 2006).

Dose Diária Máxima¹	Limite de notificação^{2,3}	Limite de identificação³	Limite de qualificação³
≤ 2 g/dia	0,05 %	0,10 % ou 1 mg da ingestão diária (o que for menor)	0,15 % ou 1 mg da ingestão diária (o que for menor)
> 2 g/dia	0,03 %	0,05 %	0,05 %

¹ Quantidade máxima da substância ativa administrada por dia;

² Limites de notificação maiores devem ser cientificamente justificados;

³ Limites menores podem ser apropriados se a impureza possuir toxicidade diferenciada.

Conforme o guia, as impurezas podem ser classificadas em três categorias principais: resíduos de solventes, impurezas inorgânicas e impurezas orgânicas. Neste contexto, inúmeras substâncias podem ser incluídas, dentre elas: reagentes de partida, isômeros, intermediários de síntese, reagentes, solventes, catalisadores e produtos de degradação (ICH Q3A(R2), 2006).

Os solventes são substâncias orgânicas voláteis utilizadas ou produzidas no processo de preparo de insumos, excipientes ou produtos finais. A escolha dos solventes é um parâmetro crítico na síntese, podendo influenciar em características como rendimento, pureza e solubilidade. Como os solventes não são completamente removidos por técnicas práticas durante o processo, é preciso ter em vista a sua toxicidade. Por isso, os solventes são classificados quanto ao seu risco potencial e, seu controle é abordado mais cuidadosamente no guia Q3C do ICH (ICH Q3C(R5), 2011).

As impurezas inorgânicas geralmente estão associadas ao processo de síntese e tem sua estrutura conhecida. Os principais representantes desta classe são reagentes, ligantes, catalisadores, metais (pesados ou residuais) e sais inorgânicos. A detecção e quantificação destas impurezas normalmente são realizadas por meio de procedimentos farmacopeicos. Os limites de aceitação para estas substâncias devem basear-se em padrões compendiais ou dados de segurança conhecidos (ICH Q3A(R2), 2006).

As impurezas orgânicas são as mais comumente encontradas nos produtos farmacêuticos. Neste grupo de impurezas, incluem-se os materiais de partida da síntese, bem como intermediários, produtos de degradação formados no

armazenamento, entre outros. Compostos como enantiômeros são importantes representantes desta classe de impurezas, haja vista que a quiralidade é um desafio nas técnicas de separação e a elevada quantidade de medicamentos que é comercializada na forma de mistura racêmica (ICH Q3A(R2), 2006; GOROG, 2017).

Já no guia *Impurities in New Drug Products*, o foco é voltado para os produtos de degradação, uma vez que estas são consideradas as principais impurezas relacionadas ao produto acabado. Além dos produtos de degradação derivados do insumo ativo, também estão inseridos nesta categoria os produtos de reações cruzadas entre fármaco e excipientes da formulação e/ou com os materiais de embalagem do produto. Este guia também traz os limites adotados para reportar os produtos de degradação, estes sendo compatíveis com os da legislação vigente da ANVISA e apresentados na Tabela 3 (ICH Q3B (R2), 2006).

Tabela 3. Limites de notificação, identificação e qualificação para produtos de degradação.

	Dose Máxima Diária¹	Limites²
Limites de Notificação	≤ 1 g	0,10 %
	> 1 g	0,05 %
Limites de Identificação	< 1 mg	1,0 % ou 5 µg ITD, o que for menor
	1 mg – 10 mg	0,5 % ou 20 µg ITD, o que for menor
	> 10 mg – 2 g	0,2 % ou 2 mg ITD, o que for menor
	> 2 g	0,10 %
Limites de Qualificação	< 10 mg	1,0 % ou 50 µg ITD, o que for menor
	10 mg – 100 mg	0,5 % ou 200 µg ITD, o que for menor
	> 100 mg – 2 g	0,2 % ou 3 mg ITD, o que for menor
	> 2 g	0,15 %

1 - Quantidade do medicamento administrado por dia

2 - Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a ingestão total diária (ITD) do produto de degradação. Limites menores podem ser apropriados se a impureza possuir toxicidade diferenciada.

3 – Limites de notificação maiores devem ser cientificamente justificados

Para que se conheça o perfil de degradação do fármaco, é necessário avaliar a estabilidade do mesmo perante condições de estresse. Os estudos de degradação forçada devem promover degradação em extensão suficiente a fim de permitir

avaliação da formação de produtos, sendo essa superior a 10 % de degradação do insumo e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra. Estes resultados fornecem subsídios para o desenvolvimento e validação de metodologias de análise desses produtos. Nos estudos de degradação forçada, as amostras devem ser submetidas a: aquecimento, umidade, hidrólises ácida e básica, oxidação, exposição fotolítica e íons metálicos (BRASIL, 2015).

3.5 Técnicas analíticas aplicadas na análise de impurezas

Nos últimos anos, a preocupação com o perfil de impurezas e métodos relacionados apresentou aumento considerável, o que se refletiu também nas publicações científicas com este tema. Diversas técnicas podem ser utilizadas para o monitoramento de impurezas em produtos farmacêuticos e a escolha do mesmo deve ser baseada na capacidade deste detectar e diferenciar os compostos presentes em uma determinada amostra. No que tange a busca por impurezas, para que o método sirva ao seu propósito, necessita apresentar alta seletividade e sensibilidade, haja vista que estas substâncias se apresentam em baixas concentrações (HOLM, 2015).

A grande maioria dos métodos reportados na literatura envolvendo impurezas utiliza CLAE com detecção UV. A CLAE apresenta precisão, velocidade e alta capacidade de separação, além de diferentes tipos de detectores, como fluorescência, UV, espectrometria de massas, dentre outros. As colunas cromatográficas apresentam novas tecnologias de preenchimento e tamanho de partícula, possibilitando inovações mesmo em uma técnica clássica como a CLAE e com tantas aplicações na área química e farmacêutica (GOROG, 2017).

O uso da CLAE como método de separação acoplado a outras técnicas, como a espectrometria de massas, tem se tornado escolha frequente para análise de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos. Esses métodos, chamados de hifenados, estão sendo cada vez mais utilizados na rotina, pois aliam as vantagens de cada equipamento, permitindo a identificação e elucidação estrutural das substâncias complexas com maior assertividade.

Outros métodos de separação comumente utilizados são cromatografia gasosa (CG), cromatografia de fluido supercrítico (CFS), cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) e eletroforese capilar (EC). A CG está bastante associada à

busca de solventes residuais e produtos de degradação oxidativos, enquanto a CLUE, operando em alta pressão, auxilia a diminuir o tempo de corrida em análises em modo gradiente com uma ampla gama de compostos ou substâncias complexas como diastereoisômeros. Apesar de consumir menos volume de solvente e, em geral apresentar baixo custo, a EC apresenta menor reprodutibilidade e sensibilidade em relação à CLAE (HOLM, 2015).

Além destas já citadas, podem ser utilizadas também técnicas espectroscópicas, tais como a espectrofotometria no UV e no infravermelho (IV), a espectroscopia de RMN e a EM. Ainda que estes métodos não sejam responsáveis pela separação, são muito utilizados para caracterização de impurezas que foram previamente isoladas, ou quando estão hifenados a técnicas com outros princípios. A EM sem separação prévia está comumente associada à detecção de contaminantes em análises forenses (GOROG, 2017).

3.6 Quality by Design

No desenvolvimento de uma metodologia analítica envolvendo estudos de estabilidade ou a análise de impurezas, o entendimento da técnica analítica representa um diferencial na qualidade e confiabilidade. O conceito de *Quality by Design* (*QbD*) foi utilizado primeiramente na indústria farmacêutica, para aprimorar o processo produtivo de desenvolvimento e produção de medicamentos (LLOYD, 2013).

O ICH define o *QbD* como uma abordagem dinâmica e sistemática que emprega objetivos pré-estabelecidos e ferramentas de predição estatística, a fim de proporcionar entendimento e controle do processo. Esta técnica permite desenvolver metodologias reprodutíveis, otimizadas, robustas e com controle estratégico efetivo, ao fazer uso de modelagem estatística e região multidimensional de espaço experimental, gerada através de avaliação multifatorial (ICH Q8(R2), 2009; LLOYD, 2013).

Após a definição dos objetivos que a ferramenta analítica deve cumprir, é feita uma análise de risco para estabelecer os parâmetros, relacionados à técnica escolhida tais como vazão de fase móvel para CLAE e diâmetro do capilar para EC, cuja flutuação pode influenciar no método. Estes parâmetros são denominados fatores críticos ao processo (CPFs, *critical process factors*). A maneira de medir essa

influência é através do monitoramento dos chamados atributos críticos da qualidade (CQAs, *critical quality attributes*), que estão relacionados ao objetivo pretendido ao método. Assim, pureza de pico e resolução são atributos que devem ser avaliados quando se deseja um método seletivo, bem como número de pratos elevado para uma metodologia sensível. A figura 7 ilustra o fluxo de aplicação do *QbD* no desenvolvimento de um método analítico (HANAI, 1999; ORLANDINI, 2013).

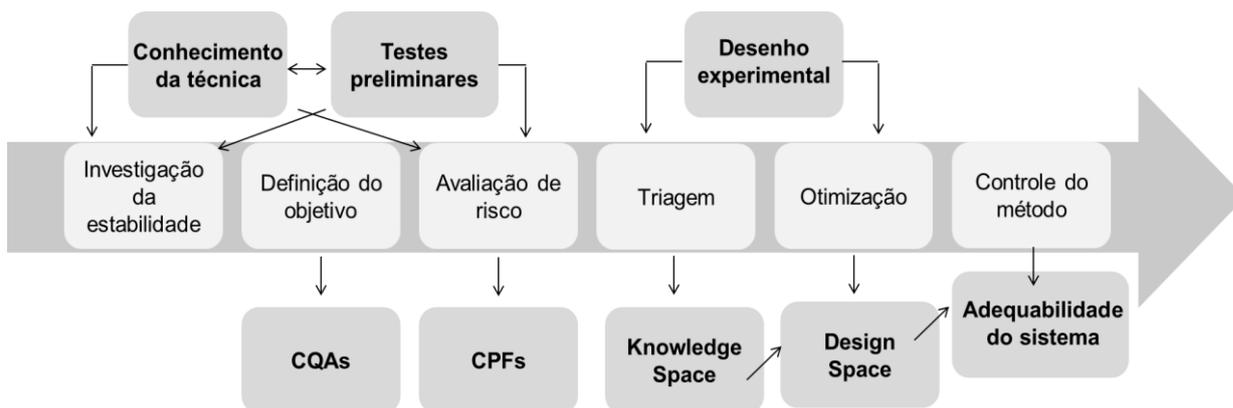


Figura 7. Esquema sequencial de aplica o dos passos da abordagem *QbD* no desenvolvimento de um método analítico otimizado.

O *QbD* utiliza o conceito de desenho experimental, otimizando a capacidade de desenvolvimento metodológico pois, ao reduzir o número de análises, promove redu o não apenas no tempo total do processo, mas principalmente de solventes e analitos. Além disso, é possível obter, através da análise estatística dos resultados, a rela o entre os fatores estudados (CAVAZZUTI, 2013; FURNALETTO, 2013).

Dentre os gráficos gerados pelo *QbD*, os principais são *Sweet Spot Plot* e *Design Space*, exemplificados nas Figuras 8 e 9, respectivamente, além do *Contour Plot* e *Design Space 4D*. O *Sweet Spot*, elucidado na Figura 8, aponta em que faixas, de dois determinados CPFs, pode-se atingir os objetivos estabelecidos para os CQAs. Ele geralmente é ilustrado por duas cores predominantes, onde uma representa a área onde todos os CQAs são atendidos simultaneamente, enquanto outra demonstra áreas onde pelo menos um dos CQAs está fora da faixa idealizada. Já o *Design Space* prevê o risco do método falhar (risco de erro), considerando a probabilidade de não atingir todos os CQAs estabelecidos, refletido através de uma escala de cores. Conforme exemplificado na Figura 9, quanto maior o número de

regiões vermelhas, maior é o risco, ao passo que um predomínio de regiões verdes indica prognóstico mínimo de erros para a metodologia.

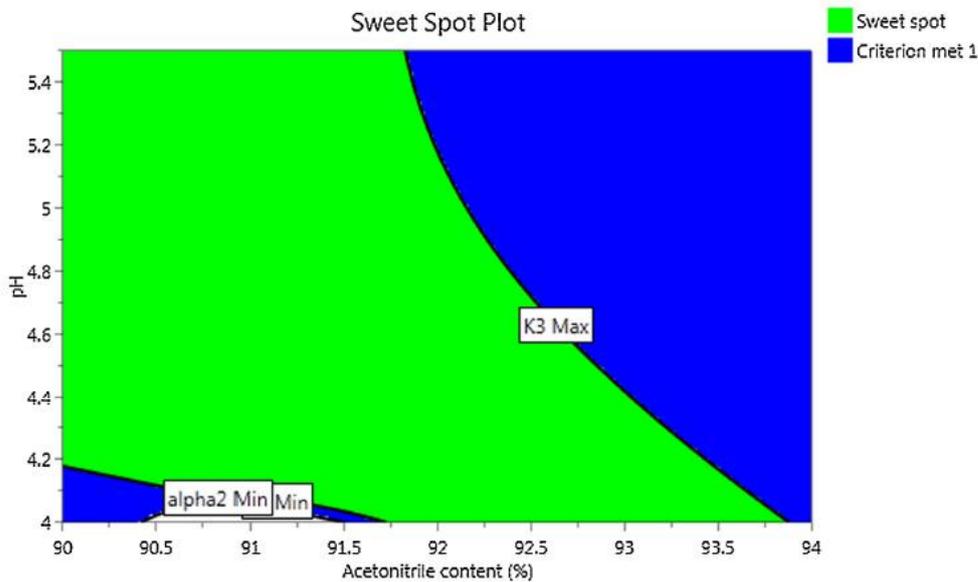


Figura 8. Representação de *Sweet Spot Plot* (TERZIC, 2016). Neste gráfico, a zona de atendimento dos critérios é representada pela cor verde, enquanto a cor azul representa inconformidade em pelo menos um dos CQAs estabelecidos.

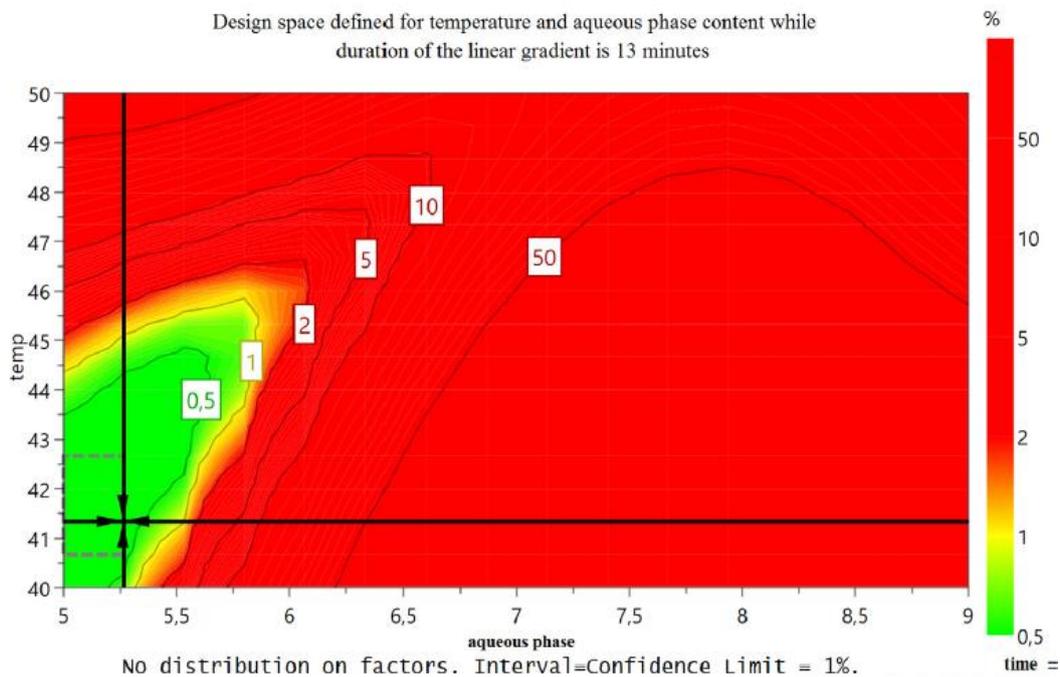


Figura 9. Representação de *Design Space* (TUMPA, 2016). A escala de cores escolhida vai do vermelho (maior chance de risco) até o verde (zona de maior confiança para alcance simultâneo dos CQAs).

O número de estudos utilizando a abordagem *QbD*, vem crescendo ao longo dos anos, como pode ser observado na Figura 10. Da mesma forma, sua aplicação tem se tornando cada vez mais frequente no que diz respeito ao desenvolvimento de

métodos para análise simultânea de compostos e detecção de impurezas. Orlandini e colaboradores (ORLANDINI, 2013) elaboraram elucidação teórica da aplicação do *QbD* para métodos analíticos, propondo um passo a passo a ser empregado. Já Furlanetto e colaboradores (FURLANETTO, 2013) utilizaram na prática o *QbD* no desenvolvimento de metodologia para análise de impurezas por EC. Estas publicações foram pioneiras e serviram de referência para diversos outros trabalhos envolvendo CLAE. Terzic e colaboradores (TERZIC, 2016) fizeram uso do *QbD* para desenvolver um método de análise de balastina e seus produtos de degradação, enquanto Zhang e Hu (ZHANG, 2017) dispuseram da técnica para uma penicilina e seus polímeros oriundos de degradação, ambos por CLAE.

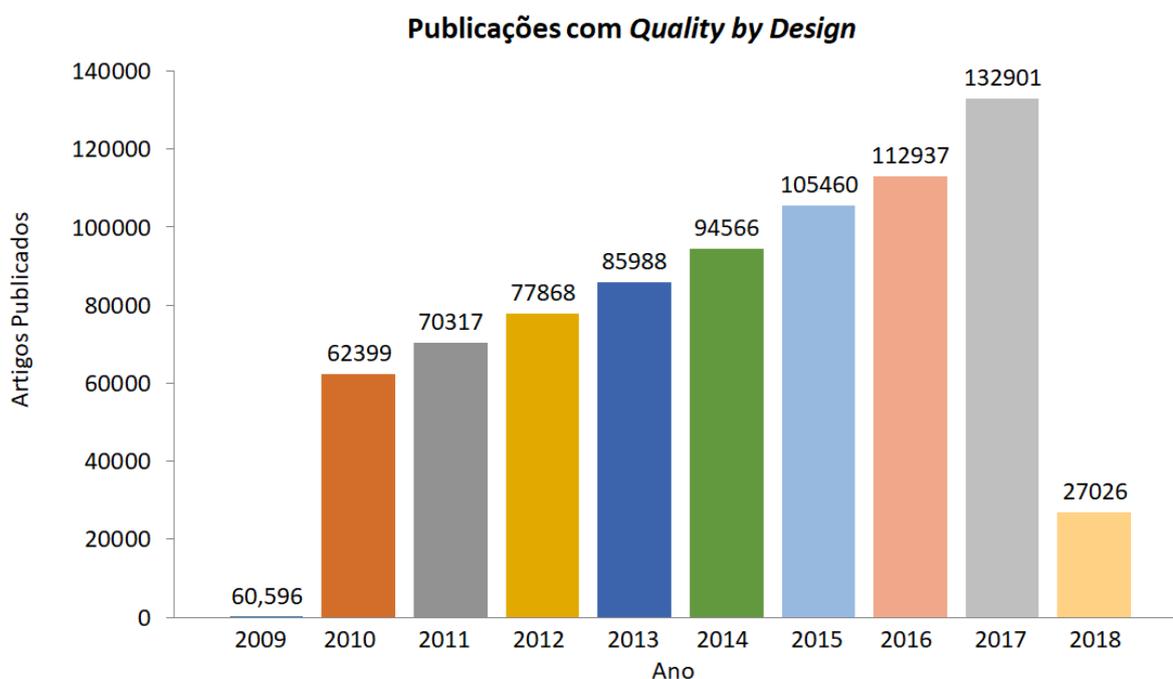


Figura 10 Gráfico referente às publicações científicas que utilizaram a abordagem *QbD* de 2009 até o presente momento, indexadas à base de dados *Science Direct*. A busca foi realizada com a palavra-chave “Quality by Design” ou “*QbD*” no título, sendo o número acima de cada barra referente a quantidade de publicações para aquele ano (<https://www.sciencedirect.com/>, acesso em 18 de janeiro de 2018).

3.7 Validação da metodologia analítica

Para que os requisitos quanto à pureza, segurança e inocuidade dos produtos farmacêuticos sejam garantidos, uma série de medidas relacionadas ao controle de qualidade deve ser tomada. Neste sentido, a confiabilidade de um resultado obtido para uma determinada análise é tão importante quanto o resultado em si. O

desenvolvimento de novas ferramentas analíticas na rotina de indústrias e laboratórios é algo corriqueiro. No entanto, antes de pô-las em prática, é preciso atestar e documentar que elas de fato produzem resultados fidedignos e são adequadas àquela finalidade.

Desta forma, a utilização de método analítico recém desenvolvido e, portanto, não descrito em compêndio oficial reconhecido pelos órgãos regulatórios, requer a realização de uma validação analítica. Os parâmetros a serem avaliados, bem como seus respectivos critérios de aceitação devem ser definidos de acordo com as características do analito e da natureza do método (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Segundo a RDC 166/2017, a validação de um método analítico é a avaliação sistemática, por meio de ensaios experimentais, que tem por objetivo confirmar e fornecer evidências práticas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2017).

Na validação de métodos analíticos, a SQR utilizada deve ser preferencialmente Farmacopeica, ou um padrão cuja identidade, qualidade, pureza, teor e potência tenham sido devidamente caracterizados. Os métodos analíticos são divididos quanto ao seu propósito, podendo ser para identificação, teste de impurezas (quantitativo ou ensaio limite) e doseamento, como dissolução e uniformidade de conteúdo (BRASIL, 2017).

Para ensaios quantitativos aplicados na determinação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos e matérias-primas, como é o caso do presente estudo, a legislação prevê que os seguintes parâmetros devem ser avaliados: seletividade, linearidade, intervalo, limite de quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão. Já a robustez é um parâmetro cuja avaliação é recomendada durante seu desenvolvimento, independentemente do propósito do método analítico (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

3.8 Avaliação da Toxicidade

A avaliação do perfil toxicológico de um fármaco é um passo muito importante para certificar sua segurança e prevenir o aparecimento de efeitos adversos. Tendo em vista o contexto atual de ética na pesquisa, e a constante busca de substituir metodologias *in vivo*, os ensaios *in vitro* se mostram uma opção importante para

obtenção de dados quanto à toxicidade de uma substância e uma perspectiva de seu efeito em humanos, bem como quais mecanismos estão envolvidos neste processo (DHAWAN, 2018).

Os métodos *in vitro* oferecem vantagens em relação aos *in vivo*, como maior controle das variáveis experimentais, obtenção de dados significativos mais facilmente e num período de tempo mais curto, além de menor custo. Neste sentido, tem-se aplicado a ideologia dos 3R's aos testes toxicológicos: Substituir (*replace*) os modelos animais, Reduzir o número de animais, quando necessário utilizar e Refinar, no sentido de diminuir o sofrimento dos animais (DHAWAN, 2018).

As linhagens celulares são amplamente utilizadas para avaliação da toxicidade hepática, pois apresentam características genótípicas e fenotípicas similares de células hepáticas normais, além de possuírem enzimas funcionais responsáveis pelo metabolismo da fase I e fase II dos xenobióticos. Muitos modelos hepáticos *in vitro* são empregados na compreensão da toxicidade. HepG2, Hep3B, HBG e HepaRG são linhas celulares derivadas de fígado, geralmente imortalizadas, usadas para avaliação *in vitro* do estudo de toxicidade hepática. A HepG2 está entre as linhagens celulares de hepatoblastoma humano mais amplamente utilizadas, pois apresenta muitas funções específicas do fígado (DONATO, 2008; DHAWAN, 2018).

Diversos métodos *in vitro* podem ser aplicados para avaliação da citotoxicidade, sendo os danos mensurados por diferentes mecanismos. Ensaio como o do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazolio (MTT) e da lactato desidrogenase (LDH), avaliam a permeabilidade da membrana celular. O teste da LDH ainda avalia viabilidade celular, tal como o teste do azul de Tripán e o vermelho neutro (VN) para atividade lisossomal (DHAWAN, 2018).

**4 CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO DA SQR DA APIXABANA E
SUAS IMPUREZAS SINTÉTICAS**

4.1 Introdução

Visando à confiabilidade dos resultados, estudos que envolvem desenvolvimento e validação de métodos analíticos demandam utilização de substâncias de referência com alto grau de pureza. As substâncias de referência podem ser compendiais, que são obtidas de fontes farmacopeicas e não precisam ser caracterizadas e as não compendiais, que são adquiridas de empresas confiáveis e devem ser do mais elevado grau de pureza possível. Estas devem ser cuidadosamente caracterizadas a fim de garantir sua identidade, teor, qualidade, pureza e potência (BRASIL, 2010).

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas SQRs de apixabana e de três impurezas sintéticas. Como nenhuma destas substâncias é classificada como compendial, fez-se necessário realizar suas respectivas caracterizações (BRASIL, 2010). Desta forma, o primeiro capítulo desta dissertação objetivou demonstrar a caracterização da SQR de apixabana e de suas impurezas sintéticas através das seguintes técnicas analíticas: ultravioleta (UV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) e espectrometria de massas (EM).

A espectrofotometria na região do ultravioleta é um método simples e rápido que auxilia na identificação de compostos. Por isso, é largamente utilizada no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, pela capacidade que a maioria dos fármacos apresenta de absorver energia nessas regiões. O fundamento da técnica está relacionado com a absorção da energia que depende tanto da concentração quanto da estrutura das moléculas. As transições na faixa ultravioleta (190 a 380 nm) são eletrônicas e ocorrem em porções da molécula denominadas cromóforos (FARMACOPEIA, 2010).

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica térmica em que as diferenças no fluxo de calor na substância são medidas como uma função da temperatura enquanto ela é submetida a um programa de temperatura controlada. Os métodos térmicos diferenciais têm encontrado larga aplicação na indústria farmacêutica para teste de pureza de amostras de fármacos, por fornecer dados como ponto de fusão, eventuais transformações polimórficas, formação de cristais e temperatura de degradação da substância ativa (FORD, 1989).

A espectroscopia de RMN é uma técnica bastante eficaz na identificação de compostos orgânicos. Através desta análise, pode-se confirmar a identidade de moléculas pela relação entre sua estrutura química e os sinais gerados pela presença dos átomos como carbono e hidrogênio na molécula. Isto ocorre pois em condições apropriadas de campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética em frequência específica e característica daquele composto (SILVERSTAIN, 2005).

A espectrometria de massas, em sua essência, consiste na geração de íons pela fragmentação das moléculas da amostra e a detecção de seus fragmentos, podendo fornecer informações tanto qualitativas quanto quantitativas dos analitos. O princípio da técnica se baseia na ionização e fragmentação da amostra que, baseada na sua relação massa/carga (m/z), gera um sinal gráfico ao chegar ao detector, relacionando a proporção m/z com sua intensidade. A partir do espectro de massas é possível confirmar a identidade da amostra através do sinal com m/z correspondente ao seu peso molecular e aos seus fragmentos característicos (SILVERSTEIN, 2005).

4.2 Materiais

4.2.1 Substâncias químicas de referência de apixabana e impurezas sintéticas

A SQR de apixabana empregada no desenvolvimento do presente trabalho foi obtida da empresa Carbosynth (Reino Unido), apresentando grau de pureza superior a 99,00%.

Após pesquisa na literatura e análise de diversas rotas sintéticas, as impurezas foram escolhidas supondo que tais substâncias possam estar presentes no produto acabado como contaminantes por não terem reagido completamente durante a síntese, problemas no processo de purificação do ativo, dentre outras falhas.

As moléculas eleitas foram denominadas de impureza 1 (etil-cloro[(4-metoxifenil) hidrazono] acetato), impureza 2 (5-morfolin-4-il-1-[4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil]-2,3-dihidropiridin-6-ona) e, impureza 3 (1-(4-metoxi-fenil)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-il) fenil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirazol [3,4-c]piridina-3-ácido carboxílico

etilester acetato), respeitando a ordem em que aparecem na síntese e a fim de facilitar a citação ao longo da dissertação.

As SQRs das impurezas foram adquiridas mediante importação junto à empresa Ontario (Canadá), com grau de pureza acima de 98,00%.

4.3 Métodos

4.3.1 Espectroscopia na região do UV

Para a caracterização das SQRs, foram preparadas soluções a 20 ug/mL para apixabana e a e 50 ug/mL para as impurezas em metanol. Foi realizada varredura na faixa de 200 a 400 nm utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Shimadzu, modelo 1800, pertencente ao Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico.

4.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

A análise das SQRs de apixabana e suas impurezas por este método foi realizada utilizando painéis de alumínio e equipamento Calorímetro Shimadzu DSC-60 (Kyoto, Japan), alocado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF), na própria Faculdade de Farmácia. O fluxo de nitrogênio empregado foi de 50 mL/min, taxa de aquecimento de 10 °C/min e faixa de aquecimento de 24 °C até temperatura especificada no certificado de análise da amostra. As impurezas 1, 2 e 3 não possuíam essa especificação e a mesma não foi encontrada com segurança em outras fontes, de modo que suas análises tiveram de ser acompanhadas mais atentamente e encerradas quando fosse observado fim do pico de aquecimento.

Para realização da técnica, foram pesados aproximadamente 2,0 mg de cada uma das SQRs a serem analisadas em painéis alumínio. Estas foram seladas e colocadas individualmente no forno do calorímetro exploratório de varredura.

4.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de hidrogênio foram obtidos em espectrômetro Bruker Ascend equipado com *console Avance III HD*, campo de 9,4T e frequência de 400

MHz através da análise de cerca de 20 mg de cada amostra dissolvido em 600 μ L de metanol deuterado.

As atribuições dos hidrogênios das moléculas foram estabelecidas com base nas tabelas constantes em literatura científica especializada (PAVIA, 2001; SILVERSTAIN, 2005).

4.3.4 Espectrometria de Massas

As análises das SQRs de apixabana e impurezas 1, 2 e 3, foram realizadas utilizando sistema CLAE-EM/EM composto de LC 1200 Series (Agilent, Alemanha) e detector de EM/EM API 5000 (Applied Biosystems, Canada), no Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro), em Porto Alegre/RS. A aquisição dos dados e tratamento foi realizada empregando o *software* Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems, Canada).

Para início das análises foram realizadas otimizações no espectrômetro de massas dos parâmetros dependentes da fonte e dos compostos. Os parâmetros dependentes dos analitos foram otimizados através de infusão direta na concentração individual de 100 ng/mL diluídos em uma solução água:acetonitrila (50:50, v/v) 0.1% ácido fórmico, utilizando bomba na vazão de 10 μ L/min. A fonte de ionização adotada foi *electrospray* em modo positivo. Os parâmetros da fonte foram: temperatura de dessolvatação de 100 °C, gás de nebulização e secagem a 20 psi, gás de colisão a 4 psi e voltagem do capilar 5,5 kV.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Resultados para espectroscopia na região do UV

Analisando o espectro da SQR da apixabana (Figura 11), ficam evidentes dois máximos de absorção, um em 220 nm e outro em 270 nm. Estes dados confirmam o que já é relatado na literatura, sendo estes os comprimentos de onda mais utilizados para análise quantitativa da apixabana (PRABHUNE, 2014; GOTTAPU, 2015; SECRETÁN, 2015).

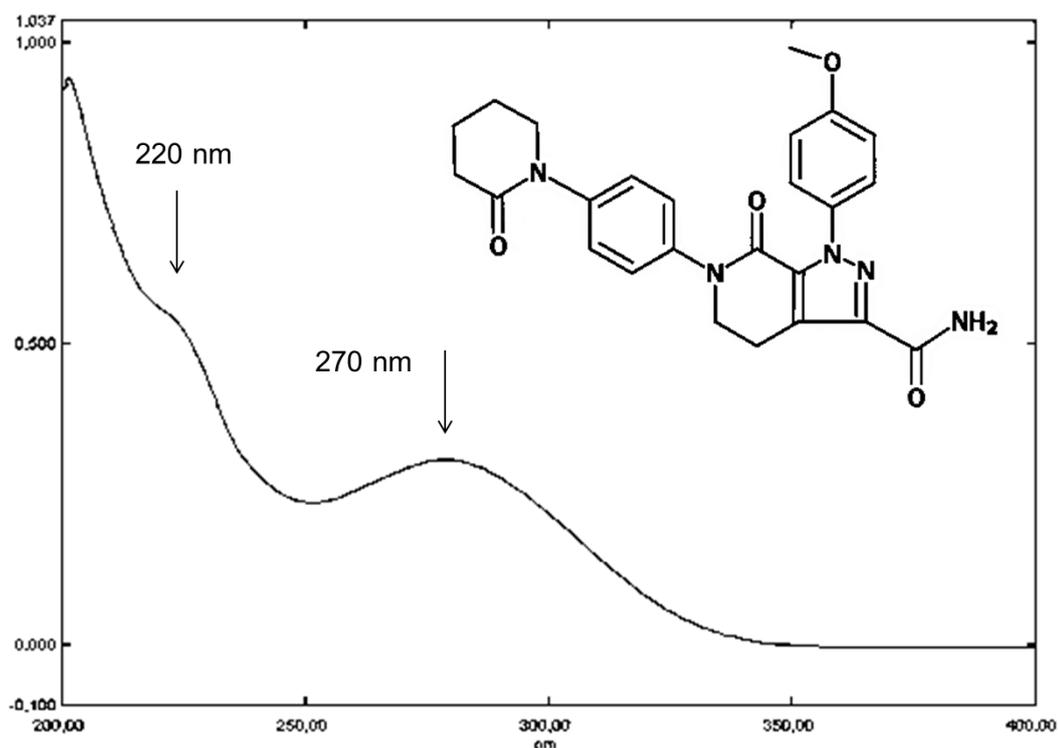


Figura 11. Espectro na região do ultravioleta da solução SQR de apixabana a 20 ug/mL em metanol obtido em espectrofotômetro Shimadzu.

Quanto às impurezas, apesar de apresentarem diferentes máximos de absorção, todas absorvem significativamente em torno de 220 nm, onde a apixabana é mais intensa, fato relevante para o desenvolvimento de um método capaz de analisar diferentes compostos simultaneamente. A impureza 1 (Figura 12) tem seus máximos em 228 e 243 nm, a impureza 2 (Figura 13) apresenta absorção significativa em 231, 303 e 345 nm. Já a impureza 3 (Figura 14) tem como máximos 222 e 277 nm.

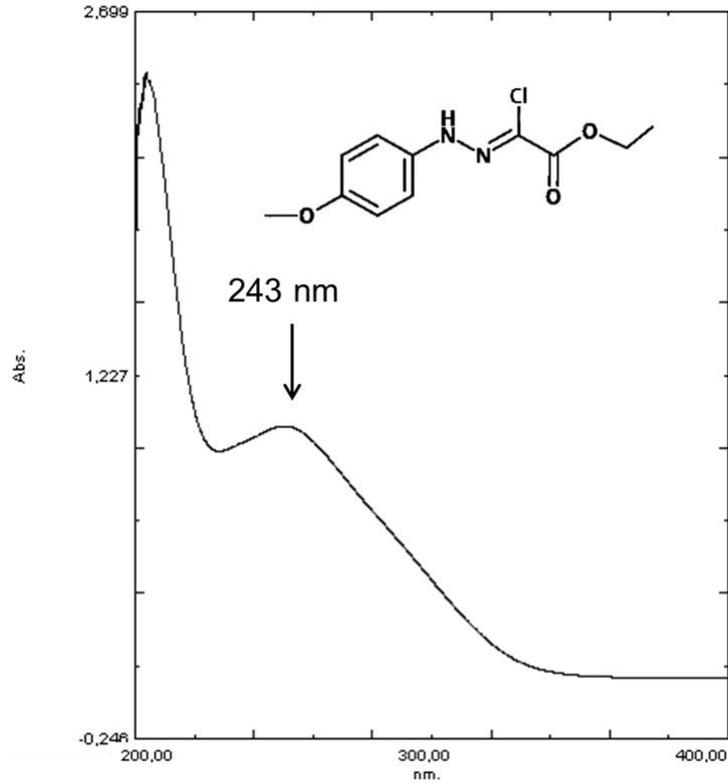


Figura 12. Espectro na região do ultravioleta da solução SQR da Impureza 1 apixabana a 50 ug/mL em metanol obtido em espectrofotômetro Shimadzu.

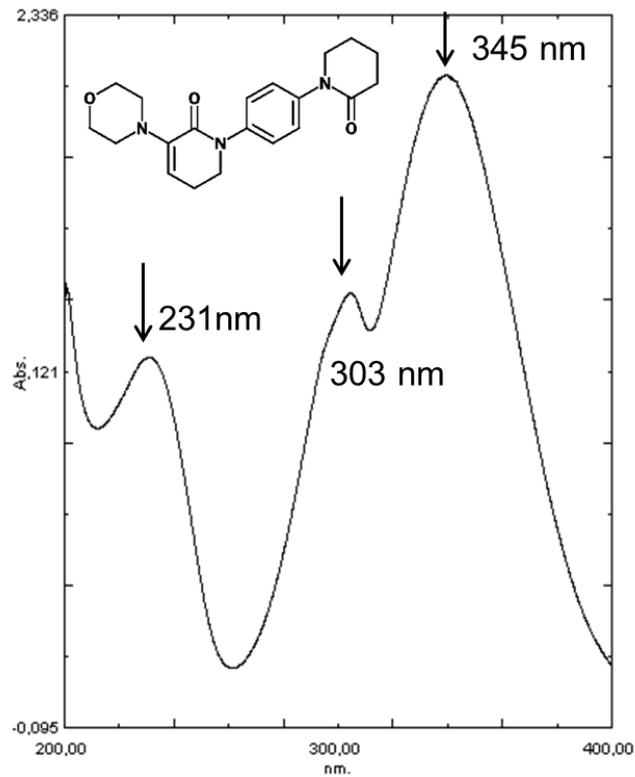


Figura 13. Espectro na região do ultravioleta da solução SQR da Impureza 2 apixabana a 50 ug/mL em metanol obtido em espectrofotômetro Shimadzu.

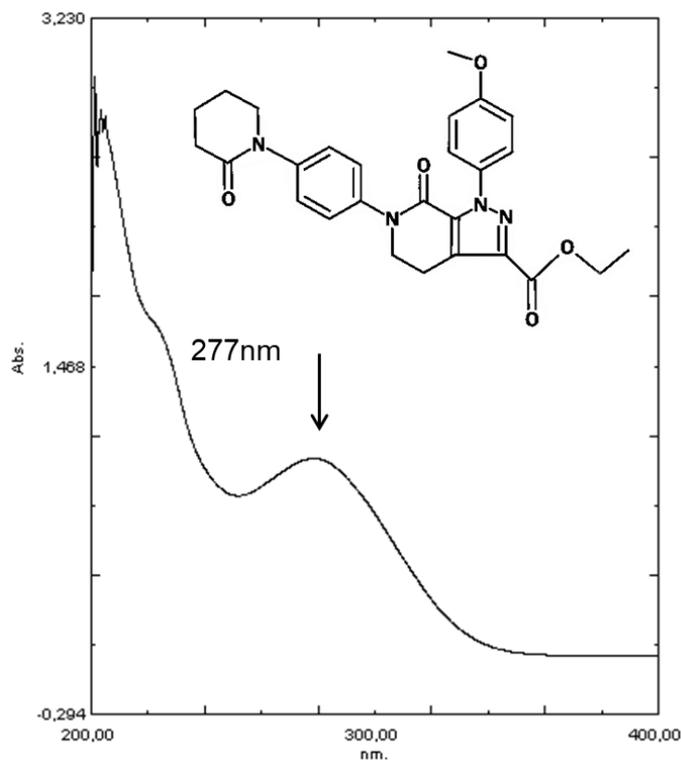


Figura 14. Espectro na região do ultravioleta da solução SQR da Impureza 3 apixabana a 50 ug/mL em metanol obtido em espectrofotômetro Shimadzu.

A partir dos resultados obtidos, é possível constatar que todas as estruturas respondem à detecção UV. Isso se dá pela presença de grupos cromóforos, correspondente aos anéis aromáticos, onde ocorrem as transições eletrônicas. Este dado é bastante importante não apenas para a caracterização, mas também para o desenvolvimento do método analítico, haja vista que a CLAE tem a detecção UV como a mais utilizada para análise de impurezas (GOROG, 2017).

4.4.2 Resultados para Calorimetria Exploratória Diferencial

Representada na Figura 15, a curva de aquecimento da apixabana apresentou pico endotérmico de fusão em 235,77 °C. Segundo o certificado de análise o ponto de fusão para a apixabana é em torno de 237 °C. O resultado obtido foi considerado adequado, haja vista que pequenas variações relacionadas aos equipamentos e materiais utilizados, bem como preparo de amostra podem ocorrer.

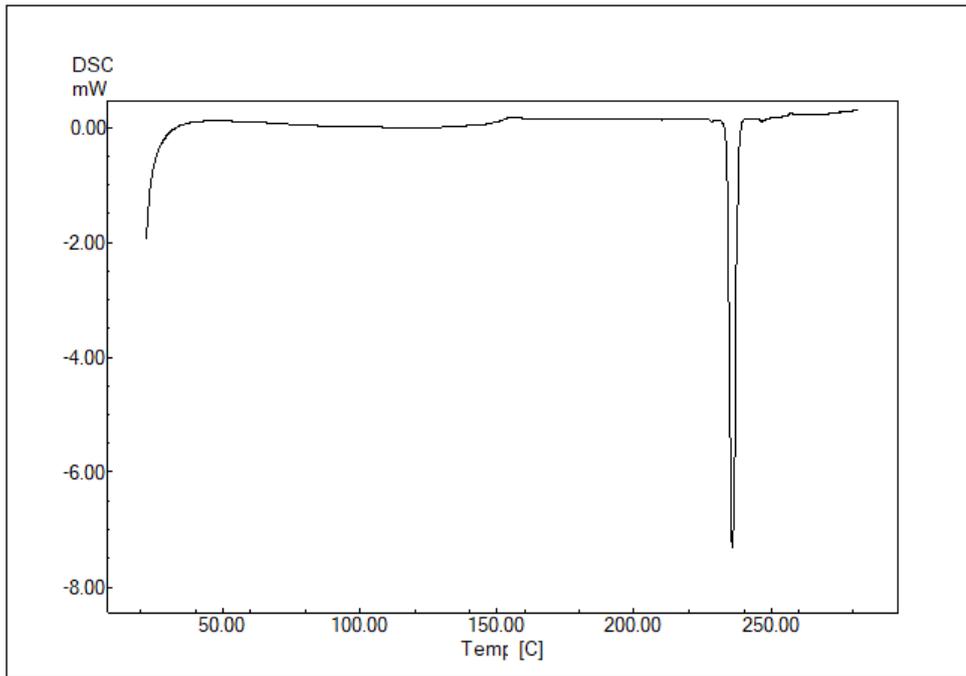


Figura 15. Curva obtida para a SQR de apixabana realizada por DSC, adquirida em fluxo de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Os certificados de análises das impurezas não continham a especificação do ponto de fusão e, buscando na literatura, os dados para impureza 1 e 2 eram conflitantes e inexistentes para impureza 3. Assim, não foi possível obter dados qualificados para realizar um comparativo com os achados neste estudo.

Para a impureza 1 (Figura 16) o ponto de fusão foi de 209,32 °C. A Figura 17 apresenta a curva de aquecimento da impureza 2, que obteve ponto de fusão de 99,32 °C. Já a impureza 3, atingiu seu ponto de fusão em 165,41 °C, como demonstrado na Figura 18.

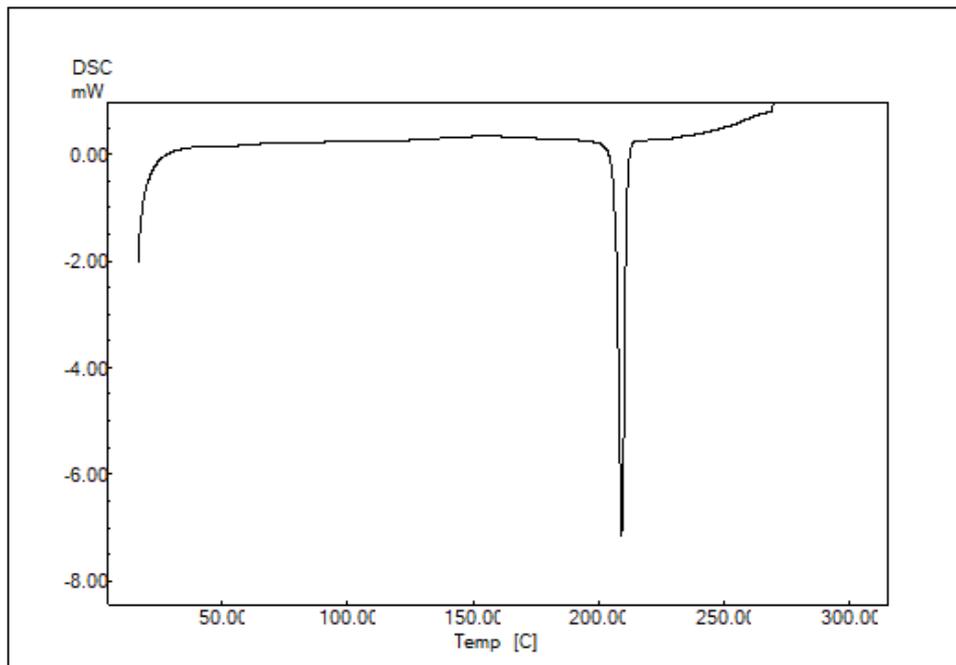


Figura 16. Curva obtida para a SQR da Impureza 1 realizada por DSC, adquirida em fluxo de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min.

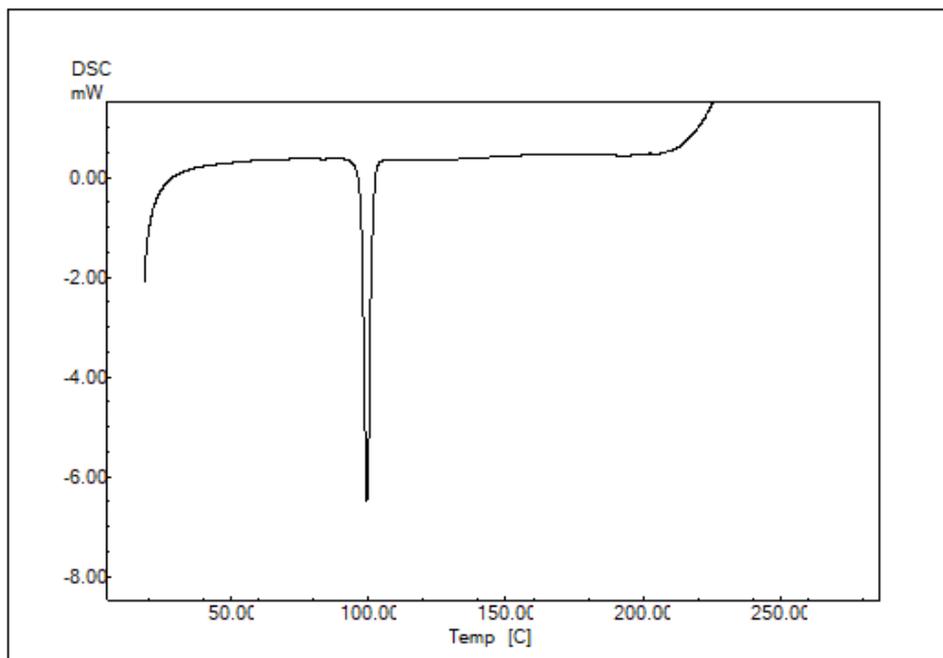


Figura 17. Curva obtida para a SQR da Impureza 2 realizada por DSC, adquirida em fluxo de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min.

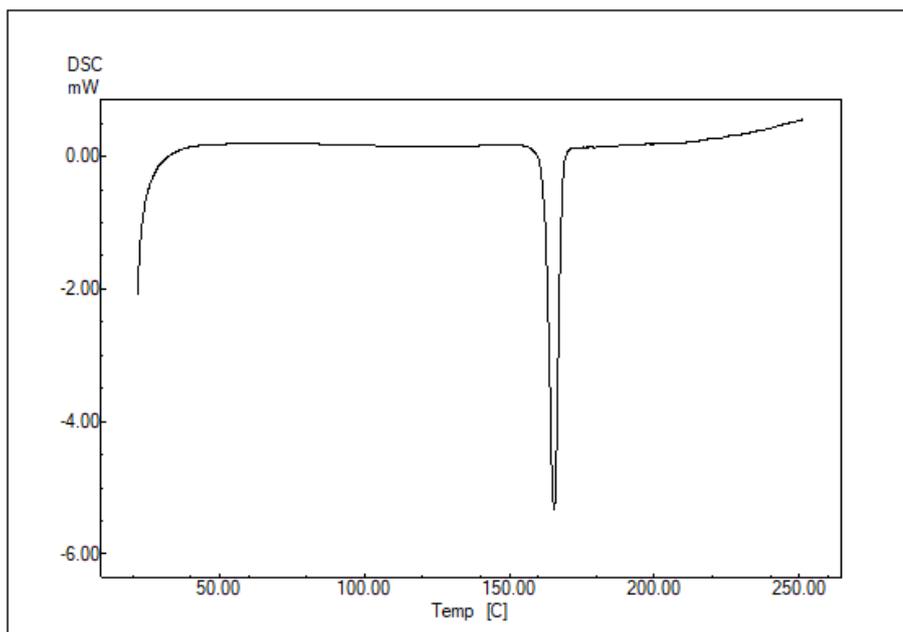


Figura 18. Curva obtida para a SQR da Impureza 3 realizada por DSC, adquirida em fluxo de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Todos os picos se mostraram finos, indicando a pureza das substâncias, uma vez que impurezas tendem a alargar os picos e sua faixa de fusão característica. Além disso, o processo de fusão da apixabana e de suas impurezas mostrou-se endotérmico, dada a direção dos picos (FORD, 1989).

4.4.3 Resultados para Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O espectro de RMN obtido através da análise da amostra de apixabana está representado na Figura 19 e a tabela com as atribuições dos sinais em relação à molécula constam na Tabela 4.

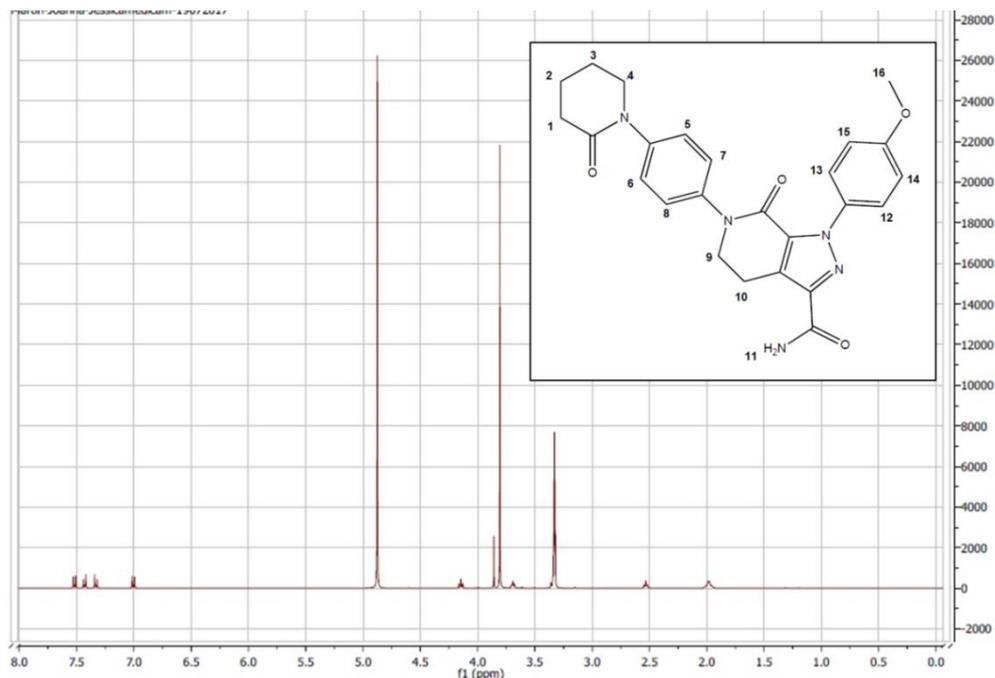


Figura 19. Espectro de RMN ^1H da apixabana obtido a partir de 20 mg de amostra em aparelho Bruker Ascend.

Tabela 4. Atribuição dos sinais teóricos para o espectro de RMN ^1H da Apixabana.

Deslocamento (ppm)	Multiplicidade	Integral	Atribuição	Identificação
1,78	Multiplete	2	CH ₂	3
2,00	Multiplete	2	CH ₂	2
2,23	Triplete	2	CH ₂	1
3,10	Triplete	2	CH ₂	10
3,30	Triplete	2	CH ₂	9
3,85	Singlete	3	CH ₃	16
4,35	Triplete	2	CH ₂	4
6,75	Duplo duplete	2	CH	5, 6
7,00	Duplo duplete	2	CH	14, 15
7,35	Duplo duplete	2	CH	7, 8
7,53	Duplo duplete	2	CH	12, 13
8,40	Singlete	2	NH ₂	11

A Figura 20 traz o espectro referente à impureza 1, ao passo que na Tabela 5 estão relacionados os sinais calculados.

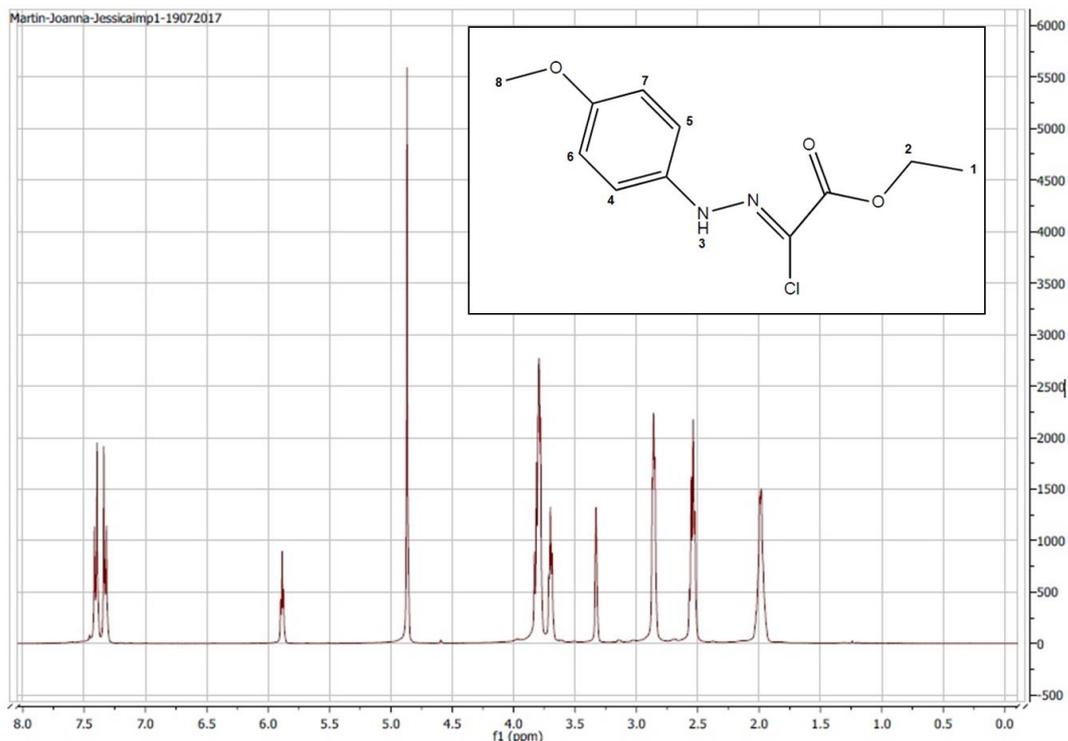


Figura 20. Espectro de RMN ^1H da impureza 1 obtido a partir de 20 mg de amostra em aparelho Bruker Ascend.

Tabela 5. Atribuição dos sinais teóricos para o espectro de RMN ^1H da Impureza 1.

Deslocamento (ppm)	Multiplicidade	Integral	Atribuição	Identificação
1,30	Tripleto	3	CH ₃	1
3,83	Singlete	3	CH ₃	8
4,15	Quadruplete	2	CH ₂	2
7,02	Singlete	1	NH	3
7,05	Duplo duplete	2	CH	4, 5
7,53	Duplo Duplete	2	CH	6, 7

Na Figura 21, encontra-se o espectro de RMN ^1H da impureza 2 e os sinais dispostos na Tabela 6.

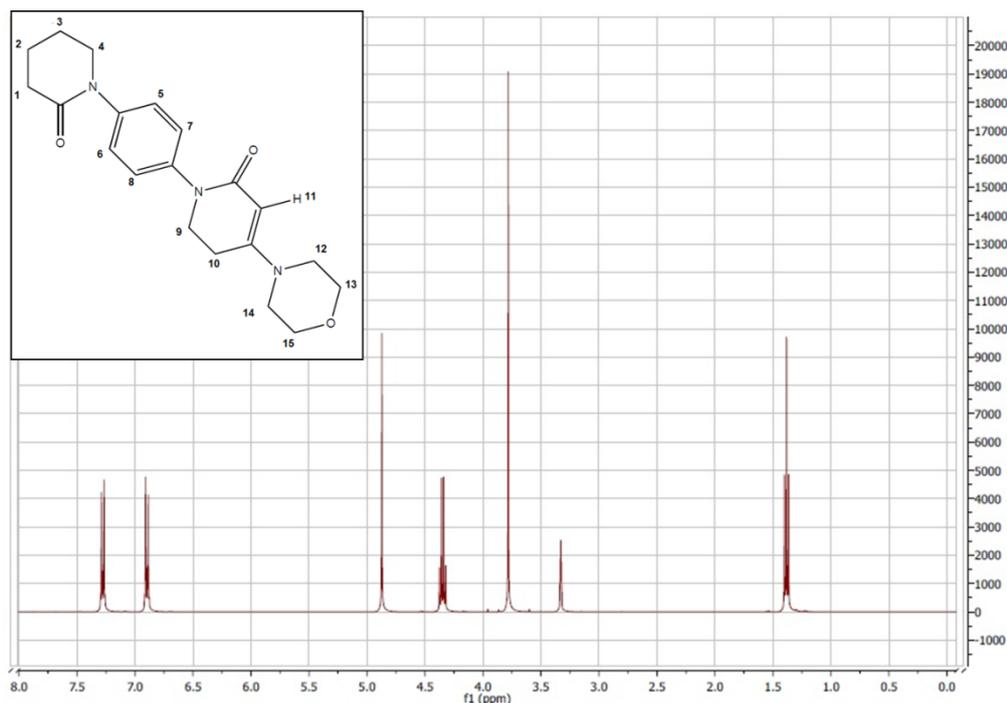


Figura 21. Espectro de RMN ^1H da impureza 2 obtido a partir de 20 mg de amostra em aparelho Bruker Ascend.

Tabela 6. Atribuição dos sinais dos sinais teóricos para o espectro de RMN ^1H da Impureza 2.

Deslocamento (ppm)	Multiplicidade	Integral	Atribuição	Identificação
1,78	Multiplete	2	CH ₂	3
2,01	Multiplete	2	CH ₂	2
2,21	Triplete	2	CH ₂	10
2,23	Triplete	2	CH ₂	1
3,15	Multiplete	4	CH ₂	12, 14
3,30	Triplete	2	CH ₂	9
3,65	Multiplete	4	CH ₂	13,15
4,35	Triplete	2	CH ₂	4
4,95	Singleto	1	NH	11
6,75	Duplo duplete	2	CH	5, 7
7,35	Duplo duplete	2	CH	6, 8

O espectro de RMN ^1H da impureza 3, bem como seus sinais calculados estão apresentados na Figura 22 e Tabela 7, respectivamente.

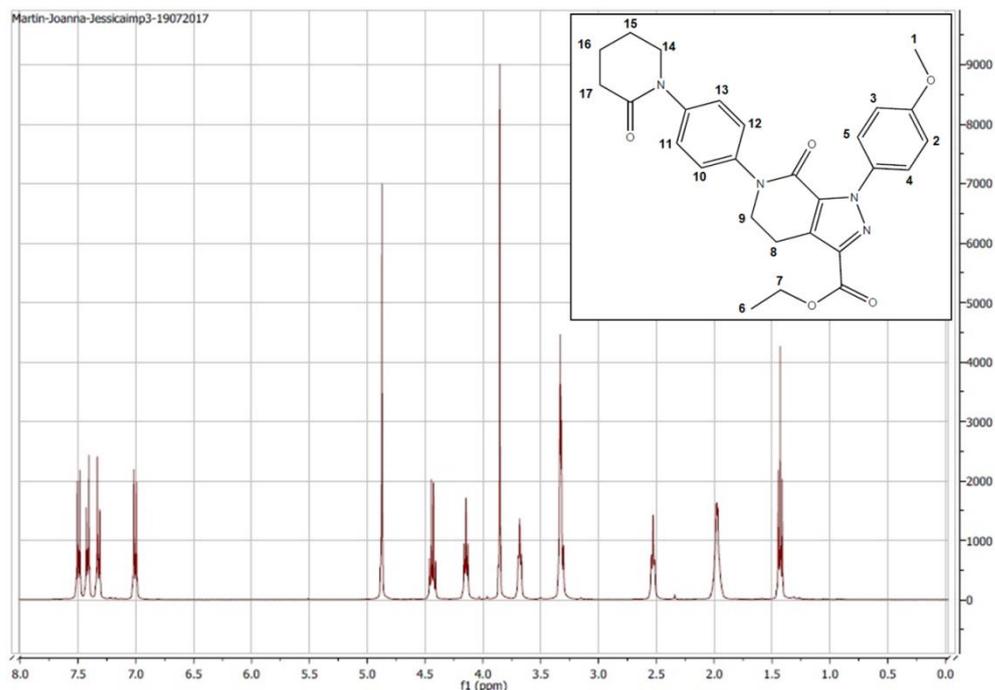


Figura 22. Espectro de RMN ^1H da Impureza 3 obtido a partir de 20 mg de amostra em aparelho Bruker Ascend.

Tabela 7. Atribuição dos sinais dos sinais teóricos para o espectro de RMN ^1H da Impureza 3.

Deslocamento (ppm)	Multiplicidade	Integral	Atribuição	Identificação
1,30	Tripleto	3	CH ₃	6
1,78	Multipleteo	2	CH ₂	15
2,00	Multipleteo	2	CH ₂	16
2,24	Tripleto	2	CH ₂	17
3,10	Tripleto	2	CH ₂	8
3,30	Tripleto	2	CH ₂	9
3,85	Singleteo	3	CH ₃	1
4,30	Quadrupleteo	2	CH ₂	7
4,35	Tripleto	2	CH ₂	14
6,75	Duplo dupleteo	2	CH	11, 13
7,00	Duplo dupleteo	2	CH	2, 3
7,35	Duplo dupleteo	2	CH	10, 12
7,53	Duplo dupleteo	2	CH	4, 5

Comparando os espectros de RMN ^1H com as tabelas calculadas baseada nos deslocamentos teóricos, é possível perceber a diferença não apenas na

multiplicidade dos sinais, mas também no número de sinais a serem atribuídos por espectro. Este fenômeno pode estar relacionado à saturação da amostra, de modo que alguns sinais ficaram sobrepostos e outros demonstraram baixa intensidade, principalmente no espectro da SQR da apixabana. Ainda assim, foi possível atribuir alguns sinais correspondentes e caracterizar as estruturas químicas da SQR e impurezas, corroborando com a identificação de todos analitos.

4.4.4 Resultados para Espectrometria de Massas

Representado na Figura 23, o espectro de massas obtido para apixabana apresenta sinal do íon molecular com m/z 460 $[M+H]^+$ correspondente à massa molecular do fármaco (459,48 g/mol) em ionização positiva. Além dele, também são perceptíveis os íons m/z 443, m/z 199 e m/z 184, fragmentos característicos da molécula com já exposto por PINTO *et al* (PINTO, 2007; SECRETÁN, 2016).

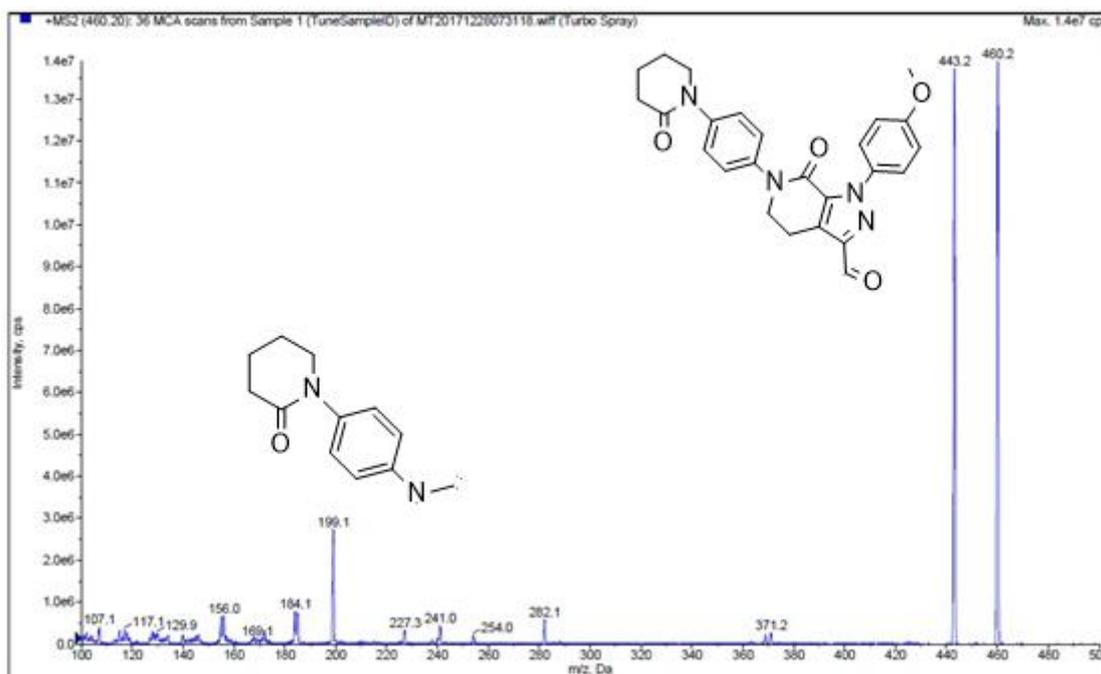


Figura 23. Espectro de massas da apixabana a partir de solução a 100 ng/mL e dados adquiridos pelo software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems).

Analisando o espectro da SQR da impureza 1, demonstrado na Figura 24, pode-se observar o íon precursor do fármaco m/z 257 $[M+H]^+$, cujo peso molecular é 256,69 g/mol. O íon m/z 122 é o mais abundante, referente à perda de $C_4H_5NO_2Cl$.

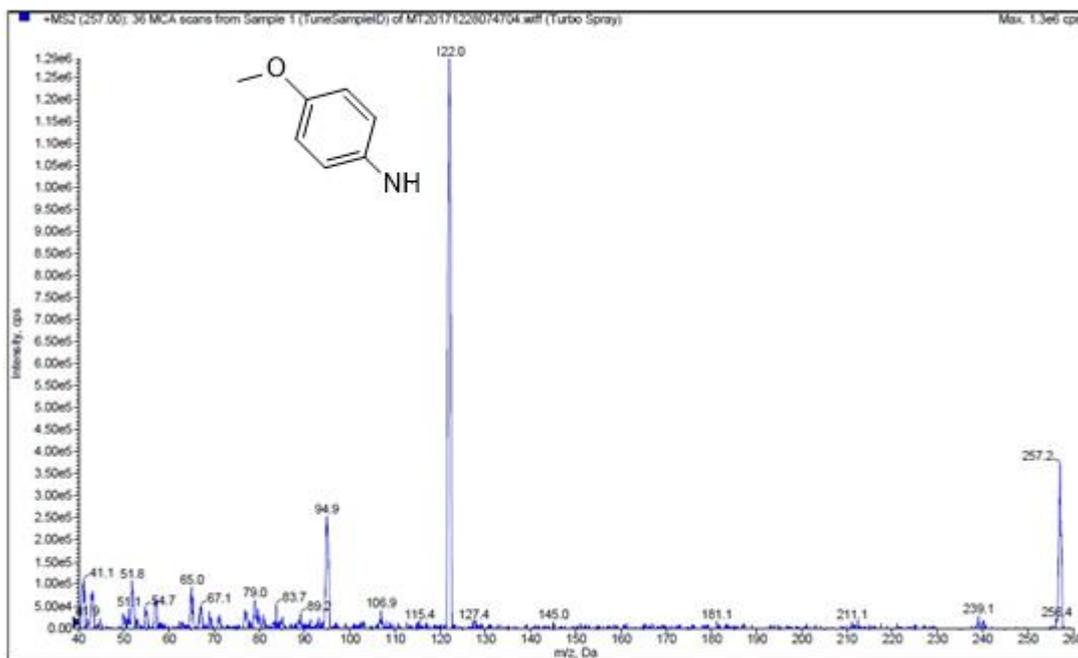


Figura 24. Espectro de massas da impureza 1 a partir de solução a 100 ng/mL e dados adquiridos pelo software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems).

O espectro da impureza 2 (Figura 25), de massa molecular 355,43 g/mol, tem como sinal mais abundante o íon molecular m/z 356. Isso se dá pela estabilidade que os anéis ressonantes proporcionam à estrutura. O fragmento m/z 312 refere-se à perda de C_2H_4O em virtude da abertura do anel de 6 membros contendo oxigênio e nitrogênio.

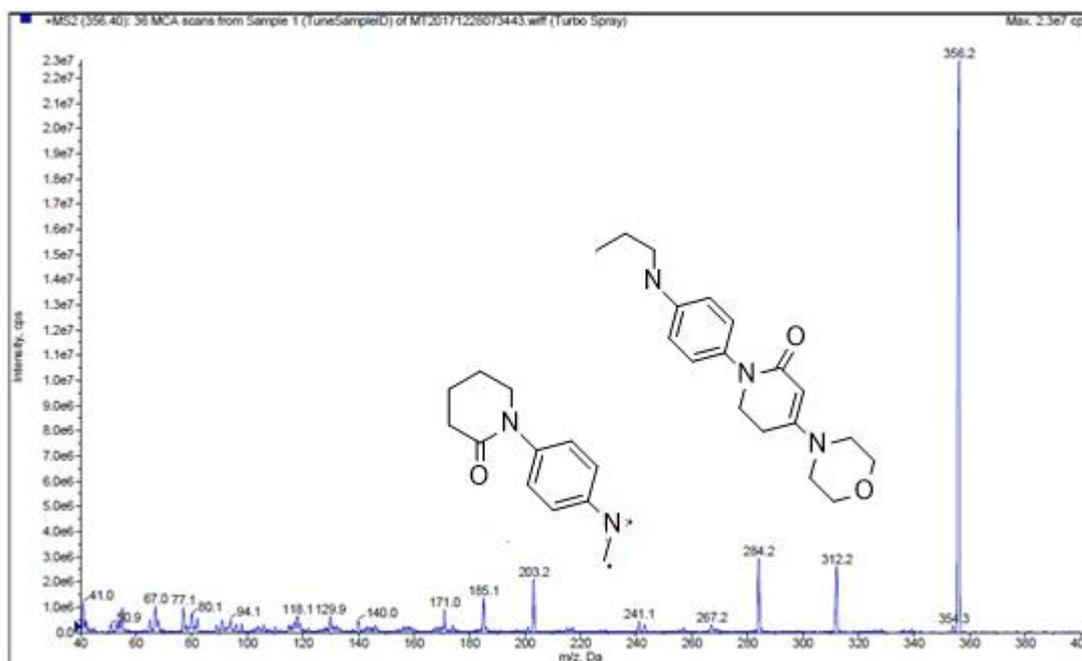


Figura 25. Espectro de massas da impureza 2 a partir de solução a 100 ng/mL e dados adquiridos pelo software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems).

Conforme demonstrado na Figura 26, o principal sinal no espectro da impureza 3 possui m/z 489 $[M+H]^+$, correspondente com o peso molecular da substância (488,54 g/mol), comprovando sua identidade. Destacam-se também os sinais m/z 443,2, fragmento em comum com a apixabana, referente à perda do grupamento $-OCH_2CH_3$ e o conjunto m/z 77 e m/z 51 pertencentes ao *cluster* aromático, evidenciando a presença de anel benzênico na molécula.

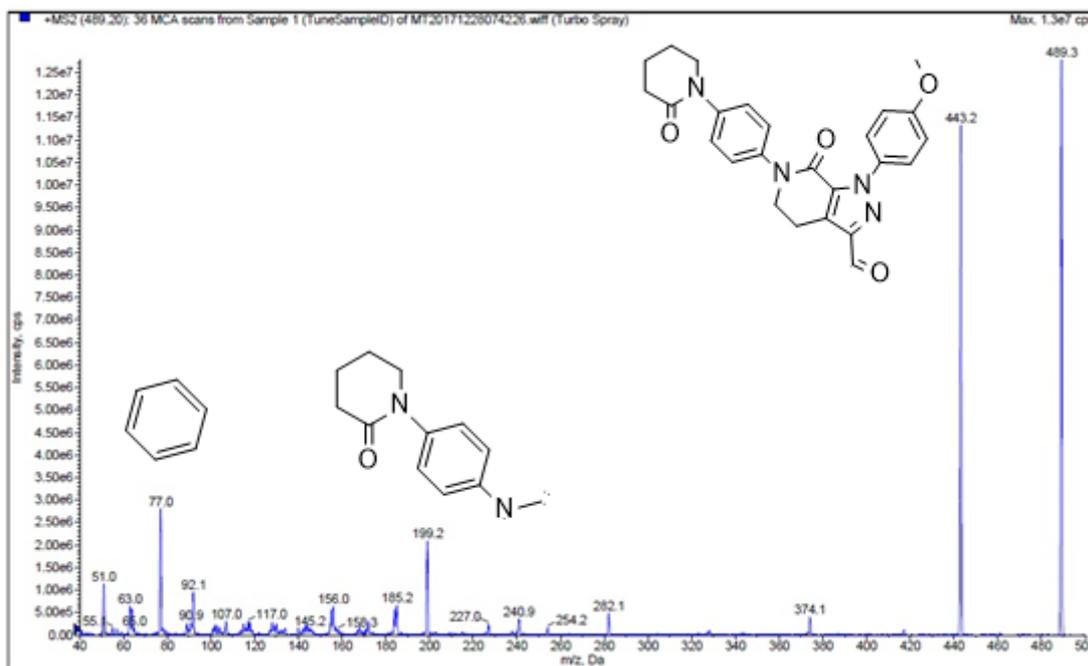


Figura 26. Espectro de massas da impureza 3 a partir de solução a 100 ng/mL e dados adquiridos pelo software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems).

5 Conclusões

Através das análises realizadas e da comparação dos resultados obtidos com o disposto na literatura, foi possível caracterizar as SQRs de apixabana e das impurezas. Desta forma, o conjunto de dados nos permite comprovar a identidade das substâncias, estando estas aptas a serem utilizadas de forma segura no desenvolvimento e validação do método analítico.

Como alguns dados para as impurezas não estavam disponíveis na literatura, os resultados obtidos neste trabalho são inéditos, podendo assim servir de subsídio para pesquisas futuras com estas substâncias.

Ainda, é importante ressaltar que a caracterização de uma substância não se dá por um teste isolado, ainda que este seja específico. Para estabelecer ou

confirmar a identidade da substância deve-se considerar o somatório de diferentes técnicas analíticas e seus resultados.

6 CAPÍTULO II. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE APIXABANA E SUAS IMPUREZAS

6.1 Introdução

Apixabana faz parte da classe de NOADs, atuando como inibidor do fator Xa da cascata de coagulação. Apesar da classe apresentar maior segurança em relação aos tratamentos mais antigos, o monitoramento contínuo por parte dos fabricantes quanto à pureza destas substâncias é não apenas necessário, mas exigido.

Segundo previsto nos guias Q3A (R2) e Q3B (R2) do ICH, e na RDC 166/2017 da ANVISA, é mandatória a apresentação de estudos acerca do perfil de impurezas dos seus produtos para que as indústrias farmacêuticas tenham seus pedidos de registro ou renovação de produtos farmacêuticos concedidos. A complexidade dos estudos a serem feitos está relacionada à dose diária do fármaco em questão e da relação desta com a quantidade encontrada da substância contaminante. (ICH Q3A(R2), 2006; ICH Q3B(R2), 2006; BRASIL, 2017)

Para tal, é necessário dispor de técnicas analíticas adequadas para detecção, identificação e quantificação dessas prováveis impurezas que podem estar presentes nos produtos farmacêuticos. A CLAE é uma técnica consagrada, que alia a seletividade da separação dos compostos com sensibilidade, sendo adequada para investigação de impurezas em fármacos.

Neste sentido, desenvolver e validar metodologias sensíveis que sejam capazes de detectar pequenas quantidades de analitos nos produtos farmacêuticos tem se tornado uma necessidade cada vez maior para os fabricantes. Isso se intensifica quando os fármacos não são descritos por nenhum compêndio oficial ou monografia farmacopeica, como é o caso da apixabana.

O *Quality by Design* é uma abordagem amplamente utilizada para desenvolvimento de métodos analíticos otimizados de maneira rápida e eficiente. Ele oferece ferramentas de predições estatísticas que ajudam na tomada de decisão e melhor entendimento do processo.

Assim, este capítulo teve por objetivo desenvolver um método seletivo para detecção, identificação e quantificação da apixabana e suas impurezas sintéticas, bem como para seus produtos de degradação.

6.2 ARTIGO CIENTÍFICO: Quality by Design approach for a stability-indicating method to determine apixaban and its related impurities

As páginas 89 – 108 foram suprimidas da dissertação por conterem informações submetidas a periódico científico.

6.3 Estudo de degradação da Apixabana

Analisando os resultados do estudo de degradação forçada, foi possível observar a formação de derivados da apixabana nas condições hidrolíticas ácida (HCl 0,1 M) e básica (NaOH 0,1 M), e consequente redução no teor do fármaco, como evidenciado na Figura 33. Além das três impurezas sintéticas (picos 2, 5 e 6), estão presentes no cromatograma dois produtos oriundos da degradação básica (picos 1 e 3) e os picos 4a e 4b, referentes à apixabana em condições normais e degradada, respectivamente. As condições de degradação térmica, fotolítica e oxidativa não causaram alterações no teor da apixabana ou detecção de algum de seus produtos de degradação.

Ainda na Figura 33, cabe ressaltar que as substâncias relacionadas oriundas da degradação básica não interferem na detecção e quantificação da apixabana, uma vez que mesmo nas amostras sob estresse, não houve alteração na pureza do seu pico, conforme verificado pelo *software* Lab Solutions[®]. Desta forma, o método provou ser não apenas seletivo, mas também indicativo de estabilidade.

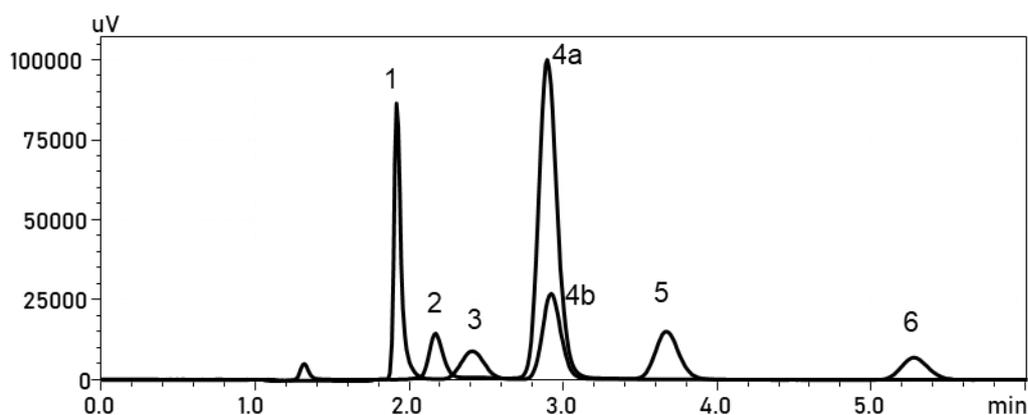


Figura 33: Representação do cromatograma referente à hidrólise básica sobreposto à mistura de apixabana e impurezas sintéticas adquirido pelo software LabSolutions. Produto de degradação básico majoritário (1), impureza 1 (2), produto de degradação básico (3), apixabana (4a), apixabana após hidrólise (4b), impureza 3 (5), impureza 2 (6).

6.4 Aplicação do QbD

A abordagem *QbD* foi um diferencial importante durante o desenvolvimento analítico, não apenas auxiliando na economia de tempo e recursos, mas principalmente aplicando o conhecimento adquirido através da análise de cada um

dos CPFs, o que possibilitou sua otimização. Dessa forma, o método obtido ao final da aplicação se mostrou mais eficiente, em questão de separação e rapidez, em relação aos resultados obtidos nos testes iniciais. A Figura 34 apresenta um comparativo entre os cromatogramas gerados com método antes (33a) e depois (33b) da aplicação do *QbD*. Percebe-se que a sobreposição de picos foi solucionada, demonstrando resolução adequada entre todos os picos. Além disso, nota-se redução significativa no tempo de análise, sendo mais rápido que todos os métodos já reportados na literatura para análise da apixabana e compostos relacionados.

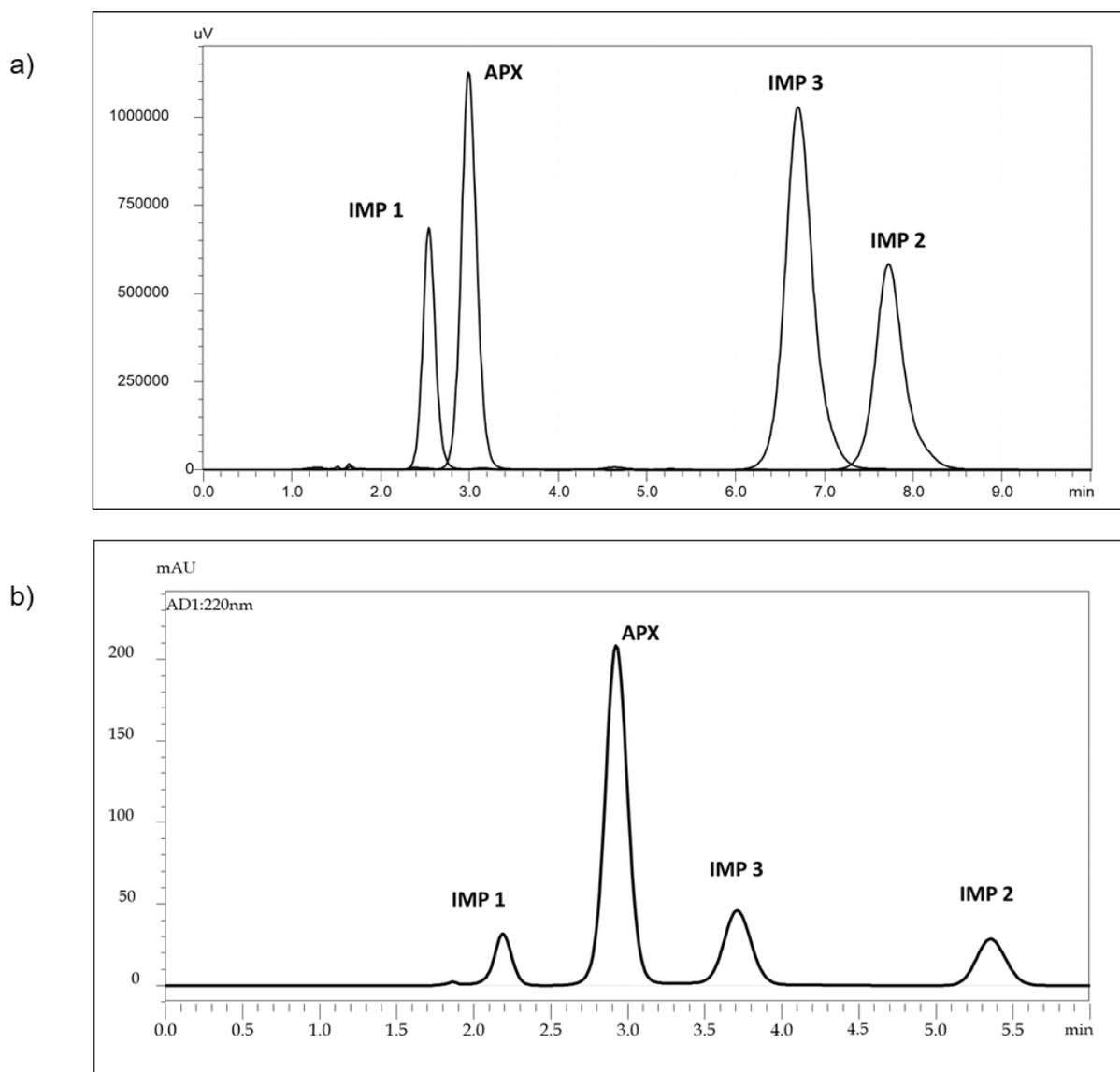


Figura 34: Representação dos cromatogramas obtidos para análise da apixabana e suas impurezas sintéticas antes (a) e depois (b) da aplicação da abordagem *QbD*. No primeiro cromatograma, a análise tem tempo total de 10 minutos e todos compostos estão na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Já no cromatogramas (b), as substâncias estão a 100% da concentração de trabalho (25 $\mu\text{g/mL}$ para apixabana e 5 $\mu\text{g/mL}$ par as impurezas), totalizando 6 minutos de análise.

Assim como já demonstrado em pesquisas como a de Karmarkar (KARMARKAR, 2014) e de Zhang (ZHANG, 2017), os resultados obtidos neste trabalho corroboram e justificam o crescimento da literatura científica relacionada ao uso do *QbD* voltado para o entendimento e a otimização de métodos analíticos. Isso fica ainda mais evidente no que tange aos métodos para substâncias relacionadas, que devem detectar diversos compostos com estrutura semelhante em um curto espaço de tempo com resolução e pureza adequadas.

Ainda, é importante frisar que as agências regulatórias nacionais e internacionais tem recomendado o estudo da robustez dos métodos analíticos durante seu processo de desenvolvimento, e não mais ao final da validação. Isso reforça os princípios do *QbD*, pois remete ao entendimento das variáveis relacionadas e, conseqüentemente, de sua influência como peça chave no desenvolvimento da ferramenta analítica, agregando confiabilidade e eficiência ao produto final.

6.5 Conclusão

Para garantir a qualidade e segurança dos produtos farmacêuticos, as agências regulatórias estão cada vez mais rigorosas quanto à presença de impurezas e elaboração dos estudos de degradação. Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento e validação de métodos analíticos que possibilitem a avaliação e monitoramento destas substâncias. O método desenvolvido neste trabalho e discutido no presente capítulo se mostrou uma ferramenta analítica robusta, confiável e adequada para este propósito, podendo ser facilmente introduzido na rotina para quantificação de APX e suas impurezas.

A aplicação do *QbD* permitiu entendimento mais aprofundado do processo, proporcionando a identificação de três fatores chave para o processo: vazão de fase móvel, temperatura da coluna e percentual de fase orgânica. Além disso, houve redução no tempo total de desenvolvimento, uma vez que o método já foi desenvolvido de maneira otimizada e os experimentos planejados estrategicamente, evitando também o uso desnecessário de grandes quantidades de solventes e analitos.

Por fim, o conhecimento da influência de cada um dos fatores envolvidos no processo é muito importante para efetuar análise de risco e manutenção da ferramenta analítica. Ao aliar os conceitos de desenho experimental e estatística ao software de predição, o *QbD* se apresenta como uma ferramenta importantíssima na tomada de decisão no que diz respeito a desenvolvimento de processos farmacêuticos.

7 CAPÍTULO III. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS IMPUREZAS DA APIXABANA

7.1 Introdução

A síntese de novos fármacos envolve o uso de diversos reagentes, solventes catalizadores e intermediários orgânicos. Tais substâncias podem estar presentes no produto final, que ainda é passível algum tipo de degradação. Dado que muitas destas substâncias são desconhecidas ou inéditas, sua avaliação toxicológica é importante para garantir a segurança do produto final (ICH M7(R1), 2017).

Ainda, sabe-se que a segurança de um produto farmacêutico é assegurada não apenas pela qualidade do insumo e compatibilidade com os excipientes, mas também pela ausência de toxicidade de impurezas e produtos de degradação. Neste sentido, o guia M7 (R1) do ICH fornece recomendações para avaliação do potencial mutagênico de impurezas e, garantir que as mesmas sejam controladas em níveis seguros (ICH M7, 2014).

A Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) tem como missão promover políticas que melhorem o bem-estar econômico e social em todo o mundo. Na área de produtos químicos, a OECD apresenta metodologias alternativas para a avaliação da toxicidade aguda *in vitro* e, suas orientações servem de referência internacional (OECD, 2010; PINTO, 2015).

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas. Já os estudos subcrônicos *in vivo* costumam ter duração de 1 a 3 meses e visam estimar o efeito de diversas administrações do tratamento (PINTO, 2015).

Hepatócitos de cultura primária, fatias de fígado e microsomas são modelos *in vitro* bastante utilizados para estudos de metabolismo de fármacos e drogas de abuso. As células HepG2 são oriundas de hepatoblastoma e representam o primeiro ponto de acúmulo para xenobióticos de circulação sistêmica após administração oral. Assim, essa linhagem celular é amplamente utilizada como um sistema de teste para a predição de toxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade celular em humanos. Para este tipo de linhagem, a concentração recomendada é de 1×10^5 células por mL de suspensão (DONATO, 2008; REPETTO, 2008; AHMED, 2015).

São muitos os métodos que podem ser utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro*. Dentre eles, os mais utilizados para citotoxicidade são MTT e vermelho

neutro (VN). O ensaio do MTT mede a atividade da enzima succinato desidrogenase, um indicador de mitocôndrias metabolicamente ativas e, portanto, da viabilidade celular. O MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazolio) é um sal de tetrazólio solúvel em água e, ao ter seu anel reduzido, forma um derivado formazânico insolúvel, que se acumula nas células íntegras. Já o VN baseia-se na capacidade de células viáveis de incorporar e ligar o corante catiônico vermelho neutro, que penetra nas células por difusão, acumulando-se nos lisossomas pela interação com os sítios aniônicos na matriz lisossomal (OGA, 2008; REPETTO, 2008 SILVA, 2015).

Dada a necessidade de averiguar o comportamento das células frente às substâncias contaminantes possivelmente presentes no produto farmacêutico e a ausência de estudos de toxicidade para as impurezas sintéticas da apixabana na literatura científica, este capítulo teve como objetivo investigar a toxicidade aguda das impurezas sintéticas isoladas e associadas ao fármaco, bem como simular uma exposição subcrônica.

7.2 Materiais e Métodos

7.2.1 Linhagem

Para o estudo toxicológico foi utilizada linhagem celular HepG2 de hepatoblastoma humano. As células foram cultivadas em frascos de 75 cm² usando meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) com alta concentração de glicose, suplementado com soro bovino fetal a 10% e solução antibiótica a 1%. Os frascos contendo as células foram mantidos em estufa a 37 °C com atmosfera de CO₂ a 5% e O₂ a 95%, com troca de meio a cada 2 ou 3 dias, conforme a necessidade. Quando a confluência atingia 70 - 80%, era realizada tripsinização com solução de tripsina a 0,25% e EDTA 1 mM. O subcultivo não excedeu 10 passagens.

7.2.2 Planejamento dos ensaios

Primeiramente, os ensaios de MTT e VN foram realizados tanto para o fármaco, quanto para cada uma das impurezas isoladamente nas concentrações de 0,1, 1,0, 5,0, 10,0, 50,0, 100,0, 500,0 e 1000,0 µM. Os experimentos foram

executados em triplicata para cada uma das concentrações e testada com três repetições.

Em seguida, foi avaliada a toxicidade da mistura da apixabana nestas mesmas concentrações, na presença das impurezas a 0,1%, conforme Tabela 11. As amostras foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em meio DMEM. Os tempos de exposição das células ao tratamento com as amostras foram de 24 horas para os testes de toxicidade aguda e de 96 horas para mimetizar uma situação de toxicidade subcrônica. A análise estatística foi realizada através de ANOVA/Bonferroni ($p < 0,001$ versus controle).

Tabela 11. Concentrações contidas na solução mistura contendo apixabana e cada uma das impurezas sintéticas a ser avaliada por VN e MTT em 24 e 96 horas.

	Apixabana	Impurezas 1, 2 e 3
Concentração amostra 1 (μM)	10,0	0,01
Concentração amostra 2 (μM)	100,0	0,1
Concentração amostra 3 (μM)	1000,0	1

7.2.3 Preparo de amostra

Para ambos os ensaios, as células cultivadas foram lavadas com PBS (*phosphate buffer solution*) e, devido à aderência característica da linhagem HepG2, uma nova lavagem com solução de tripsina foi realizada. Em seguida, o meio foi repostado e o conteúdo transferido para tubo falcon e, a partir de uma alíquota de 10 μL , foi realizada contagem das células em câmara de Neubauer. A partir da quantidade de células contadas tem-se a concentração da suspensão. Relacionando esta concentração e o volume da placa a ser utilizado, foi possível calcular a alíquota a ser retirada da suspensão para realização do ensaio. O diluente empregado foi o meio DMEM e o volume final era de 100 μL por poço. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas.

No dia seguinte, o meio foi retirado e nos poços foram pipetados 100 μL de solução referente a cada diluição do tratamento em meio DMEM. O controle negativo utilizado foi o meio DMEM, pois não causa nenhum dano às células, enquanto o controle positivo foi triton 100%, tensoativo que provoca morte celular.

No terceiro dia, para avaliação de 24h, e no sexto, para a de 96 h, foi removido o meio contendo o tratamento e seguido o protocolo para cada um dos testes, conforme subitens **7.2.3.1** e **7.2.3.2**.

7.2.3.1 Vermelho Neutro

Para este ensaio, foram adicionados 200 µL de solução de VN e as placas levadas a estufa para incubação a 37 °C por 2 horas. Passada a incubação, a solução foi removida, realizada lavagem com 200 µL PBS e, em seguida, foram adicionados 100 µL de solução contendo ácido acético e etanol, provocando lise celular e liberação do corante VN. Após 10 minutos em agitador, as placas foram avaliadas em espectrofotômetro SpectraMax M2 (California, EUA) com detecção em 540 nm. O cálculo da viabilidade foi realizado através da fórmula 1.

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância controle positivo} \times 100}{\text{absorbância controle negativo}} \quad (1)$$

7.2.3.2 MTT

Para realização do MTT, foram adicionados 100 µL de solução de MTT seguido por incubação das placas em estufa por 2 horas. Após, esta solução foi removida e, a todos os poços foram adicionados 100 µL de DMSO para lise celular. A placa passou por agitador por 10 minutos e feita a leitura em espectrofotômetro SpectraMax M2 no comprimento de onda de 585 nm. A viabilidade celular também foi calculada com base na fórmula 1.

7.3 Resultados e discussão

No teste do VN, avalia-se a viabilidade celular através da capacidade das células viáveis de incorporar o corante VN nos lisossomos. Os resultados referentes aos ensaios do VN estão apresentados graficamente como porcentagem de morte celular em relação ao controle pela concentração (µM). Como pode-se observar nas

Figuras 35 e 36, as substâncias isoladas não demonstraram citotoxicidade nas concentrações avaliadas.

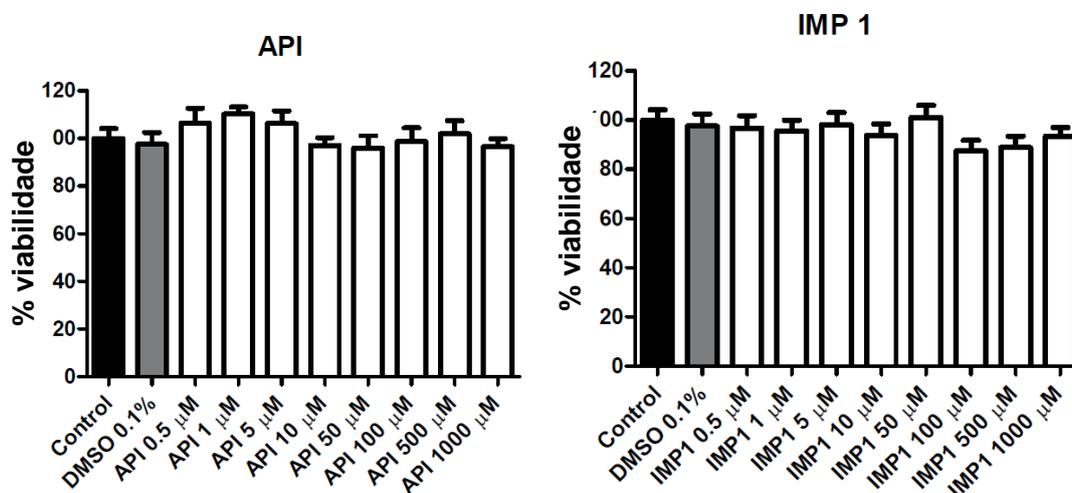


Figura 35. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à apixabana (a) e à impureza 1 (b) pelo ensaio do vermelho neutro por 24h.

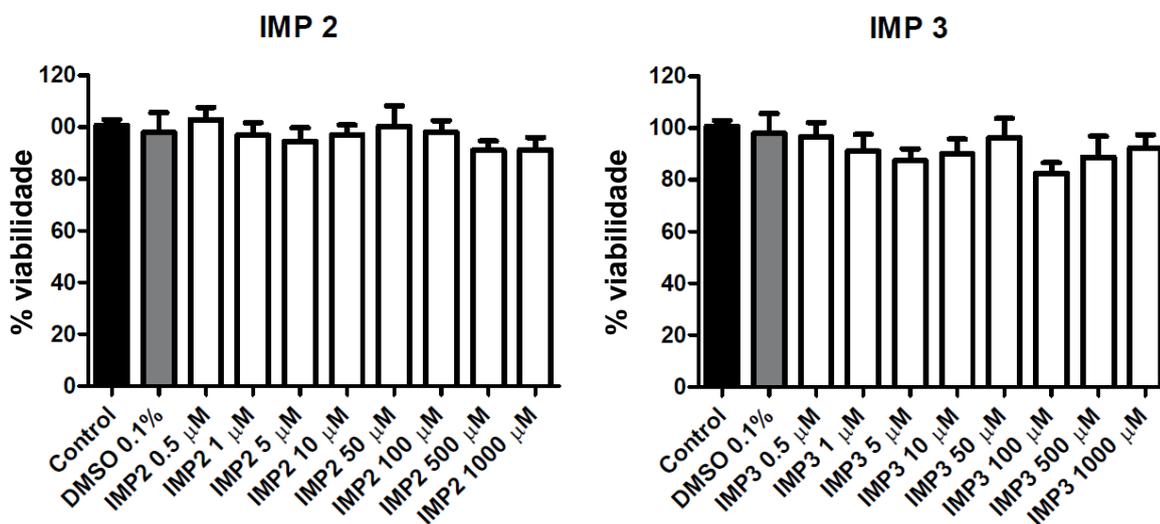


Figura 36. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à impureza 2 (a) e à impureza 3 (b) pelo ensaio do vermelho neutro por 24h.

No entanto, quando avaliadas em conjunto, com o intuito de simular uma situação real em que as impurezas estariam presentes no produto acabado, a maior concentração apresentou diferença significativa em relação ao controle (Figura 37).

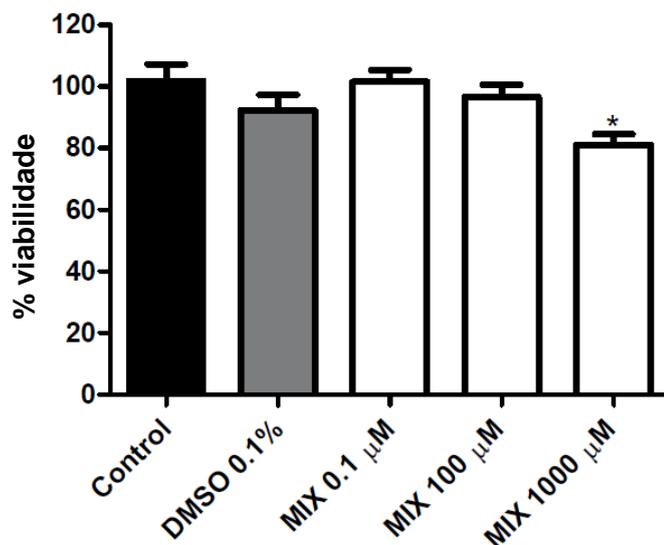


Figura 37. Resultados da avaliação citotóxica por vermelho neutro de células HepG2 frente à mistura da apixabana contaminada com as impurezas 1, 2 e 3 a 0,1% da sua concentração por 24h.

Da mesma forma, os resultados do MTT com tratamento de 24 horas também demonstraram ausência de toxicidade para as amostras isoladas, como pode-se ver nas Figuras 38 e 39.

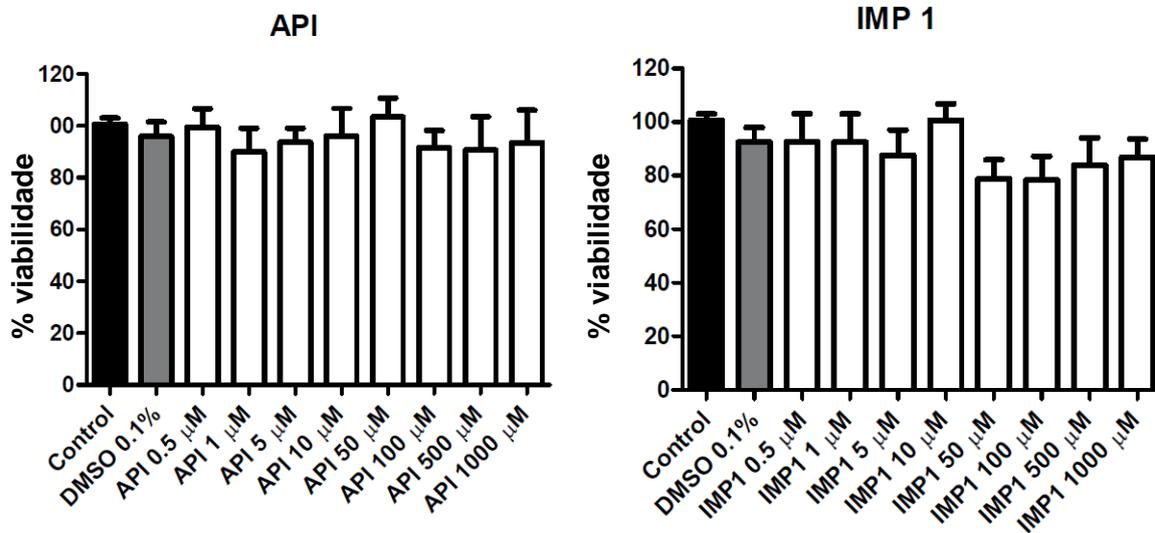


Figura 38. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à apixabana (a) e à impureza 1 (b) pelo ensaio do MTT por 24h.

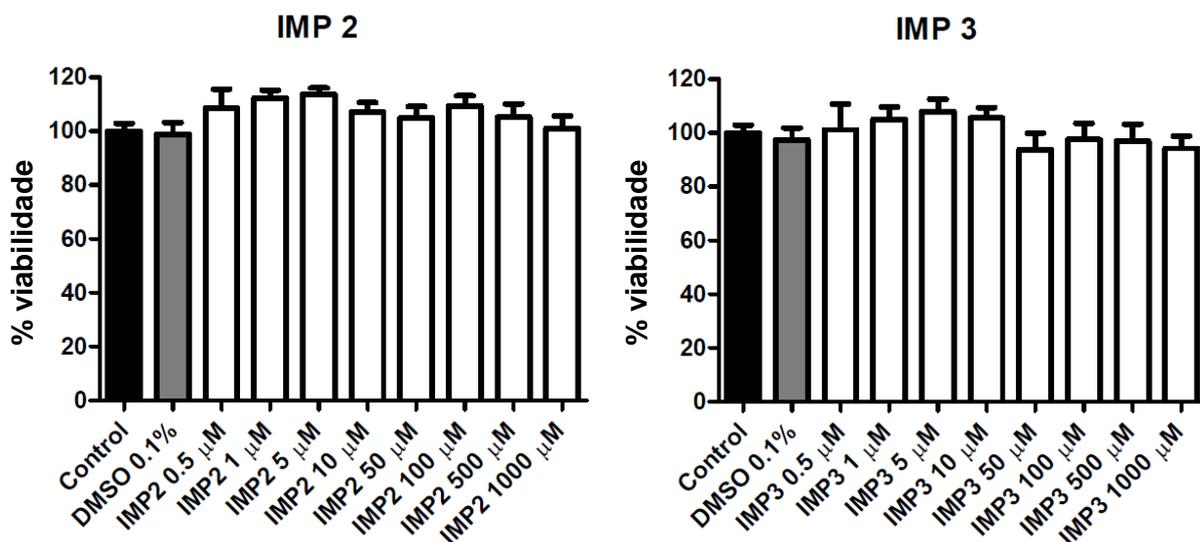


Figura 39. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à impureza 2 (a) e à impureza 3 (b) pelo ensaio do MTT por 24h.

Ainda corroborando com o ensaio do VN, novamente a amostra contendo a mistura do fármaco e suas impurezas na concentração mais elevada teve diferença significativa quando comparado ao controle positivo (Figura 40).

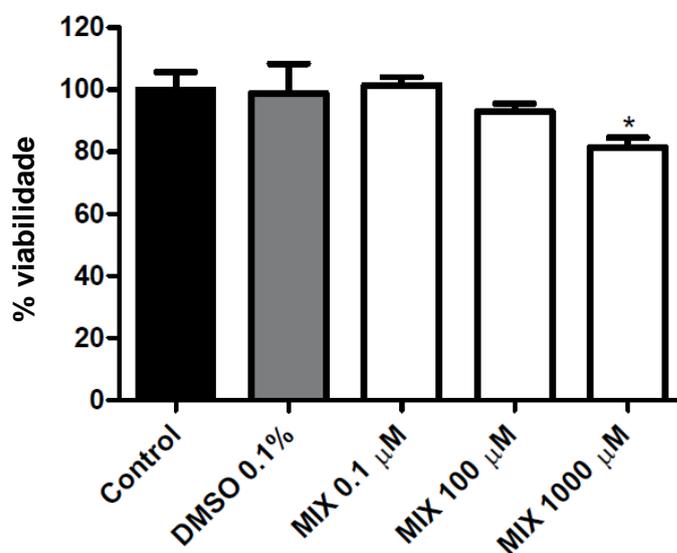


Figura 40. Resultados da avaliação citotóxica por MTT de células HepG2 frente à mistura da apixabana contaminada com as impurezas 1, 2 e 3 a 0,1% da sua concentração por 24h.

A concordância dos resultados apontando toxicidade aguda para a mistura do fármaco e suas impurezas demonstra a importância do monitoramento constante dos produtos farmacêuticos e do desenvolvimento de métodos para esta avaliação.

As substâncias também foram submetidas à exposição de 96 horas, onde a apixabana e as impurezas 1 e 2 continuaram sem demonstrar toxicidade. A Figura 41 ilustra estes resultados de VN, ao passo que, como pode ser visto na Figura 42, a impureza 3 foi tóxica na maior concentração (1000 μM).

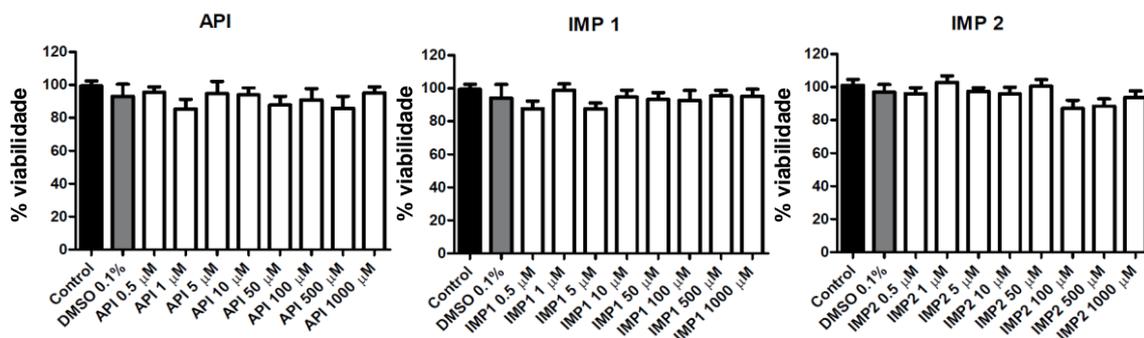


Figura 41 Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à apixabana (a), à impureza 1 (b) e à impureza 2 (c) pelo ensaio do VN por 96h.

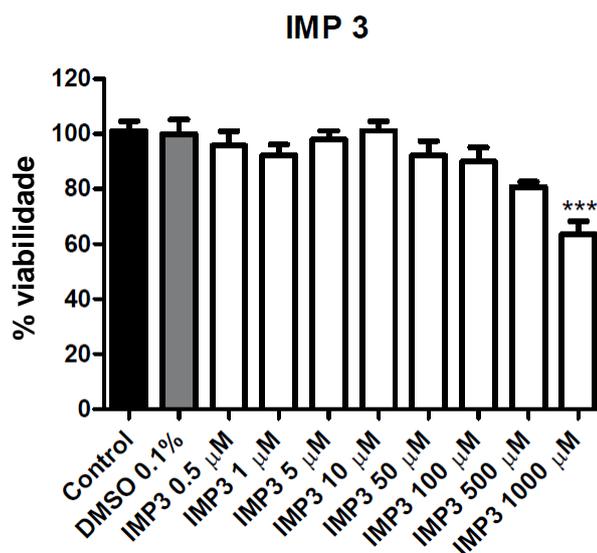


Figura 42. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à impureza 3 (b) pelo ensaio do VN por 96h.

Ainda neste ensaio, embora visualmente a mistura do fármaco e impurezas demonstre morte celular (Figura 43), esta diferença não foi estatisticamente significativa.

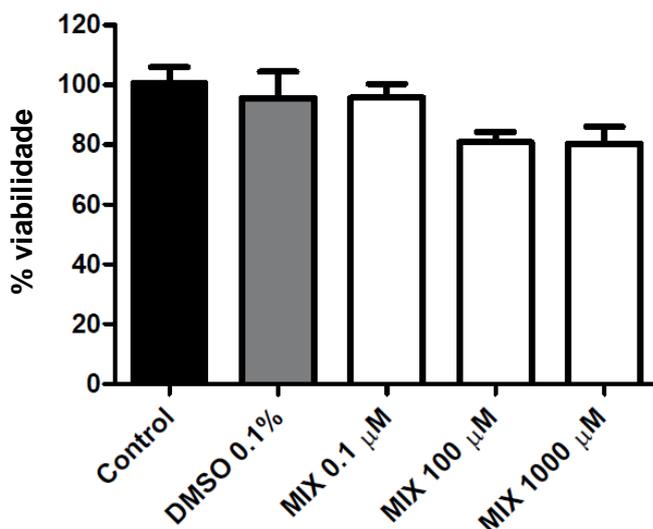


Figura 43. Resultados da avaliação citotóxica por vermelho neutro de células HepG2 frente à mistura da apixabana contaminada com as impurezas 1, 2 e 3 a 0,1% da sua concentração por 96h.

Novamente pode-se observar concordância entre os resultados do teste do VN e do MTT. A Figura 44 exibe a ausência de toxicidade da apixabana, impureza 1 e impureza 2 analisadas isoladamente por MTT em 96 horas de exposição.

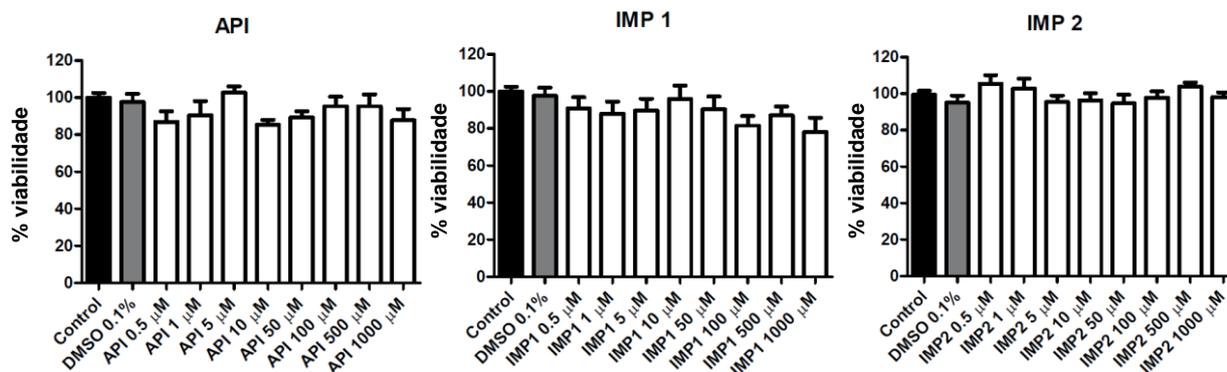


Figura 44. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à apixabana (a), à impureza 1 (b) e à impureza 2 (c) pelo ensaio do MTT por 96h.

A impureza 3 também se mostrou citotóxica no ensaio do MTT, porém, em duas concentrações: 500 µM e 1000 µM, como apresentado na Figura 45. Esta diferença de sensibilidade entre um teste e outro pode ser atribuída ao fato dos ensaios terem mecanismos diferentes, visto que o MTT avalia a permeabilidade da membrana da célula viável, enquanto o VN estima sua atividade lisossomal.

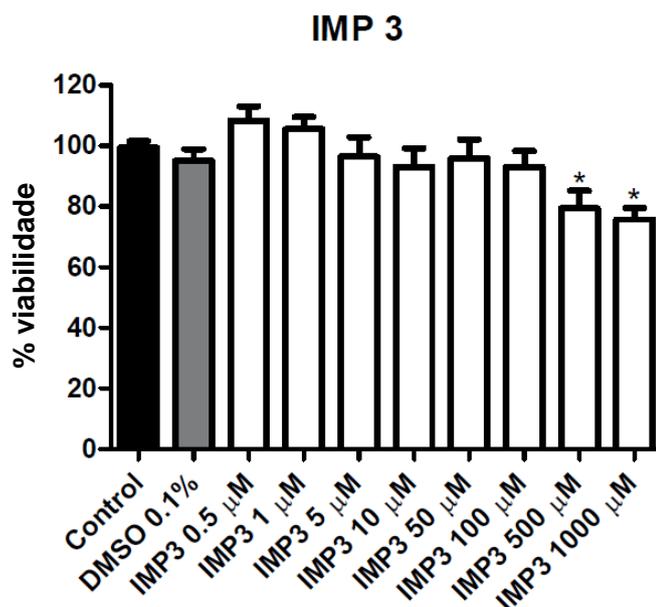


Figura 45. Resultados da avaliação citotóxica de células HepG2 frente à impureza 3 pelo ensaio do MTT por 94h.

Por fim, a mistura de fármaco e impurezas não se mostrou tóxica no ensaio do MTT de exposição prolongada. Estes resultados também estão de acordo com os achados do VN e constam na Figura 46.

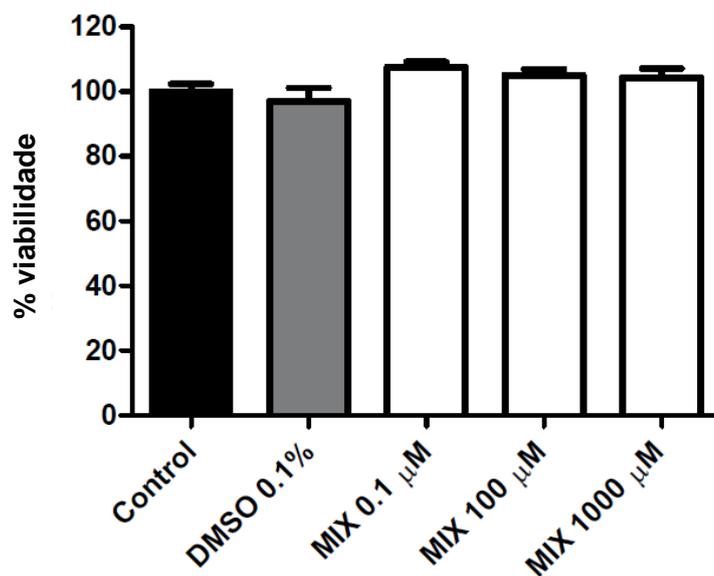


Figura 46. Resultados da avaliação citotóxica MTT de células HepG2 frente à mistura da apixabana contaminada com as impurezas 1, 2 e 3 a 0,1% da sua concentração por 96h.

Com relação aos resultados obtidos para a mistura no MTT, nota-se uma discrepância entre os tempos de 24 e 96 horas, pois o primeiro havia demonstrado citotoxicidade. Entretanto, cabe ressaltar que o ensaio do MTT não mede a morte

das células, mas sim a sua atividade metabólica através da succinato desidrogenase. A redução do metabolismo celular é apenas um indicativo de dano e este não necessariamente levará à morte. Desta forma, os resultados indicam que no tempo de 96 horas as células teriam sofrido desaceleração no seu metabolismo, porém, através de mecanismos compensatórios de detoxificação, os danos causados pela mistura foram revertidos, ao passo que as células expostas a 24 horas de tratamento não foram capazes de ativar estas vias (GOLAN, 2013). Tendo em vista que a recuperação foi bastante aparente no ensaio do MTT, o que não pode-se observar no ensaio do VN, supõe-se que este mecanismo de detoxificação esteja associado à mitocôndria. Mecanismos relacionados ao aumento da atividade mitocondrial, bem como vias como a do PGC 1 α , que desempenha papel central na regulação da biogênese e cadeia respiratória, podem estar envolvidas neste processo, sendo alvos interessantes para investigações mais aprofundadas (LIN, 2005).

7.4 Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos através dos testes de VN e MTT, conclui-se que as substâncias analisadas possuem perfil toxicológico diferenciado. Para toxicidade aguda, apenas a mistura apresentou danos às células de hepatoblastoma humano enquanto que, isoladamente, foram bem toleradas em todas as concentrações.

Já na abordagem realizada visando mimetizar um tratamento mais duradouro, as células foram expostas ao tratamento por 96 horas e apenas a impureza 3 apresentou toxicidade. Além disso, possivelmente os danos causados pela mistura em 24 horas puderam ser revertidos por algum mecanismo de defesa celular ativado após maior tempo de exposição ao tratamento.

Sendo assim, mais estudos devem ser conduzidos para determinar o potencial citotóxico da impureza 3, tal como ensaio cometa, que visa avaliação de danos ao DNA e citometria de fluxo para identificação do mecanismo de morte celular. Ainda, os resultados obtidos neste capítulo mostram-se inovadores, tanto pela ausência de dados acerca da toxicidade destes compostos na literatura científica, como a aplicação de um teste *in vitro* para avaliação toxicológica subcrônica.

Ainda, cabe ressaltar a importância da pureza do produto farmacêutico, visto que a presença de contaminantes pode causar prejuízos à saúde do usuário, bem como do monitoramento constante do perfil de impurezas e seus limites, a fim de que estejam sempre dentro das faixas especificadas, garantindo assim a qualidade do medicamento e a segurança do usuário.

- A caracterização da SQR de apixabana, realizada por diferentes técnicas, possibilitou a confirmação de sua identidade, permitindo seu uso como padrão ao longo do desenvolvimento deste trabalho;
- O conjunto de testes ao qual foram submetidas as SQRs das Impurezas 1, 2 e 3 permitiram sua caracterização, não apenas garantindo sua identidade, mas também fornecendo informações inéditas sobre estas substâncias;
- O método desenvolvido para avaliação da apixabana em presença de suas impurezas orgânicas por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou ser aplicável à quantificação e monitoramento do perfil de impurezas na rotina de trabalho;
- A aplicação do *Quality by Design* agregou muito ao processo de desenvolvimento, tanto no que tange ao entendimento do método e suas variáveis, como também na otimização do tempo, do número total de ensaios realizados e do volume de solventes gastos durante o processo;
- Os ensaios de degradação forçada desempenhados durante a validação do método analítico demonstraram que o mesmo é indicativo de estabilidade e a apixabana é mais sensível a condições de hidrólise ácida e básica;
- Os testes de toxicidade aguda *in vitro* demonstraram que a apixabana, quando em presença de todas as impurezas sintéticas abordadas neste trabalho, apresentou toxicidade em sua maior concentração;
- Mimetizando a administração subcrônica da apixabana e suas impurezas, a impureza 3 se mostrou tóxica, devendo ser investigada por outras técnicas. Já a mistura de impureza e fármaco não apresentou danos, sugerindo algum mecanismo de recuperação.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, R.; JAIN, P.; DIKSHIT, S. N. Apixaban: A new player in the anticoagulant class. **Current Drug Targets**. 13, 863-875, 2012.

AHMEDA, F. R.; SHOAIBA, M. H.; AZHARC, M.; UMD, S. H.; YOUSUFA, R. I.; HASHMIE, S.; DARC, A. *In-vitro* assessment of cytotoxicity of halloysite nanotubes against HepG2, HCT116 and human peripheral blood lymphocytes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 135, 50–55, 2015.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Registro Eliquis. Disponível em: www.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto. Acessado em: 17 mai 2016.

AUSTRÁLIA. Therapeutic Goods Administration, Department of Health and Ageing. **Australian Public Assessment Report for Apixaban**. Australian Government. Novembro, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 17, de 16 de abril de 2010, Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim de Farmacovigilância. Carta de orientação aos médicos sobre o uso do produto Eliquis® (apixabana). Ano II, nº 3, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 53, de 7 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 166, de 24 de julho de 2017, Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.

BONAR, R.; FAVALORO E.J.; MOHAMMED S.; AHUJA M.; PASALIC L.; SIOUFI J.; MARSDEN K. The effect of the direct factor Xa inhibitors apixaban and rivaroxaban on haemostasis tests: a comprehensive assessment using *in vitro* and *ex vivo* samples. **Pathology**, 48, 60–71, 2016.

BRAUNWALD, E.; BONOW, R.; ZIPES, D. P. BRAUNWALD. **Tratado de Doenças Cardiovasculares**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

CASSONE, A.; VIEGAS, A. C.; SGUIZZATTO, G. T.; CABRITA, H. A. B. A.; AQUINO, M. M.; FURLANETO, M. E.; REIFF, R. B. M.; LEME, L. E. G.; AMATUZZ, M. M. Trombose venosa profunda em artroplastia total de quadril. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 37, nº 5, 2002.

CAVAZZUTI, M. Optimization methods: From theory to design. 1ª ed, Berlin: Springer, 2013.

DHAWAN, A.; KWON, S. S. Chapter 3 Principles for *in vitro* toxicology book: *In vitro* toxicology. Official Journal of the European Society of Toxicology in Vitro, Elsevier, 2018.

DELAVENNE, X.; MISMETTI, P.; BASSET, T. Rapid determination of apixaban concentration in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 78– 79, 150– 153, 2013.

DONATO, M.T., LAHOZ, A., CASTELL, J.V., GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. **Current Drug Metabolism**. 9, 1–11, 2008.

EMA - European Medicines Agency. Science Medicines Health – Apixaban (2011). Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002148/WC500107773.pdf. Acesso em: 24 abr 2016.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010. 1v.

FAVAROLO, E. J.; LIPPI, G. Laboratory testing in the era of direct or non–vitamin k antagonist oral anticoagulants: A practical guide to measuring their activity and avoiding diagnostic errors. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. 41, 208–227, 2015.

FDA – Food and Drug Administration. FDA Approved Drug Products - Apixaban (2012) Disponível em: www.fda.gov Acessado em: 18 mai 2016.

FROST, WANG, J.; NEPAL, S.; SCHUSTER, A.; BARRETT, Y. C.; MOSQUEDA-GARCIA, R.; REEVES, R. A.; LACRETA, F. Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology** 75:2, 476–487, 2012.

FURLANETTO, S.; ORLANDINI, S.; PASQUINI, B.; BUBBA, M. D. Quality by design approach in the development of a solvent-modified micellar electrokinetic chromatography method: Finding the design space for the determination of amitriptyline and its impurities. **Analytica Chimica Acta**. 802, 113-124, 2013.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H. Jr.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. Princípios de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2013.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GOROG, S. Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade. **Trends in Analytical Chemistry**. 1 – 15, 2017.

GOTTAPU, S; VATSA, H. K.; ANITHA, B. Analytical method development and validation of chloro impurity and methyl ester impurity by using RP-HPLC. **AJMPS**, 3(1), 214–218, 2015.

GRANGER, C. B.. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. **The New England Journal of Medicine**. Ed 365, 11, 981-992, 2011.

HANAI, T. **HPLC A Practical guide**. 1^a ed, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999.

Health Canada. Summary Basis of Decision Eliquis (2012) Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/prodpharma/sbd-smd/drug-med/sbd_smd_2012_eliquis_141873-eng.pdf Acesso em: 24 abr 2016.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em Hematologia**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOLM, R.; ELDER, D. P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 87, 118–135, 2016.

HUYNH, K. Era of the NOACs. **Nature Milestones**. v 10, 2017.

ICH. **International Conference on Harmonisation**. Validation of Analytical Procedures: methodology. Q2B(R1), 2005.

ICH - **International Conference on Harmonisation**. Impurities in New Drug Substances. Q3A(R2), 2006.

ICH - **International Conference on Harmonisation**. Impurities in New Drug Products. Q3B(R2), 2006.

ICH. **International Conference on Harmonisation**. Pharmaceutical Development. Q8(R2), 2009.

ICH. **International Conference on Harmonisation**. Guideline for Residual Solvents. Q3C(R5), 2011.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7, 2014.

KARMAKAR, S.; YANG, X.; SZAJKOVICS, A.; KOBERDA, M. Quality by design (QbD) based development and validation of an HPLC method for amiodarone

hydrochloride and its impurities in the drug substance. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 100, 167 – 174, 2014.

LANDGE, S. B.; JADHAV, S. A.; DAHALE, S. B.; SOLANKI, P. V.; BEMBALKAR, S. R.; MATHAD, V. T. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method on core shell column for determination of degradation and process related impurities of apixaban—an anticoagulant drug, **American Journal of Analytical Chemistry**, 6, 539-550, 2015.

LASSEN, M.; DAVIDSON, L.; GALLUS, A.; PINEO, G.; ANSELL, J.; DEITCHMAN, D. The efficacy and safety of apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, as thromboprophylaxis in patients following total knee replacement. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 5, 2368–2375, 2007.

LASSEN, M. R.; RASKOB, G.E.; GALLUS A.; PINEO G.; CHEN D.; HORNICK P. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement (ADVANCE-2): a randomised double-blind trial. **Lancet** 375, 807–815, 2010.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; Spiegelman, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metabolism**. Vol 1, 6, 361 – 370, 2005.

LLOYD, D.K.; BERGUM, J.: Chapter 3 – Application of quality by design (QbD) to the development and validation of analytical methods. **Specification of Drug Substances and Products**. ed.: Riley, CM; Rosanske, Elsevier, 2013.

MAKARYUS, J. N.; HALPERIN J. L.; LAU J.F. Oral anticoagulants in the management of venous thromboembolism. **Nature Reviews Cardiology**. 10, 397–409, 2013.

MAXWELL, B. D.; TRAN, S. B.; CHEN, S. Y.; ZHANG, D.; CHEN, B. C.; ZHANG, H.; BONACORSI JR, S. J. The syntheses and in vitro biotransformation studies of [¹⁴C] apixaban, a highly potent, selective, efficacious and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation Factor Xa, **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**. 54, 418–425, 2011.

NEVULURI, N. R; RAPOLU, R. K.; IQBAL, J.; KANDAGATLA, B.; SEN, S.; DAHANUKAR, V. H.; ORUGANTI, S. A morpholine-free process amenable convergent synthesis of apixaban: a potent factor Xa inhibitor, **Monatsh Chem** 148, 1477–1482, 2017.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed, São Paulo: Atheneu, 2008.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Doenças cardiovasculares (2017). Disponível em http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doen-cas-cardiovasculares&Itemid=839. Acesso em: 28 dez 2017.

ORLANDINI, S.; PINZAUTI, S.; FURLANETTO, S. Application of quality by design to the development of analytical separation methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 405, 443–450, 2013.

PAVIA, L. D.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. Canada: Thomson Learning, 2001.

PINTO, D. J. P.; ORWAT, M. J.; KOCH, S.; ROSSI, K. A.; ALEXANDER R. S.; SMALLWOOD, A.; WONG, P. C.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; HE, K.; XIN, B. WEXLER, R. R.; PATRICK Y. S. LAM, P. Y. S. Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (Apxiban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor xa. **j. med. chem**, 50, 5339, 2007.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4ª ed, São Paulo: Manole, 2015.

PRABHUNE, S. S.; JAGUSTE, R. S.; KONDALKAR, P. L.; PRADHAN, N. S. Liquid chromatographic determination of apixaban in the presence of degradation products. **Scientia Pharmaceutica**, 82, 777–785, 2014.

PURSLEY, J. SHEN, J. X.; SCHUSTER, A.; DANG, O. T.; LEHMAN, J.; BUONARATI, M. H.; SONG, Y.; AUBRY, A. F.; ARNOLD, M. E. LC–MS/MS determination of apixabana (BMS-562247) and its major metabolite in human plasma: an application of polarity switching and monolithic HPLC column. **Bioanalysis**. 6(15), 2071–2082, 2014.

RANG H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

REPETTO, G.; PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**. v. 3 n. 7, 2008.

ROMUALDI, E.; DONADINI, M. P.; AGENO, W. Oral rivaroxaban after symptomatic venous thromboembolism: the continued treatment study (EINSTEIN-extension study). **Expert Review of Cardiovascular Therapy**. 9, 841–844 2011.

SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Cardiômetro – Morte por doenças cardiovasculares no Brasil (2017)**. Disponível em: <http://www.cardiometro.com.br>. Acesso em: 28 dez 2017.

SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes brasileiras de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes em cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v 101, nº 3, supl. 3, 2013.

SECRÉTAN, P. H.; SADOU-YAYÉ, H. AYMES-CHODUR, C. BERNARD, M.; SOLGADI, A.; AMRANI, F.; YAGOUBIA, N.; DO, B. A comprehensive study of apixaban's degradation pathways under stress conditions using liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry. **The Royal Society of Chemistry**. 5, 35586–35597, 2015.

SERRANO JR C. V.; TIMERMAN A.; STEFANINI E. **Tratado de cardiologia**, SOCESP. 2ª ed. Barueri (SP): Ed. Manole; 2009.

SILVA, D. D.; ARBO, M.; VALENTE, M. J.; BASTOS, M. L.; CARMO, B. H. Hepatotoxicity of piperazine designer drugs: Comparison of different *in vitro* models. **Toxicology in Vitro**. 29, 987–996, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

SUN, X.; HONG, Z.; LIU, M.; GUO, S.; YANG, D.; WANG, Y.; LAN, T.; GAO, L.; QI, H.; GONG, P.; LIU, Y. Design, synthesis, and biological activity of novel tetrahydropyrazolopyridone derivatives as FXa inhibitors with potent anticoagulant activity, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 25, 2800–2810, 2017.

TANTAWY, M. A.; EL-RAGEHY, N. A.; HASSANA, N. Y.; ABDELKAWY, M. Stability-indicating spectrophotometric methods for determination of the anticoagulant drug apixaban in the presence of its hydrolytic degradation product. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 159, p: 13–20, 2016.

TERZIC, J.; POPOVIC, I.; STAJIC, A.; TUMPA, A.; JANCIC, B. S. Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 125, 385–393, 2016.

TURPIE, A, G. G. Oral, Direct Factor Xa Inhibitors in Development for the prevention and Treatment of Thromboembolic Diseases. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v 27 p 722–727, 2007

TUMPA, A.; STAJIC, A.; JANCIC, B. S.; MEDENICA, M. Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 134, 18–26, 2017.

WHO – World Health Organization. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control, 2011. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/

WHO – World Health Organization. Cardiovascular disease. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. Acesso em: 23 dez 2017

XU, Q.; HUANG, S.; LI, W.; WEISI, G.; HAN, X. **Process for preparation of anti-thrombotic agent Apixaban**. CN 104892601 A, 9 set 2015.

ZHANG, W.; LOU, D.; ZHANG, D.; HUANG, H. Determination of rivaroxaban, apixaban and edoxaban in rat plasma by UPLC–MS/MS method. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**. 42, 205–211, 2016.

ZHANG, X.; HU, C. Application of quality by design concept to develop a dual gradient elution stability-indicating method for cloxacillin forced degradation studies using combined mixture-process variable models. **Journal of Chromatography A**. 1514, 44–53, 2017.