

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE
ESTABILIDADE DE ETEXILATO DE DABIGATRANA EM CÁPSULAS**

RAQUEL MARTINI BERNARDI

Porto Alegre, 2013.

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE
ESTABILIDADE DE ETEXILATO DE DABIGATRANA EM CÁPSULAS**

Tese apresentada por **RAQUEL MARTINI
BERNARDI** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr^a. Ana Maria Bergold

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2013.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.10.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Clarice Madelena Bueno Rolim
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Bernardi, Raquel Martini
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudo de estabilidade de etexilato de dabigatrana em cápsulas / Raquel Martini Bernardi. -- 2013.
151 f.

Orientador: Ana Maria Bergold.
Coorientador: Pedro Eduardo Fröhlich.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Etexilato de dabigatrana. 2. Métodos indicativos de estabilidade. 3. Detector aerossol carregado. 4. Produtos de degradação. 5. Validação. I. Bergold, Ana Maria, orient. II. Fröhlich, Pedro Eduardo, 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 realizado nas dependências do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*Às minhas anjas, vó Eli Martini e Allana
Willers "Bernardi", que sempre me iluminam
e me guardam lá de cima.*

Saudades eternas...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela possibilidade de conclusão de mais esta etapa.

À Profa. Ana Maria Bergold, pela oportunidade, orientação, dedicação, amizade, confiança, pelo apoio nas dificuldades e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Pedro Eduardo Froehlich, pela co-orientação e importante colaboração neste trabalho.

Aos amigos e colegas do LAPPS Ana Paula, Andrea, Andréia, Cristiane, Fernanda, Graciela, Leonardo, Marcella, Mariana, Marquinhos, Sirlei e Tamara pela amizade, carinho, imensos auxílios prestados, discussões científicas e momentos de descontração.

Aos grandes amigos Angela Maria Moro, Felipe B. D'Avila e Vítor Todeschini pelo incentivo, motivação e importantíssima colaboração neste trabalho.

Aos amigos da Multilab, em especial à Almeici Cavedon, Diogo Paim Leal e Elisa Hexel Gonçalves pela oportunidade de crescimento, apoio e contribuições.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores e funcionários dessa Instituição.

À família Ferretto pelo apoio, carinho e incentivo.

Ao Ricardo Machado Ferretto, cujo amor tornou essa etapa possível, pela compreensão, companheirismo, incentivo constante e importante colaboração técnica.

À minha família enorme, em especial à tia Liane e tia Lenise, pelo amor e apoio.

Aos meus pais, Antônio e Lorena, e à minha irmã Priscila, por serem minha base, pelo amor, apoio incondicional, compreensão e por sempre acreditarem em mim.

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

RESUMO

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudo de estabilidade de etexilato de dabigatrana em cápsulas

Etexilato de dabigatrana (DAB) é um pró-fármaco da dabigatrana disponível para administração oral. DAB é um inibidor direto da trombina, desenvolvido para prevenção de acidente vascular cerebral e embolia sistêmica em pacientes com fibrilação atrial e para a prevenção de eventos tromboembólicos em pacientes que se submeteram à cirurgia de artroplastia total de joelho e de quadril. Atualmente, não há métodos publicados para a análise qualitativa e quantitativa e estudos de estabilidade de DAB em cápsulas. Portanto, inicialmente, a caracterização da substância química de referência foi realizada por espectrometria de massas (EM), espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e calorimetria exploratória diferencial. Os métodos por cromatografia em camada delgada, CLAE utilizando detectores UV, CAD e EM foram usados para identificar o fármaco nas cápsulas. Na sequência, foram desenvolvidos métodos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector ultravioleta (CLAE-UV) e detector aerossol carregado (CLAE-CAD) para a quantificação de DAB em cápsulas. Os mesmos foram validados, avaliando-se parâmetros como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação. Os métodos foram comparados estatisticamente por ANOVA e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os mesmos. O estudo de estabilidade de DAB frente à degradação térmica foi investigado. Através dos métodos por CLAE-UV e CLAE-EM pode-se propor a identidade dos produtos de degradação formados, sem processo de isolamento ou purificação. Adicionalmente, a cinética de degradação do DAB e a citotoxicidade das amostras degradadas também foram estudadas. O estudo de cinética de degradação térmica apresentou cinética de primeira ordem ($R^2 = 0,9900$). Além disso, nenhuma evidência de citotoxicidade *in vitro* em estudo utilizando células mononucleares humanas foi observada. Desse modo estabeleceram-se procedimentos que podem ser aplicados para aprimorar o controle de qualidade, contribuindo para assegurar a eficácia terapêutica de produtos à base de DAB.

Palavras-chave: cromatografia líquida, detector aerossol carregado, etexilato de dabigatrana, métodos indicativos de estabilidade, produtos de degradação, validação.

ABSTRACT

Development and validation of analytical methods and stability study of dabigatran etexilate in capsules

Dabigatran etexilate (DAB) is an orally available prodrug of dabigatran. DAB is a direct thrombin inhibitor, developed for stroke and systemic embolism prevention in patients with atrial fibrillation and prevention of venous thromboembolic events in patients who have undergone elective total hip replacement or total knee replacement surgery. Currently, there are no methods published for the qualitative and quantitative analysis and stability study of DAB in capsules. Thus, initially, the characterization of the chemical reference substance was performed by mass spectrometry (MS), infrared spectroscopy, ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and differential scanning calorimetry. The methods by thin-layer chromatography, LC using UV and CAD detector and LC-MS were used to identify the drug in capsule. High performance liquid chromatographic (LC) methods were developed for the assessment of dabigatran etexilate (DAB) in capsules with ultraviolet detector (LC-UV) and charged aerosol detector (LC-CAD). They were validated by evaluating parameters such as specificity, linearity, precision, accuracy, robustness and limits of detection and quantitation. The methods were compared statistically by ANOVA and no statistic difference was found between them. The stability study of DAB under thermal condition was investigated. The degradation products formed were analyzed by LC-UV and LC-MS methods and it's identify could be suggested, without isolation or purification process. Additionally, the thermal degradation kinetic of DAB and the cytotoxicity of the degraded samples were also studied. The kinetics results could be best described as first-order process ($R^2 = 0.9900$). No evidence of cytotoxicity in human mononuclear cell was observed for drugs degraded samples. So, procedures which can be applied to improve the quality control and contribute to ensure the therapeutic efficacy of products containing DAB.

Keywords: charged aerosol detector, dabigatran etexilate, degraded products liquid chromatography, stability-indicating methods, validation.

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 3.1. Cascata de coagulação	16
FIGURA 3.2. Estrutura química do mesilato de etexilato de dabigatran.	18
FIGURA 3.3. Hidrólise metabólica do pró-fármaco DAB em dabigatran.	19

4. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA SQR

FIGURA 4.1. Espectro de massas de SQR de DAB adquirido no modo de varredura total dos íons principais com eletronebulização positiva	38
FIGURA 4.2. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) de SQR de DAB	39
FIGURA 4.3. Espectro de absorção na região do IV para a SQR de DAB	42
FIGURA 4.4. Curva de aquecimento de SQR de DAB, obtida por DSC	44

5. CAPÍTULO 2 – ANÁLISE QUALITATIVA DE CÁPSULAS DE DAB

FIGURA 5.1. Cromatograma obtido por CCD na análise da solução da SQR de DAB (P), da solução amostra das cápsulas de DAB (A) e da solução da SQR de cefalexina (C)	49
FIGURA 5.2. Cromatogramas sobrepostos da SQR de DAB (a) e da solução amostra de cápsulas de DAB (b).....	51
FIGURA 5.3. Sobreposição dos espectros de absorção no UV da SQR de DAB (a) e da solução amostra das cápsulas de DAB (b).....	52
FIGURA 5.4. Cromatogramas sobrepostos da SQR de DAB (a) e da solução amostra de cápsulas de DAB (b).....	53
FIGURA 5.5. Cromatogramas CLAE-EM da SQR de DAB (a) e da solução amostra das cápsulas de DAB (b).....	56

6. CAPÍTULO 3 – ANÁLISE QUANTITATIVA

FIGURA 6.2.1. Chemical structure of dabigatran etexilate.....	64
FIGURA 6.2.2. LC chromatograms of dabigatran etexilate (30 µg mL ⁻¹). (a) Dabigatran etexilate reference solution: peak 1 – dabigatran etexilate and 2 - placebo chromatogram. (b) After acidic hydrolysis: peaks 1, 2, 3, 4 and 5 – degraded forms, peak 6 – dabigatran etexilate. (c) After basic hydrolysis: peaks 1, 2 and 3 – degraded forms, peak 4 – dabigatran etexilate. (d) After oxidation: peak 1 and 3 –	

degraded form, peak 2 - hydrogen peroxide, peak 4 – dabigatran etexilate. (e) After thermal condition: peaks 1, 2 and 3 – degraded forms, peak 4 – dabigatran etexilate. (f) After exposition to UV light: peaks 1, 2, 3, 4, 5 and 6 photodegraded forms, peak 7 – dabigatran etexilate..... 71

FIGURA 6.3.1. Chemical structure of dabigatran etexilate 83

FIGURA 6.3.2. LC chromatograms of dabigatran etexilate (30 µg/mL). Dabigatran etexilate (DAB) reference solution (1) and placebo solution (2) - CAD (A) and UV (B). After acidic hydrolysis - CAD (C) and UV (D). After basic hydrolysis - CAD (E) and UV (F). After oxidation - CAD (G) and UV (H). After thermal condition - CAD (I) and UV (J). After exposure to UV - CAD (K) and UV (L)..... 91

FIGURA 6.3.3. Pareto chart representing the effects of the variables on the DAB assay for the robustness test using the Plackett-Burman design (12 experiments) for CAD (A) and UV (B) detectors 94

7. CAPÍTULO 4 – ESTUDO DE ESTABILIDADE: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E CITOTOXICIDADE

FIGURA 7.2.1. Chemical structure of dabigatran etexilate 106

FIGURA 7.2.2. Overlapping LC-UV chromatograms of DAB (30 µg/mL): (a) DAB without exposure to stress; (b) DAB after thermal stress condition..... 112

FIGURA 7.2.3. Representative chromatograms of DAB after thermal stress condition: LC-ESI-MS analysis: DAB at m/z 628.3 (a); DP-01 at m/z 500.2 (b); DP-02 at m/z 264.1 (c)..... 112

FIGURA 7.2.4. Proposed structures of DP-01 and DP-02..... 113

FIGURA 7.2.5. Degradation kinetics assay and plots obtained for: first-order reaction of DAB after thermal degradation 115

FIGURA 7.2.6. Cytotoxicity study of DAB, before and after degradation treatment 116

LISTA DE TABELAS

4. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA SQR

TABELA 4.1. Atribuições do espectro de RMN ¹ H de SQR de DAB.	40
TABELA 4.2. Frequências das principais bandas de absorção de DAB e suas atribuições.....	42

5. CAPÍTULO 2 – ANÁLISE QUALITATIVA DE CÁPSULAS DE DAB

TABELA 5.1. Condições cromatográficas para identificação de DAB	50
TABELA 5.2. Condições cromatográficas para identificação de DAB.	53
TABELA 5.3. Condições cromatográficas e parâmetros otimizados do espectrômetro de massas para identificação de DAB por CLAE-EM.....	55

6. CAPÍTULO 3 – ANÁLISE QUANTITATIVA

TABELA 6.2.1. Excipients to prepare in-house placebo	67
TABELA 6.2.2. Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for DAB in the capsules	73
TABELA 6.2.3. Accuracy of RP-LC for DAB in samples of capsule.....	74
TABELA 6.2.4. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.	75
TABELA 6.2.5. Results of the system suitability test.	76
TABELA 6.2.6. Determination of DAB in capsules by the proposed LC method	76
TABELA 6.3.1. Variables selected as factors and values chosen as levels to evaluate the robustness of the method	88
TABELA 6.3.2. Accuracy data for DAB in the capsules using CAD-UV detectors....	93
TABELA 6.3.3. Results of the system suitability tests	95
TABELA 6.3.4. Determination of DAB in capsules by the proposed LC-CAD, LC-UV detectors and LC-UV previously validated	96

11. ANEXO

TABELA 11.1. Teste <i>t</i> - resultados obtidos da comparação entre os métodos CLAE-CAD e CLAE-UV[2]..	151
TABELA 11.2. ANOVA - resultados obtidos da comparação entre os métodos CLAE-UV[1], CLAE-CAD e CLAE-UV[2].....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC	Área sob a curva;
AVC	Acidente vascular cerebral;
AVK	Antagonista da vitamina K;
CAD	<i>Charged aerosol detector</i> ;
CCD	Cromatografia em camada delgada;
CLUE	Cromatografia de ultra eficiência;
C _{máx}	Concentração plasmática máxima;
DAB	Etexilato de dabigatrana;
DSC	Calorimetria exploratória diferencial;
EM	Espectrometria de massas;
EMA	<i>European Medicines Agency</i> ;
ESI	<i>Electrospray ionization</i> ;
FA	Fibrilação atrial;
HBPM	Heparina de baixo peso molecular;
HNF	Heparina não fracionada;
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> ;
IDT	Inibidor direto da trombina;
k	Contante de velocidade de degradação;
LOD	Limite de detecção;
LOQ	Limite de quantificação;
m/z	Relação massa/carga;
PDA	<i>Photodiode array detection</i> ;
R ²	Coeficiente de determinação;
R _f	Fator de retenção;
RP	<i>Reversed-phase</i> ;
R _x	Fator de retenção relativo;
SIR	<i>Selected ion recording</i> – Monitoramento seletivo de íon;
SQR	Substância química de referência;
t	Tempo;
t _{90%}	Tempo com concentração 90%;
TEV	Tromboembolismo venoso.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1. Aspectos gerais	11
3.2. Etxilato de dabigatrana.....	17
3.2.1. Descrição	17
3.2.2. Aspectos farmacológicos.....	18
3.2.3. Aspectos farmacocinéticos.....	19
3.2.4. Eventos adversos	21
3.3. Literatura analítica envolvendo DAB	21
3.4. Métodos analíticos para avaliação quantitativa de fármacos	22
3.4.1. Cromatografia líquida	24
3.4.2. Detector CAD	25
3.5. Validação de métodos analíticos.....	27
3.6. Estudos de estabilidade	29
4. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA SQR	35
4.1. Introdução	37
4.2. Substância química de referência	37
4.3. Caracterização da SQR de DAB	37
4.3.1. Espectrometria de massas	38
4.3.1.1. Condição experimental.....	38
4.3.1.2. Resultados e discussão.....	38
4.3.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	39
4.3.2.1. Condição experimental.....	39
4.3.2.2. Resultados e discussão	39
4.3.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	41
4.3.3.1. Condição experimental.....	41
4.3.3.2. Resultados e discussão	41

4.3.4. Calorimetria exploratória diferencial.....	43
4.3.4.1. Condição experimental	43
4.3.4.2. Resultados e discussão	44
5. CAPÍTULO 2 – ANÁLISE QUALITATIVA DE CÁPSULAS DE DAB.....	45
5.1. Introdução.....	47
5.2. Produto farmacêutico.....	47
5.3. Identificação do fármaco na forma farmacêutica	47
5.3.1. Cromatografia em camada delgada.....	47
5.3.1.1. Condição experimental	48
5.3.1.2. Resultados e discussão	48
5.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	49
5.3.2.1. Detector UV (CLAE-UV)	50
5.3.2.1.1 Condição experimental	51
5.3.2.1.2 Resultados e discussão	51
5.3.2.2. Detector CAD (CLAE-CAD)	52
5.3.2.2.1. Condição experimental	52
5.3.2.2.2. Resultados e discussão	53
5.3.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	54
5.3.3.1. Condição experimental	54
5.3.3.2. Resultados e discussão	55
6. CAPÍTULO 3 – ANÁLISE QUANTITATIVA	57
6.1. Introdução.....	59
6.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Development and validation of a stability-indication liquid chromatography method for the determination of Dabigatran Etexilate in capsules	61
6.2.1. Abstract.....	63
6.2.2. Introduction	64
6.2.3. Experimental.....	65
6.2.4. Results and discussion	70
6.2.5. Conclusion	76
6.2.6. Acknowledgements.....	77
6.2.7. References	77

6.3. ARTIGO CIENTÍFICO – Comparison of ultraviolet detection and charged aerosol detection stability-indicating RP-LC method for the assessment of Dabigatran Etexilate in capsules	79
6.3.1. Abstract	81
6.3.2. Introduction.....	82
6.3.3. Experimental	84
6.3.4. Results and discussion.....	89
6.3.5. Conclusion.....	96
6.3.6. Acknowledgements	96
6.3.7. References	96
7. CAPÍTULO 4 – ESTUDO DE ESTABILIDADE: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E CITOTOXICIDADE	99
7.1. Introdução	101
7.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Main degradation products of Dabigatran Etexilate evaluated by LC-UV and LC-ESI-MS, degradation kinetics and <i>in vitro</i> cytotoxicity studies	103
7.2.1. Abstract	105
7.2.2. Introduction.....	106
7.2.3. Experimental	108
7.2.4. Results and discussion.....	111
7.2.5. Conclusion.....	116
7.2.6. Acknowledgements	116
7.2.7. References	117
8. DISCUSSÃO GERAL.....	121
9. CONCLUSÕES.....	133
10. REFERÊNCIAS.....	137
11. ANEXO.....	149

1. INTRODUÇÃO

Tromboembolismo venoso (TEV) é uma potencial complicação de alto risco, que ocorre em 10 a 40% dos pacientes submetidos a alguma cirurgia geral e em 40 a 60% dos pacientes submetidos à cirurgia ortopédica maior, particularmente comum após a artroplastia total de joelho e quadril (BECATTINI; VEDOVATI; AGNELLI, 2012; FUJI *et al.*, 2010).

A fibrilação arterial (FA) é responsável pelo maior risco de acidente vascular cerebral (AVC), sendo a incidência em pacientes com FA não valvular de duas a sete vezes maior que na população em geral (MAEGDEFESSEL *et al.*, 2010). O progressivo aumento na expectativa de vida da população tornou cada vez mais evidente o seu impacto e o ônus nos sistemas de saúde. Em média, 10% da população com mais de 80 anos desenvolve essa arritmia cardíaca, com mais de 75% destes apresentando moderado a alto risco de embolia (BENDEL; BONA; BAKER, 2011; MANNUCCI; NOBILI; GARATTINI, 2012).

A terapia antitrombótica representa um papel muito importante na prevenção e tratamento destas desordens tromboembólicas. Uma profilaxia com agentes adequados reduz a ocorrência, assim como a mortalidade (BLECH *et al.*, 2008). No entanto, os agentes antitrombóticos atualmente disponíveis apresentam certas limitações. Os antagonistas orais da vitamina K (AVK), como a varfarina, apresentam farmacocinética não previsível e mostram inúmeras interações com outros fármacos e alimentos, necessitando de constante monitoramento laboratorial. Já as heparinas não fracionadas (HNF) e as heparinas de baixo peso molecular (HBPM), entre outras desvantagens, requerem administração parenteral (BLECH *et al.*, 2008; GINSBERG *et al.*, 2009; STANGIER *et al.*, 2005; STANGIER *et al.*, 2007).

Por estas razões o tratamento farmacológico dos distúrbios tromboembólicos tem testemunhado significantes avanços. Os novos fármacos antitrombóticos, como o etexilato de dabigatrana, os quais agem inibindo um único fator da cascata de coagulação, a trombina ou o fator Xa, apresentam características que os tornam mais efetivos e de mais fácil administração que os tradicionais. Inúmeros estudos clínicos indicam que os inibidores da trombina ou do fator Xa são altamente eficientes para a prevenção de tromboembolismo (ERIKSSON *et al.*, 2004; FRANCHINI & MANNUCCI, 2009; HYERS, 2003).

Em relação ao DAB, o mesmo é um pró-fármaco rapidamente absorvido e convertido em dabigatrana, que age como um inibidor direto da trombina (IDT). Visto que a trombina possibilita a conversão de fibrinogênio em fibrina durante a cascata de coagulação, a sua inibição previne o desenvolvimento de distúrbios tromboembólicos (ERIKSSON *et al.*, 2005).

Em março de 2008, a EMA (European Medicines Agency) aprovou o DAB nas concentrações de 75 e 110 mg para a prevenção de eventos tromboembólicos após artroplastia total de joelho e quadril. Em julho do referido ano foi aprovado pela ANVISA nas mesmas concentrações e indicação. O FDA (Food and Drug Administration) o aprovou em outubro de 2010, com a indicação de prevenção de acidente vascular cerebral em pacientes com FA na concentração de 75 e 150 mg. Este foi o primeiro anticoagulante de uso oral aprovado nos EUA nos últimos 50 anos. Essa nova indicação também foi aprovada pela EMA e pela ANVISA em agosto de 2011 nas concentrações de 110 e 150 mg. (BENDEL; BONA; BAKER, 2011; GANETSKY *et al.*, 2011) .

O controle de qualidade é responsável pela avaliação de inúmeras propriedades que conferem a confiabilidade aos medicamentos, desde a matéria-prima até o produto acabado, atuando no desenvolvimento e validação de métodos analíticos, nos estudos de estabilidade de formulações e na análise de produtos de degradação. Sendo assim, métodos analíticos confiáveis, que atendam as legislações vigentes, são imprescindíveis para a correta identificação e determinação quantitativa do produto farmacêutico.

Destaca-se que o DAB não possui monografia em compêndios oficiais, nem registros disponíveis para determinações quantitativas em matéria-prima ou produto acabado, bem como relatos sobre sua estabilidade. Sendo assim, a validação de métodos analíticos para realização do controle de qualidade do fármaco em cápsulas, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa, além do estudo de estabilidade justificam a realização deste trabalho. Por estas razões, este estudo contribui para aprimorar a área de controle da qualidade, assim como a segurança e eficácia terapêutica do produto farmacêutico comercializado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação qualitativa e quantitativa de DAB em cápsulas, bem como avaliar a estabilidade do fármaco.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a substância química de referência (SQR) do fármaco através da espectrometria de massas (EM), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Desenvolver métodos qualitativos para identificação de DAB nas cápsulas por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) e com detector aerossol carregado (CLAE-CAD) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM);
- Desenvolver e validar métodos para determinação quantitativa de DAB em cápsulas por CLAE-UV e CLAE-CAD;
- Realizar análise estatística comparativa entre os métodos propostos;
- Avaliar a estabilidade térmica, química e fotoquímica do fármaco e determinar a cinética de degradação térmica;
- Identificar os produtos de termodegradação por CLAE-EM;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de amostras integra e degradada de DAB.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais

Distúrbios tromboembólicos venosos e arteriais são ainda a mais frequente causa de morte e incapacidade em países de alta renda, e sua incidência está aumentando drasticamente também em países de média e baixa renda (FRANCHINI & MANNUCCI, 2009).

A trombose é definida como a formação de um coágulo sanguíneo em um vaso sanguíneo ou cavidade do coração; já o tromboembolismo se caracteriza por coágulos que se deslocam através da corrente sanguínea, e que podem se alojar em um vaso sanguíneo bloqueando a circulação (MAEGDEFESSEL *et al.*, 2010). Mais de 15% dos pacientes hospitalizados em razão de alguma doença aguda desenvolvem um distúrbio tromboembólico, entre eles a trombose venosa profunda e a embolia pulmonar. Estas se caracterizam por serem complicações graves e que representam uma fonte importante de morbidade e mortalidade ao redor do mundo, podendo, sob a forma de embolia pulmonar massiva, causar morte súbita (HYERS, 2003).

O tromboembolismo venoso é particularmente comum após cirurgia de substituição total de quadril ou joelho ou de quadril fraturado. Historicamente, após submissão a algum destes procedimentos, na ausência de trombopprofilaxia, mais de 50% dos pacientes desenvolvem trombose venosa profunda. Ressalta-se ainda, que a embolia pulmonar aguda é a primeira causa de morte após cirurgia ortopédica maior, estando na faixa de 3 a 28%. Além disso, muitos casos de TEV sintomáticos manifestam-se após alta hospitalar e são a razão mais comum para readmissão hospitalar após procedimentos ortopédicos (BECATTINI; VEDOVATI; AGNELLI, 2012; ERIKSSON *et al.*, 2004; FUJI *et al.*, 2010; HYERS, 2003; MAEGDEFESSEL *et al.*, 2010).

Em razão disso, uma trombopprofilaxia agressiva utilizando fármacos antitrombóticos é recomendada e largamente utilizada ao redor do mundo em pacientes submetidos a este e outros procedimentos ortopédicos maiores (FUJI *et al.*, 2010).

Embora muitas vezes a trombose venosa esteja associada a algum trauma ou cirurgia recente, em 50 a 70% dos casos sintomáticos ela ocorre em pacientes hospitalizados, que geralmente estão imóveis ou acamados. Estudos demonstram que pacientes hospitalizados de alto risco que não recebem terapia anticoagulante preventiva podem desenvolver trombose isolada. Mesmo na ausência de uma doença crítica, a falta de mobilidade pode levar a estase venosa e TEV, como ocorre em viagens de avião de longa distância (MAEGDEFESSEL *et al.*, 2010).

A fibrilação atrial é a mais comum arritmia cardíaca observada na prática clínica, afetando aproximadamente 1,5 milhões de pessoas na Europa, 2,2 milhões de pessoas na América. No Brasil é avaliado em mais de um milhão de pessoas, uma prevalência extremamente alta (MAEGDEFESSEL *et al.*, 2010; NIESPIALOWSKA-STEUDEN; MARKIDES; GOROG, 2012). É estimado que um em cada quatro indivíduos com 40 anos ou mais irá desenvolver pelo menos um episódio durante a vida. A FA é mais comumente idiopática na juventude, mas com o aumento da idade é frequentemente associada com insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana, doença cardíaca valvular, cardiomiopatia, diabetes e hipertensão arterial (NIESPIALOWSKA-STEUDEN; MARKIDES; GOROG, 2012; SPINLER, 2013).

A prevalência desta arritmia aumenta acentuadamente com o aumento da idade, sendo incomum em indivíduos com menos de 50 anos (MAEGDEFESSEL *et al.*, 2010). Observa-se que a prevalência global de FA na população é de 5%, aumentando de 0,7% na idade entre 55 e 59 anos para 17,9% naqueles acima de 85 anos, embora a prevalência possa ser maior, devido ao subdiagnóstico. A média de idade dos pacientes com FA é 72 anos (BENDEL; BONA; BAKER, 2011).

Na FA a função mecânica contrátil dos átrios é perdida, resultando na estagnação do sangue no átrio, aumentando a propensão para a formação de trombos localizados. Um trombo cardíaco é formado *in situ* principalmente por células vermelhas e fibrinogênias, já os trombos atriais são formados com alta proporção de plaquetas. Tais trombos no átrio esquerdo ou no apêndice atrial esquerdo podem sofrer embolização, na maioria das vezes resultando em AVC isquêmico ou manifestando-se como embolia arterial periférica, causando isquemia

aguda nos membros ou embolia mesentérica (NIESPIALOWSKA-STEUDEN; MARKIDES; GOROG, 2012).

A principal causa de incapacidade séria, de longo prazo e de morte nos países desenvolvidos está associada ao AVC. A incidência é mais alta em idosos, com a taxa de mortalidade duplicada a cada 10 anos na faixa etária entre 55 e 85 anos, sendo que, aproximadamente 75% das mortes por AVC ocorrem em indivíduos com mais de 65 anos de idade (NIESPIALOWSKA-STEUDEN; MARKIDES; GOROG, 2012). O AVC é um evento drástico, sendo que aproximadamente 20% dos pacientes morrem na fase aguda, 40% durante o primeiro ano após o evento e 40% desenvolvem incapacidade severa (MANNUCCI; NOBILI; GARATTINI, 2012).

Uma correta profilaxia antitrombótica, utilizando agentes anticoagulantes, pode reduzir os casos de TEV sintomáticos e assintomáticos, assim como a mortalidade na maioria dos pacientes sob risco de TEV (BECATTINI; VEDOVATI; AGNELLI, 2012).

O tratamento da FA envolve vários fatores, entre eles o controle do ritmo cardíaco, a eliminação do fator de risco cardiovascular coexistente, e o mais importante, uma terapia antitrombótica com a função de reduzir o risco de AVC. Os fármacos antitrombóticos, que inibem a coagulação ou a função plaquetária, exercem papel chave no controle desta arritmia, reduzindo a incidência de morte e de eventos cardioembólicos (BECATTINI; VEDOVATI; AGNELLI, 2012; FRANCHINI & MANNUCCI, 2009; NIESPIALOWSKA-STEUDEN; MARKIDES; GOROG, 2012).

O uso difundido de anticoagulantes para o tratamento e prevenção de TEV começou apenas há 50 anos, sendo os únicos agentes terapêuticos efetivos disponíveis na época HNF e anticoagulantes orais severos (HYERS, 2003).

A heparina foi descoberta em 1914 por Jay McLean, um estudante de medicina de 24 anos, e introduzida na prática clínica apenas na década de 1940. A hirudina foi isolada a partir da saliva de sanguessugas e recentemente, no ano de 2000, tornou-se um agente terapêutico (SAMAMA & GEROTZIAS, 2010).

Os AVK têm sido utilizados desde os anos 50 do século passado, e ainda são recomendados como terapia antitrombótica em longo prazo pelos guias atuais. São utilizados principalmente em pacientes com FA e moderado a alto risco de AVC (BENDEL; BONA; BAKER, 2011; SAMAMA & GEROTZIAFAS, 2010). Tradicionalmente a opção de tratamento antitrombótico oral é a varfarina, o mais comum AVK, que reduz o risco relativo de AVC em 68% quando comparado ao placebo. Apesar de ser extremamente eficiente, a varfarina é usada somente em, aproximadamente, 50% dos pacientes, isto devido ao risco de hemorragia, especialmente em idosos (MAEGDEFESSEL *et al.*, 2010; NIESPIALOWSKA-STEUDEN; MARKIDES; GOROG, 2012).

Embora os benefícios da varfarina estejam bem estabelecidos, em um amplo espectro de distúrbios tromboembólicos, o seu uso é dificultado por numerosas limitações. Entre estas: o atraso no início e no fim da ação, a janela terapêutica estreita, a variação genética do metabolismo e a interação com alimentos e outros fármacos, o que requer frequente monitoramento e ajuste de dose. Como a varfarina, a HNF é altamente eficaz, mas também apresenta um número de limitações que restringem o seu uso clínico. Entre as principais estão: a via de administração (principalmente venosa), sua significativa ligação com proteínas plasmáticas e endoteliais, necessidade de monitoramento laboratorial, risco de osteoporose e de abandono de tratamento devido a complicações tromboembólicas associadas com trombocitopenia induzida por heparina (ERIKSSON *et al.*, 2005; FRANCHINI & MANNUCCI, 2009; STANGIER *et al.*, 2005).

As limitações da varfarina e HNF levaram ao desenvolvimento de novos anticoagulantes para a prevenção e tratamento do tromboembolismo venoso e arterial (FRANCHINI & MANNUCCI, 2009). No início da década de 80, foi introduzida na Europa a HBPM, derivada da fragmentação ou despolimerização da HNF através de procedimento químico ou enzimático, resultando em cadeias de menor comprimento, próximo de 5000 Daltons *versus* os 25000 Daltons das HNF (HYERS, 2003; SAMAMA & GEROTZIAFAS, 2010). A HBPM tem progressivamente substituído a HNF, pois apresenta similar ou maior eficácia e segurança, além de numerosas vantagens, como tempo de meia vida mais longo e uma dose-resposta mais previsível, a qual permite uma dosagem ajustada ao peso do paciente, sem a

necessidade de monitoramento laboratorial. No entanto, o uso de HBPM é ainda associado com o risco de trombocitopenia induzida por heparina, embora em grau muito menor que a HNF, e a necessidade de administração parenteral (principalmente subcutânea) tornando seu uso muitas vezes restrito ao ambiente ambulatorial (ERIKSSON *et al.*, 2005; FRANCHINI & MANNUCCI, 2009).

Apesar do progresso que o uso da HBPM trouxe a prática clínica, os anticoagulantes disponíveis apresentavam importantes limitações, não atendendo ao critério de fármaco ideal para a trombofilaxia em longo prazo de FA, o que estimulou o desenvolvimento de novas moléculas anticoagulantes (MANNUCCI; NOBILI; GARATTINI, 2012; SAMAMA & GEROTZAFAS, 2010).

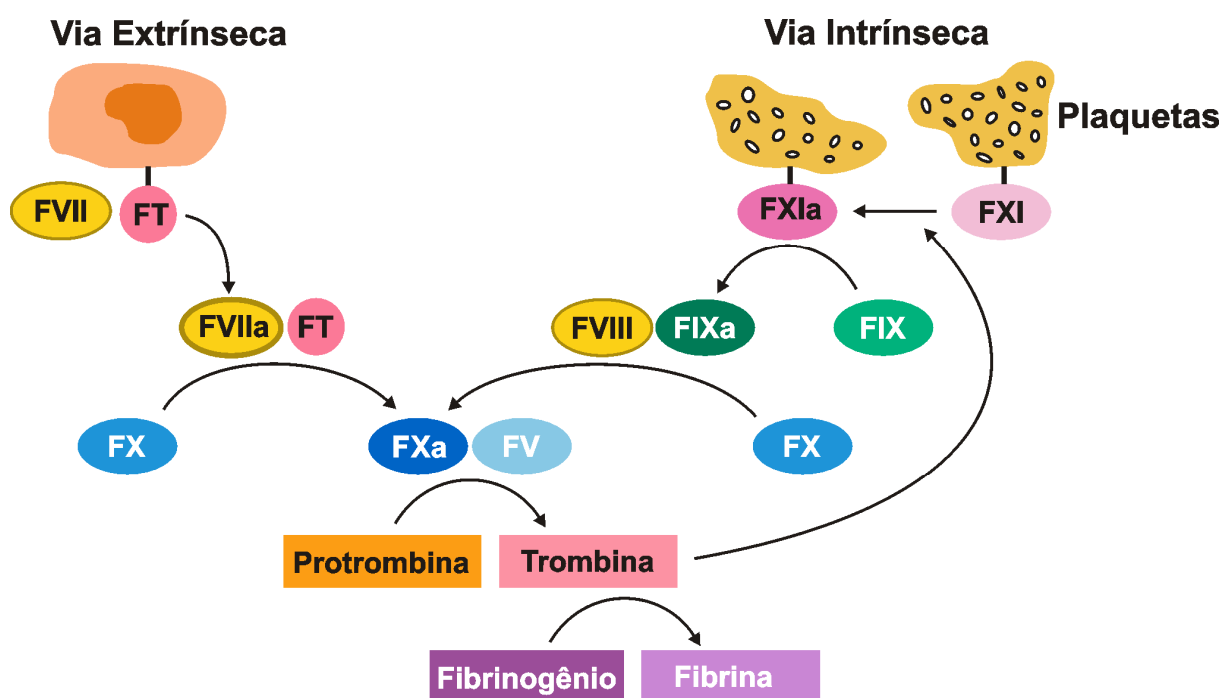
Devido às características epidemiológicas da FA e sendo o acidente vascular uma das principais causas de morte e incapacidade, durante a última década, o interesse em anticoagulantes tem crescido bastante. Isto pode ser confirmado pelo grande número de fármacos submetidos a estudos pré-clínicos e clínicos. Particularmente, as pesquisas foram focadas em novos agentes com sítio de ação específico em etapas da cascata de coagulação. A maioria dos fármacos atualmente pesquisados apresenta a grande vantagem de ser administrada oralmente, em dose fixa (FRANCHINI & MANNUCCI, 2009; MAEGDEFESSEL *et al.*, 2010).

Na busca do fármaco antitrombótico ideal, alguns pontos devem ser analisados: a taxa de prevenção de embolia cardiovascular e acidente vascular isquêmico deve ser alta ou pelo menos equivalente aquela apresentada pelo padrão ouro, a varfarina; o risco de sangramento deve ser pequeno, particularmente no que diz respeito à hemorragia no sistema nervoso central ou outros alvos críticos; a não necessidade de monitorização laboratorial constante; menor ou nenhuma interação com outros fármacos e/ou alimentos; financeiramente apresentar igual ou menor custo (MANNUCCI; NOBILI; GARATTINI, 2012; SPINAR, 2013).

Enquanto AVK inibem a função coagulante de todos os fatores vitamina K dependentes, II, VII, IX e X, os novos fármacos têm alvos simples e específicos, agindo em diferentes etapas do sistema de coagulação. As pesquisas clínicas mais satisfatórias resultaram em inibidores do fator Xa e da trombina, os quais são etapas chaves no mecanismo de formação de trombos (Figura 3.1). Outra potencial

vantagem destes compostos é que também inibem as moléculas da trombina e fator Xa adsorvidas nos trombos, enquanto AVK e os anticoagulantes tradicionais inibem somente enzimas de coagulação que estão livremente presentes na circulação (FRANCHINI & MANNUCCI, 2009; GANETSKY *et al.*, 2011; MANNUCCI; NOBILI; GARATTINI, 2012).

FIGURA 3.1. Cascata de coagulação - adaptado de SAMAMA & GEROTZIAS, 2010.



A trombina, que catalisa a formação de fibrina, é o mais potente ativador fisiológico da agregação plaquetária. Está envolvida na formação de trombos, que contribuem para a trombose venosa profunda, infarto do miocárdio e AVC (BENDEL; BONA; BAKER, 2011). Em função disso, a trombina apresenta um papel chave nos eventos tromboembólicos, sendo sua inibição o alvo terapêutico principal em numerosos estudos clínicos (LIESENFELD *et al.*, 2006; STANGIER *et al.*, 2005; STANGIER *et al.*, 2007).

A necessidade de um agente antitrombótico oral efetivo e bem tolerado, com propriedades farmacológicas mais previsíveis, combinado com o aumento do reconhecimento de que a trombina é a enzima chave na cascata de coagulação sanguínea e na trombogênese, tem levado ao desenvolvimento de uma nova classe de agentes antitrombóticos, com ação diretamente na trombina. Ao contrário da

varfarina e da heparina, os IDT são capazes de inibir a trombina livre e também a ligada à fibrina, permitindo assim a inibição mais eficaz da coagulação (STANGIER *et al.*, 2007).

O IDT mais estudado no momento é o DAB, um pró-fármaco administrado oralmente, que quando absorvido pelo trato gastrointestinal é rapidamente convertido para a forma ativa dabigatrana, que se liga à trombina com alta afinidade e especificidade, agindo como antitrombótico (ERIKSSON *et al.*, 2005; FRANCHINI & MANNUCCI, 2009).

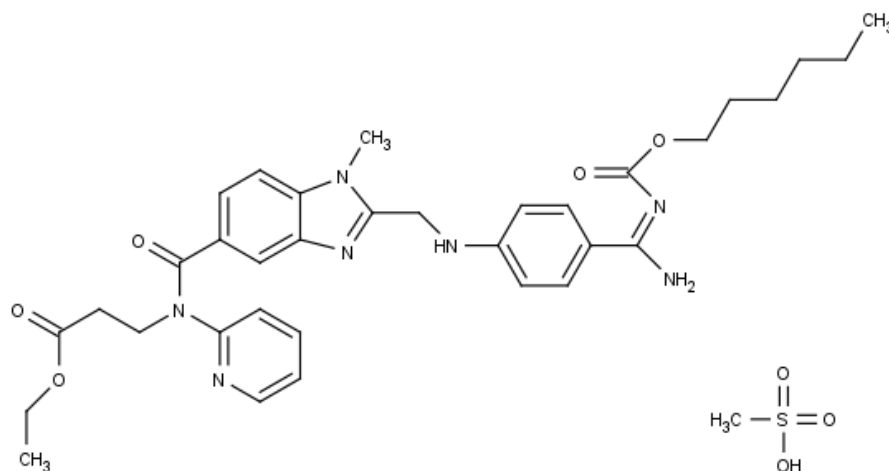
3.2. Etxilato de dabigatrana

3.2.1. Descrição

O pró-fármaco etxilato de dabigatrana está na forma de um sal mesilato (Figura 3.2) e apresenta as seguintes características (EMA, 2008; DRUGBANK, 2013; BOEHRINGER-INGELHEIM, 2013):

- Aspecto: pó cristalino branco amarelado a amarelo;
- Nome químico: metanossulfonato de etil N-{{[2-({[4-((E)amino{{(hexiloxi) carbonila] imino} metil) fenil]amino] metil)-1-metil-1H-benzimidazol-5-il] carbonila}-N-piridina-2-il-β-alaninato;
- Fórmula molecular: C₃₄H₄₁N₇O₅-CH₄SO₃;
- Massa molecular: 723,83 (sal) e 627,75 (base livre);
- Denominação Comum Internacional (DCI): dabigatran etexilate;
- Denominação Comum Brasileira (DCB): etxilato de dabigatrana;
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): 593282-20-3 (sal) e 211915-06-9 (base livre);
- Solubilidade: muito solúvel em metanol, solúvel em etanol, moderadamente solúvel em isopropanol, levemente solúvel em acetona e praticamente insolúvel em acetato de etila, tolueno e n-hexano.

FIGURA 3.2. Estrutura química do mesilato de etexilato de dabigatrana.



3.2.2. Aspectos farmacológicos

DAB é um novo anticoagulante de uso oral, univalente e de baixo peso molecular, que liga-se ao sítio ativo na molécula de trombina, inibindo a mesma competitiva e reversivelmente com concentração dependente. Ao contrário da heparina, age independentemente da antitrombina e inibe tanto a trombina plasmática livre quanto a ligada à fibrina (ERIKSSON *et al.*, 2005; EZEKOWITZ & NAGARAKANTI, 2011; GANETSKY *et al.*, 2011; LIESENFELD *et al.*, 2006).

A trombina, uma serina-protease tipo tripsina, desempenha um papel central nos processos de trombose e hemostase. Sendo assim, entender seu papel na coagulação é fundamental para a discussão do mecanismo de ação do DAB e outros anticoagulantes (GANETSKY *et al.*, 2011; LIESENFELD *et al.*, 2006).

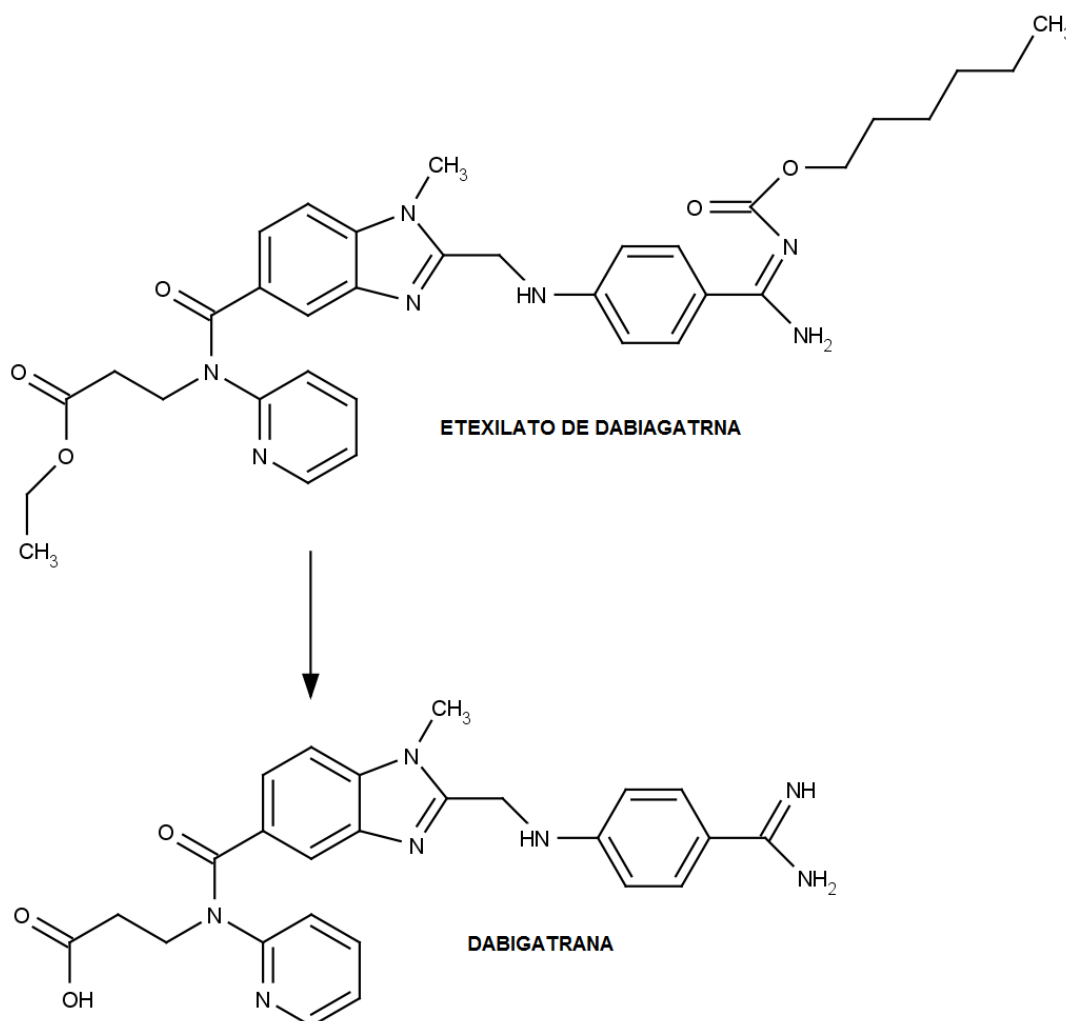
Uma injúria endotelial resulta na exposição do fator tecidual, o qual interage com o fator VII ativado para iniciar a cascata de coagulação (Figura 3.1) (LIESENFELD *et al.*, 2006). A etapa chave na cascata de coagulação do sangue é a trombina, exibindo tanto propriedades pró-coagulante quanto anticoagulante; é o fator principal na iniciação e propagação de distúrbios trombóticos através da catálise da formação da fibrina a partir do fibrinogênio. A trombina ativa os fatores de coagulação V, VIII, XI e XIII da cascata de coagulação permitindo a formação do trombo. Também estimula a agregação plaquetária pela ativação de receptores

ativados por proteases na superfície das plaquetas. Dado o papel chave da trombina nos eventos trombóticos, sua inibição representa um alvo terapêutico para numerosos distúrbios tromboembólicos (GANETSKY *et al.*, 2011).

3.2.3. Aspectos farmacocinéticos

DAB é um pró-fármaco rápido e completamente convertido no fármaco principal dabigatrana, por meio de hidrólise, catalisada por esterases plasmáticas não específicas (Figura 3.3). A diferença entre a dabigatrana e o seu pró-fármaco é um grupo etila ligado ao ácido carboxílico e uma cadeia lateral hexiloxicarbonila na amina. Ambas são cadeias hidrofóbicas que facilitam a sua absorção (EBNER; WAGNER; WIENEN, 2010; EZEKOWITZ & NAGARAKANTI, 2011).

FIGURA 3.3. Hidrólise metabólica do pró-fármaco DAB em dabigatrana – adaptado de EBNER; WAGNER; WIENEN, 2010.



O perfil farmacocinético da dabigatrana em voluntários sadios é caracterizado pela concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) em torno de duas horas após administração e pela disposição bi-exponencial da fase de eliminação. O tempo de meia vida terminal é de 14-17 horas após a administração de múltiplas doses e o estado de equilíbrio é atingido três dias após o início do tratamento com duas administrações diárias (ERIKSSON *et al.*, 2005; LIESENFELD *et al.*, 2006). Os parâmetros farmacocinéticos de $C_{m\acute{a}x}$ e área sob a curva (ASC) aumentam proporcionalmente com a dose, indicando que a dabigatrana apresenta farmacocinética linear na faixa de concentração de 10-400 mg (STANGIER *et al.*, 2007).

Isoenzimas do citocromo P450 não são envolvidas no metabolismo do DAB e da dabigatrana, ou seja, não induzem ou inibem a atividade enzimática (STANGIER *et al.*, 2005). O fármaco é eliminado principalmente não alterado através de excreção renal; após administração intravenosa da dabigatrana, a recuperação urinária é de, aproximadamente, 80% da dose (ERIKSSON *et al.*, 2005; LIESENFELD *et al.*, 2006).

A biodisponibilidade absoluta da dabigatrana, quando administrada como pró-fármaco DAB, é de 5%. A variabilidade interindividual de voluntários sadios demonstrou ser baixa, com coeficiente de variação (CV) do $C_{m\acute{a}x}$ e da ASC usualmente menor que 30%. Já a variabilidade intraindividual foi muito menor, apresentando um CV entre 6 e 14% (ERIKSSON *et al.*, 2005; LIESENFELD *et al.*, 2006; STANGIER *et al.*, 2005).

Quando co-administrado com alimentos o DAB apresenta um atraso na absorção, com um $T_{m\acute{a}x}$ médio aumentando de duas para quatro horas. Já a ASC e o $C_{m\acute{a}x}$ não foram alterados no estado alimentado, em comparação à condição de jejum. Como DAB requer um ambiente ácido para sua absorção, um estudo foi realizado administrando pantoprazol como pré-tratamento. O resultado demonstrou uma diminuição nos parâmetros de ASC e $C_{m\acute{a}x}$, uma variabilidade interindividual maior enquanto o $T_{m\acute{a}x}$ permaneceu inalterado (STANGIER *et al.*, 2005).

3.2.4. Eventos adversos

O sangramento é o evento adverso mais relevante após uso do DAB. Dependendo da indicação, sangramento de qualquer tipo ou gravidade ocorreu em cerca de 14% dos pacientes tratados em curto prazo, após cirurgia de artroplastia total de quadril ou joelho. Em tratamento de longo prazo, uma média anual de 16,5% dos pacientes com fibrilação atrial tratados para prevenção de AVC e embolia sistêmica tiveram sangramentos. Apesar da rara frequência nos estudos clínicos, sangramentos graves podem ocorrer e, independentemente, da sua localização, podem levar à incapacitação, risco de vida ou mesmo evolução fatal (BOEHRINGER-INGELHEIM, 2013).

Em estudos clínicos, o evento adverso mais comum observado foram distúrbios gastrointestinais, como a vômito, diarreia, náusea, seguidas de distúrbios gerais, como fadiga, edema e dores de cabeça (SPINLER, 2013).

3.3. Literatura analítica envolvendo DAB

Na literatura, não foi encontrada nenhuma informação referente à determinação quantitativa de DAB em matéria-prima e formulações farmacêuticas. Existem artigos relacionados a estudos clínicos e farmacocinéticos que relatam a determinação do fármaco em fluidos biológicos, utilizando CLAE-EM, sendo que todos descrevem brevemente a mesma metodologia, e não trazem os dados de validação de método (LIESENFELD *et al.*, 2006; STANGIER *et al.*, 2005; STANGIER *et al.*, 2008; TROCÓNIZ *et al.*, 2007).

São relatados ainda estudos de metabolismo e distribuição de dabigatrana, através de um método por CLAE com detecção de radioatividade (BLECH *et al.*, 2008) e CLAE-EM (HU *et al.*, 2013). Além dos artigos publicados por nosso grupo (BERNARDI; FRÖHLICH; BERGOLD *et al.*, 2013a; BERNARDI *et al.*, 2013b), existe um único artigo que descreve um método para determinação de dabigatrana em plasma por CLUE-EM/EM completamente validado, na faixa de 2-500 µg/L, publicado após o início de desenvolvimento desta tese (DELAVENNE *et al.*, 2012).

3.4. Métodos analíticos para avaliação quantitativa de fármacos

A utilização de métodos analíticos é imprescindível para que o controle de qualidade possa garantir a segurança, eficácia e qualidade total de um medicamento. São várias as metodologias e técnicas analíticas utilizadas na identificação, caracterização e quantificação de substâncias, sendo escolhidas avaliando-se fatores relativos à substância, como também do método empregado (RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo o ICH (2006a), a definição de qualidade de medicamento é “a adequação de qualquer fármaco ou espécie medicamentosa para o uso pretendido, incluindo atributos como identidade, potência e pureza”. Do ponto de vista farmacêutico, identidade, potência e pureza são certamente os elementos principais da eficácia e segurança do uso de medicamentos. O principal objetivo de todos os envolvidos com fármacos nos laboratórios de controle de qualidade, nas indústrias farmacêuticas ou nas agências reguladoras sempre é contribuir para a segurança e eficiência da terapia medicamentosa, através do controle destes atributos (GOROG, 2008; ICH, 2006a).

No entanto, devido à falta de métodos seletivos na primeira metade do século passado, este objetivo não pode ser completamente atingido, pois os métodos analíticos predominantes na análise de fármacos (titulação e espectrofotometria) não apresentavam seletividade. A mudança de paradigma, a partir dos anos 50, resultou no desenvolvimento e rápida propagação de técnicas cromatográficas seletivas, sensíveis e robustas.

As técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa, CLAE e eletroforese capilar, vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI *et al.*, 2004). Destaca-se a grande capacidade destas técnicas, de separar e quantificar compostos com alta precisão e exatidão.

A determinação de teor é parte integrante das monografias farmacopeicas para fármacos e produto acabado, sendo um parâmetro chave para a avaliação da

conformidade do medicamento com as especificações definidas (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012). Ao avaliar-se teor é imprescindível a aplicação de um método analítico indicativo de estabilidade, ou seja, um método analítico capaz de separar, detectar e quantificar o produto principal sem a influência de impurezas e/ou produtos de degradação, que podem se originar de processos de produção, embalagem e/ou armazenamento. Os métodos de análises quantitativos devem ser, por sua vez, adequadamente validados (BOUABIDI *et al.*, 2010; ICH, 2003; ICH, 2006a; ICH, 2006b).

O acompanhamento da estabilidade de fármacos e medicamentos está condicionado ao emprego de métodos de análise específicos, que não sofram interferência dos produtos de degradação, e que estejam validados para tal utilização. Metodologia que não garanta esta diferenciação não deve ser utilizada, ou seja, não é adequada para verificar se o medicamento é estável. Segundo o Q1A-ICH, depois de submetidas aos estudos de estabilidade, as substâncias devem ser analisadas por métodos validados indicativos de estabilidade. Os estudos de estabilidade poderão indicar alterações no fármaco durante o armazenamento podendo estas influenciar a qualidade, segurança e/ou eficácia (BAKSHI & SINGH, 2002; CARSTENSEN & RHODES, 2000).

Segundo o FDA (1998) métodos indicativos de estabilidade são definidos como “métodos analíticos quantitativos validados que podem detectar as mudanças em função do tempo, das propriedades químicas, físicas e microbiológicas da matéria-prima e do produto acabado e que são específicos. Assim, o teor da substância ativa, do produto de degradação ou outro componente de interesse poderá ser medido com precisão, sem interferências”.

Uma abordagem correta do desenvolvimento de método indicativo de estabilidade deve envolver o estudo de degradação forçada do fármaco nos estágios iniciais de desenvolvimento. As amostras degradadas devem ser utilizadas como a chave do processo de desenvolvimento, pois a degradação forçada é um meio adequado de gerar impurezas, as quais podem ser formadas durante o processo de produção ou durante o prazo de validade do medicamento (ALSANTE *et al.*, 2007; SCHIESEL; LÄMMERHOFER; LINDNER, 2012).

3.4.1. Cromatografia líquida

Desde a descoberta da cromatografia por M.S. Tswett em 1903 até os dias de hoje, a cromatografia líquida tem apresentado um desenvolvimento impressionante, devido a suas inúmeras vantagens como a análise quantitativa rápida e precisa, operação automatizada, sensibilidade de detecção e aplicabilidade da técnica a diversas amostras (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; DONG, 2006; WATSON, 2005).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes em duas fases, que estão em contato íntimo (ARDREY, 2003; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; POOLE, 2003).

A utilização da cromatografia líquida baseia-se em diferentes mecanismos de separação, sendo eles: cromatografia em fase normal, que é baseada na adsorção/dessorção do analito na fase estacionária polar; cromatografia em fase reversa, cuja separação é baseada no coeficiente de partição entre uma fase móvel polar e uma fase estacionária apolar; cromatografia por troca iônica que é baseada na presença de grupamentos iônicos na fase estacionária, sendo que estes podem ser trocadores de cátions ou de ânions e cromatografia por exclusão, cuja separação é baseada no tamanho das moléculas dos componentes da amostra (DONG, 2006). A escolha da coluna, da fase móvel e do método de detecção possibilita a variação dos mecanismos de separação, permitindo a utilização desta técnica nas diferentes fases de estudo de produtos farmacêuticos (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

A CLAE ocupa um lugar de destaque entre os métodos modernos de análise qualitativa e quantitativa de fármacos e produtos acabados, sendo a técnica mais utilizada nos últimos tempos. Diferentes detectores têm sido utilizados, sendo o detector ultravioleta (UV) ainda o carro-chefe nos laboratórios farmacêuticos, devido à excelente confiabilidade, baixo custo, facilidade de utilização, repetibilidade, sensibilidade e aplicações bem documentadas. De fato, esta técnica foi estabelecida como padrão, utilizada como comparativo para novas técnicas (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; POOLE, 2003; RAO & NAGARAJU, 2003; SWARTZ & KRULL, 1998). Destaca-se ainda a possibilidade de avaliação de pureza de pico, através da

utilização de um detector UV de arranjo de diodos (DAD) que realiza uma varredura em todos os comprimentos de onda. A CLAE ainda pode ser utilizada acoplada com outras técnicas instrumentais, como a EM (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

3.4.2. Detector CAD

No passado, vários detectores baseados na evaporação/aerossol foram desenvolvidos, como o detector evaporativo de espalhamento de luz. No entanto, a baixa sensibilidade, a resposta não linear e a ocorrência de picos não reprodutíveis em altas concentrações são limitações claras deste tipo de detector. Felizmente, novos sistemas de detecção baseados neste mecanismo têm sido desenvolvidos em um passado recente. Dentre eles o detector CAD, o qual foi introduzido em 2002 por Dixon e Peterson, como um novo tipo de detector para aplicações utilizando CLAE (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; DIXON, 2002; ZHANG; DAI; CHETWYN, 2010).

O CAD tem como características positivas a detecção universal de compostos voláteis, resposta independente das propriedades químicas, ampla faixa de resposta com sensibilidade de poucos ng até altos µg, boa precisão para ampla gama de analitos e operação simples e confiável. No entanto, apresenta as limitações de ter resposta variável em função da composição da fase móvel e não possibilitar a verificação da pureza do pico cromatográfico (VEHOVEC & OBREZA, 2010; ZHANG; DAI; CHETWYN, 2010).

Neste tipo de detector, depois de ter passado pela separação na coluna, o eluente do cromatógrafo líquido é transferido para o CAD, onde é nebulizado por meio do efeito de Venturi produzido pelo gás de arraste, tipicamente nitrogênio. Esta etapa transforma a fase líquida em pequenas gotículas, que são carregadas positivamente pelo gás de nebulização secundário, o qual foi previamente carregado ao passar por um sistema de alta voltagem. A detecção das partículas carregadas é realizada utilizando um eletrômetro altamente sensível, que opera à medida que as partículas passam próximo à região de descarga positiva (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; DIXON, 2002; HUTCHINSON *et al.*, 2010; VEHOVEC & OBREZA, 2010).

A operação do CAD é simples e requer apenas a definição de poucos parâmetros de controle, como a pressão do gás de entrada, o intervalo de saída de sinal e a temperatura. Um pré-requisito importante para a detecção por CAD é que o soluto deve ser menos volátil que a fase móvel. Na prática isso significa que a escolha dos aditivos da fase móvel é limitada e que uma fase móvel volátil sempre deve ser utilizada (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; GAMACHE *et al.*, 2005; VEHOVEC & OBREZA, 2010).

Comparado com outros detectores como UV, fluorescência ou amperométrico, a resposta do detector CAD não é afetada pelas propriedades espectrais ou físico-químicas da molécula, ou seja, uma resposta similar deve ser esperada para diferentes compostos, pois se trata de um sistema de detecção massa-dependente (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; HUTCHINSON *et al.*, 2010; VEHOVEC & OBREZA, 2010). A resposta do CAD depende muito da proporção de modificador orgânico na fase móvel. Um aumento de sinal de 5-10 pode ser observado quando uma fase móvel 100% aquosa é alterada para uma 100% orgânica. Isto é, devido ao alto conteúdo orgânico na fase móvel que gera um aumento da eficiência do transporte do nebulizador, resultando em um grande número de partículas atingindo a câmara de detecção e um alto sinal (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; BRUNELLI *et al.*, 2007).

Devido ao seu princípio de separação a resposta do CAD não é diretamente linear, tendo uma resposta quadrática em relação à concentração. Porém, a mesma foi reportada como linear em alguns estudos que apresentam um intervalo estreito de concentração e baixas concentrações do analito (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; JOSEPH & RUSTUM, 2010; VEHOVEC & OBREZA, 2010).

As aplicações do CAD encontradas na literatura são bastante diversas incluindo a análise de ácidos graxos, extratos de plantas, polímeros, produtos cosméticos e análise de produtos farmacêuticos (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012).

Em 2012, Schiesel e colaboradores desenvolveram um método para a determinação do perfil de impurezas com estruturas desconhecidas em soluções nutricionais de uso parenteral, utilizando CAD acoplado com cromatografia líquida.

Também bases voláteis, como trietilamina e hidrazina foram determinadas por cromatografia líquida acoplada ao CAD, solucionado um problema recorrente, pois estas não apresentam grupamentos cromóforos para avaliação com detector UV (COHEN; LIU; GONG, 2012).

Na área de análise farmacêutica foram desenvolvidos e validados métodos utilizando o CAD para determinação de pancurônio e suas impurezas (BLAZEWICZ *et. al.*, 2010), impurezas provenientes de reação de Mailard em comprimidos de memantina (RYSTOV *et al.*, 2011), análise de gabapentina em comprimidos e cápsulas (JIA *et al.*, 2011), identificação e controle de impurezas de sulfato de estreptomicina (HOLZGRABE *et. al.*, 2011), avaliação de estatinas como a sinvastatina, atorvastatina e lovastatina (NOVAKOVA *et al.*, 2009) entre outras aplicações descritas em literatura.

3.5. Validação de métodos analíticos

A necessidade de demonstrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. A confirmação da habilidade de um método analítico para quantificar é de grande importância para assegurar a qualidade, segurança e eficácia das preparações farmacêuticas. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação, para assegurar que a metodologia é exata, específica, reprodutível e robusta (RIBANI *et al.*, 2004; ROZET *et al.*, 2007; SHABIR, 2003). Validação é o ato documentado atestando que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente conduz aos resultados esperados (BRASIL, 2010).

A validação de um método é um processo contínuo, que inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo do desenvolvimento da metodologia, através de calibrações e qualificações de instrumentos e materiais, além de treinamento adequado de pessoal (RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR *et al.*, 2007).

Para registro de novos medicamentos, os órgãos reguladores do Brasil e do exterior exigem a validação de metodologia analítica. Para isso a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais, que são diretrizes a serem adotadas em uma validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Os parâmetros analíticos normalmente avaliados em uma validação de métodos de separação são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, adequabilidade do sistema e robustez (RAO & NAGARAJU, 2003; ROZET *et al.*, 2007).

Além dos ensaios usuais (resistência a pequenas e deliberadas modificações nas condições experimentais, como por exemplo, mudança de pH e proporção de fase móvel, temperatura de análise, entre outros), a robustez pode ser avaliada através da realização de estudos fatoriais, como por exemplo, o desenho experimental de Plackett-Burman (HEYDEN *et al.*, 2001). A utilização dessas abordagens estatísticas aumentou consideravelmente (MONTGOMERY, 2001). A possibilidade de variação de um número relativamente grande de fatores em um número relativamente pequeno de experimentos torna este tipo de procedimento atrativo, pois conduz à diminuição do custo e tempo total de análise. Além disso, os estudos fatoriais permitem uma completa avaliação estatística dos valores obtidos, com diversos tipos de gráficos e, quando aplicados, possuem vantagens em relação à metodologia clássica, a qual apresenta uma estatística limitada, baseada na interpretação e experiência do analista (HEYDEN *et al.*, 2001; DEJAEGER & HEYDEN, 2011; VOGT & KORD, 2011).

Métodos indicativos de estabilidade são requeridos para monitorar possíveis produtos de degradação que possam surgir devido a interações da substância ativa com os excipientes, processo de produção, embalagens e/ou armazenamento inadequado. O método indicativo de estabilidade necessita ser validado e ser incluído na investigação e aplicação de novos fármacos. Estes métodos devem ser robustos e reunir todos os parâmetros de validação requeridos em cada estágio do desenvolvimento do fármaco e na análise do produto final (BOUABIDI *et al.*, 2010; ICH, 2003; ICH, 2006a; ICH, 2006b; SEHRAWAT.; MAITHANI; SINGH. 2010).

3.6. Estudos de estabilidade

A finalidade de um estudo de estabilidade é fornecer informações de como a qualidade da matéria-prima ou do produto acabado varia em função do tempo, sob a influência de uma variedade de fatores ambientais, como a temperatura, a umidade e a luz. Além destes, outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem podem influenciar a estabilidade do produto. Todas estas informações serão utilizadas para estabelecer seu prazo de validade ou de reteste, além de recomendações de condições de armazenamento (BRASIL, 2005; ICH, 2003).

A estabilidade pode ser definida, portanto, como o tempo durante o qual uma determinada especialidade farmacêutica ou mesmo uma matéria-prima considerada isoladamente, em um material de acondicionamento específico, mantém, dentro dos limites especificados, as mesmas condições físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas que possuía quando da época de sua fabricação (BRASIL, 2005; O'DONNELL & BOKSER, 2006).

A falta de estabilidade da formulação farmacêutica pode levar à perda parcial ou total da atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos cuja toxicidade é elevada, entre outras, afetando sua segurança e eficiência, características de fundamental importância na terapêutica. Modificações como, alterações de cor, solubilidade, pH, viscosidade, teor do fármaco ou presença de produtos de degradação, possibilitam, com boa margem de segurança, estabelecer um prazo mínimo de validade, no qual a formulação será estável (CARSTENSEN & RHODES, 2000).

A RE nº 1/2005 da ANVISA (BRASIL, 2005) define três tipos de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos a fim de prever, determinar ou acompanhar o seu prazo de validade: estabilidade acelerada, estabilidade de longa duração e estabilidade de acompanhamento. No estudo de estabilidade acelerada são empregadas condições mais drásticas de temperatura e umidade (temperatura de

40 ± 2 °C e 75 ± 5% de umidade relativa), com o objetivo de acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas do produto farmacêutico. Visam a prever o efeito de pequenos desvios nas condições ideais de armazenamento e/ou transporte que poderão ocorrer. O estudo de longa duração é projetado para verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Este estudo é realizado sob condições normais de armazenamento, ou seja, as condições ambientais nas quais o produto será exposto durante a comercialização e armazenamento por todo seu prazo de validade, com temperatura de 30 ± 2 °C e 75 ± 5% de umidade relativa. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar condições de armazenamento. Os estudos de estabilidade de acompanhamento são realizados com o intuito de verificar a manutenção das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas previstas nos estudos de estabilidade de longa duração, sendo realizado nas mesmas condições de temperatura e umidade deste.

A realização de um estudo de estabilidade está condicionada à existência de métodos analíticos indicativos de estabilidade para sua avaliação. Estes métodos possibilitam estabelecer se o fármaco contido nas amostras permanece inalterado, ou ainda parcial ou totalmente alterado, quando forem conservadas em condições adequadas. A determinação quantitativa do fármaco se faz necessária, assim como, se possível, a determinação dos seus produtos de degradação. Uma técnica muito empregada para identificação completa do fármaco inalterado e de seus possíveis produtos de alteração é a CLAE. Os métodos de análises quantitativos devem ser, por sua vez, muito específicos de maneira a poderem distinguir entre o fármaco inalterado e o produto de degradação. Um método que não garanta esta diferenciação não deve ser utilizado, ou seja, não é adequado para verificar se o medicamento é estável (BAJAJ; SINGLA; SAKHUJA, 2012; BAKSHI & SINGH, 2002; CARSTENSEN & RHODES, 2000).

Estudos de degradação forçada são particularmente imprescindíveis quando pouca informação está disponível sobre potenciais impurezas do fármaco em questão. Do ponto de vista regulamentar estes estudos fornecem dados para suportar a identificação dos produtos de degradação, as vias de degradação,

instabilidade intrínseca da molécula e a especificidade na validação de métodos indicativos de estabilidade (AHUJA, 2004; ALSANTE *et al.*, 2007; REYNOLDS *et al.*, 2002; SCHIESEL; LÄMMERHOFER; LINDNER, 2012).

As diretrizes atuais explicitamente exigem a realização de estudos de degradação, sob uma variedade de condições, como luz, calor, hidrólise ácida e básica e oxidação. A separação do fármaco dos possíveis produtos de degradação formados é imprescindível (BAKSHI & SINGH, 2002).

A temperatura é o mais importante dentre os fatores ambientais envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos, uma vez que, na maioria dos casos, a velocidade de degradação química aumenta com o aumento da temperatura (KOMMANABOYINA & RHODES, 1999). Russel (1994) cita que o aumento da velocidade da reação em função do aumento da temperatura pode ser explicado pelo fato de que em qualquer temperatura existe uma distribuição de energias cinéticas moleculares e, em temperaturas mais elevadas, essa distribuição se desloca no sentido de se ter um maior número de moléculas rápidas e menos moléculas lentas.

Os guias regulatórios disponíveis fornecem informações úteis e comentários gerais sobre os estudos de degradação. No entanto, orientações quanto ao escopo, tempos e as melhores práticas para os estudos de degradação são bastante gerais (REYNOLDS *et al.*, 2002).

A cinética de degradação é o estudo da velocidade da mudança química e do modo como é influenciada por fatores como a concentração do fármaco ou do reagente, o solvente empregado, as condições de temperatura, pH do meio, energia de radiação e presença de catalisadores. A maioria das reações de degradação dos fármacos apresenta taxas finitas e é de natureza química. Ao considerar a estabilidade de um produto farmacêutico é preciso conhecer os princípios da cinética química, que envolvem a avaliação da velocidade e a ordem da reação. A partir disso torna-se possível a obtenção de outros dados característicos de estudos de estabilidade, tais como, o $t_{90\%}$, que representa o tempo em que a concentração do fármaco atinge 90% da concentração inicial e a constante de velocidade de reação

(*k*) (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; AHUJA, 2004; LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001; NUDELMAN, 1975).

A ordem da reação é caracterizada pela maneira pela qual a taxa de reação depende da concentração dos reagentes. A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade da reação é independente da concentração dos reagentes. Um gráfico de concentração (*C*) em função do tempo (*t*), cuja inclinação da reta corresponde à constante de velocidade de reação (*k*), é obtido. A reação de primeira ordem ocorre quando a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração do reagente. Essa reação é representada pelo gráfico do logaritmo da concentração ($\log C$) em função do tempo (*t*). Quando a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração de dois reagentes ou à segunda potência da concentração de um deles temos uma reação de segunda ordem, que é representada pelo gráfico do inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (*t*) (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001; NUDELMAN, 1975).

O modelo cinético pode ser representado pelas seguintes equações:

$$C = C_0 - kt \quad t_{90\%} = (0,1 \times C_0)/k \quad (\text{reação de ordem zero})$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad t_{90\%} = 0,106/k \quad (\text{reação de primeira ordem})$$

$$1/C = 1/C_0 + kt \quad t_{90\%} = 1/(9k \times C_0) \quad (\text{reação de segunda ordem})$$

Onde C_0 é a concentração dos reagentes no tempo zero, *C* é a concentração após reação no tempo *t* e *k* é a constante de velocidade da reação.

A determinação da ordem de reação é realizada a partir de procedimentos analíticos utilizados para determinar específica e quantitativamente a concentração da substância de interesse (NUDELMAN, 1975).

Segurança e eficácia dos fármacos são os dois princípios fundamentais na terapia farmacêutica. A segurança do fármaco é determinada pelo seu perfil toxicológico, incluindo os efeitos adversos causados pela presença de impurezas na forma farmacêutica final. Os produtos de degradação representam fonte importante

de possíveis impurezas (RAO & NAGARAJU, 2003). Sendo assim, razões éticas, econômicas e competitivas, assim como aquelas ligadas à segurança e eficácia, suportam a necessidade de monitorar produtos de degradação (AHUJA, 2004). Com o aumento do rigor regulatório no controle de produtos destas substâncias em fármacos e na forma farmacêutica final, grande ênfase está sendo colocada em sua caracterização e análise (SINGH *et al.*, 2012).

A identificação dos produtos de degradação desempenha um papel importante na descoberta de medicamentos e desenvolvimento de processos. Está bem documentado que os medicamentos são submetidos a degradações físico-químicas durante o processo de fabricação e armazenamento. Testes de degradação forçada do fármaco podem ajudar a identificar os prováveis produtos de degradação, o que por sua vez pode ajudar a estabelecer a rota de degradação e a estabilidade intrínseca da molécula (LIU *et al.*, 2011).

A degradação de fármacos em formulações é um processo bastante complexo e imprevisível. Dependendo da estrutura da molécula, o processo de degradação pode ser influenciado pela composição da formulação, o processo de preparação e as condições de estocagem incluindo temperatura, umidade e luz. Adicionalmente, o conhecimento sobre os produtos de degradação formados pode ser crucial para entender a toxicidade ou efeitos colaterais. Além disso, uma elucidação estrutural rápida e exata de um processo de degradação pode ser essencial para reduzir o tempo de desenvolvimento de um medicamento (MODHAVE *et al.*, 2011; WU, 2000).

A elucidação estrutural de compostos por técnicas tradicionais é bastante demorada e exige muitos recursos. Em função disso uma nova estratégia analítica foi desenvolvida, aliando os estudos de degradação forçada com métodos de análise utilizando CLAE-EM ou CLAE-EM/EM. Estas técnicas hífenizadas têm evoluído como uma versátil ferramenta para a caracterização de impurezas de fármacos e produtos de degradação, pois fornecem uma rápida e exata elucidação estrutural, sem a necessidade de um processo de isolamento anterior (MODHAVE *et al.*, 2011; ROURICK *et al.*, 1996).

A EM é uma técnica que apresenta alta sensibilidade e seletividade, resposta a diferentes classes de compostos e capacidade de detecção de misturas complexas, com análises rápidas tanto quali quanto quantitativas. Nesse sentido, tem sido amplamente utilizada para análise de produtos farmacêuticos, inclusive para detecção, identificação e elucidação de estruturas químicas de produtos de degradação (FUKUTSU *et al.*, 2006; LEE, 2005; PEREIRA, 2005).

A combinação de CLAE-EM pode ser considerada como uma das técnicas mais importantes desenvolvidas no último século. Comparado com o detector UV, fornece maior confirmação de identidade e maior seletividade, permitindo a identificação definitiva e a determinação quantitativa de compostos (ARDREY, 2003; NIESSEN, 1999).

Sua alta seletividade está ligada à possibilidade de determinar com alta precisão o peso molecular do analito – e esta é simplesmente a informação mais discriminatória que pode ser obtida – o qual, junto com a informação estrutural que pode ser gerada, muitas vezes permite realizar uma identificação inequívoca. A alta seletividade do CLAE-EM muitas vezes permite a identificação de compostos não resolvidos cromatograficamente ou parcialmente resolvidos. Outra vantagem é a alta sensibilidade; uma identificação pode ser obtida a partir de picogramas da amostra. Esta situação é frequentemente encontrada durante a pesquisa e desenvolvimento de fármacos, e a quantificação, mesmo utilizando baixas concentrações, é altamente exata e precisa (ARDREY, 2003; ROURICK *et al.*, 1996).

Em relação ao DAB, não foram encontradas referências na literatura pesquisada sobre sua estabilidade, cinética de degradação e produtos de degradação.

4. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA SQR

4.1. Introdução

A qualidade da substância de referência é de extrema relevância para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos no desenvolvimento, validação e aplicação do método analítico, uma vez que são utilizadas como parâmetro de comparação. Para tanto, materiais de referência bem caracterizados e com pureza documentada devem ser utilizados para os estudos (ICH, 2005).

Segundo o FDA, as substâncias químicas de referência (SQR) podem ser classificadas em duas categorias: as compendiais e as não compendiais. As compendiais são obtidas a partir de fontes farmacopeicas, como a Farmacopeia Americana ou Brasileira, e não necessitam de caracterização posterior. As não compendiais, também apresentam elevado teor de pureza, mas devem ser cuidadosamente caracterizadas para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998).

A SQR de DAB utilizada neste trabalho é classificada como não compendial, sendo assim, objetivou-se a sua caracterização.

4.2. Substância química de referência

A SQR de DAB, com teor declarado de 99,5%, foi adquirida da empresa Sequoia Research Products Ltd., Reino Unido.

4.3. Caracterização da SQR de DAB

Utilizaram-se as seguintes técnicas para caracterização da SQR de DAB: espectrometria de massas (EM) por varredura total dos íons principais, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

4.3.1. Espectrometria de massas (EM)

O EM é um detector que permite um alto nível de seletividade, analisando um número selecionado de íons para caracterizar um determinado composto.

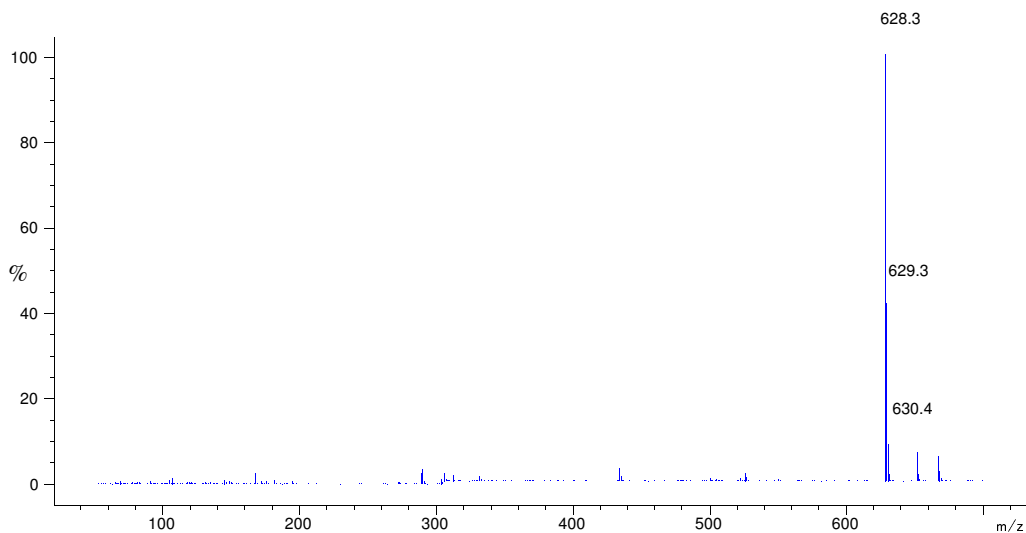
4.3.1.1. Condição experimental

A determinação do íon de m/z da SRQ de DAB foi realizada em espectrômetro de massas Agilent® modelo 1260 Infinity, equipado com quadrupolo 6120 e uma interface de ionização por eletronebulização (ESI), operado no modo positivo. Os parâmetros operacionais fixados foram: fluxo de gás para nebulização de 12 L/min, pressão de nebulização de 55 psi, temperatura do gás de secagem de 300 °C e voltagem do capilar de 3000 V. A solução contendo 2 µg/mL de SQR de DAB diluída em metanol foi mantida em ultrassom por 10 minutos e posteriormente filtrada em filtro com membrana de 0,45 µm. Foi então introduzida no EM através da infusão direta a uma vazão de 10 µL/min.

4.3.1.2. Resultados e discussão

Sendo a massa molecular do DAB 627, os parâmetros do equipamento foram otimizados de modo a maximizar a intensidade do íon de m/z 628 $[M+H]^+$. O espectro de massas está representado na Figura 4.1, e sua análise possibilita verificar a massa de 628 m/z , referente ao íon molecular do DAB.

FIGURA 4.1. Espectro de massas de SQR de DAB adquirido no modo de varredura total dos íons principais com eletronebulização positiva.



4.3.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H)

A RMN é uma técnica extremamente eficaz, pois permite caracterizar uma substância química através da presença e/ou ausência de sinais característicos da molécula (WATSON, 2005).

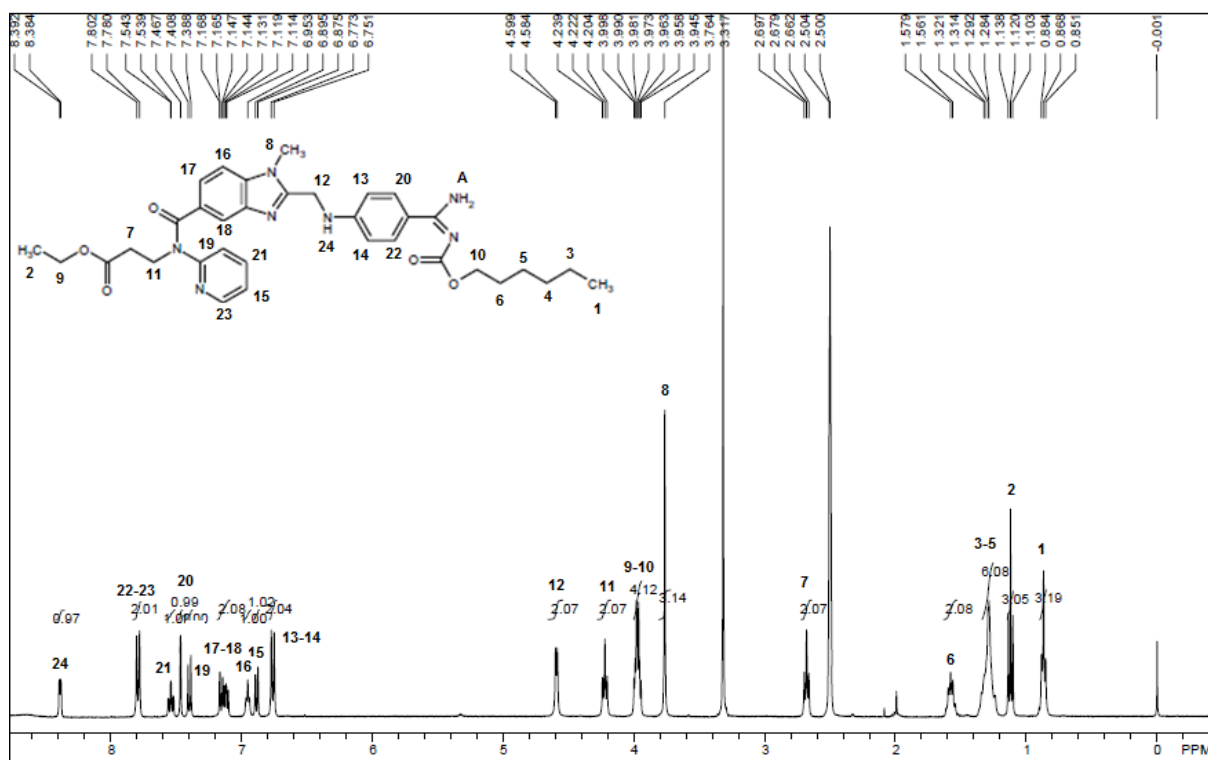
4.3.2.1. Condição experimental

O espectro de RMN ¹H da SQR de DAB foi realizado em equipamento Bruker, 400 MHz, utilizando solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO_{d6}). A análise foi realizada pelo laboratório produtor Sequoia Research Products Ltd.

4.3.2.2. Resultados e discussão

O espectro de RMN ¹H da SQR de DAB, bem como sua estrutura química, são apresentados na Figura 4.2.

FIGURA 4.2. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) de SQR de DAB utilizando DMSO_{d6} como solvente. * Fornecido pelo laboratório produtor Sequoia Research Products Ltd.



As atribuições do espectro de RMN ^1H de SQR de DAB estão apresentadas na Tabela 4.1.

TABELA 4.1. Atribuições do espectro de RMN ^1H de SQR de DAB em DMSO_{d6} (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Posição	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade	Número de hidrogênios	Interpretação
1	0,851-0,884	Tripleto	3	CH_3
2	1,103-1,138	Tripleto	3	CH_3
3-5	1,284-1,321	Multiplete	6	CH_2
6	1,561-1,579	Multiplete	2	CH_2
-	2,500-2,504	Dupleto	-	Solvente (DMSO_{d6})
7	2,662-2,697	Tripleto	2	CH_2
-	3,317	Simpleto	-	Solvente (DMSO_{d6})
8	3,764	Simpleto	3	CH_3
9-10	3,945-3,998	Multiplete	4	CH_2
11	4,204-4,239	Tripleto	2	CH_2
12	4,584-4,599	Dupleto	2	CH_2
13-14	6,751-6,773	Dupleto	2	H aromático
15	6,875-6,895	Dupleto	1	H aromático
16	6,953	Simpleto	1	H aromático
17-18	7,114-7,168	Multiplete	2	H aromático
19	7,388-7,408	Dupleto	1	H aromático
20	7,467	Simpleto	1	H aromático
21	7,539-7,543	Tripleto	1	H aromático
22-23	7,780-7,802	Dupleto	2	H aromático
24	8,384-8,392	Dupleto	1	N-H

Cabe ressaltar que, apesar da molécula possuir um total de 41 hidrogênios e o espectro contabilizar 39, possivelmente esses hidrogênios sejam correspondentes ao NH₂ (A), uma vez esses são hidrogênios de troca rápida e essa troca está acima da escala do equipamento, por isso nem sempre são visualizados.

Na literatura, não se encontram disponíveis para comparação espectros de RMN de ¹H de DAB; sendo assim as atribuições dos hidrogênios da SQR de DAB foram estabelecidas com base em dados tabelados disponíveis na literatura consultada (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005), demonstrando que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para o composto em estudo.

4.3.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

O espectro de infravermelho pode ser usado na identificação de moléculas da mesma forma que a impressão digital é usada nos seres humanos. Independentemente do tipo de molécula, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem praticamente na mesma frequência. No entanto, considerando duas moléculas com o mesmo grupamento, em cada estrutura a mesma ligação estará em ambiente diferente e, por isso, não há possibilidade de duas moléculas terem o mesmo espectro de infravermelho (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

4.3.3.1. Condição experimental

O espectro IV foi obtido através da análise direta da SQR de DAB, em espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum BX.

4.3.3.2. Resultados e discussão

O espectro pode ser verificado na Figura 4.3. As atribuições para as principais bandas referentes aos grupos funcionais característicos da molécula estão descritas na Tabela 4.2.

FIGURA 4.3. Espectro de absorção na região do IV para a SQR de DAB (4000 a 600 cm^{-1}) obtido com espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer, Spectrum BX.

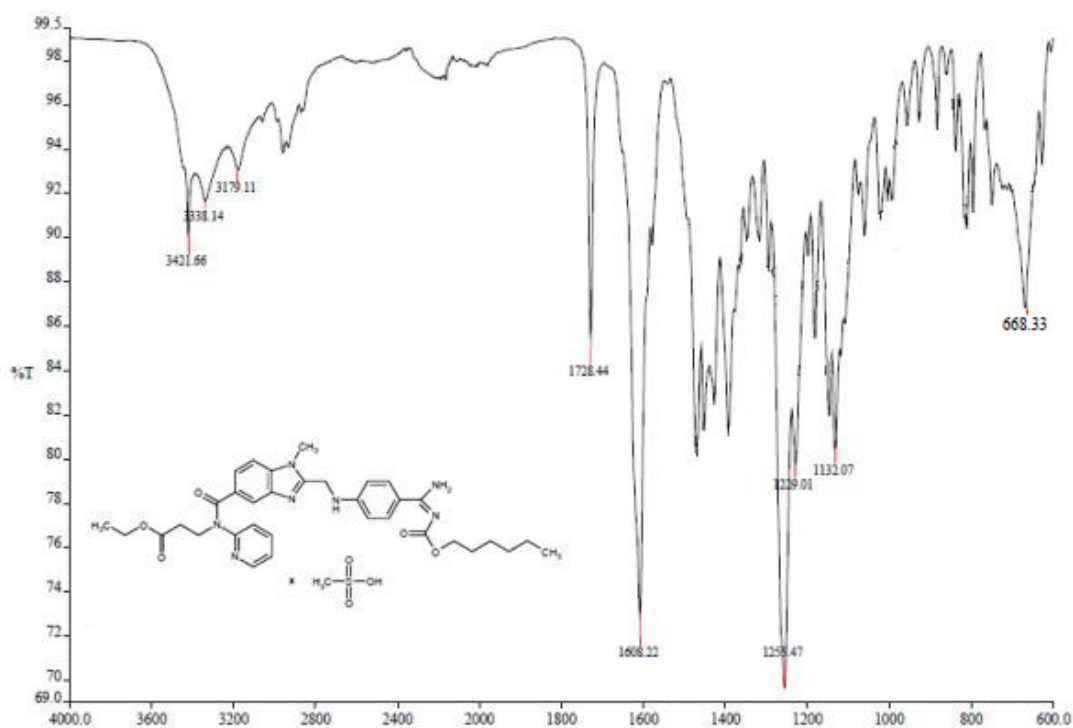


TABELA 4.2. Frequências das principais bandas de DAB e suas atribuições (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Frequência (cm^{-1})	Atribuição
3421	Vibração de deformação axial de amina
3338	Vibração de deformação axial de amina secundária
3179	Vibração de deformação axial de C-H
1728	Vibração de deformação axial de C=O de éster
1608	Vibração de deformação axial de C=O de amida
1258	Vibração de deformação axial de C-O de éster
1229	Vibração de deformação axial de C-N de amina
1132	Vibração de deformação axial de C-O de éster
668	Vibração de deformação axial de S-O

O espectro obtido para a SQR de DAB apresenta bandas de absorção características dos grupamentos presentes na estrutura química da molécula. A partir da análise detalhada das bandas de absorção podem-se obter dados seguros de identificação. No entanto, a ausência de espectros de referência na literatura inviabiliza a confirmação da identidade do fármaco considerando unicamente essa técnica.

4.3.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica que possibilita avaliar os fenômenos energéticos, físicos e/ou químicos produzidos durante o aquecimento (ou resfriamento) de uma substância (FB, 2010). Através da DSC se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência (termicamente estável), em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura (SILVA; PAOLA; MATOS, 2007).

Devido ao polimorfismo, caracterizado pela ocorrência de diferentes formas cristalinas, uma mesma molécula pode apresentar distintas propriedades físicas. Em razão disto, na literatura estão descritos diferentes pontos de fusão para a molécula de DAB. A forma cristalina anidra I apresenta ponto de fusão de 180 ± 3 °C, enquanto o ponto de fusão da forma anidra II é 150 ± 3 °C, da forma cristalina III é 185-190 °C e o ponto de fusão da forma tetraidratada é relatado como 90 ± 5 °C (HAUEL *et al.*, 2006; LEKSIC; DOGAN; CERIC, 2012).

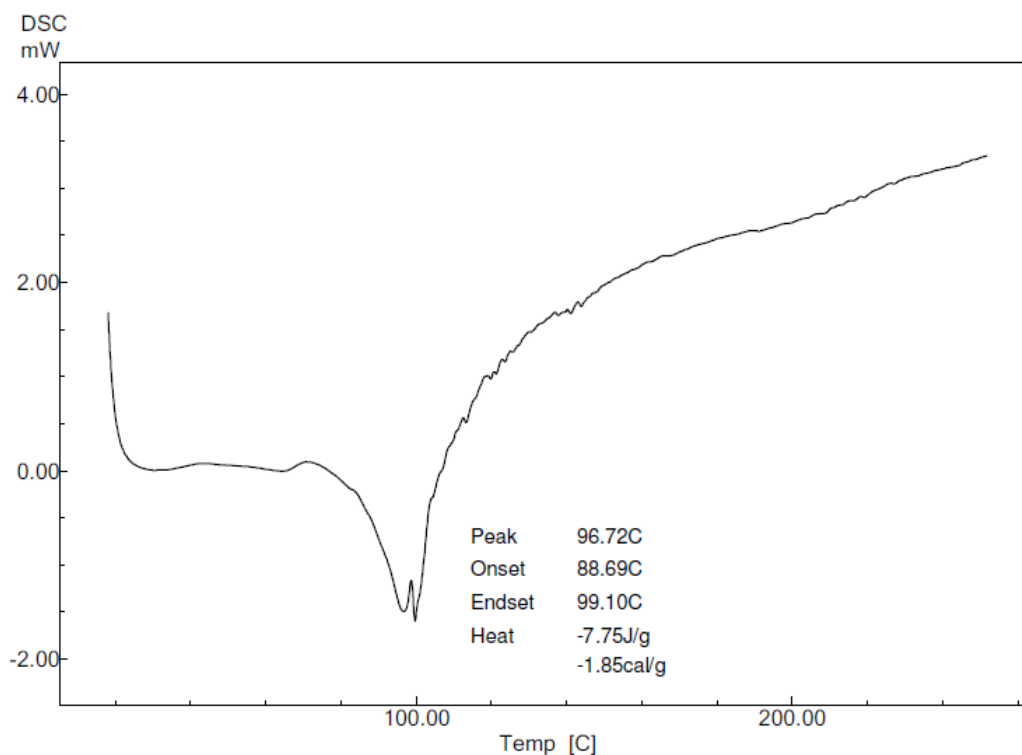
4.3.4.1. Condição experimental

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, com integrador Thermal Analyzer TA-60WS e controlador de fluxo FC-60-A, sob atmosfera inerte de gás nitrogênio com fluxo de 50 mL/min e velocidade de aquecimento de 10 °C/min até 300 °C. A curva de DSC foi obtida empregando porta-amostra de alumínio, o qual foi selado contendo em torno de 2,0 mg de SQR. O ensaio foi realizado no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Farmacêutica (CDTF) da Faculdade de Farmácia (UFRGS).

4.3.4.2. Resultados e discussão

Os valores da faixa de fusão e a curva de aquecimento obtida a partir da determinação por DSC para SQR de DAB estão apresentados na Figura 4.4.

FIGURA 4.4. Curva de aquecimento de SQR de DAB, obtida por DSC - calorímetro diferencial exploratório Shimadzu, modelo DSC-60.



Esta técnica avalia e compara diferenças no fluxo de calor entre a substância em análise e uma referência (porta-amostra selado vazio) enquanto ambas são submetidas ao programa de temperatura controlada.

A faixa de fusão obtida para SQR de DAB, de 88-99 °C, demonstrou ser correspondente à forma polimórfica tetraidratada. Esse resultado está também de acordo com o certificado da SQR emitido pelo fornecedor (88-98 °C) e com a informação de que a molécula em questão é tetraidratada, relatada no mesmo.

5. CAPÍTULO 2 – ANÁLISE QUALITATIVA DE CÁPSULAS DE DAB

5.1. Introdução

A comparação de resultados qualitativos obtidos por uma substância de referência com aqueles obtidos para as amostras permite a identificação do fármaco na forma farmacêutica. Essa análise é fundamental no controle de qualidade das mesmas.

Várias técnicas analíticas e métodos são utilizados na identificação do fármaco no produto acabado, o que é de fundamental importância no controle de qualidade do mesmo. Os métodos adequados são selecionados avaliando-se as propriedades químicas, físicas e biológicas da substância além da avaliação da disponibilidade, simplicidade, adequação técnica e viabilidade financeira do método.

Neste estudo, foram desenvolvidos métodos de CCD, CLAE-UV, CLAE-CAD e CLAE-EM para identificar o fármaco na forma farmacêutica.

5.2. Produto farmacêutico

Cápsulas de DAB equivalente a 110 e 150 mg de etexilato de dabigatrana (Pradaxa[®]), fabricados pela Boehringer Ingelheim do Brasil.

Os excipientes presentes na formulação são: ácido tartárico, acácia, hipromelose, talco, dimeticona e hidroxipropilcelulose. Os componentes da cápsula são: carragenina, cloreto de potássio, dióxido de titânio, corante amarelo crepúsculo, corante indigotina, hipromelose e água purificada (BOEHRINGER INGELHEIM DO BRASIL, 2013).

5.3. Identificação do fármaco na forma farmacêutica

5.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD é uma técnica de separação de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Permite identificar o fármaco quando este é analisado juntamente com a SQR, através da comparação dos fatores de retenção (R_f) obtidos (GIL *et al.*, 2005; WATSON, 2005).

5.3.1.1. Condição experimental

Soluções da SQR de DAB e da amostra de DAB em cápsulas foram preparadas em metanol na concentração de 200 µg/mL, submetidas a ultrassom por 10 minutos, com posterior filtração em filtro com membrana de 0,45 µm.

A fim de verificar se o sistema proposto seria capaz de diferenciar outras moléculas, empregou-se também uma solução de SQR de cefalexina preparada em metanol na concentração de 500 µg/mL. A cefalexina foi escolhida aleatoriamente, pois não existe comercialmente disponível nenhum fármaco com estrutura semelhante ao DAB.

O método cromatográfico foi desenvolvido testando-se diversos tipos e proporções de solventes, buscando verificar o sistema eluente adequado para a obtenção do R_f satisfatório.

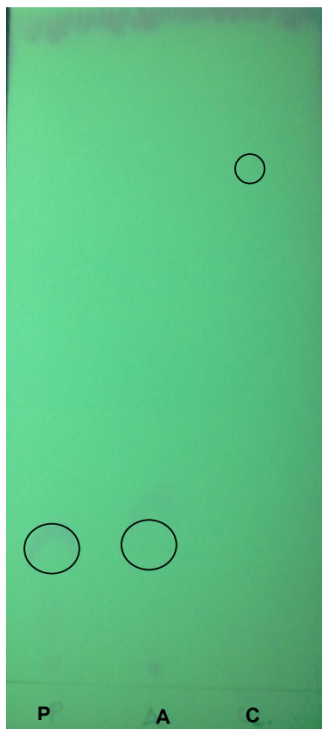
O sistema eluente constituído por uma mistura de acetonitrila e diclorometano (85:15, v/v) se mostrou adequado. Foram utilizadas placas cromatográficas aluminizadas de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck).

Após a aplicação das soluções, a placa foi transferida para cuba, previamente saturada com o sistema eluente. O cromatograma foi desenvolvido e após a evaporação total do solvente, realizou-se a visualização das manchas, através da exposição da placa à lâmpada de luz ultravioleta (UV) com emissão em 254 nm.

5.3.1.2. Resultados e discussão

O cromatograma da solução de SQR de DAB e da solução das cápsulas de DAB obtido por CCD, nas condições descritas anteriormente está apresentado na Figura 5.1.

FIGURA 5.1. Cromatograma obtido por CCD na análise da solução da SQR de DAB (P), da solução amostra das cápsulas de DAB (A) e da solução da SQR de cefalexina (C), revelados por luz UV 254 nm. Sistema eluente: acetonitrila e diclorometano (85:15, v/v). Suporte: gel de sílica 60 F₂₅₄.



As soluções da SQR e da solução amostra das cápsulas de DAB obtiveram um Rf de 0,25. Como o valor de Rf pode sofrer influência de fatores externos, como a temperatura, avaliou-se também o valor de fator de retenção relativo (Rx) em relação à cefalexina. A cefalexina apresentou um Rf de 0,75; sendo assim o valor de Rx para a solução SQR e solução das cápsulas de DAB é 3. A similaridade no perfil cromatográfico e os valores de Rx obtidos sugerem a identidade do fármaco presente nas amostras de cápsulas frente à SQR de DAB.

5.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

A CLAE é um método bastante empregado em análises quantitativas, podendo ser muito útil na identificação de fármacos. Se as substâncias são idênticas, apresentarão os mesmos tempos de retenção, quando analisadas sob as mesmas condições experimentais. Caso o equipamento esteja equipado com um detector de arranjo de fotodiodos (DAD), além da comparação do tempo de retenção, permite-se verificar a pureza de pico e a similaridade entre os espectros obtidos.

5.3.2.1. Detector UV (CLAE-UV)

5.3.2.1.1. Condição experimental

Soluções da SQR de DAB e da amostra de DAB em cápsulas foram preparadas em metanol na concentração de 100 µg/mL, submetidas a ultrassom por 10 minutos, com posterior filtração em filtro com membrana de 0,45 µm. Após foram diluídas a 30 µg/mL com a fase móvel descrita na Tabela 5.1.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu equipado com controlador de sistema CBM-20A operado pelo programa Class VP 6.12. O equipamento é composto de sistema binário de bombas LC-20ATvp, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10ADvp, forno CTO-10ACvp e auto-injetor SIL-20A.

As condições cromatográficas definidas para identificação de DAB por CLAE-UV estão apresentadas na Tabela 5.1.

TABELA 5.1. Condições cromatográficas para identificação de DAB por CLAE-UV.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	Acetonitrila : trietilamina 0,1% pH 6,0 ajustado com ácido fosfórico (65:35, v/v)
Fluxo	1,0 mL/min
Coluna	Zorbax [®] Agilent C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Detecção	Detector de arranjo de fotodiodos em 225 nm
Volume injetado	20 µL

A comparação dos tempos de retenção da amostra com aquele da solução da SQR de DAB e a sobreposição dos espectros de absorção do fármaco no respectivo tempo foi utilizada para a identificação do fármaco na amostra de cápsulas. Além disso, foi realizada a avaliação da pureza do pico cromatográfico, como análise auxiliar na correta identificação da substância.

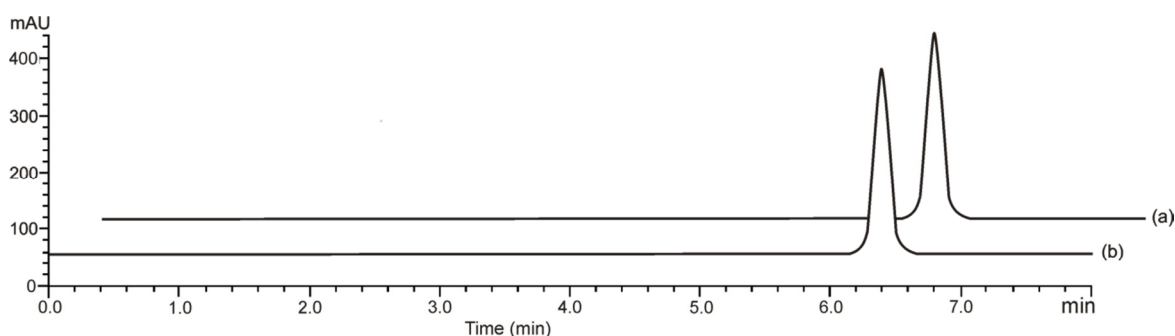
5.3.2.1.2. Resultados e discussão

Os cromatogramas obtidos a partir da análise da SQR de DAB e amostra de cápsula estão apresentados na Figura 5.2.

Ressaltamos que, em virtude da necessidade de uma adequada separação do pico principal em relação aos produtos de degradação, foi imprescindível a utilização de uma coluna com comprimento de 250 mm, visto que, em colunas menores, este objetivo não foi alcançado.

A avaliação da pureza dos picos da solução SQR e da amostra das cápsulas mostrou-se adequada, com valores de 1,0.

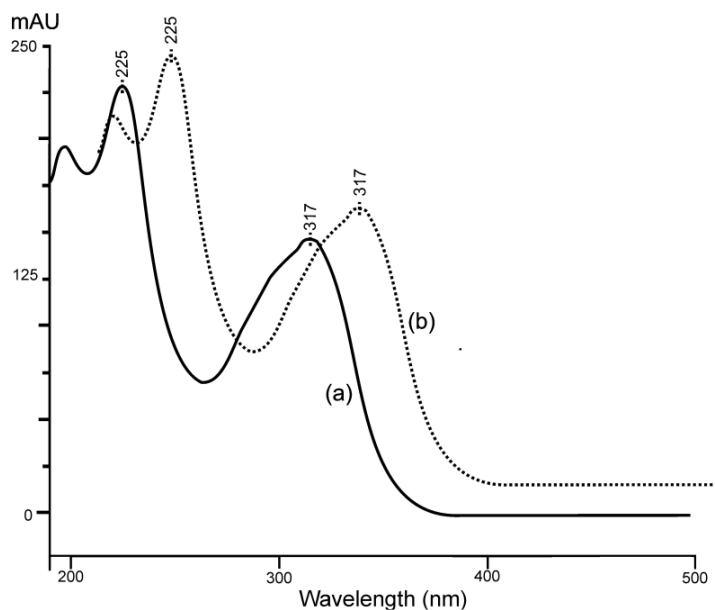
FIGURA 5.2. Cromatogramas sobrepostos da SQR de DAB (a) e da solução amostra de cápsulas de DAB (b) a 30 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila : trietilamina 0,1% pH 6,0 (65:35, v/v), fluxo de 1,0 mL/min, coluna Zorbax® Agilent C₁₈ (250mm x 4,6 mm), detector UV em 225 nm, volume de injeção de 20 µL.



O método por CLAE-UV demonstrou ser adequado para a análise qualitativa de DAB no produto farmacêutico, devido à similaridade entre os tempos de retenção, de aproximadamente 6,3 minutos obtidos para a SQR de DAB e para a amostra (Figura 5.2).

Os espectros sobrepostos de absorção na região do UV (190 a 500 nm), obtidos em detector de arranjo de fotodiodos do ápice dos picos das soluções de SQR e amostras das cápsulas de DAB, estão apresentados na Figura 5.3.

FIGURA 5.3. Sobreposição dos espectros de absorção no UV (190 a 500 nm) obtidos em detector de arranjo de fotodiodos, acoplado ao sistema de CLAE, da SQR de DAB (a) e da solução amostra das cápsulas de DAB (b).



A semelhança entre os espectros obtidos (Figura 5.3) e a correta pureza dos picos cromatográficos, colaboram com a correta identificação do fármaco na amostra de cápsula.

5.3.2.2. Detector CAD (CLAE-CAD)

5.3.2.2.1. Condição experimental

Soluções da SQR de DAB e da amostra de DAB em cápsulas foram preparadas em metanol na concentração de 100 µg/mL, submetidas a ultrassom por 10 minutos, com posterior filtração em filtro com membrana de 0,45 µm. Após foram diluídas a 30 µg/mL com a fase móvel descrita na Tabela 5.2.

Os experimentos por CLAE-CAD foram realizados em cromatógrafo a líquido (Shimadzu) equipado com sistema binário de bombas LC-20AT, desgaseificador DGU-14A, forno CTO10A, detector de ultravioleta SPD-10A e detector de CAD ESA Inc. conectados em série. O programa Chromeleon 6.8 foi utilizado para controle do sistema, aquisição e tratamento de dados.

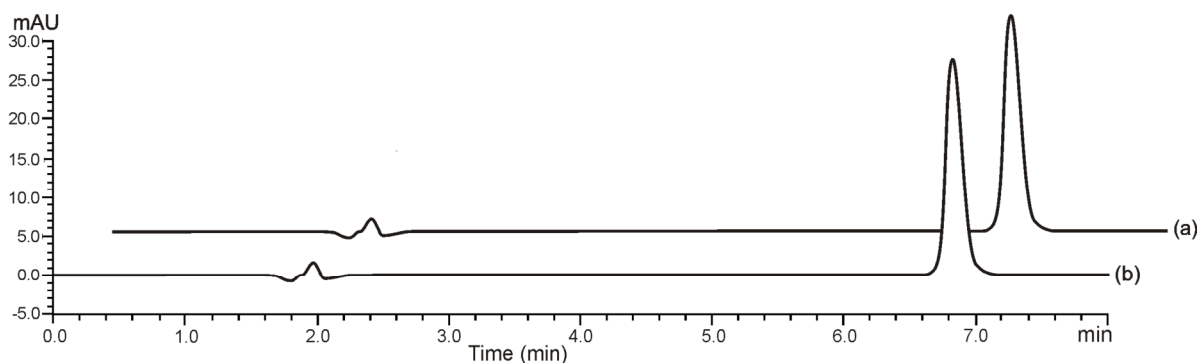
TABELA 5.2. Condições cromatográficas para identificação de DAB por CLAE-CAD.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	Acetonitrila : tampão acetato de amônio 10 mM pH 5,5 ajustado com ácido acético (65:35, v/v)
Fluxo	1,0 mL/min
Coluna	Inertsil® GL Sciences C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Temperatura	30 °C
Volume injetado	20 µL
Detector CAD	Pressão de nitrogênio 35 psi Faixa (range) de 100 pA

5.3.2.2.2. Resultados e discussão

A identificação do fármaco na amostra de cápsulas foi realizada de forma semelhante ao método com detecção por UV, pela comparação dos tempos de retenção da amostra com aquele da solução da SQR de DAB. Os cromatogramas obtidos, a partir da análise da SQR de DAB e da amostra de cápsulas estão apresentados na Figura 5.4.

FIGURA 5.4. Cromatogramas sobrepostos da SQR de DAB (a) e da solução amostra de cápsulas de DAB (b) a 30 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila : tampão acetato de amônio 10 mM pH 5,5 (65:35, v/v), fluxo de 1,0 mL/min, coluna Inertsil® GL Sciences C₁₈ (250mm x 4,6 mm), volume de injeção de 20 µL.



A similaridade entre os tempos de retenção obtidos para a SQR de DAB e para a amostra das cápsulas (cerca de 6,7 minutos) demonstra a adequabilidade do método desenvolvido por CLAE-CAD para a análise qualitativa de DAB no produto farmacêutico (Figura 5.4).

5.3.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)

De todos os detectores o espectrômetro de massas é o que permite a identificação mais precisa, pois determina o peso molecular do analito apresentando alto nível de seletividade. Além disso, pode-se realizar a comparação dos perfis cromatográficos e dos tempos de retenção da solução amostra com a solução padrão de fármaco (ARDREY, 2003).

5.3.3.1. Condição experimental

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Agilent Infinity 1260 equipado com bomba quaternária 1260 Quaternary Pump, degaseificador Standard Degasser, termoestatizador 1260 TCC e auto-injetor ALS 1260. O cromatógrafo foi acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo Agilent, modelo 6120, equipado com uma fonte de ionização de eletronebulização, operado pelo programa ChemStation. Na Tabela 5.3 estão apresentadas as condições cromatográficas e os parâmetros otimizados do espectrômetro de massas para identificação de DAB por CLAE-EM.

Soluções da SQR de DAB e da amostra de DAB em cápsulas foram preparadas em metanol na concentração de 100 µg/mL, submetidas a ultrassom por 10 minutos, com posterior filtração em filtro com membrana de 0,45 µm. Após, foram diluídas a 2 µg/mL com a fase móvel descrita na Tabela 5.3.

A detecção do íon principal característico do DAB, bem como a comparação do tempo de retenção da amostra com aquele da solução SQR de DAB foram utilizadas para a identificação do fármaco nas cápsulas.

TABELA 5.3. Condições cromatográficas e parâmetros otimizados do espectrômetro de massas para identificação de DAB por CLAE-EM.

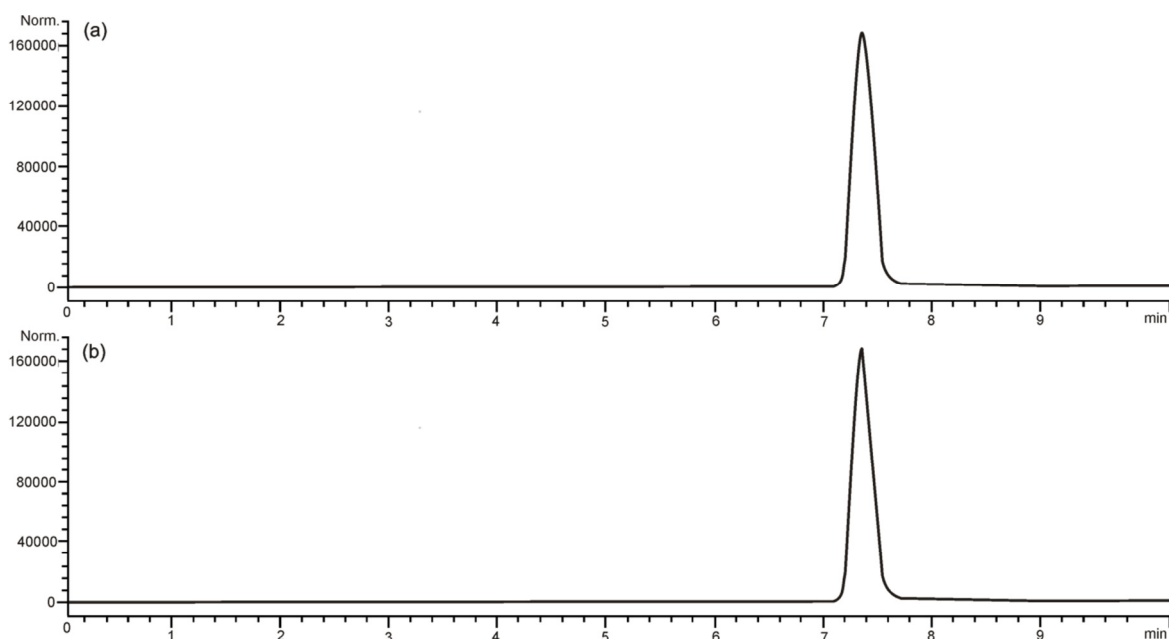
Parâmetro	Descrição
Fase móvel	Acetonitrila : tampão acetato de amônio 10 mM pH 5,5 ajustado com ácido acético (65:35, v/v)
Fluxo	1,0 mL/min
LC Coluna	Inertsil® GL Sciences C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Temperatura	30 °C
Volume injetado	10 µL
MS Tipo de ionização	Eletronebulização positiva
Modo de operação	Monitoramento seletivo de íons (SIR)
Íon monitorado	<i>m/z</i> 628
Fluxo de gás para nebulização	12 L/min
Pressão de nebulização	55 psi
Temperatura do gás de secagem	300 °C
Voltagem do capilar	3000 V

5.3.3.2. Resultados e discussão

Os cromatogramas da solução da SQR de DAB e da amostra das cápsulas de DAB estão apresentados na Figura 5.5.

No modo de monitoramento seletivo de íons, somente as intensidades de um número selecionado de íons para caracterizar um composto são analisados, ao invés do espectro de massas inteiro no modo de varredura. O instrumento detecta rapidamente os íons, fazendo com que esse modo seja altamente sensível e específico (BARKER, 1999).

FIGURA 5.5. Cromatogramas CLAE-EM da SQR de DAB (a) e da solução amostra das cápsulas de DAB (b) a 2 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de acetonitrila : tampão acetato de amônio 10 mM pH 5,5 (65:35, v/v), fluxo de 1,0 mL/min, coluna Inertsil® GL Sciences C₁₈ (250mm x 4,6 mm), volume de injeção de 10 µL. Análise espectral de massa: ionização por eletronebulização positiva, operação no modo de monitoramento seletivo de íons, monitorando o produto 628 massa-carga para DAB.



O método por CLAE-EM demonstrou ser adequado para a análise qualitativa de DAB no produto farmacêutico, devido à detecção do íon principal característico, previamente selecionado de acordo com a relação m/z 628 $[M+H]^+$, assim como a similaridade entre os tempos de retenção (aproximadamente 7,4 minutos) obtidos para a SQR de DAB e para a solução de cápsulas (Figura 5.5).

6. CAPÍTULO 3 – ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1. Introdução

Os métodos desenvolvidos por CLAE-UV e CLAE-CAD para determinação de DAB em cápsulas, bem como a avaliação de intercambialidade entre eles, serão apresentados no formato de artigos científicos (**ARTIGO CIENTÍFICO 6.2. e ARTIGO CIENTÍFICO 6.3**) e suas redações foram dispostas nas normas e formatos das revistas nas quais estão publicados.

**6.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Development and validation of a stability-indication
liquid chromatography method for the determination of Dabigatran
Etexilate in capsules**

Journal of AOAC International, v. 96, p. 37-41, 2013.

Development and validation of a stability-indicating liquid chromatography method for the determination of Dabigatran Etexilate in capsules

Raquel M. Bernardi, Pedro E. Fröhlich and Ana M. Bergold.

*Post graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre-RS, Brazil*

6.2.1. ABSTRACT

A reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the determination of dabigatran etexilate in capsule. The LC method was carried out on a Zorbax C₁₈ column (250 mm x 4.6 mm ID). The mobile phase consisted of acetonitrile and a solution of triethylamine 0.1% pH 6.0 (adjusted with phosphoric acid) (65:35; v/v), run at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ and using photodiode array (PDA) detection at 225 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time of 6.31 min, and was linear in the range of 10-70 µg mL⁻¹ ($R^2=0.9991$). The specificity and stability-indicating capability of the method was proven through the degradation studies and showing also, that there was no interference of the excipients. The accuracy was 100.23% with RSD of 1.34%. The limits of detection and quantitation were 0.04 and 10 µg mL⁻¹, respectively. Moreover, method validation demonstrated acceptable results for precision, sensitivity and robustness. The proposed method was applied for the analysis of the capsules assuring the therapeutic efficacy.

Keywords: Reversed-phase liquid chromatography; dabigatran etexilate; method validation; stability-indicating method.

6.3. ARTIGO CIENTÍFICO – Comparison of ultraviolet detection and charged aerosol detection stability-indicating RP-LC method for the assessment of Dabigatran Etexilate in capsules

Analytical Methods, v.5, p. 4777-4784, 2013.

Comparative study on the analytical performance of charged aerosol detector and ultraviolet detector for the RP-LC analysis of dabigatran etexilate in capsules

Raquel M. Bernardi, Felipe B. D'Avila, Vítor Todeschini, Pedro E. Fröhlich and Ana M. Bergold

Post graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

6.3.1. ABSTRACT

The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the assessment of dabigatran etexilate (DAB) in capsules using ultraviolet detector (UV) and a charged aerosol detector (CAD) connected in series. The RP-LC method was carried out on a GL Sciences Inc. Inertsil ODS-2 column (250 mm x 4.6 mm I.D.). The mobile phase consisted of acetonitrile and ammonium acetate buffer (pH 5.5; 10 mM) (65:35, v/v) flow rate of 1.0 ml/min. CAD detection was performed using a nitrogen pressure of 35 psi and range of 100 pA and the UV detection at 225 nm. The chromatographic separation was obtained with a retention time of 6.7 min. Validation parameters such as specificity, linearity, precision, accuracy and robustness were evaluated. The method was linear over the concentration range of 1–70 µg/ml in both detectors. The specificity and stability-indicating capability of the method were proven through the degradation studies and also showing, that there was no interference from the excipients. The method was precise, accurate, with the Plackett-Burman experimental design used to evaluate robustness, delivering results within the acceptable range. The method was successfully applied for DAB analysis and the results of the CAD and UV detectors were compared, showing a non-significant difference ($P > 0.05$).

Keywords: Reversed-phase liquid chromatography; dabigatran etexilate; method validation; stability-indicating method; charged aerosol detector.

**7. CAPÍTULO 4 – ESTUDO DE ESTABILIDADE: CINÉTICA DE
DEGRADAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E
CITOTOXICIDADE**

7.1. Introdução

A avaliação da estabilidade de DAB, bem como a identificação dos produtos de degradação térmica, os estudos de citotoxicidade e cinética de degradação dos mesmos serão apresentados no formato de artigo científico (**ARTIGO CIENTÍFICO 7.2**) e sua redação foi disposta nas normas e formatos da revista à qual foi submetido para publicação.

**7.2. ARTIGO CIENTÍFICO – Main degradation products of Dabigatran Etexilate
evaluated by LC-UV and LC-ESI-MS, degradation kinetics and *in vitro*
cytotoxicity studies**

Submetido à publicação.

Main degradation products of Dabigatran Etexilate evaluated by LC-UV and LC-ESI-MS, degradation kinetics and *in vitro* cytotoxicity studies

Raquel Martini Bernardi, Felipe Bianchini D'Avila, Vítor Todeschini, Juliana Maria de Mello Andrade, Pedro Eduardo Fröhlich and Ana Maria Bergold

Post graduation in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

7.2.1. ABSTRACT

The present study reports the stability profile of a novel antithrombotic drug: dabigatran etexilate. The drug was subjected to thermal degradation at 60 °C and the products formed were investigated by LC-UV and LC-ESI-MS. The separation of the degradation products was performed on a GL Sciences Inc. Inertsil ODS-2 (250 mm x 4.6 mm I.D.) column with the mobile phase consisting of acetonitrile and ammonium acetate buffer (pH 5.5; 10 mM) (65:35, v/v) pumped at 1.0 mL/min flow rate. The column temperature was set at 30 °C and the detection at 225 nm using a UV detector. The LC-UV method previously validated was extended to LC-ESI-MS for the characterization of the degradation products, without complicated isolation or purification processes, based on retention times and confirmation of molecular weight. The degradation kinetics of the drug was also evaluated and could be described as a first-order process for DAB ($R^2= 0.9900$). Furthermore, no evidence of cytotoxicity in human mononuclear cells was observed for DAB degraded samples. No previous reports were found in the literature regarding the characterization of degradation products behavior of dabigatran etexilate.

Keywords: Cytotoxicity; Dabigatran etexilate; degradation kinetics; degradation products; LC-UV; LC-ESI-MS.

8. DISCUSSÃO GERAL

O DAB, um inibidor direto da trombina, utilizado no tratamento de distúrbios tromboembólicos, embora de grande importância clínica na terapia medicamentosa, não apresenta monografia em compêndios oficiais e registros na literatura científica sobre métodos de avaliação. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas de análise aplicáveis ao controle de qualidade do produto acabado, juntamente com o estudo de estabilidade, possuem fundamental importância para garantir a administração segura e eficaz do medicamento.

Esclarecemos que a discussão apresentada a seguir refere-se às análises qualitativas para caracterização da SQR, à identificação do fármaco nas amostras de cápsulas, à determinação quantitativa do mesmo em cápsulas utilizando diferentes técnicas analíticas, aos estudos de estabilidade e avaliação dos produtos de degradação térmica formados, estando baseada nos artigos publicados ou submetido à publicação, referenciados adequadamente no texto correspondente.

Os testes apresentados na análise qualitativa de DAB visaram à identificação da SQR utilizada, bem como fornecer dados que até o momento não estavam disponíveis na literatura. Primeiramente, a caracterização da SQR foi realizada utilizando as técnicas de EM, RMN ^1H , espectroscopia na região do IV e DSC que são adequadas para caracterizar a substância utilizada como referência.

O EM é um detector que permite a determinação qualitativa e quantitativa de vários componentes de uma amostra, sendo muito utilizada para obter informação do íon molecular e de características estruturais da amostra. O espectro de massas obtido por varredura total permitiu observar o íon massa/carga (m/z) característico do DAB (Figura 4.1).

A RMN é a técnica que fornece mais informação sobre a estrutura molecular do que qualquer outra técnica, pois permite caracterizar uma estrutura química e avaliar possíveis modificações através de sinais característicos da molécula frente ao espectro da SQR (GIL *et al.*, 2005; WATSON, 2005). As atribuições dos sinais referentes ao espectro de RMN ^1H (Figura 4.2) obtido no teste estão de acordo com o esperado e descrito na literatura pertinente.

Para a identificação da estrutura de moléculas através do espectro de infravermelho a análise das bandas características de determinados grupos fornece informações relevantes; no entanto, o espectro deve ser analisado em conjunto com outros dados para uma caracterização mais completa (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). A interpretação das bandas de absorção do espectro IV da SQR de DAB (Figura 4.3) possibilitou a observação de grupamentos funcionais característicos do composto, auxiliando na identificação do mesmo.

De acordo com a curva de aquecimento obtida por DSC (Figura 4.4), verifica-se que a SQR corresponde à forma polimórfica tetraidratada, sendo assim, a DSC pode ser considerada ferramenta adequada para colaborar com a caracterização desta SQR.

No presente trabalho, os resultados obtidos nas técnicas para caracterização confirmam a identidade e o alto grau de pureza da SQR de DAB.

A identificação da substância ativa na forma farmacêutica foi baseada na comparação de resultados qualitativos obtidos pela SQR de DAB com aqueles obtidos para as amostras de cápsulas. Com este propósito foram desenvolvidos métodos de CCD, CLAE-UV, CLAE-CAD e CLAE-EM.

O desenvolvimento da técnica de CCD é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, tais como fácil interpretação e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande repetibilidade e baixo custo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). A identificação dos compostos foi baseada na comparação do Rx da solução amostra e da solução SQR. A utilização do método por CCD sugere a identificação do fármaco DAB nas cápsulas através da comparação dos valores do Rx obtido com a SQR de DAB e também devido à similaridade no perfil cromatográfico (Figura 5.1). Além disso, os resultados demonstraram a capacidade do método de separar substâncias com diferentes estruturas químicas.

Quando utilizada para identificação de compostos, a CLAE baseia-se na comparação entre os tempos de retenção obtidos para o pico da solução amostra e da solução SQR.

A semelhança entre os tempos de retenção no método por CLAE-UV (6,3 minutos) (Figura 5.2) bem como no método por CLAE-CAD (6,7 minutos) (Figura 5.4), obtidos para a solução da SQR de DAB e solução das cápsulas de DAB, permite sugerir a identificação do fármaco na forma farmacêutica. Além disso, a similaridade entre os respectivos espectros obtidos (Figura 5.3) é mais uma evidência utilizada na identificação do fármaco DAB na forma farmacêutica. Ainda, a avaliação da pureza dos picos da solução SQR e da amostra das cápsulas mostrou-se adequada, com valores de 1,0.

A CLAE-EM permite a rápida identificação de fármacos, bem como produtos de degradação e impurezas. Além disso, a co-eluição de picos ou a presença de componentes não suficientemente resolvidos pela cromatografia não interferem na qualidade da análise, devido à capacidade seletiva atribuída ao espectrômetro de massas (BARKER, 1999). O método permitiu identificar o íon principal do DAB (m/z 628 $[M+H]^+$), tanto na solução da SQR de DAB como na da amostra de cápsulas de DAB. A similaridade entre os tempos de retenção do fármaco nestas mesmas soluções (7,4 minutos) também sugerem a identificação do composto (Figura 5.5).

Com base no conjunto de resultados apresentados por estes métodos foi possível identificar o DAB nas amostras da forma farmacêutica cápsula.

Com o intuito de garantir a qualidade, segurança e eficácia terapêutica de fármacos e produtos farmacêuticos, o controle de qualidade é fundamental durante o desenvolvimento farmacêutico, a avaliação de formulações, bem como no processo de produção de medicamentos. Nesse contexto, os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, estudos de estabilidade e análises de fármacos e produtos farmacêuticos.

Considerando que antes da elaboração deste projeto não constava na literatura científica referência à determinação quantitativa de DAB em forma farmacêutica, objetivou-se o desenvolvimento de métodos analíticos com aplicação para o controle da qualidade do produto farmacêutico descritos nos itens **6.2 ARTIGO CIENTÍFICO** - *Development and validation of a stability-indicating liquid chromatography method for the determination of Dabigatran Etextilate in capsules* e **6.3 ARTIGO CIENTÍFICO** - *Comparative study on the analytical performance of*

charged aerosol detector and ultraviolet detector for the RP-LC analysis of Dabigatran Etexilate in capsules.

Para o desenvolvimento dos métodos foram levados em consideração diversos parâmetros, baseando-se em questões, tais como, tempo de análise, simplicidade, custo, amostragem, equipamentos, aplicabilidade na rotina do controle de qualidade, disponibilidade e capacidade de aplicação em estudos de estabilidade.

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). CLAE é uma das técnicas mais difundidas em laboratórios analíticos, sendo que hoje em dia as análises farmacêuticas e o controle de qualidade são impensáveis sem sua utilização (POOLE, 2003). A técnica de detecção mais comumente utilizada na CLAE é a UV, devido ao seu vasto campo de aplicação, sua sensibilidade, a larga faixa de linearidade e a compatibilidade com eluição em gradiente (POOLE, 2003). Assim o objetivo inicial deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de uma metodologia por CLAE-UV[1] indicativa de estabilidade, conforme descrito no item **6.2 ARTIGO CIENTÍFICO.**

Para obter a melhor condição cromatográfica a fase móvel foi otimizada buscando seletividade e sensibilidade em um curto espaço de tempo, além de excelente resolução entre o pico do fármaco e os picos dos produtos de degradação. Os solventes orgânicos comumente utilizados nos métodos por CLAE são a acetonitrila e o metanol; em razão disto o desenvolvimento do método por cromatografia em fase reversa partiu de diferentes proporções destes solventes orgânicos e de água com e sem a adição de trietilamina, em diferentes pH. Além disso, colunas de diferentes empacotamentos e tamanhos foram avaliadas, sendo definida a coluna de fase reversa C₁₈ (250 mmx 4,6 mm, 5 µm) mantida à temperatura ambiente. Ressaltamos que, em virtude da necessidade de uma adequada separação do pico principal em relação aos produtos de degradação, foi imprescindível a utilização de uma coluna com comprimento de 250 mm, visto que, em colunas menores, este objetivo não foi alcançado. Os testes de desenvolvimento demonstraram que a utilização de trietilamina é imprescindível, uma vez que, sem sua adição, os parâmetros de pico não são adequados para a análise. Assim, a fase

móvel definida é composta por trietilamina 0,1% pH 6,0 (pH ajustado com ácido fosfórico): acetonitrila (35:65, v/v) com fluxo de 1,0 mL/min, obtendo-se adequada separação dos produtos de degradação em relação ao fármaco, com excelentes parâmetros cromatográficos, resultando em um tempo de retenção relativamente curto e uma fase móvel simples. O volume de injeção foi de 20 µL.

O método apresentado mostrou-se específico, uma vez que não houve interferência dos excipientes presentes na formulação na determinação do fármaco. Além disso, destaca-se a capacidade do método desenvolvido em determinar o fármaco na presença de produtos de degradação obtidos por degradação forçada nas condições ácida, básica, térmica, oxidativa e fotolítica. O mesmo apresentou excelente resolução entre os picos do DAB e dos produtos de degradação. Sendo assim, o método pode ser aplicado para verificação e monitoramento da estabilidade do DAB na forma farmacêutica em estudo (Figura 6.2.2).

O estudo de linearidade foi conduzido para o método proposto, através da construção da curva padrão, na faixa de 10-70 µg/mL. O método apresentou relação linear entre as concentrações utilizadas e as respectivas respostas obtidas, apresentando coeficiente de determinação próximo à unidade ($R^2=0,9991$). As análises indicaram que a regressão foi significativa e não houve desvio de linearidade ($p < 0,05$).

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão entre dias e entre analistas). Os resultados de desvio padrão relativo (DPR) obtidos para o método foram 1,66%, 1,14% e 1,41%, respectivamente, o que demonstra a precisão do método proposto.

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação, onde foram adicionadas quantidades de SQR na amostra em três diferentes níveis de concentração. A exatidão foi estabelecida visto que a recuperação média apresentou resultado 100,23% (DPR=1,34%).

A robustez foi avaliada com pequenas e deliberadas modificações nos parâmetros analíticos. Foram realizadas alterações em fluxo, coluna, volume de injeção, percentagem de acetonitrila e pH da fase móvel. Foi avaliada em cada condição alterada a ocorrência de modificações nos parâmetros cromatográficos,

bem como o teor de amostras. Os resultados demonstraram que o método é robusto nas condições testadas. Além disso, a estabilidade da solução de SQR e cápsulas foram estudadas, demonstrando ser estáveis por seis horas em auto injetor à temperatura ambiente e 72 horas quando mantidas em geladeira (2-8 (2-8 °C)).

Considerando todos os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros, tais como, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, é possível afirmar que o método foi validado de forma satisfatória para a determinação quantitativa de DAB em cápsulas.

A utilização do CAD no controle de qualidade de fármacos e produtos farmacêuticos é ainda restrita, mas vem aumentando exponencialmente nos últimos anos, devido à sua facilidade de operação, versatilidade e vasta gama de aplicações.

Esclarecemos que o detector CAD apresenta propriedades específicas, como por exemplo, a necessidade de utilização de uma fase móvel volátil. Conforme observado acima, a fase móvel utilizada no método CLAE-UV[1] é composta de acetonitrila : trietilamina, com ajuste de pH utilizando ácido fosfórico, não cumprindo com o requisito do detector. Assim ocorreu a necessidade de desenvolvimento de um novo método CLAE-CAD. Outro fator relevante é a utilização do CAD como uma alternativa aos detectores existentes. Sendo assim, optou-se por validar e aplicar o método desenvolvido para o detector CAD também para o detector UV (CLAE-UV[2]), visando a avaliar a intercambialidade dos parâmetros de validação e dos resultados obtidos nas análises da forma farmacêutica, conforme descrito no item

6.3 ARTIGO CIENTÍFICO.

Para o desenvolvimento do método os parâmetros que podem influenciar a resposta dos detectores foram avaliados. Inicialmente foi definida a “faixa” que influencia a sensibilidade do CAD, devido ao melhor sinal/ruído o valor de 100 pA foi escolhido entre os valores testados de 20 a 500 pA. Como já referido a fase móvel utilizada em detectores CAD deve ser volátil, assim a influência da fase móvel foi verificada alterando a composição do conteúdo de acetonitrila de 50-80%. Diferentes aditivos voláteis foram usados durante o desenvolvimento (ácido fórmico, ácido acético e acetato de amônio) e o melhor resultado foi obtido com o tampão acetato

de amônio, em seguida avaliado em diferentes pH (4-6,0) e concentrações (10-30mM). Por fim, avaliaram-se colunas de diferentes tamanhos e empacotamentos além do fluxo da fase móvel. Levando em consideração a resposta de ambos os detectores, os parâmetros de pico e a resolução entre o pico do DAB e os picos dos produtos de degradação, a condição final foi estabelecida com fase móvel composta de acetonitrila: tampão acetato de amônio 10 mM pH 5,5 (65 : 35, v/v), fluxo de 1 mL/min e coluna GL Sciences Inc. Inertsil ODS-2 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). O volume de injeção foi de 20 µL.

Na avaliação da especificidade, a solução placebo não apresentou nenhuma interferência no tempo de retenção do fármaco. Além disso, o método é capaz de determinar o fármaco na presença dos produtos de degradação obtidos de diferentes condições de estresse (hidrólise ácida e básica, calor, oxidação e luz), pois apresentaram resolução adequada entre os picos do DAB e dos principais produtos de degradação formados (Figura 6.3.2).

A conformidade do modelo linear foi comprovada através do método dos mínimos quadrados e ANOVA, onde o método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 1-70 µg/mL, $R^2 = 0,9997$ para CLAE-CAD e $R^2 = 0,9987$ para CLAE-UV[2], com desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$). Destaca-se que para o método CLAE-CAD uma resposta linear não seria a esperada, pois este detector apresenta uma resposta quadrática em relação à concentração. Porém devido ao estreito intervalo de concentração e as baixas concentrações do analíto utilizadas no método a resposta foi reportada como linear (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; JOSEPH & RUSTUM, 2010; VEHOVEC & OBREZA, 2010).

A precisão, demonstrada por meio da precisão intermediária (entre dias e entre analistas) e da repetibilidade, foi adequada, pois apresentou valores de DPR inferiores a 1,24% para CLAE-UV[2] e 1,37% para CLAE-CAD.

A exatidão do método foi realizada adicionando quantidades conhecidas de SQR na solução placebo em três diferentes níveis de concentração. Apresentou resultados dentro do recomendado, com valores médios de recuperação de 100,77% e 99,42%, para CLAE-UV[2] e CLAE-CAD, respectivamente.

A robustez foi avaliada utilizando-se o delineamento experimental proposto por Plackett-Burman, através da modificação de fatores: pH, proporção de solvente orgânico, vazão da fase móvel, concentração de acetato de amônio e temperatura em que a coluna cromatográfica foi mantida. De acordo com os resultados obtidos, as modificações nos fatores estudados não interferiram na determinação quantitativa do fármaco por CLAE-UV[2] e CLAE-CAD, demonstrando a robustez do método analítico (Figura 6.3.3). Além disso, a estabilidade das soluções da SQR e da amostra de cápsulas foram estudadas, demonstrando serem estáveis por oito horas em temperatura ambiente e 120 horas quando mantidas a -20 °C.

Desse modo, demonstrou-se que o método proposto por CLAE-CAD E CLAE-UV[2] cumpre os requisitos de validação, estando de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados e, além disso, podem ser utilizados em estudos de estabilidade, uma vez que determinam o fármaco sem interferência, mesmo na presença de produtos de degradação.

Com o objetivo de estabelecer uma comparação e verificar a capacidade de intercambialidade dos métodos propostos, realizou-se a análise estatística comparativa entre os resultados da determinação quantitativa de DAB em amostras de cápsulas obtidos pelos métodos CLAE-UV[1], CLAE-CAD e CLAE-UV[2]. Através da análise de variância (ANOVA) não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os mesmos (Tabela 6.3.4), demonstrando, portanto, que os métodos são intercambiáveis e adequadas para análises de controle de qualidade.

Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho constituem-se, portanto, em procedimentos importantes para o controle de qualidade de medicamentos contendo DAB, contribuindo para garantir a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis no país.

Durante o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos anteriormente descritos o DAB foi submetido a diferentes condições de estresse, evidenciando a sua suscetibilidade a todas as condições avaliadas (degradação forçada ácida, básica, térmica, oxidativa e fotolítica). Estes resultados serviram, portanto, como subsídio para a sequência dos estudos de estabilidade: cinética de degradação, identificação de produtos de degradação e estudo de citotoxicidade, conforme

observado no item **7.2 ARTIGO CIENTÍFICO** - *Main degradation products of Dabigatran Etexilate evaluated by LC-UV and LC-ESI-MS, degradation kinetics and in vitro cytotoxicity studies.*

Para o estudo de citotoxicidade *in vitro*, a condição estudada, preferencialmente, não deve conter outras substâncias utilizadas nos ensaios de degradação que possam influenciar nos resultados obtidos, como por exemplo, ácido, base ou peróxido de hidrogênio. Sendo assim, a condição de degradação térmica foi previamente escolhida para o estudo de cinética de degradação.

O método analítico indicativo de estabilidade descrito no item 6.3 ARTIGO CIENTÍFICO - *Comparative study on the analytical performance of charged aerosol detector and ultraviolet detector for the RP-LC analysis of Dabigatran Etexilate in capsules* - foi desenvolvido objetivando a rápida determinação do fármaco e ótima resolução entre o mesmo e os produtos de degradação formados, além de estabelecer uma adequada interface para a realização de estudos por CLAE-EM na caracterização dos produtos de degradação. Por conseguinte o método por CLAE-UV[2] foi utilizado na análise de cinética de degradação do fármaco.

Durante os estudos de degradação forçada, foi possível observar aproximadamente 75% de degradação após 4 horas de exposição à condição térmica. A partir dos dados obtidos em diferentes tempos de amostragem, pode-se atribuir uma cinética de reação de primeira ordem ($R^2 = 0,9900$) (Figura 7.2.5). Dessa forma, com base nas equações matemáticas específicas de cada ordem da reação, os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação (k) e tempo de vida útil (t_{90}) foram calculados como $0,0028 \text{ min}^{-1}$ e 37,49 min, respectivamente.

A seguir, procederam-se as análises por EM. Primeiramente, foram obtidos os espectros de varredura total dos íons para a solução SQR de DAB sem degradação, bem como as degradadas. Através da comparação desses espectros, picos adicionais foram observados e suas massas moleculares puderam então ser monitoradas pelo sistema.

Quando comparados com os cromatogramas obtidos por CLAE-UV[2], os estudos por CLAE-EM demonstraram picos nos mesmos tempos de retenção, tanto para o fármaco quanto para os principais produtos de degradação visualizados

(Figura 7.2.2). Dessa forma, foi possível obter os valores de m/z característicos de cada produto formado (Figura 7.2.3) e então sugerir suas identidades (Figura 7.2.4). Verificou-se que o produto de degradação DP-01, etil 3-(2(((4-carbamimidoilfenil)amino)metil-N-(piridina-2-il)-1H-benzol [d]imidazol -5-carboxamida) propanoato trata-se de um metabólito já identificado, enquanto o produto de degradação DP-02, (E)-hexil(amino(4-aminofenil)metileno)carbamato foi descrito pela primeira vez neste estudo. Destacamos que este foi o primeiro estudo a identificar produtos de degradação provenientes de DAB.

O termo citotoxicidade significa causa de efeitos tóxicos (morte, alterações na permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática) em nível celular. Sobretudo o teste de viabilidade celular *in vitro* é utilizado para verificar citotoxicidade aguda, tal como o ensaio de liberação da desidrogenase láctica (PALMA; CORAT; SOARES, 2008), que é um ensaio de baixo custo, fácil de manipular e os dados obtidos são reprodutíveis (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). A enzima lactato desidrogenase está presente em todo o citoplasma celular, e quando a membrana é danificada há um contato com o meio externo (PALMA; CORAT; SOARES, 2008). A perda da desidrogenase láctica intracelular e sua liberação é um indicador de morte celular irreversível devido a dano da membrana celular (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006).

A fim de observar o potencial citotóxico das amostras degradadas frente às amostras não degradadas foi realizado um estudo preliminar de toxicidade utilizando células mononucleares. Diferenças não significativas ($p > 0,05$) foram observadas quando as amostras degradadas, contendo os produtos de degradação e amostras não degradadas foram comparadas com o controle negativo, indicando que a presença dos produtos de degradação não interferiu na viabilidade celular em todas as concentrações analisadas (Figura 7.2.6).

Ressalta-se que os métodos analíticos para quantificação de DAB na forma farmacêutica cápsula apresentados neste trabalho foram validados de acordo com códigos oficiais, cumprindo com parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003, ICH, 2005a; USP 36, 2013).

9. CONCLUSÕES

•

- A análise do espectro de massas da SQR de DAB demonstrou a presença do íon principal m/z 628 $[M+H]^+$ referente à molécula de DAB, contribuindo para a identidade da SQR;
- A interpretação do espectro de RMN 1H demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de DAB;
- A interpretação do espectro de IV demonstrou que as bandas obtidas são sinais característicos dos grupamentos funcionais da molécula de DAB;
- A faixa de fusão obtida por DSC demonstrou-se adequada, contribuindo para a identificação;
- O conjunto de resultados obtidos caracterizou a SQR de DAB como adequada para ser utilizada nos estudos propostos neste trabalho;
- O método proposto por CCD contribuiu para identificar o fármaco na forma farmacêutica de maneira simples;
- Os resultados obtidos para o método cromatográfico com detectores UV e CAD permitiram identificar o composto no produto farmacêutico. Ambos apresentaram tempos de retenção similares para os sinais analíticos da solução da SQR e da solução da amostra de cápsulas. Além disso, foi possível observar semelhantes espectros no UV obtidos no respectivo tempo de retenção;
- O método proposto por CLAE-EM permitiu identificar seletivamente o fármaco em estudo pelo monitoramento do íon principal, além do perfil cromatográfico e tempo de retenção semelhante;
- O método desenvolvido por CLAE-UV[1], nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear na faixa de 10-70 $\mu\text{g/mL}$, específico, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de DAB em cápsulas;
- O método quantitativo desenvolvido por CLAE-UV[2] e CLAE-CAD cumpriu satisfatoriamente com os parâmetros de validação preconizados para

métodos analíticos. Mostrou-se intercambiável frente aos dois diferentes detectores, segundo teste *t* de Student ($p > 0,05$), (Tabela 11.1 do Anexo);

- Os métodos validados por CLAE-UV[1], CLAE-CAD e CLAE-UV[2] não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com a ANOVA ($p > 0,05$), (Tabela 11.2 do Anexo), caracterizando, portanto, a intercambialidade dos mesmos;
- O método desenvolvido por CLAE-UV[2] compatível com os estudos por CLAE-EM, foi satisfatoriamente aplicado para avaliação da estabilidade de DAB na condição térmica;
- O método CLAE-EM possibilitou, sem o isolamento, sugerir a identidade dos íons moleculares de dois produtos de degradação do DAB;
- Os resultados obtidos na avaliação da cinética de degradação indicaram que o DAB segue uma cinética de primeira ordem na condição térmica;
- O estudo utilizando células mononucleares não apresentou evidências de citotoxicidade para as amostras contendo o fármaco após degradação;
- Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos na área e procedimentos importantes para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos de DAB disponíveis comercialmente.

10. REFERÊNCIAS

AHUJA, S. Overview: isolation and characterization of impurities. **Separation Science and Technology**, v. 5, p. 1-25, 2004.

ALMELING, S.; ILKO, D.; HOLZGRABE, U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 50-63, 2012.

ALSANTE, K. M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T. D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 29-37, 2007.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, J. L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª Ed. São Paulo: Premier, 2000.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003.

BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability testing of pharmaceutical products. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 3, p. 129-138, 2012.

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

BARKER, J. **Mass Spectrometry – Analytical Chemistry by Open Learning**. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1999.

BECATTINI, C.; VEDOVATI, M. C.; AGNELLI, G. Old and new oral anticoagulants for venous thromboembolism and atrial fibrillation: A review of the literature. **Thrombosis Research**, v. 129, p. 392-400, 2012.

BENDEL, S. D.; BONA, R.; BAKER, W. L. Dabigatran: an oral direct thrombin inhibitor for use in atrial fibrillation. **Advances in Therapy**, v. 28, p. 460-472, 2011.

BERNARDI, R. M.; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Development and validation of a stability-indicating liquid chromatography method for the determination of dabigatran etexilate in capsules. **Journal of AOAC International**, v. 96, p. 37-41, 2013a.

BERNARDI, R. M.; D'AVILA, F. B.; TODESCHINI, V.; FRÖEHLICH P. E.; BERGOLD, A. M. Comparative study in the analytical performance of charged aerosol detector and ultraviolet detector for the RP-LC analysis of dabigatran etexilate in capsules, **Analytical Methods**, v. 5, p. 4777-4784, 2013b.

BLAZEWICZ, A.; FIJALEK, Z.; SARNA, K. WAROWNA-GRZESKIEWICZ, M. Determination of pancuronium and its impurities in pharmaceutical preparation by LC with charged aerosol detection. **Chromatographia**, v. 72, p. 183-186, 2010.

BLECH, S.; EBNER, T.; LUDWIG-CHEWELLINGER, E.; STANGIER, J.; ROTH, W. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, p. 386-399, 2008.

BOEHRINGER-INGELHEIM. Pradaxa. Ingelheim am Rhein – Alemanha, 2013. Bula.

BOUABIDI, A.; ROZET, E.; FILLET, M.; ZIEMONS, E.; CHAPUZET, E.; MERTENS, B.; KLINKENBERG, R.; CECCATO, A.; TALBI, M.; STREEL, B.; BOUKLOUZE, A.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3180-3192, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Poder Executivo, de 01 agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 17, de 16 de abril de 2010. Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Poder Executivo, de 01 de agosto de 2010.

BRUNELLI, C.; GORECKI, T.; ZHAO, Y.; SANDRA, P. corona-charged aerosol detection in supercritical fluid chromatography for pharmaceutical analysis. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 2472-2482, 2007.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability Principles and Practices**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 2000.

COHEN, R.D.; LIU, Y.; GONG, X. Analysis of volatile bases by high performance liquid chromatography with aerosol-based detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1229, p. 172-179, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Ed. da UNICAMP, 2006.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y.V. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 141-158, 2011.

DELAVENTE, X.; MORACCHINI, J.; LAPORTE, S.; MISMETTI, P. BASSET, T. UPLC MS/MS assay for routine quantification of dabigatran – A direct thrombin inhibitor – in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 58, p. 152–156, 2012.

DIXON, R. W. Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2930-1937, 2002.

DONG, M. W. **Modern HPLC for Practicing Scientists**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006.

DRUGBANK. Dabigatran. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06695> Acesso em 29/08/2013 .

EBNER, T.; WAGNER, K.; WIENEN, W. Dabigatran acylglucuronide, the major human metabolite of dabigatran: in vitro formation, stability, and pharmacological activity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, p. 1567-1575, 2010.

EMA, **European Medicine Agency** – Chmp assessment report for Pradaxa, 2008. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000829/WC500041062.pdf Acesso em 14/09/12.

ERIKSSON, B. I.; DAHL, O. E.; KALEBO, P.; STANGIER, J.; NEHMIZ, G.; HERMANSSON, K.; KOHLBRENNER, V. Dose escalating safety study of a new oral direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, in patients undergoing total hip replacement: BISTRO I. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 2, p. 1573-1580, 2004.

ERIKSSON, B. I.; DAHL, O. E.; BULLER, H. R. ; HETTIARACHCHI, R.; ROSENCHER, N.; BRAVO, M. L.; AHNFELT, L.; PIOVELLA, F.; STANGIER, J.; KALEBO, P.; REILLY, P. A new oral direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, compared with enoxaparin for the prevention of thromboembolic events following total hip or knee replacement: the BISTRO II randomized trial. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, p. 103-111, 2005.

EZEKOWITZ, M. D.; NAGARAKANTI, R. Dabigatran in atrial fibrillation: pharmacology and clinical trials. **Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology**, v. 32, p. 173-180, 2011.

FB, FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FDA - **Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products (Draft guidance)**. Food and Drug Administration, Rockville, MD, 1998.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p. 171-177, 2006.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. A new era for anticoagulants. **European Journal of Internal Medicine**, v. 20, p. 562-568, 2009.

FUJI, T.; FUJITA, S.; UJIHIRA, T.; SATO, T. Dabigatran etexilate prevents venous thromboembolism after total knee arthroplasty in Japanese patients, with a safety profile comparable to placebo. **The Journal of Arthroplasty**, v. 25, p. 1267-1274, 2010.

FUKUTSU, N.; KAWASAKI, T.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Application of high-performance liquid chromatography hyphenated techniques for identification of degradation products of cefpodoxime proxetil. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 153-159, 2006.

GAMACHE, P. H.; McCARTHY, R. S.; FREETO, S. M.; ASA, D. J.; WOODCOCK, M. J.; COLE, R. O. HPLC analysis of nonvolatile analytes using charged aerosol detection. **LCGC North America**, v. 23, p. 35-42, 2005.

GANETSKY, M.; BABU, K. M.; SALHANICK, S. D.; BROWN, R. S.; BOYER, E. W. Dabigatran: review of pharmacology and management of bleeding complications of this novel oral anticoagulant. **Journal of Medical Toxicology**, v. 7, p. 281-287, 2011.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**, Campo Grande: Editora UNIDERP, 2005.

GINSBERG, J. S.; DAVIDSON, B. L.; COMP, P. C.; FRANCIS, C. W.; FRIEDMAN, R. J.; HOU, M. H.; LIEBERMAN, J. R.; MUNTZ, J. E.; RASKOB, G. E.; CLEMENTS, M. L.; HANTEL, S.; SCHNEE, J. M.; CAPRINI, J. A. Oral thrombin inhibitor dabigatran etexilato vs. north american enoxaparin regimen for prevention of venous thromboembolism after knee arthroplasty surgery. **The Journal of Arthroplasty**, v. 24, p. 1-9, 2009.

GOROG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 247-253, 2008.

HAUEL, N.; SCHIMID, R.; SIEGER, P.; SOBOTTA, R. **Polymorphs of 3-[(2-1—methyl-1H-benzimidazole-5-carbonyl)-pyridin-2-yl-amino]-propionic acid ethyl ester**. US 2006/0276513 A1, 7 dez. 2006. 7 p.

HOLZGRABE, U.; NAPB, C.; KUNZB, N.; ALMELING, S. Identification and control of impurities in streptomycin sulfate by highperformance liquid chromatography coupled with mass detection and corona charged aerosol detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 271-279, 2011.

HU, Z. H.; PARKER, R. B.; HERRING, V. L.; LAIZURE, S. C. Conventional liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based metabolite identification and semi-quantitative estimation approach in the investigation of *in vitro* dabigatran etexilate metabolism. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 1695-1704, 2013.

HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.; MASSART, D. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.

HUTCHINSON, J. P.; LI, J.; FARELL, W.; GROEBER, E.; SZUCS, R.; DICINOSKI, G.; HADDAD, P. R. Universal response model for a corona charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7418-7427, 2010.

HYERS, T. M. Management of venous thromboembolism. Past, present and future. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, p. 759-768, 2003.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Stability Testing of New Drug Substances and Products - Q1A(R2). ICH Steering Committee, Geneva, 2003.

ICH – **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Steering Committee, Geneva, 2005.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Impurities in New Drug Substances - Q3A (R2). ICH Steering Committee, Geneva, 2006a.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Impurities in New Drug Products - Q3B (R2). ICH Steering Committee, Geneva, 2006b.

JIA, S.; PARKA, J.H.; LEEB, J.; KNOW, S.W. Comparison of two aerosol-based detectors for the analysis of gabapentin in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography, **Talanta**, v. 85, p. 2301-2306, 2011.

JOSEPH, A.; RUSTUM, A. Development and validation of a RP-HPLC method for the determination of gentamicin sulfate and its related substances in a pharmaceutical cream using a short pentafluorophenyl column and a Charged Aerosol Detector. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 521-531, 2010.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, p. 857-68, 1999.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LEE, H. Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28, p. 1161-1202, 2005.

LEKSIC, E.; DOGAN, J.; CERIC, H. **Solid state forms of dabigatran etexilate, dabigatran etexilate mesylate and process for preparation thereof**. WO 2012/027543 A1, 01 mar. 2012. 52 p.

LIESENFELD, K-H.; SCHAFFER, H. G.; TROCÓNIZ, I. F.; TILLMANN, C.; ERIKSSON, B. I. ; STAGNGIER, J. Effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran on *ex vivo* coagulations time in orthopaedic surgery patients: a population model analysis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 62, p. 527-537, 2006.

LIU, Z. Y.; ZHANG, H. H.; CHEN, X. J.; ZHOU, X. N.; WAN, L.; SUN, Z. L. Structural elucidation of degradation products of olaquinox under stressed conditions by accurate mass measurements using electrospray ionization hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 303, p. 90-96, 2011.

MAEGDEFESSEL, L.; SPIN, J. M.; AZUMA, J.; TSAO, P. S. New options with dabigatran etexilate in anticoagulant therapy. **Vascular Health and Risk Management**, v. 6, p. 339-349, 2010.

MANNUCCI, P. M.; NOBILI, A.; GARATTINI, S. New drugs for thromboprophylaxis in atrial fibrillation. **European Journal of Internal Medicine**, v. 23, p. 1-5, 2012.

MODHAVE, D. T.; HANDA, T.; SHAH, R. P.; SINGH, S. Stress degradation studies on lornoxicam using LC, LC-MS/TOF and LC-MSn. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 538-545, 2011.

MONTGOMERY, D.G. **Design and Analysis of Experiments**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

NIESPIALOWSKA-STEUDEN, M. M.; MARKIDES, V.; GOROG, D. A. Novel antithrombotic agents for atrial fibrillation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, p. 345-354, 2012.

NIESSEN, W. M. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 179-197, 1999.

NOVAKOVA, I.; LOPEZB, S.A.; SOLICHOVAC, D.; SATINSKYA, D.; KULICHOVAD, B.; HORNADE, A.; SOLICHA, P. Comparison of UV and charged aerosol detection approach in pharmaceutical analysis of statins. **Talanta**, v. 78, p. 834-839, 2009.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de medicamentos**. 1st ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.

O'DONNELL, P. B.; BOKSER, A. D. Stability of pharmaceutical products. In: TROY, D. B. (Ed). **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 21th ed. Philadelphia: The University of the Sciences, 2006.

PALMA, M. B. S.; CORAT, E. J.; SOARES, C. P. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de superfícies recobertas por nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT). 2008. Disponível em: mtc-m17.sid.inpe.br/sid.inpe.br/mtc-m17@80/2007/11.29.19.17 Acesso em 16/09/2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry**. 3th ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001.

PEREIRA, A. S. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, p. S107-S11, 2005.

POOLE, C. F. **The Essence of Chromatography**. Detroit: Elsevier, 2003.

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

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K.L.; MULLANEY, J.F.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, T. D.; MOTTO, M. G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, 2002.

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

ROURICK, R. A.; VOLK, K. J.; KLOHR, S. E.; SPEARS, T.; KERNS, E. H.; LEE, M. S. Predictive strategy for rapid structure elucidation of drug degradants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1743-1752, 1996.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

RUSSEL, F. **Química geral e experimental**, 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1994.

RYSTOV, L.; CHADWICK, R.; KROCK, K.; WANG, T. Simultaneous determination of Maillard reaction impurities in memantine tablets using HPLC with charged aerosol detector. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 887-894, 2011.

SAMAMA, M. M.; GEROTZIAS, G. T.; Newer anticoagulantes in 2009. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 29, p. 92-104, 2010.

SCHIESEL, S.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Comprehensive impurity profiling of nutritional infusion solutions by multidimensional offline reversed phase liquid chromatography \times hydrophilic interaction chromatography–ion trap massspectrometry and charged aerosol detection with universal calibration. **Journal of Chromatography A** (*in press*) doi:10.1016/j.chroma.2012.01.009.

SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Regulatory aspects in development of a stability-indicating methods: a review. **Chromatographia**, v. 72, n. 1-2, p. 1-6, 2010.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

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

SILVA, E. C.; Paola, M. V. R. V.; Matos, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 347-356, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2005.

SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; SAHU, A.; JUNWAL, M.; SHAH, R. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 148-173, 2012.

SPINAR, J. S. Dabigatran in clinical trials and clinical praxis. **Cor et Vasa** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvasa.2013.04.006>

SPINLER, S. The Pharmacology and Therapeutic Use of Dabigatran Etexilato. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 1-13, 2013.

STANGIER, J.; ERIKSSON, B. I.; DAHL O. W.; ANHFELT, L.; NEHMIZ, G.; STAHL, H.; RATHGEN, K.; SVARD, R. Pharmacokinetic profile of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in healthy volunteers and patients undergoing total hip replacement. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, p. 555-563, 2005.

STANGIER, J.; RATHGEN, K.; STAHL, H.; GANSSER, D.; ROTH W. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, p. 292-303, 2007.

STANGIER, J.; STAHL, H.; RATHGEN, K.; FUHR, R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the direct oral thrombin inhibitor dabigatran in healthy elderly subjects. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 47, p. 47-59, 2008.

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

TROCÓNIZ, I. F.; TILLMANN, C.; LIESENFELD, K-H.; SCHÄFER, H-G.; STANGIER, J. Population pharmacokinetic analysis of the new oral thrombin inhibitor dabigatran etexilate (BIBR 1048) in patients undergoing primary elective total hip replacement surgery. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, p. 371-382, 2007.

USP 36. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 36th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013.

VEHOVEC, T.; OBREZA, A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1549-1556, 2010.

VOGT, F.G.; KORD, A.S. Development of quality-by-design analytical methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 3, p. 797-812, 2011.

WATSON, G. D. **Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists.** London: Churchill Livingstone, 2005.

WU, Y. The use of liquid chromatography-mass spectrometry for the identification of drug degradation products in pharmaceutical formulation. **Biomedical Chromatography**, v. 14, p. 384-396, 2000.

ZHANG, K.; DAI, L. CHETWYN, N. P. Simultaneous determination of positive and negative pharmaceutical counterions using mixed-mode chromatography coupled with charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5776–5784, 2010.

TABELA 11.1. Teste *t* - resultados obtidos da comparação entre os métodos CLAE-CAD e CLAE-UV[2].

	CLAE-UV(2)	CLAE-CAD
Média	100,79	100,42
Variância	0,93	1,84
Observações	6,00	6,00
Correlação de Pearson	0,77	
Hipótese da diferença de média	0,00	
gl	5,00	
Stat t	1,06	
P(T<=t) uni-caudal	0,17	
t crítico uni-caudal	2,02	
P(T<=t) bi-caudal	0,34	
t crítico bi-caudal	2,57	

TABELA 11.2. ANOVA - resultados obtidos da comparação entre os métodos CLAE-UV[1], CLAE-CAD e CLAE-UV[2].

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F calculado</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,60	2	0,30	0,31*	3,68
Dentro dos grupos	14,39	15	0,96		
Total	14,99	17			

* não significativo para $p > 0,05$