

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ADRIANE LETTNIN ROLL FEIJÓ

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE TIROFIBANA E IMPUREZAS DE
SÍNTESE E ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE**

Uruguaiana, RS

2018

ADRIANE LETTNIN ROLL FEIJÓ

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE TIROFIBANA E IMPUREZAS DE
SÍNTESE E ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik

Uruguaiiana, RS

2018

F297d

Feijó, Adriane Lettnin Roll

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE TIROFIBANA E IMPUREZAS DE SÍNTESE E ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE / Adriane Lettnin Roll Feijó.

130 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2018.

"Orientação: Marcelo Donadel Malesuik".

1. Agrastat. 2. CLAE. 3. Impurezas. 4. Degradação. 5. Cinética. I. Título.

ADRIANE LETTNIN ROLL FEIJÓ

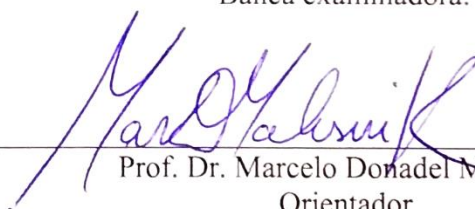
**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE TIROFIBANA E IMPUREZAS DE SÍNTESE
E ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

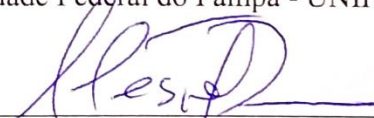
Área de concentração: Controle de qualidade de fármacos, medicamentos e cosméticos.

Dissertação defendida e aprovada em: 20 de agosto de 2018.

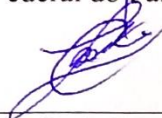
Banca examinadora:



Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
Orientador
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Dedico este trabalho ao meu esposo Lucas.
Obrigada por todo carinho, companheirismo,
apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas. A vida só tem sentido quando se idealiza projetos com o coração, desenvolve-os com a imaginação e constrói com as parcerias certas. À essas pessoas que me ajudaram das mais diversas formas, gostaria de prestar meus sinceros agradecimentos...

Ao meu esposo Lucas de Quadro Feijó, por todo amor, carinho e companheirismo. Obrigada pelo incentivo e apoio incondicional durante esta trajetória, por acreditar no meu potencial, por cuidar de mim, e por compreender os momentos de ausência que se fizeram necessários durante estes dois anos;

A minha família, pela compreensão nos momentos de ausência;

Ao Prof. Dr. Marcelo Malesuik, meu orientador, que tornou possível esta pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos acadêmicos, pela dedicação, pela disponibilidade, pela orientação, e principalmente pela confiança em mim depositada.

À “minha farmacêutica favorita” Fernanda Macke Hellwig, pelo auxílio no laboratório, pelos momentos de estudo e de descontração que temos em nosso dia-a-dia, tanto na execução deste trabalho, quanto na execução das tarefas profissionais.

Aos professores do PPGCF, que contribuíram de uma forma ou de outra para minha formação como profissional.

Aos colegas de curso, principalmente aos que ao longo da caminhada tornaram-se muito mais do que colegas de classe. Descobri amigos valiosos. Agradeço especialmente às colegas, amigas e companheiras de viagem Isadora Marques e Jassana Floriano. Agradeço pela amizade, pelo bom humor que contagia (não esquecerei dos “yupi yupi” ao longo do caminho, muito menos dos “sincericídios”) e pelo trabalho em equipe que desenvolvemos nos projetos de ensino e extensão.

Aos amigos Carjone, Luciano, Edgar e Robson, pela amizade, pelos momentos de descontração e comilança.

Aos colegas laboratoristas da Unipampa – Campus Itaqui, sempre compreensivos durante todo período de afastamento para capacitação.

Faço ainda um agradecimento especial ao Professor Flávio Dias Ferreira, que mesmo no breve período que trabalhando juntos, muito me ensinou e incentivou a ingressar na Pós-Graduação, em especial no PPGCF.

Agradeço ainda à FAPERGS e CNPq pelo auxílio financeiro (Edital ARD/PPP/FAPERGS/CNPq – processo 16/2551-0000185-5) e à Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda pela doação das amostras de Agrastat[®], e à Unipampa Campus Itaqui, por possibilitar a execução desta pesquisa no Laboratório de Análise Instrumental I.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

“É aqui junto ao chapéu, no nosso eu mais profundo, que reside a diferença entre o seco e o fecundo. Existe larga distância entre o primeiro e o segundo, entre os que mancham a história e os que constroem o mundo.”

-Ângelo Franco-

Resumo

A tirofibrana é um fármaco inibidor molecular não peptídico derivado da tirosina que inibe a agregação plaquetária no final da cascata de coagulação, especificamente como antagonista dos receptores da glicoproteína (GP) IIb/IIIa, sendo o inibidor desta GP mais utilizado mundialmente desde a aprovação de sua nova dosagem pela FDA, em 2013, sob nome comercial de Agrastat[®]. A ANVISA e guias internacionais determinam que os medicamentos comercializados devem garantir a qualidade do produto e a segurança do consumidor. Neste contexto, torna-se imprescindível o desenvolvimento e validação de métodos que permitam a avaliação desde a matéria-prima até a forma farmacêutica, contemplando o estudo da estabilidade do fármaco nas formulações, a análise de produtos de degradação, identificação e determinação dos níveis de impurezas e padronização dos procedimentos de produção. Há poucos relatos na literatura sobre a determinação quantitativa da tirofibrana e sobre degradação em condições forçadas. Além disso, a literatura não traz registro de desenvolvimento e validação de método indicativo da estabilidade, determinação de impurezas de síntese e produtos de degradação. Perante o exposto, este estudo objetivou o desenvolvimento e validação de método indicativo da estabilidade para determinação da tirofibrana na presença de duas impurezas de síntese (impureza A e impureza C), bem como realizar estudo preliminar de estabilidade e determinar a cinética de degradação relacionando com os principais fatores de degradação. O desenvolvimento e validação do método foi realizado em concordância com os principais guias oficiais. Utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (DAD), em 226 nm, empregando-se coluna C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5µm), em temperatura ambiente, com fase móvel eluída em modo gradiente, constituída de mistura de trietilamina 0,1% acidificada a pH 5,5 com ácido fosfórico e acetonitrila, em fluxo de 1 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. O método apresentou linearidade, precisão, exatidão e robustez satisfatórios, além de baixos limites de detecção e quantificação, que demonstram sensibilidade na determinação da tirofibrana e impurezas A e C. Apresentou-se seletivo para a determinação do fármaco e impurezas analisadas, sem interferência dos produtos de degradação gerados em condições forçadas, dados que demonstram a capacidade indicativa da estabilidade do método proposto. A tirofibrana mostrou-se praticamente estável às condições de estresse oxidativo (H₂O₂ 30% por 24 horas) e térmico (75°C por 24 horas), apresentou degradação frente à luz UVA e hidrólise ácida, obedecendo à cinética de primeira ordem. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância do aprofundamento dos estudos nesta área, no intuito de garantir a qualidade dos produtos farmacêuticos comercializados.

Palavras-chave: Agrastat, CLAE, impurezas, degradação, cinética.

Abstract

Tirofiban is a non-peptidic inhibitor drug derived from tyrosine that inhibits platelet aggregation at the end of the coagulation cascade, specifically as a glycoprotein (GP) IIb / IIIa receptor antagonist, the most widely used GP inhibitor being the worldwide its new dosage by the FDA in 2013, under the trade name of Agrastat[®]. ANVISA and international guides determine that marketed medicines must guarantee product quality and consumer safety. In this context, it is essential to develop and validate methods that allow evaluation from the raw material to the pharmaceutical form, contemplating the study of drug stability in the formulations, the analysis of degradation products, identification and determination of the levels of impurities and standardization of production procedures. There are few reports in the literature on the quantitative determination of tirofiban and on degradation under forced conditions. In addition, the literature does not show a record of development and validation of method indicative of stability, determination of impurities of synthesis and products of degradation. This study aimed the development and validation of an indicative method of stability for determination of tirofiban in the presence of two impurities (impurity A and impurity C), as well as to perform a preliminary stability study and to determine the kinetics of degradation related to the main factors of degradation. The method development and validation were carried out in agreement with the main official guides. High-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a photodiode array detector (DAD) at 226 nm using a C₁₈ column (4.6 x 250 mm, 5µm) was used at room temperature with a mobile phase eluted in a gradient mode, consisting of a mixture of 0.1% triethylamine acidified to pH 5.5 with phosphoric acid and acetonitrile, in a flow rate of 1 mL.min⁻¹ and an injection volume of 20 µL. The method presented satisfactory linearity, precision, accuracy and robustness, as well as low limits of detection and quantification, which demonstrate sensitivity in the determination of tirofiban and impurities A and C. It was selective for the determination of the drug and impurities analyzed, without interference of the degradation products generated under forced conditions, data demonstrating the capacity indicative of the stability of the proposed method. Tirofiban was practically stable under oxidative (30% H₂O₂ for 24 hours) and thermal (75°C for 24 hours) conditions, presenting degradation against UVA light and acid hydrolysis, following the first order kinetics. The results obtained in this work demonstrate the importance of expanding the studies in this area, in order to guarantee the quality of commercialized pharmaceutical products.

Key words: Agrastat, HPLC, impurities, degradation, kinetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Locais de ação dos fármacos antiplaquetários.	6
Figura 2. Estrutura química da tirofibana.	9
Figura 3. Rota de síntese da para obtenção da tirofibana (Fonte: SITTING, 2007).	13
Figura 4. Fórmula química estrutural da Impureza C.	13
Figura 5. Fórmula química estrutural do composto Tirofibana-D6.	13
Figura 6. Fórmula química estrutural da Impureza A.	14
Figura 7. Espectros de absorção do cloridrato de tirofibana, obtidos através de varredura em detector de arranjo de fotodiodos acoplado à CLAE em diferentes diluentes.	62
Figura 8. Sobreposição de cromatogramas, de diferentes condições para o desenvolvimento de método. Injeção de 20 µL de Cloridrato de tirofibana 50 µg.mL ⁻¹ , sob fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , coluna C ₁₈ (50 x 2,1 mm, 3 µ), detector DAD a 226 nm.	64
Figura 9. Sobreposição de cromatogramas resultantes de diferentes condições utilizado para o desenvolvimento de método. Injeção de 20 µL de cloridrato de tirofibana 50 µg.mL ⁻¹ , sob fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , coluna C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), detector DAD 226 nm. Fase móvel composta por Trietilamina 0,1% pH5,5:Acetonitrila em diferentes proporções:	65
Figura 10. Sobreposição de cromatogramas, com leve deslocamento de tempo e absorbância, de diferentes condições utilizadas para o desenvolvimento de método. Injeção de 20 µL de Cloridrato de tirofibana 50 µg.mL ⁻¹ , sob fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , coluna C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), detector DAD 226 nm. Fase móvel composta por Trietilamina 0,1% acidificada:Acetonitrila (75:25 (v/v)), em diferentes pH.	67
Figura 11. Espectro de absorção das impurezas A e C na concentração de 10µg.mL ⁻¹ em solução metanólica.	69
Figura 12. Cromatograma da metodologia desenvolvida para análise de cloridrato de tirofibana e suas impurezas A e C. 1- Impureza A (10 µg.mL ⁻¹). 2- Tirofibana (200 µg.mL ⁻¹). 3- Impureza C (10 µg.mL ⁻¹).	72
Figura 13. Sobreposição de cromatogramas para determinação de seletividade perante excipientes, com leve deslocamento de tempo e absorbância. Cromatograma 1 – pico 1 Impureza A (10 µg.mL ⁻¹), pico 2 Tirofibana (200 µg.mL ⁻¹) pico 3 Impureza C (10 µg.mL ⁻¹). Cromatograma 2 – Amostra simulada de excipientes.	74
Figura 14. Espectro de absorção do produto de degradação gerado em estresse hidrolítico ácido (A) e básico (B) de cloridrato de tirofibana (200 µg.mL ⁻¹ em solução metanólica).	76

Figura 15. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação hidrolítica do cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 2) mediante adição de impureza A ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1) e impureza C ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 3).....	76
Figura 16. Sobreposição de cromatogramas obtidos através da degradação fotolítica (UVA) do cloridrato de tirofibana $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diferentes tempos de exposição, com posterior adição de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das impurezas A e C. Os cromatogramas foram levemente deslocados em relação ao tempo e à absorbância para facilitar a visualização. Cromatogramas: 1-Tempo zero, sem exposição ao agente indutor. 2- Após 1 hora de exposição ao agente indutor.	78
Figura 17. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação térmica do cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1), por um período de 24h. Cromatogramas: 1 – Sem exposição a temperatura. 2- exposição à $35 \text{ }^\circ\text{C}$. 3- exposição à $55 \text{ }^\circ\text{C}$. 4- exposição à $75 \text{ }^\circ\text{C}$	78
Figura 18. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação oxidativa do cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1), por um período de 24h. Cromatogramas: 1 – Sem adição do agente oxidante. 2- Mediante adição de 1% (v/v) de H_2O_2 30 volumes. 3- Mediante adição de 3% (v/v) de H_2O_2 30 volumes. 4- Mediante adição de 6% (v/v) de H_2O_2 30 volumes.	79
Figura 19. Representações gráficas de linearidades obtidas pelo método desenvolvido para determinação do cloridrato de tirofibana e impurezas A e C.	81
Figura 20. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação da hidrólise ácida com concentração final igual a 1 mol.L^{-1} do cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1), em diferentes tempos de exposição, com surgimento de produto oriundo da degradação (pico 2) após o tempo 2 horas.	89
Figura 21. Representações gráficas das cinéticas de degradação de ordem zero, primeira e segunda ordem, com respectivos coeficientes de determinação do cloridrato de tirofibana sob estresse de hidrólise ácida.	90
Figura 22. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação da hidrólise ácida (1 mol.L^{-1}) do medicamento Agrastat [®] ($180 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1), em diferentes tempos de exposição, com surgimento de produto oriundo da degradação (pico 2) após o tempo 24 horas.	91
Figura 23. Representações gráficas das cinéticas de degradação de ordem zero, primeira e segunda ordem, com respectivos coeficientes de determinação do produto comercial Agrastat [®] sob estresse de hidrólise ácida.	93
Figura 24. Representações gráficas das cinéticas de degradação de ordem zero, primeira e segunda ordem, com respectivos coeficientes de determinação do cloridrato de tirofibana em base metanólica submetido à fotólise.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites de impurezas relacionados ao relato, identificação ou qualificação..	12
Tabela 2. Critérios para necessidade de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação (PD).	15
Tabela 3. Fórmulas para cálculo dos modelos cinéticos para reações de ordem zero, primeira e segunda ordem.	25
Tabela 4. Parâmetros utilizados para determinação de tirofibana por diversos autores.	30
Tabela 5. Diferentes condições de gradiente e respectivos tempos de retenção da Tirofibana e Impurezas A e C.	70
Tabela 6. Condições cromatográficas utilizadas na validação do método por CLAE-DAD para determinação quantitativa de Tirofibana e impurezas de síntese.	72
Tabela 7. Parâmetros de adequabilidade do sistema para o método analítico desenvolvido e resultados preconizados.	73
Tabela 8. Resultado da degradação forçada de solução metanólica de cloridrato de tirofibana, com concentração final de 200 µg.mL ⁻¹ .	75
Tabela 9. Limite de detecção e quantificação da tirofibana e impurezas obtidos na validação do método analítico.	80
Tabela 10. Resultados do teste unilateral de análise de variância (ANOVA) para tirofibana e suas impurezas.	82
Tabela 11. Resultados de repetibilidade e precisão intermediária obtidos para a validação do método analítico para o cloridrato de tirofibana e impurezas A e C.	84
Tabela 12. Resultados da exatidão obtidos pelo teste de recuperação para validação do método analítico para determinação de cloridrato de tirofibana e impurezas A e C.	85
Tabela 13. Parâmetros avaliados e resultados obtidos na análise de robustez, do cloridrato de tirofibana e impurezas A e C.	88
Tabela 14. Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação e degradação do cloridrato de tirofibana sob hidrólise ácida ao longo do tempo.	90
Tabela 15. Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação e degradação do produto comercial Agrastat [®] sob hidrólise ácida ao longo do tempo.	93
Tabela 16. Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação e degradação do cloridrato de tirofibana, em solução metanólica, sob estresse fotolítico (radiação UVA) ao longo do tempo.	95

Tabela 17. Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação e degradação do cloridrato de tirofibana em solução acetoniúrílica, sob estresse fotolítico (radiação UVA) ao longo do tempo.	97
Tabela 18. Coeficientes de correlação encontrados para cinética de degradação de ordem zero, primeira e segunda ordem, nas condições de estresse avaliadas.	100
Tabela 19. Resultados dos modelos cinéticos obtidos para as condições degradativas estudadas para o cloridrato de tirofibana e o produto Agrastat [®]	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – acetonitrila

ADP – Adenosina difosfato

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASE – Amostra simulada de excipientes

ATD – Administração total diária

AVE – Acidente vascular encefálico

C - Concentração

CG – Cromatografia a gás

CID – Classificação Internacional de Doenças

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLUE – Cromatografia líquida de ultra eficiência

DAD – Detector de arranjo de fotodiodos

DCV – Doença cardiovascular

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

FDA – Food and Drugs Administration

GP - Glicoproteína

H – Hidrogênio

h – hora

H₂O - água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

HPLC - High performance liquid chromatography

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human

k – Constante de velocidade de decaimento

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MeOH - Metanol

min - minutos

N – Pratos teóricos

NaOH – Hidróxido de sódio

OH - Hidroxila

PD – Produto de degradação

pH – Potencial de hidrogênio

pKa – Constante de acidez

q.s.p. – Quantidade suficiente para

R - Resolução

r – Coeficiente de correlação

r² – Coeficiente de determinação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RGD – sequência de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido Aspártico

T – Fator de cauda

t^{1/2} - Tempo de meia vida

t_{90%} - Tempo necessário para que a concentração decaia à 90%

UV – Radiação ultravioleta

UVA - Radiação ultravioleta A

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	3
2.1.	Geral.....	3
2.2.	Objetivos específicos.....	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1.	Doenças cardiovasculares.....	4
3.2.	Antiplaquetários.....	6
3.3.	Tirofibana.....	7
3.4.	Impurezas farmacêuticas.....	10
3.5.	Estabilidade de fármacos e medicamentos.....	15
3.6.	Técnicas analíticas para análise de fármacos e impurezas.....	26
4.	METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1.	Desenvolvimento de Método Indicativo da Estabilidade para Determinação de Tirofibana e Impurezas de Síntese e Estudo da Cinética de Degradação.....	33
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	61
5.1.	Preparo da amostra.....	61
5.2.	Desenvolvimento de metodologia.....	61
5.3.	Validação de Metodologia Analítica.....	73
5.4.	Cinética de degradação.....	89
6.	CONCLUSÃO.....	102
7.	REFERÊNCIAS.....	103

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de mortalidade no mundo, sendo responsáveis por 17,3 milhões de mortes por ano (TOWNSEND et al., 2016). No Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia, as doenças cardiovasculares são as que mais matam no país, com registros de cerca de 350 mil óbitos anuais. As disfunções mais comuns são o infarto do miocárdio, a insuficiência cardíaca e o acidente vascular encefálico (AVE) (LORGA FILHO et al., 2016).

As plaquetas são pequenas células anucleadas e discoides, derivadas dos megacariócitos, de suma importância para o sistema cardíaco. Proporcionam o tampão hemostático inicial nos locais de lesão vascular e desempenham papel fundamental em trombooses patológicas que levam ao infarto do miocárdio, ao AVE e a trombooses vasculares periféricas (DÍAZ, 2011; WEITZ, 2012).

Os agentes antiplaquetários, apesar de comprovada eficácia clínica, apresentam algumas limitações, pois a inibição plaquetária é relativamente fraca e podem causar efeitos colaterais sistêmicos, como a inibição irreversível da ciclooxigenase, podendo ocasionar úlcera péptica, acarretada pela administração da aspirina, ou ainda, a administração da ticlopidina, associada à agranulocitose (GOMES et al., 2000).

A descoberta do receptor glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), como via final comum da agregação plaquetária gerou interesse na investigação de antagonistas para este sítio, visando efeitos mais específicos e minimizando as reações adversas. Os receptores podem ser bloqueados/antagonizados por diversos agentes terapêuticos, como abciximab (anticorpo monoclonal), o eptifibatide (heptapeptídeo sintético) e a tirofibana (não-peptídico intravenoso mimético dos sítios da sequência RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) (ROCHA, 2001).

A tirofibana é um antagonista não-peptídico dos receptores GP IIb/IIIa derivado da tirosina. Mimetiza a geometria, estereoatividade e características elétricas do RGD, interferindo na agregação plaquetária (GOMES et al., 2000; ROCHA, 2001). No Brasil, a tirofibana é comercializada atualmente pela parceria entre as indústrias farmacêuticas Aspen Pharma e Merck Sharp & Dohme, na forma farmacêutica injetável (0,25 mg/mL), sob nome comercial de Agrastat[®].

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que os medicamentos comercializados devem cumprir as especificações que garantam a segurança do consumidor, como o controle de qualidade da matéria-prima, verificação da reprodutibilidade e eficácia terapêutica, por meio de comprovação laboratorial ou de estudos clínicos (ANVISA, 2004).

Considerando que os fármacos utilizados no processo de produção das formulações farmacêuticas não são considerados totalmente puros, os guias regulatórios descrevem a necessidade da caracterização e avaliação do perfil de impurezas presentes no fármaco ou no produto farmacêutico. Neste contexto, torna-se imprescindível o desenvolvimento e validação de métodos, para que se possa avaliar a qualidade dos produtos farmacêuticos, contemplando o estudo da estabilidade do fármaco nas formulações, a análise de produtos de degradação, identificação e determinação dos níveis de impurezas e padronização dos procedimentos de produção.

Atualmente é observada uma escassez de trabalhos sobre a determinação do cloridrato de tirofibana na presença de impurezas de síntese e produtos de degradação. El-Bagary e colaboradores (2018) desenvolveram metodologia para análise do fármaco na presença da tirosina, todavia, faz-se necessário método analítico capaz de determinar diferentes impurezas, já que diferentes rotas sintéticas para a concepção de um mesmo fármaco podem gerar impurezas distintas (NG; LUNN; FAUSTINO, 2007). Além disso, são necessários métodos que possam avaliar o cloridrato de tirofibana na presença de seus produtos de degradação, que também são impurezas, mas obtidas da decomposição do fármaco.

Considerando o exposto, o presente trabalho buscou desenvolver e validar metodologia analítica indicativa da estabilidade por CLAE para determinação de tirofibana e duas de suas principais impurezas de síntese, bem como realizar estudos preliminares relacionados à sua estabilidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver método analítico indicativo da estabilidade por CLAE-DAD para determinação da tirofibana e suas impurezas e realizar estudo preliminar da estabilidade da tirofibana.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método indicativo da estabilidade por CLAE-DAD para determinação qualitativa e quantitativa da tirofibana e suas principais impurezas de síntese A e C;
- Realizar estudo de degradação forçada do cloridrato de tirofibana, com avaliação do perfil de degradação do fármaco em diferentes condições: temperatura, luz, hidrólise e oxidação;
- Determinar a cinética de degradação do cloridrato de tirofibana relacionando com os principais fatores de degradação;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) constituem um grupo de doenças do coração, doenças vasculares do cérebro e doenças dos vasos sanguíneos, definidas na Classificação Internacional de Doenças (CID) como Doenças do Aparelho Circulatório, incluem: febre reumática aguda; doenças cardíacas reumáticas crônicas; doenças hipertensivas; doenças isquêmicas cardíacas; doença cardíaca pulmonar e da circulação pulmonar; outras formas de doença cardíaca; doenças cerebrovasculares; doenças das artérias, das arteríolas e capilares; doenças das veias, vasos linfáticos e dos gânglios linfáticos, não classificados em outra parte; e outros transtornos, e os não especificados do sistema circulatório (GENS, 2016).

As DCVs estão entre as principais causas de mortalidade, morbidade e hospitalização na contemporaneidade no mundo, sendo responsáveis por 17,3 milhões de mortes por ano (TOWNSEND et al., 2016), o que representa 31% de todas as mortes a nível mundial (WHO, 2015). No Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia, as DCVs são as que mais matam no país, afetando homens e mulheres, e são responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos. Anualmente o país apresenta registros de cerca de 350 mil óbitos, sendo as disfunções mais comuns o infarto do miocárdio, a insuficiência cardíaca e o AVE (LORGA FILHO et al., 2016; MASSAROLI et al., 2018).

As DCVs são patologias complexas e multifatoriais, caracterizadas por diversos elementos e disfunções metabólicas como níveis elevados de colesterol e triglicérides séricos, aumento no fibrinogênio plasmático e fatores de coagulação, ativação plaquetária aumentada, alterações no metabolismo da glicose, diabetes, hipertensão, sobrepeso/obesidade, entre outros. Além dos fatores de risco metabólicos, os fatores comportamentais também desempenham um papel fundamental na etiologia das DCVs, frequentemente associadas ao sedentarismo, tabagismo, etilismo e alimentação (MASSAROLI et al., 2018; SILVA et al., 2014; WHO, 2015; WOOD, 2001). Yusuf e colaboradores (2004) descreveram que existe uma ação sinérgica entre estes fatores, de tal forma que a presença de dois ou mais fatores de risco elevam mais o risco cardiovascular global que a somatória dos seus efeitos isolados.

Embora as DCVs que afetam o sistema circulatório sejam de vários tipos, as doenças cerebrovasculares e as doenças isquêmicas cardíacas são as mais preocupantes.

Dentre os óbitos mundiais relacionados às DCVs, avalia-se que aproximadamente 43% foram provenientes de doença cardíaca coronariana e 39% devido a acidente vascular encefálico (AVE) (WHO, 2015). Estes são geralmente eventos agudos, provocados por aterosclerose da parede arterial e por trombose, que impedem o fluxo sanguíneo de atingir de forma satisfatória o coração e o cérebro (GENS, 2016).

A aterosclerose é um processo inflamatório complexo que afeta os vasos sanguíneos de médio e grande porte de todo o sistema cardiovascular e que se desenvolve ao longo de muitos anos, sendo considerada a base fisiopatológica para os eventos cardiovasculares. Este processo ocorre principalmente mediante a exposição de elevados níveis de colesterol, lipoproteína de baixa densidade e algumas outras substâncias, tais como os radicais livres, que passam a se depositar sobre a parede endotelial dos vasos. Estes depósitos, as placas ateroscleróticas, fazem com que a superfície interna dos vasos sanguíneos se torne irregular e o lúmen se estreite, tornando mais difícil para o sangue fluir. Além disso, os vasos sanguíneos também se tornam menos flexíveis (SANTOS et al., 2013; WHO, 2015).

O quadro supracitado se agrava quando ocorre a ruptura das placas ateroscleróticas, e inicia-se a ativação e agregação plaquetária, levando a formação de trombos que causam a oclusão total ou parcial do lúmen (BUENO, 2016). A ocorrência deste evento nas artérias pode resultar na síndrome coronária aguda, evoluindo para um ataque cardíaco ou AVE (PESARO et al., 2008).

As plaquetas (também denominadas trombócitos) são corpúsculos anucleados, com a forma de disco, medindo cerca de 2-4 μm de diâmetro, derivados de células gigantes e poliplóides da medula óssea, os megacariócitos. São as principais responsáveis pela manutenção da integridade vascular, pois são capazes de responder rapidamente frente a qualquer alteração no endotélio por meio das suas propriedades de adesão, liberação de substâncias e agregação (GRASSI & ARAÚJO, 2012).

Desempenham importante papel na coagulação sanguínea, atuando na manutenção da integridade vascular protegendo o organismo contra hemorragias espontâneas. Porém, quando na existência de lesões vasculares ocorre a interação com substâncias subendoteliais expostas, como proteínas fibrosas e colágeno, presentes naturalmente na parede do endotélio, iniciando-se assim uma cascata de eventos que levam à formação de coágulos sanguíneos e trombos (NIESWANDT et al., 2011).

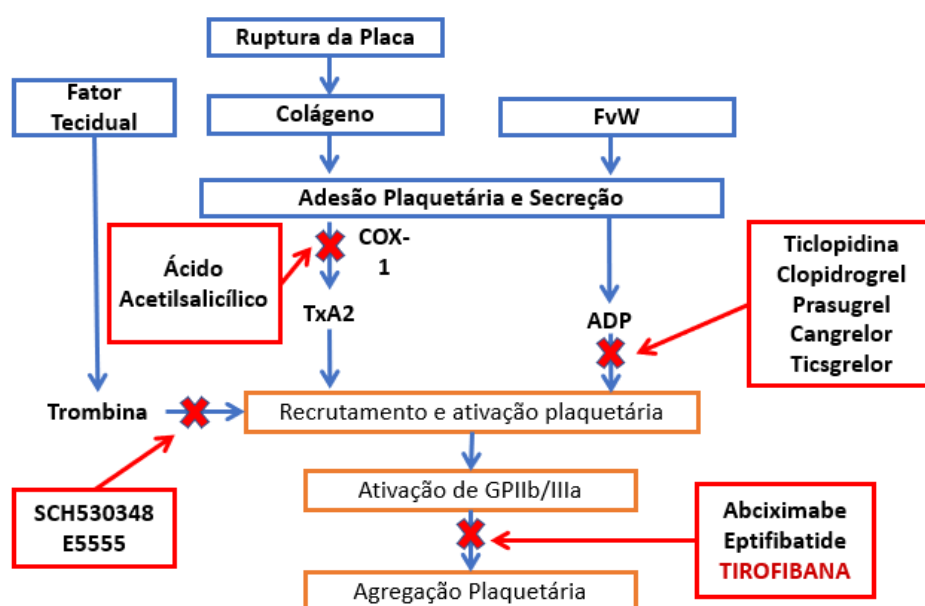
Os mecanismos pelos quais as plaquetas formam os coágulos, incluindo a síntese de tromboxano A₂, a sinalização mediada pelo ADP (adenosina difosfato) e a sinalização via GP IIb-IIIa, são importantes e amplamente explorados como alvos de fármacos, seletivos ou não, utilizados no tratamento e prevenção do risco de eventos aterotrombóticos em pacientes com doenças cardiovasculares (HUBER et al., 2011; WARDEN et al., 2012).

3.2. Antiplaquetários

Os antiplaquetários são fármacos que têm em comum a propriedade de inibir a formação e agregados plaquetários e de trombo, sem interferir, de forma significativa, nos demais segmentos da cascata de coagulação. A formação destes agregados plaquetários e de trombos na circulação podem precipitar vaso espasmos, oclusão coronária, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (CRAIG E STIZEL, 2004).

De forma geral, promovem a inibição das funções plaquetárias, inibem a secreção das plaquetas, reduzem os agregados plaquetários circulantes e, em conjunto com a heparina, são administrados como adjuvantes no tratamento da terapia trombolítica. Embora o uso de antiplaquetários seja importante para a prevenção de trombose em procedimentos coronarianos, seu uso aumenta o risco de sangramentos (LORGA FILHO et al., 2016).

Estes fármacos promovem a inibição das funções plaquetárias como adesividade e agregação, e liberação ou secreção de substâncias, através de diferentes vias (Figura 1).



(Adaptado de WEITZ, 2012).

Figura 1. Locais de ação dos fármacos antiplaquetários.

Segundo Craig e Stizel (2004) os antiplaquetários podem ser classificados quanto ao seu sítio de ação, como:

- I. Via do ácido araquidônico → por alteração dos fosfolípidios e da membrana plaquetária, por inibição da fosfolipase A2, por inibição da ciclooxigenase e antagonistas dos receptores tromboxano A2 e prostaglandina H2.
- II. Aumento do AMPc plaquetário → por estimulação da adenilato ciclase, por inibição da fosfodiesterase, por inibição da ADP e da ligação do fibrogênio com receptores das glicoproteínas IIb/IIIa.
- III. Antagonistas dos receptores das glicoproteínas IIb/IIIa → por inibição não competitiva irreversível e por inibição competitiva reversível.
- IV. Inibidores de antagonistas específicos → por inibição da trombina.
- V. Antagonistas da serotonina.
- VI. Antagonistas da adrenalina.
- VII. Inibição por fator de ativação plaquetária.

Segundo esta classificação, a tirofibana encontra-se no grupo III, atuando como antagonista dos receptores das GP IIb/IIIa, por inibição competitiva reversível (WEITZ, 2012).

3.3. Tirofibana

3.3.1. Aspectos gerais

A tirofibana foi aprovada pela *Food and Drugs Administration* (FDA) em 1998 e comercializada pela Merck. Devido a sua atuação específica sobre o receptor GPIIa/IIIb, foi rapidamente adotado como tratamento da síndrome coronária aguda e tornou-se o fármaco mais utilizado para este tratamento entre os anos de 1998 e 2000 (KING et al., 2016).

No ano de 2001, Topol e colaboradores realizaram estudo comparando a eficácia da tirofibana com abciximab, onde a tirofibana obteve resultado inferior em eficácia global quando comparado a abciximab (TOPOL et al., 2001).

Outros autores (PATEL e HURSTING, 2005; RIESS, 2005) corroboraram com a diminuta eficácia da tirofibana, deste modo acarretando na diminuição de vendas deste

fármaco, que após diversas transações financeiras entre empresas norte-americanas, passou a ser comercializado pela empresa canadense Medicure no ano de 2006 (KING et al., 2016).

No entanto, foram realizados novos estudos utilizando *bolus*, onde foi proposta a elevação da dose inicial de tirofiban. A dosagem até então utilizada, de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foi elevada à $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que resultou em uma inibição plaquetária mais rápida quando comparado com o regime de dosagem usual (NAZIF et al., 2014; NEY et al., 2011; MANOUKIAN et al., 2016; OCHOA et al., 2015; STONE et al., 2007; TEBET et al., 2007; VALGIMIGLI et al., 2008; VALGIMIGLI et al., 2010; VALGIMIGLI et al., 2012; VALGIMIGLI et al., 2013).

Moliterno e colaboradores (2011) realizaram um estudo que utilizou a tirofiban com uma dose de carga maior ($25 \mu\text{g.kg}^{-1}$) em *bolus* para obter inibição plaquetária. O regime de dose alta em *bolus*, consiste em $25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ao longo de 3 min, seguido por uma infusão de $0,15 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ por até 18 horas, no momento da intervenção percutânea primária. Ele atinge mais de 90% de inibição da agregação plaquetária em 10 min.

No ano de 2012, Manoukian e colaboradores iniciaram o estudo SAI-PCI, pela Medicure, comparando o uso de tirofiban como um *bolus* de dose alta seguido por uma infusão de menor dosagem. Atualmente, o teste encontra-se na fase II (ADIS, 2018).

A dose mais elevada da tirofiban foi aprovada pela FDA em 2013, sob nome comercial de Aggrastat[®]. As diretrizes da *Non-ST-segment elevation acute coronary syndromes* (NSTE-ACS) e as diretrizes da *American College of Cardiology* e *American Heart Association* (ACC/AHA) forneceram à nova dosagem deste fármaco uma recomendação de classe I, ou seja, há evidências e/ou comum acordo de que o fármaco é benéfico, útil e eficaz (AMSTERDAM, et al., 2014; O’GARRA, et al., 2013). Desde 2013 até a atualidade o Aggrastat[®] permanece como o inibidor GIIb/IIIa mais utilizado no mundo (KING et al., 2016).

Atualmente o fármaco é fabricado por Patheon Manufacturing Services, embalado por Orion Corporation e importado para o Brasil, pelas indústrias farmacêuticas Aspen Pharma e Merck Sharp & Dohme na forma farmacêutica injetável, sob nome comercial de Agrastat[®], em ampolas de 50 mL. Sua comercialização é restrita para uso hospitalar (ASPEN PHARMA, 2013).

3.3.2. Agrastat®

O Agrastat® apresenta em sua formulação 0,25 mg/mL de tirofibana em base livre e cloreto de sódio (8 mg.mL⁻¹), citrato de sódio dihidratado (2,7 mg.mL⁻¹) e ácido cítrico (0,16 mg.mL⁻¹) como ingredientes inativos, em um frasco ampola de 50 mL. O pH da solução varia entre 5,5 e 6,5 (ASPEN PHARMA, 2013; MERCK & CO., 1998)

Em alguns países europeus foi liberada a comercialização do fármaco genérico tirofibana em tampão fosfato e tampão acetato, porém quando comparado ao Agrastat® (tirofibana em tampão citrato) no tratamento de síndromes coronárias agudas, o fármaco genérico foi associado a uma maior taxa de trombocitopenia e com aumento potencial do risco de desfechos clínicos adversos (ADAMO et al., 2016).

A Sociedade Italiana de Cardiologia Intervencionista defende que a utilização destas versões do fármaco, contendo excipientes diferentes daqueles utilizados na formulação original deve ser evitada. A janela terapêutica estreita do fármaco e a evidência recente de possíveis eventos adversos graves associados a estes corroboram com a necessidade de dados clínicos adicionais para comparar a eficácia e não-inferioridade do medicamento genérico (ADAMO et al., 2017).

Atualmente o Agrastat® é o fármaco inibidor GPIIb/IIIa mais comercializado no mundo, graças ao seu favorável perfil farmacológico, com baixo peso molecular e baixo custo, quando comparado aos demais fármacos da mesma categoria (ADAMO et al., 2017).

3.3.3. Características físico-químicas

A tirofibana (N-(butylsulfonyl)-O-[4-(4-piperidiny)butyl]-L-tyrosine) (Figura 2) é um inibidor molecular não peptídico de GPIIb/IIIa, derivado da tirosina. Atua inibindo a agregação plaquetária de forma específica sobre o receptor GPIIb/IIIa, ocasionando o bloqueio da união cruzada das plaquetas (CARAMORI et al., 1998; GANDHIMATHI et al., 2013; WEITZ, 2012).

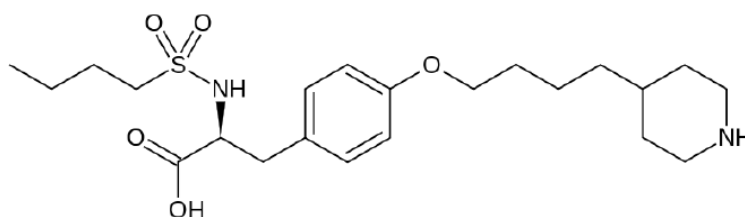


Figura 2. Estrutura química da tirofibana.

Possui fórmula molecular $C_{22}H_{36}N_2O_5S$ com baixa massa molecular de 440,598 g/mol. Apresenta aspecto físico de pó branco, com ponto de fusão entre 83 e 87 °C (O'NEIL, et al., 2013). Em relação à solubilidade, é ligeiramente solúvel em água de 3,17 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e apresenta boa solubilidade em metanol (DARKOVSAKA-SERAFIMOVSKA et al., 2016). Dispõe de duas constantes de pKa, nos valores de 10,5 e 3,3 referentes à protonação da amina primária e do ácido carboxílico, respectivamente (O'NEIL, et al., 2013).

3.4. Impurezas farmacêuticas

3.4.1. Aspectos gerais

Impureza farmacêutica é conceituada como qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem o(s) excipiente(s) (BRASIL, 2015; BRASIL, 2017).

3.4.2. Tipos de impurezas farmacêuticas

As impurezas farmacêuticas podem ser classificadas como impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas, solventes residuais e outros tipos de impurezas (formas polimórficas e esteroisômeros) (ICH, 2006).

As impurezas orgânicas são derivadas de matérias-primas, subprodutos, intermediários, PD, impurezas de síntese, reagentes e catalisadores e, podem surgir durante o processo de fabricação e/ou armazenamento da nova substância (ICH, 2006).

As impurezas inorgânicas podem ser resultado do seu processo de fabricação, podendo ser reagentes, catalisadores, metais pesados, tampões e outros materiais utilizados no processo de síntese (ICH, 2006).

Os solventes residuais são líquidos inorgânicos ou orgânicos utilizados como veículos para a preparação de soluções ou suspensões na síntese de uma nova substância. Sendo dividida em três classes, de acordo com o grau de risco à saúde humana, sendo elas:

- Classe 1 → carcinogênicos, alta toxicidade (ex. benzeno e tetracloreto de carbono);
- Classe 2 → toxicidade intermediária (ex. diclorometano, metanol, piridina, tolueno e acetonitrila);
- Classe 3 → baixo potencial tóxico (ex. ácido acético, acetona, álcool isopropílico, butanol, etanol e acetato de etila) (ICH, 2006).

Impurezas polimórficas apresentam a capacidade de se apresentar em mais de uma forma cristalina. Com esta capacidade, o fármaco pode vir a apresentar diferentes propriedades o que pode interferir no processo de fabricação de um medicamento e, conseqüentemente modificar suas características físico-químicas (ARAUJO, 2009). As Impurezas enantioméricas também recebem atenção em estudos farmacológicos, pois as vias sintéticas de fármacos quirais, em sua maioria, não são estereosseletivas, levando à formação de ambos os enantiômeros, de difícil segregação, sendo então, em sua maioria, comercializados na forma de misturas racêmicas (BERNARDO, 2008).

3.4.3. Legislação

A legislação brasileira, por meio da RDC nº 57, de 17 de novembro de 2009, descreve a necessidade de caracterizar o perfil de impurezas como requisito para registro de insumos farmacêuticos ativos a serem comercializados no país, entretanto, nesta resolução não são estabelecidos limites (BRASIL, 2009).

A legislação nacional estabelece os requisitos para a validação de metodologia analítica empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção através da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017).

Outrossim a ICH estabelece três guias regulatórios com intuito de padronizar e regulamentar o perfil de impurezas presente em formulações farmacêuticas, sendo eles:

- ICH Q3A (R2) (2006) → descreve as orientações sobre registro e qualificação do teor de impurezas presentes em novos fármacos produzidos por síntese química.
- ICH Q3B (R2) (2006) → viabiliza orientações sobre registro e qualificação de impurezas presentes em novos medicamentos produzidos a partir de novos fármacos.
- ICH Q3C (R5) (2005) → fornece limites aceitáveis para solventes residuais presentes em produtos farmacêuticos.

De uma forma geral o ICH Q3A (R2) prevê que para impurezas em novos produtos, a identificação não é necessária quando seu nível está abaixo de 0,1% a menos que as mesmas sejam tóxicas ou apresentem alguma atividade. Neste sentido, o ICH

Q3A (R2) preconiza os limites estabelecidos (Tabela 1) para impurezas em matérias-primas de novos fármacos produzidos por síntese química, conforme sua dose máxima diária.

Tabela 1. Limites de impurezas relacionados ao relato, identificação ou qualificação

Dose máxima	Limite relatado ¹	Limite de identificação ²	Limite de qualificação ³
≤ 2 g/dia	0,05%	0,1% ou ingestão de 1,0 mg/dia	0,15% ou ingestão de 1,0 mg/dia
≥ 2 g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

Legenda:

¹Limite acima do indicado a impureza deve ser relatada;

²Limite acima do indicado a impureza que deve ser identificada;

³Limite acima do indicado, a impureza deve ser qualificada.

3.4.4. Impurezas de síntese da Tirofibana

Nos insumos farmacêuticos ativos, as principais impurezas são derivadas do processo de síntese. Diferentes rotas sintéticas para a concepção de um mesmo fármaco podem gerar diferentes impurezas, pois estas estão diretamente relacionadas às reações que ocorrem no processo (NG; LUNN; FAUSTINO, 2007).

Uma das rotas de síntese da tirofibana (figura 3) inicia pela reação da tirosina com o bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida para proteção das funções -OH e COOH-. O produto intermediário gerado é tratado com cloreto de butilsulfonila gerando o derivado sulfonamida correspondente. O grupamento sililo é removido através de acidificação, resultando em N-butilsulfonil-tirosina. Paralelamente, a 4-picolina é convertida em sua forma aniônica pela reação com butil-lítio, gerando 4-[4-clorobutil]-piridina, que sofre alquilação com 1-bromo-3-cloropropano. O composto originado reage em meio básico, pela adição de hidróxido de sódio, com o N-butilsulfonil-tirosina, gerado anteriormente. O resultante desta reação é o ácido 2-butilsulfonilaminol-3- [4-piridin-4-il-butoxi-fenil] propanoico. Para reduzir o anel de piridina, para uma piperina e assim, assumir o papel de antagonista do receptor de fibrogênio desempenhado pela tirofibana, o ácido 2-butilsulfonilaminol-3- [4-piridin-4-il-butoxi-fenil] propanoico passa pelo processo de hidrogenação sobre paládio e carvão (CHUNG, et al., 1993; SITTING, 2007).

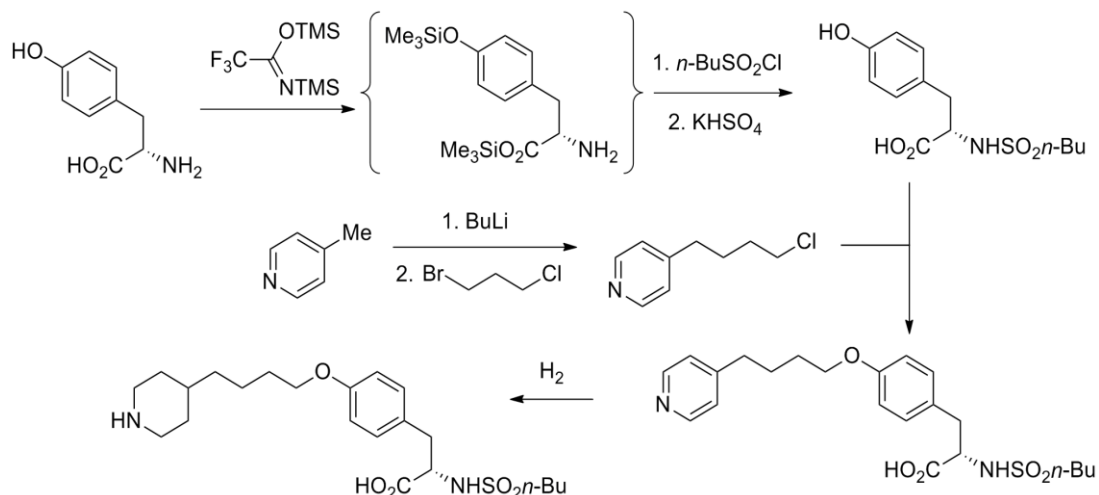


Figura 3. Rota de síntese da para obtenção da tirofibana (Fonte: SITTING, 2007).

Um produto intermediário, gerado no final desta rota de síntese, antes do processo de hidrogenação é o N-(n-Butanosulfonil)-O-[4-(4-piridinil)-butil]-(S)-tirosina (CHUNG, et al., 1993) usualmente chamado de tirofibana impureza C. Apresenta fórmula molecular $C_{22}H_{30}N_2O_5S$, peso molecular de 434,55, apécto físico de pó bege pálido, sendo levemente solúvel em metanol. Sua fórmula estrutural é ilustrada na figura 4 (MERCK & CO. INC., 1994).

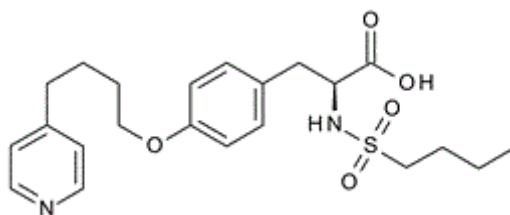


Figura 4. Fórmula química estrutural da Impureza C.

No entanto a impureza A (Debutilpiperidina tirofibana ou L-N-Butilsulfonil-p-hidroxifenilalanina) é uma resultante intermediária da síntese da tirofibana-d6, um análogo marcado da tirofibana. A tirofibana-D6, N-(Butilsulfonil)-O-[4-(4-piperidinil)butil-d6]-L-tirosina, apresenta fórmula molecular $C_{22}H_{30}D_6N_2O_5S$ e peso molecular de $446,63 \text{ g.mol}^{-1}$ com uma estrutura mais leve que a tirofibana. Sua fórmula estrutural é ilustrada na figura 5 (TORONTO RESERCH CHEMICALS, 2015).

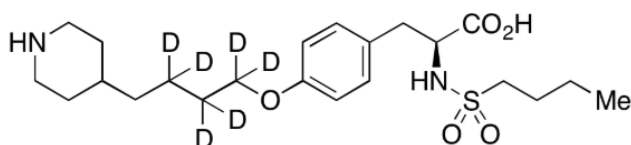


Figura 5. Fórmula química estrutural do composto Tirofibana-D6.

A impureza A (figura 6) apresenta especto físico de pó, com coloração que varia entre amarelo pálido e off-white, apresenta fórmula molecular $C_{13}H_{19}NO_5S$ e e peso molecular de $446,63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, higroscópico, dissolve bem em metanol e água acidificada (TORONTO RESERCH CHEMICALS, 2015).

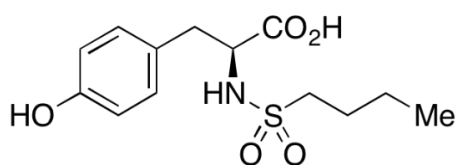


Figura 6. Fórmula química estrutural da Impureza A.

3.4.5. Produtos de Degradação (PD)

PD são conceituados, pela RDC nº 53 de 04 de dezembro de 2015, como impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento (BRASIL, 2015). Estas alterações podem ser oriundas dos efeitos de reação com pH, temperatura, luz, umidade e outras características inerentes ao fármaco, podendo ocorrer ainda da reação dos excipientes ou do contato com a embalagem primária. Estas reações químicas podem ocorrer de forma isolada ou sinérgicas (MELO, 2012).

É de extrema importância o conhecimento do comportamento do fármaco e os prováveis PD a serem formados, a fim de diferenciá-los das impurezas de síntese. Sob o ponto de vista do desenvolvimento da metodologia analítica a distinção deste perfil não é significativa, entretanto, as estratégias empregadas para o desenvolvimento metodológico para o estudo do perfil degradativo difere das utilizadas para o estudo das impurezas relacionados ao processo produtivo (MEIRELLES, 2014).

Os resultados dos ensaios de quantificação dos PD devem ter avaliação crítica frente à redução do teor do insumo farmacêutico ativo observada durante os estudos de estabilidade. A RDC nº 53 de 04 de dezembro de 2015 (BRASIL, 2015) estabelece critérios para a necessidade de notificação, identificação e qualificação dos PD no decorrer do estudo de estabilidade, conforme tabela 2.

Tabela 2. Critérios para necessidade de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação (PD).

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

Onde:

1 - Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia.

2 - Limites dos PD são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um PD.

A segurança biológica dos PD gerados deve ser atestada quando apresentar teor acima dos limites de identificação e abaixo dos limites de qualificação, que apresentem na sua estrutura química características que conduzam à classificação de produto potencialmente tóxico, para tal, se faz necessário a qualificação destes produtos. A identificação pode ser realizada mediante comparação com padrão analítico, ou caracterização conclusiva, realizada com pelo menos duas técnicas espectroscópicas diferentes (espectros de massas, de RMN, infravermelho) (BRASIL, 2015).

A RDC nº 171, de 24 de agosto de 2017 estabelece as datas limites para vigorar a RDC nº53 de 04 de dezembro de 2015, para medicamentos já registrados, de forma escalonada. Os antitrombóticos encontram-se no segundo escalão de classes terapêuticas, com data de execução em 31 de dezembro de 2019 (BRASIL,2017a).

3.5. Estabilidade de fármacos e medicamentos

3.5.1. Aspectos gerais

Antes de comercializar um novo fármaco ou medicamento a indústria deve realizar uma série de ensaios para avaliar sua conformidade com as especificações físico-químicas e microbiológicas sob condições compatíveis com a zona climática da região geográfica onde o produto será distribuído (AHUJA, 2007; MEIRELLES, 2014).

A estabilidade de um fármaco pode ser conceituada como a extensão na qual o produto mantém, dentro dos limites especificados e por todo seu prazo de validade, as características originais do momento da fabricação. Esta manutenção é um atributo

crítico de qualidade. O objetivo inicial do estudo de estabilidade foi definir o prazo de validade de medicamentos, porém, o viés dado à segurança destes produtos farmacêuticos, através da determinação e quantificação de produtos de degradação (PD) têm se sobreposto, como pôde ser observado pela Consulta Pública nº 11/2012, realizada pelo Ministério da Saúde que trata do estabelecimento de parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de PD em medicamentos (BRASIL, 2012).

A possível formação de produtos tóxicos durante sua degradação, podem ocasionar reações alérgicas nos pacientes (AHUJA, 2007; ROSA, 1990). O estudo de estabilidade em condições forçadas pode auxiliar a identificar prováveis produtos formados e a estabilidade intrínseca do fármaco, estabelecendo possíveis rotas de degradação (ICH, 2003).

A ANVISA, através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº53 de 04 de dezembro de 2015 (BRASIL, 2015) estabelece parâmetros para a verificação de PD em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação de PD em medicamentos ao longo do prazo de validade. Este teste se aplica aos medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos genéricos e similares.

3.5.2. Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade visa ainda diferenciar os PD oriundos do fármaco e daqueles gerados a partir de excipientes/adjuvantes em uma formulação, permitindo elucidar os mecanismos de degradação envolvidos, compreendendo as propriedades físico-químicas envolvidas e, a partir destes gerar formulações mais estáveis (ALCÂNTARA et al., 2013).

A predição da estabilidade do fármaco é realizada mediante a exposição do medicamento a condições reais de estresse, induzindo, deste modo, à redução gradativa do teor ativo e a elevação do teor de PD. A indução da degradação é medida mediante o aumento da temperatura e/ou umidade, exposição a diferentes condições de pH, luz intensa (natural ou simulada) e agentes oxidantes (MEIRELLES, 2014; ROSA, 1990).

3.5.3. Método indicativo de estabilidade

Métodos indicativos de estabilidade devem ser desenvolvidos e validados para identificar e quantificar as impurezas e PD, garantindo a confiabilidade dos resultados.

O perfil de degradação pode ser realizado elencando uma condição específica de degradação ou através do estudo de estabilidade (BRASIL, 2015).

A Consulta Pública nº 11/2012 determinou que o teste deve proporcionar uma degradação de 10 a 30%, cujo limite de detecção e quantificação é atribuído de acordo com a dose diária máxima (BRASIL, 2012). Em 2015, foi publicado pela ANVISA a RDC nº 53 de 04 de dezembro de 2015, que preconiza que os testes devem promover degradação em extensão suficiente a fim de permitir avaliação da formação de PD, com degradação superior a 10% e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra, comprometendo o teste (BRASIL, 2015).

É de suma importância a realização de um ensaio controle com o placebo, visando identificar a origem dos PD, se fármaco-dependente ou não (MEIRELLES, 2014).

Pode-se utilizar diferentes técnicas para obter metodologia indicativa de estabilidade. A utilização de CLAE proporciona a separação dos compostos gerados do fármaco não degradado de forma quantitativa, sensível, específica e possibilita ainda a detecção de impurezas. Os subprodutos detectados podem ser isolados e caracterizados utilizando detectores específicos ou outras técnicas auxiliares (MEIRELLES, 2014; SILVA et al., 2009).

Para avaliação da qualidade e eficiência da separação cromatográfica do método, recomenda-se a observância dos seguintes parâmetros: resolução, pureza do pico, assimetria e eficiência da coluna (LANÇAS, 2009).

3.5.4. Fatores que influenciam a estabilidade

A estabilidade de produtos farmacêuticos é afetada por fatores externos (como pH, temperatura luz, umidade, oxigênio) e/ou a fatores internos (interações entre fármacos, entre fármacos e os solventes e ou adjuvantes, compostos dos recipientes, presença de impurezas, entre outros) (ROSA, 1990).

A velocidade destas alterações varia de acordo com a susceptibilidade do fármaco às condições de estresse a qual é submetida, acarretando alterações nas características organolépticas ou não. A ausência de alterações organolépticas é preocupante, visto que não são detectadas facilmente. Estas alterações podem levar à

perda parcial ou total da atividade do medicamento ou à formação de produtos que possuem maior toxicidade do que o fármaco que lhes deu origem (LEITE, 2005).

As variáveis avaliadas nos estudos de estabilidade podem ser classificadas como química, física, microbiológica, farmacológica e toxicológica (MEIRELLES, 2014).

A degradação química dos princípios ativos é a causa mais frequente da instabilidade dos medicamentos, para tanto, é fundamental o conhecimento destas reações e suas características, como as condições e velocidades em que ocorrem, a fim de estabelecer o prazo de validade e manutenção da dosagem requerida (LEITE, 2005).

A estabilidade química ainda determina as incompatibilidades fármaco-excipiente na formulação e permite selecionar as condições de armazenamento e acondicionamento compatíveis com o produto. A manutenção das características físicas está relacionada aos aspectos intrínsecos do fármaco ou forma farmacêutica, podendo ter influência do material de embalagem devido sua permeabilidade (MEIRELLES, 2014).

As formas farmacêuticas líquidas apresentam maior instabilidade do que as sólidas. Variações na temperatura de armazenamento e pH podem provocar problemas na solubilização do fármaco (ALCÂNTARA, 2013). As soluções devem ser límpidas, com cor e odores adequados, devem ser destituídas de precipitação, descoloração, turvação, ação de gases e desenvolvimento microbiano, caso contrário, apresentam indícios de degradação (SILVA, et al., 2009).

Reações em soluções aquosas são, em geral, catalisadas por pH, e monitoradas através da velocidade de degradação, em temperatura, força iônica e concentração de solvente constantes (WELLS, 2005).

3.5.5. Estudo da degradação forçada

O estudo de estabilidade objetiva demonstrar a variação da qualidade de um fármaco em função do tempo sob influência de uma variedade de fatores, podendo assim estabelecer um período para realização de novos testes, determinar prazos de validade e recomendar as condições de estocagem (ICH, 2003).

O estudo se inicia com a seleção dos fatores de degradação. A pesquisa prévia em referências bibliográficas específicas ao tema permite o delineamento das condições que efetivamente podem levar à decomposição dos fármacos (CARTENSEN e RHODES, 2000; SINGH & BAKSHI, 2000; BAKSHI & SINGH, 2002).

O estudo de degradação forçada é, portanto, a ferramenta utilizada para se obter um perfil de degradação para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, sendo que também nos fornece dados sobre o comportamento e suscetibilidade do fármaco à degradação em diferentes condições. No entanto, como o perfil de degradação depende das condições a que se expõe o produto, o perfil obtido na degradação forçada não será necessariamente igual ao obtido no estudo de estabilidade. Daí a necessidade da realização de degradação forçada em diversas condições para gerar todos os PD que por ventura possam vir a aparecer nos estudos de estabilidade, colaborando também com a elucidação das prováveis rotas de degradação do fármaco (BRASIL, 2015).

A degradação de um produto farmacêutico pode ocasionar inúmeras alterações em suas características, com sérias consequências a sua qualidade, tais como: redução ou aumento da sua atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos de toxicidade elevada, entre outras. Assim, a avaliação da estabilidade dos medicamentos, de forma a assegurar a identidade, eficácia, segurança e pureza até o momento de seu uso é de extrema importância (AHUJA, 2007; SILVA et al., 2009).

Além dos fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, outros fatores relacionados ao próprio produto, podem afetar a estabilidade de produtos farmacêuticos como propriedades físicas e químicas da substância ativa, interação entre a substância ativa e excipientes, processo de produção, forma farmacêutica e materiais de embalagem (BRASIL, 2005; LEITE, 2005).

Os excipientes possuem um papel fundamental na estabilidade dos medicamentos. Podem afetar a estabilidade do fármaco através de vários mecanismos, podendo participar diretamente na degradação como reagentes, ou catalisar as reações de degradação (YOSHIOKA & STELLA, 2002). Mas os excipientes também contribuem para melhorar a estabilidade dos medicamentos, como por exemplo, o tampão citrato no Agrastat[®], que contribui para a estabilidade da substância ativa, mantendo o medicamento mais próximo da neutralidade possível, por tratar-se de um injetável. Em via de regra, a estabilidade do fármaco é maior que a do medicamento, já que a energia de ativação do fármaco é sempre superior à da formulação final (OLIVEIRA et al., 2011).

Recomenda-se que o estudo seja realizado no placebo, no produto e no insumo farmacêutico ativo isolado nas mesmas condições (BRASIL, 2015), testando-se, quando aplicável e possível, cada uma das condições abaixo:

3.5.5.1. Hidrólise

A degradação da maioria dos fármacos é catalisada por extremos de pH, e a estabilidade da maioria dos fármacos ocorre entre pH 4 e 8, visto que os íons hidrogênio e hidroxilas podem acelerar ou retardar o processo de degradação (SILVA, et al., 2009).

Fármacos com grupos funcionais ésteres, imidas, iminas, lactonas, amidas, sulfonamidas e ureídeos estão sujeitos a reações de hidrólise quando dispostos em soluções, acarretando a cisão da molécula ou abertura do ciclo ocasionando a perda da atividade farmacológica (SINGH e BAKSHI, 2000; ROSA, 1990).

A hidrólise ácida e alcalina do cloridrato de tirofibana foi estudada por El-Bagary e colaboradores (2018) em concentração de 1 Molar, e apresentou um decaimento de 53% após 8 horas de hidrólise básica e 45% após 8 horas em hidrólise ácida, com detecção de produtos de degradação em ambas condições.

3.5.5.2. Oxidação

As reações oxidativa em geral, ocorrem em contato com o oxigênio atmosférico. A maioria das reações de decomposição oxidativa de fármacos tem natureza auto oxidativa e necessitam de pequena quantidade de oxigênio molecular para iniciarem o processo de reação em cadeia com formação de radicais livres (ALSANTE et al., 2007).

Os radicais necessários à iniciação da reação de oxidação são geralmente formados por clivagem hemolítica, promovida por calor, luz ou processo de oxirredução, envolvendo a transferência de elétrons (SILVA, et al., 2009).

Estes radicais reagem com o oxigênio molecular, formando novos radicais, dá-se aí uma complexa reação em cadeia, culminando na reação com outros compostos, ou entre si formando moléculas não reativas. Deste modo, a oxidação pode ser controlada pelo ambiente, ou seja, luz, traços de metais, oxigênio e outros agentes oxidantes (WELLS, 2005; SILVA, et al., 2009).

Os grupos funcionais sujeitos a oxidação são principalmente fenóis, catecóis éteres e tio éteres (ROSA, 1990). A tirofibana apresenta um grupamento éter em sua molécula, podendo sofrer reações oxidativas.

O peróxido de hidrogênio é utilizado para criar as condições de estresse empregadas para o estudo de oxidação, sendo o agente mais empregado para este fim. A concentração de peróxido utilizada varia entre 1% a 30% (SILVA, et al., 2009).

A estabilidade da tirofibana perante reações oxidativas foi avaliada por EL-Bagary e colaboradores (2018) e atingiu um decaimento de 51,7% mediante adição de peróxido de hidrogênio 3% durante 12 horas.

3.5.5.3. Fotólise

Reações de fotólise ocorrem pela absorção de energia luminosa, sendo que no panorama farmacêutico, diversos são os fármacos que estão suscetíveis a tal forma de degradação. A luz é um fator ambiental capaz de fornecer energia necessária para desencadear reações de degradação de acordo com o comprimento de onda (λ) emissor da radiação luminosa. Quanto menor o λ da radiação, maior energia é absorvida por mol de reagente, e com isso, mais rápida a degradação (LACHMAN et al., 2001).

Uma série de reações pode ser iniciada fotoquimicamente, tais como: hidrólise, oxidação, isomerização, abertura de anel, polimerização ou remoção de vários substituintes, como halogênios ou grupos carboxílicos (TONNESEN, 2001).

Nos estudos de estabilidade frente à luz alguns fatores devem ser levados em consideração, tais como fonte de irradiação, tempo de exposição e intensidade, preparo das amostras para o estudo e nível de degradação (HIBBERT, 1991).

O comprimento de onda é inversamente proporcional a potência energética da radiação luminosa. Ao aumentar o conteúdo energético do sistema, pela transferência do fóton ao fármaco, reações oxidativas tendem a ser catalisadas (ALLEN, et al., 2007).

Uma das condições para que a reação química ocorra é que a molécula tenha máximos de absorção de luz na região de comprimento de onda da fonte de radiação. Em face disso, lâmpadas UV têm sido utilizadas em alguns estudos descritos de fotoestabilidade (ABOUNASSIF *et al.*, 2005; BREIER *et al.*, 2006; MALESUIK *et al.*, 2009).

Bergquist e colaboradores (1999) realizaram testes de degradação sobe luz fluorescente (680 nm), em temperatura ambiente, e não observaram alteração da concentração de tirofibana. Foram avaliados também o pH e a turbidez da solução preparada para administração de Agrastat[®], sendo que estes, do mesmo modo, não apresentaram alterações significativas. Quando combinado a outros fármacos, manteve a estabilidade, armazenada em frascos de vidro por um período de 4 horas (BERGQUIST et al., 2001).

A tirofibana foi submetida a teste de estresse fotolítico também por Henriet e colaboradores (2016). No estudo, o fármaco foi submetido à irradiação de luz entre 300 e 800 nm em solução aquosa e na ausência de foto catalisadores. Foram identificados doze compostos derivados da fotodegradação da tirofibana. Estes incluíram a foto-oxidação da porção piperidina sem afetar a amina secundária, a hidroxilação do grupo metileno ativado pelo anel aromático, a oxidação do grupo alquil-sulfonamida e também a oxidação descarboxilativa da molécula. Os compostos hidroxilados, geminais e compostos vicinal-diol, foram realçados sugerindo que a maioria dos foto produtos são mais hidrofílicos do que o fármaco.

A fotólise do cloridrato de tirofibana foi estudada também por El-Bagary e colaboradores (2018), onde o cloridrato de tirofibana solubilizado em tampão fosfato (pH 3,0) e acetonitrila, na proporção de 70:30 (v/v) foi submetido a radiação UV por 48 horas e apresentou decaimento de 10,9% em relação a concentração inicial.

3.5.5.4. Temperatura

A temperatura é um fator que influencia a velocidade de reações, portanto análises que empreguem termo degradação são úteis para a avaliação da estabilidade térmica (ATIKINS, 1999). Por essa via de degradação destacam-se alterações que podem ocorrer na estrutura da molécula por reações de descarboxilação, hidrólise e rearranjos (BAERTSCHI et al., 2005).

A degradação de fármacos ocorre geralmente à temperatura ambiente, mas podem ocorrer também em temperatura de refrigeração, porém a velocidade de reação é maior em temperaturas mais elevadas, quando comparadas a temperatura ambiente ou de refrigeração (SILVA et al., 2009).

A degradação pode ser acelerada com o aumento da temperatura, de modo que a cada acréscimo de 10 °C, aumenta-se em média de duas a três vezes a velocidade da reação de degradação. Algumas moléculas são estáveis com esta alteração inicial, por isto é adotado o intervalo de 40 °C a 110 °C, com variação no tempo de exposição, de poucos minutos a meses (ALSANTE et al., 2007; SINGH e BAKSHI, 2000; WELLS, 2005).

A degradação térmica do cloridrato de tirofibana foi estudado por El-Bagary e colaboradores (2018), onde observaram um decréscimo de 1,3% da concentração inicial do fármaco, após submetê-lo a 55 °C por um período de 72 horas.

3.5.6. Cinética de degradação

Cinética é o estudo da velocidade na qual os processos ocorrem, objetivando fornecer informações para a compreensão dos mecanismos responsáveis pelas transformações e a previsão quantitativa desta alteração após um dado intervalo de tempo. As transformações podem ser químicas ou físicas, as quais permitem uma abordagem racional para compreensão sobre a estabilidade e a produção de medicamentos, velocidade de decomposição e a predição do prazo de validade (MEIRELES, 2014).

O estudo da cinética de degradação foi apresentado inicialmente por Garret e Carper (1955), onde através de equações matemáticas os autores propuseram mecanismos para as reações de degradação e estabeleceram condições para acelerar ou diminuir estas velocidades.

Em 1963 Rogers propôs uma segunda abordagem, onde a energia de ativação, as velocidades de reação e a previsão da estabilidade são obtidas mediante um único experimento, programando as variações da condição a uma velocidade predeterminada.

A concentração dos reagentes e a variação da velocidade de reação podem ser definidas através da determinação da ordem de reação. A ordem de uma reação é a soma dos expoentes das concentrações das substâncias que intervêm na equação da velocidade e (ALLEN Jr., 2016).

Segundo Allen Jr. (2016), os produtos farmacêuticos geralmente apresentam velocidades de reação de ordem zero e de primeira ordem, e com menos frequência, de segunda ordem, sendo assim descritas:

- Reações de ordem zero → são aquelas em que a velocidade independe da concentração dos reagentes. O fator limitante destas reações são agentes externos, neste caso, somente a quantidade de fármaco presente em solução sofre o processo degradativo. Conforme o fármaco é degradado, decresce a concentração em solução, desta forma, mais fármaco se dissolve, até que a reação se complete. Assim sendo, a reação de degradação independe da totalidade de fármaco, sujeitando-se apenas à quantidade presente em solução, o que resulta numa reação de ordem zero. Para representação gráfica, considera-se a concentração *versus* tempo.
- Reações de primeira ordem → onde a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração de um dos reagentes, geralmente a substância ativa, sendo assim, as alterações na concentração do componente ativo não têm influência no teor de decomposição. Esta reação ocorre frequentemente nas reações de hidrólise de fármacos. Para representação gráfica considera-se logaritmo natural da concentração *versus* tempo.
- Reações de segunda ordem → caracterizam-se por uma velocidade de reação proporcional à concentração de dois reagentes ou à segunda potência de um deles. Para representação gráfica considera-se o inverso da concentração *versus* tempo.

A avaliação da cinética química e da ordem das reações determina o conhecimento do perfil de degradação ou perfil de concentração-tempo de um fármaco ou medicamento. Após submeter a amostra ao agente de estresse, os resultados são linearizados para obter as representações gráficas, e a partir desta escolher o modelo mais adequado utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (r) (CARTENSEN e RHODES, 2000).

A substituição do valor de k na ordem apropriada da reação permite calcular a quantidade de degradação após um determinado intervalo de tempo. Os resultados de um estudo cinético geralmente são expressos em tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), que traduz o tempo necessário para que a concentração de fármaco seja metade do valor inicial; e tempo $t_{90\%}$ que indica o tempo necessário para que ocorra uma redução de 10 % da concentração inicial de fármaco. O $t_{90\%}$ é preconizado como o limite de degradação

máxima que um fármaco pode sofrer, visando à sua utilização pelo paciente (CARTENSEN e RHODES, 2000). As fórmulas utilizadas para cada ordem de reação estão dispostas na tabela 3.

Tabela 3. Fórmulas para cálculo dos modelos cinéticos para reações de ordem zero, primeira e segunda ordem.

Ordem de Reação	k	t_{90%}	t_{1/2}
Ordem Zero	$k = C_0 - C / t$	$t_{90\%} = 0,1 \cdot C_0 / k$	$t_{1/2} = C_0 / 2k$
Primeira Ordem	$\ln C = \ln C_0 - kt$	$t_{90\%} = 0,106 / k$	$t_{1/2} = \ln 2 / k$
Segunda Ordem	$1/C = 1/C_0 + kt$	$t_{90\%} = 1/9 kC_0$	$t_{1/2} = 1/kC_0$

Legenda: C₀ = concentração dos reagentes no tempo zero; C = concentração após reação no tempo t; k = constante de velocidade da reação.

3.6. Técnicas analíticas para análise de fármacos e impurezas

3.6.1. Aspectos Gerais

Um controle de qualidade eficaz das formulações farmacêuticas é indispensável para que possa ser garantida a segurança do consumidor. Para tanto a regulamentação de metodologias analíticas capazes de garantir essa segurança e a eficácia do produto final é imprescindível, visto que o assunto se relaciona diretamente à saúde pública.

Considerando que mesmo pequenas alterações nas formulações farmacêuticas podem provocar alterações significativas na segurança do medicamento, são necessárias atualizações constantes nas normativas e ações corretivas dos órgãos regulamentadores, a nível nacional e mundial, além de constante atualização de metodologias analíticas, visando garantir melhores resultados analíticos e efetivo controle de qualidade (BARATA-SILVA et al., 2017).

A Política de Regulamentação de Medicamentos, que foi implementada em 2004 no Brasil, lida com as regras aplicadas ao controle do mercado de medicamentos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que os medicamentos comercializados devem cumprir as especificações que garantam a segurança do consumidor, como o controle de qualidade da matéria-prima, verificação da reprodutibilidade, e eficácia terapêutica, por meio de comprovação laboratorial ou de estudos clínicos (ANVISA, 2004; BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

Neste contexto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de metodologia, para que se possa avaliar a qualidade dos produtos farmacêuticos desde a matéria-prima até a forma farmacêutica, contemplando o estudo da estabilidade do fármaco nas formulações, a análise de PD, identificação e determinação dos níveis de impurezas e padronização dos procedimentos de produção.

Os métodos analíticos têm por objetivo fornecer informações confiáveis quanto à natureza e à composição dos materiais submetidos à análise. Porém, certo grau de variabilidade está atrelado a todas as avaliações, o que torna necessário o processo de validação da metodologia analítica (LEITE, 2009).

A integração entre métodos cromatográficos e espectroscópicos/espectrométricos constitui uma abordagem de crucial importância para garantir a qualidade requerida. Estas ferramentas tecnológicas de análise e identificação são capazes de fornecer facilidade de operação e rapidez de resultados, favorecendo o

processo de pesquisa, desenvolvimento e produção. O isolamento de substâncias a partir de matrizes complexas depende primeiramente de suas características físico-químicas. Quanto mais semelhantes forem as propriedades entre as substâncias presentes na mistura, mais complicada torna-se a separação e purificação de seus componentes (BARATA-SILVA et al., 2017).

Os métodos cromatográficos são comumente utilizados em laboratórios de análise para a avaliação qualitativa e quantitativa de fármacos em matérias-primas e produtos acabados, sua popularidade deriva da sua versatilidade, pois além da quantificação permitem a separação de componentes, podendo ser utilizados na avaliação da estabilidade, quando devidamente desenvolvidos e validados (WATSON, 2005).

3.6.2. Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação, fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias proporciona uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (HARRIS, 2012).

Os primeiros artigos envolvendo a cromatografia como uma ciência foram publicados em 1906 por Michael Tswett, um botânico russo, o qual separou algumas substâncias de extratos de plantas. Durante a última metade do século XX, foi o notório o crescimento de demanda por separações analíticas mais complexos, e de forma concomitante ocorreu a automatização e sofisticação das técnicas cromatográficas utilizadas, como a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (MÜHLEN & LANÇAS, 2004; LANÇAS, 2003).

Como resultado deste avanço tecnológico as ciências analíticas migraram de operações simples, semi-quantitativas para complexas determinações instrumentais de alta resolução, que permitem a análise de uma maior gama de componentes devido ao aumento da resolução e eficiência de separação dos compostos, seguidas por procedimentos de validação, com o intuito de tornar o método reprodutível com níveis de confiabilidade exigidos pelas agências reguladoras governamentais (LANÇAS, 2003).

Atualmente a ciência analítica permite a qualificação e quantificação de diversos compostos, mesmo que presentes em quantidades mínimas, utilizando técnicas miniaturizadas, de ultra resolução, com menor emprego de solventes tóxicos (MÜHLEN & LANÇAS, 2004; LANÇAS, 2009). Para análise de fármacos e suas impurezas, os métodos mais utilizados são CLAE, cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), cromatografia gasosa (CG) e a eletroforese capilar, ligados a diferentes detectores (BUENO, 2016).

Para o desenvolvimento deste trabalho, optou-se por utilizar a CLAE para determinação do cloridrato de tirofibana e as suas impurezas de síntese A e C, devido as características da técnica, que a tornam a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios de indústrias química e farmacêuticas dos últimos anos (MALDANER & JARDIM, 2009).

3.6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida consiste na separação de compostos de uma determinada mistura, através da diferença de afinidade do composto analisado frente à fase estacionária (coluna) e o eluente (estado líquido). O desenvolvimento contínuo de novas partículas de fase estacionária e a evolução na automatização do processo permitiram o avanço da cromatografia líquida, gerando colunas mais seletivas, eficiente e estáveis química e mecanicamente, originando a CLAE (LANÇAS, 2003; MALDANER & JARDIM, 2009).

Entretanto, o uso de partículas menores que 2 μm se tornou possível recentemente, com o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). (MALDANER & JARDIM, 2009).

Para sua aplicação se faz necessária duas etapas principais, o desenvolvimento da metodologia e a validação da metodologia analítica. No desenvolvimento da metodologia são testadas técnicas de limpeza e extração, quando requeridas, bem como selecionadas as variáveis cromatográficas com a finalidade de selecionar o melhor cenário de adequabilidade do sistema, como por exemplo a fase móvel (composição, pH e vazão), coluna cromatográfica (temperatura, dimensões, tipo e tamanho de partícula), e o detector e suas variáveis correspondentes (LANÇAS, 2009).

Dentre os detectores utilizados, o de luz UV-visível destaca-se por aceitar o uso de gradientes e não ser afetado por pequenas variações de fluxo e temperatura. Consiste

em um fotômetro que mede a absorção de luz dos compostos, em determinado comprimento de onda, compreendido entre as regiões visível e ultravioleta, regido pela lei de Beer-Lambert, onde a absorbância é proporcional a concentração do analito na amostra. O detector UV-Visível permite a seleção de apenas um comprimento de onda previamente selecionado, enquanto que o detector de arraste de diodos (DAD) permite a detecção de vários comprimentos de onda de forma simultânea (LANÇAS, 2009).

3.6.4. Validação de metodologia analítica

Validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos. A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. Para isto, o analista deve selecionar os parâmetros a serem analisados, visto que a necessidade de avaliação depende do tipo de método e da finalidade de sua utilização. Para análise quantitativa do fármaco e suas impurezas, é recomendado pela ANVISA e o ICH a avaliação da exatidão, repetibilidade, precisão intermediária, seletividade, limite de quantificação e linearidade, sendo o limite de detecção necessário em alguns casos (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

3.6.5. Determinação de cloridrato de tirofibana

No sentido do controle de qualidade, existem alguns relatos sobre a determinação quantitativa da tirofibana, tanto em preparações farmacêuticas, quanto em material biológico, como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros utilizados para determinação de tirofibana por diversos autores.

Matriz	Solvente	Proporção (v/v)	Coluna	Detector	Autor
Fármaco	Tampão Fosfato (pH 2,3): Acetonitrila	78:22	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) 35°C	UV λ227 nm	BERGQUIST et al., 1999
Fármaco	Tampão Fosfato (pH 2,3): Acetonitrila	78:22	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) 40°C	UV λ227 nm	BERGQUIST et al., 2001
Fármaco	Tampão Fosfato (pH 3,0): Acetonitrila	70:30	C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) 25°C	UV λ210 nm	EL-BAGARY, et al., 2018
Fármaco	Tampão Fosfato (pH 2,3): Acetonitrila	78:22	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) 25°C	UV λ227 nm	GARABITO, et al., 2001
Fármaco	Tampão fosfato (pH 5,0): Acetonitrila	70:30	C18	UV λ226 nm	GANDHIMATHI et al., 2013
Fármaco	Formato de amônio 10mM: Acetonitrila	Gradiente	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm)	LC-HR-MS	HENRIET et al., 2016
Fármaco	Tampão (pH3,0): Acetonitrila	55:45	C18 (250 × 4.6 mm) 25°C	UV λ277 nm	NATARAJ et al., 2013
Fármaco	Ácido octano sulfônico (pH 3,0) : Acetonitrila	55:45	C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm) Temperatura ambiente	UV λ227 nm	RANJITHA e RAO, 2011
Resíduos em superfície de equipamentos de produção	Tampão Fosfato (pH6,0) : Acetonitrila	71:29	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) 40°C	UV λ227 nm.	AKL et al., 2013
Matriz Biológica	Tampão Acetato de Amônio (pH 7,5) : Acetonitrila	Gradiente	C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm) 60°C	MS/MS	DI RAGO et al., 2014
Matriz Biológica	Acetonitrila : Tampão Acetato de Amônio (pH6,0)	41,5:58,5	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm)	MS/MS	ELLIS et al., 1997
Matriz Biológica	Acetonitrila : Tampão Acetato de Amônio : Ácido fórmico	Gradiente	C18 (55 x 2mm)	MS/MS	OERTEL et al., 2004
Matriz Biológica	Tampão Fosfato (pH 5,2): Acetonitrila	70:30	C18 (250 x 4,0 mm, 5 µm)	UV λ274 nm	DARKOVSAK-SERAFIMOVSKA et al., 2014
Matriz Biológica	Tampão Fosfato (pH 5,2): Acetonitrila	70:30	C18 (150 x 4,0 mm, 5 µm)	UV λ277 nm	DARKOVSAK-SERAFIMOVSKA et al., 2016
Matriz Biológica	Acetonitrila : Tampão Acetato (pH 4,5)	40:60	C18 (300 x 4,6 mm)	MS/MS	VICKERS et al., 1999
Matriz Biológica	Acetonitrila: água ultrapurificada com ácido Fórmico	Gradiente	C8 (50 x 2,1 mm, 5 µm)	MS/MS	YANG, et al., 12016

Dentre os trabalhos supracitados, destaca-se o experimento conduzido por Henriët e colaboradores (2016), onde foi desenvolvida metodologia analítica por LC-HR-MS, a qual proporcionou a detecção e identificação de doze produtos resultantes da fotodegradação da tirofibana. O trabalho sugeriu ainda a estrutura química dos compostos fotodegradados.

Outro trabalho a ser destacado foi desenvolvido por El-Bagary e colaboradores (2018), onde o cloridrato de tirofibana foi testado em diferentes condições degradativas, (hidrólise ácida e básica, temperatura, oxidação e fotólise), e foi desenvolvida metodologia analítica para determinação do fármaco na presença da tirosina, como impureza de síntese. Todavia, neste trabalho a adição da impureza não ocorreu de forma simultânea com os produtos de degradação encontrados.

Apesar dos trabalhos listados, a literatura não traz registro de desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade, na presença das impurezas de síntese A e C e produtos de degradação gerados em condições de estresse.

4. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES

A metodologia, resultados e discussões da dissertação estão apresentados na forma de artigo científico, intitulado “**Desenvolvimento de Método Indicativo da Estabilidade para Determinação de Tirofibana e Impurezas de Síntese e Estudo da Cinética de Degradação**” que será submetido a periódico da área.

4.1. Desenvolvimento de Método Indicativo da Estabilidade para Determinação de Tirofibana e Impurezas de Síntese e Estudo da Cinética de Degradação

1 *Resumo*

2 A tirofibana é um fármaco inibidor molecular não peptídico derivado da tirosina que
3 inibe a agregação plaquetária no final da cascata de coagulação, especificamente como
4 antagonista dos receptores da glicoproteína (GP) IIb/IIIa, sendo o inibidor desta GP mais
5 utilizado mundialmente desde a aprovação da nova dosagem pela FDA, em 2013, sob nome
6 comercial de Agrastat®. A ANVISA e guias internacionais determinam que os medicamentos
7 comercializados devem garantir a qualidade do produto e segurança do consumidor. Neste
8 contexto, torna-se imprescindível desenvolver e validar métodos que permitam a avaliação desde
9 a matéria-prima até a forma farmacêutica, contemplando o estudo da estabilidade do fármaco nas
10 formulações, a análise de produtos de degradação, identificação e determinação dos níveis de
11 impurezas e padronização dos procedimentos de produção. Há poucos relatos na literatura sobre
12 a determinação quantitativa da tirofibana e degradação em condições forçadas. Além disso, a
13 literatura não traz registro de desenvolvimento e validação de método indicativo da estabilidade,
14 determinação de impurezas de síntese e produtos de degradação. Perante o exposto, este estudo
15 objetivou desenvolver e validar metodologia indicativo da estabilidade para determinação da
16 tirofibana na presença de duas impurezas de síntese (impureza A e impureza C), bem como
17 realizar estudo preliminar de estabilidade e determinar a cinética de degradação relacionando
18 com os principais fatores de degradação. O desenvolvimento e validação do método foi realizado
19 em concordância com os principais guias oficiais. Utilizou-se a cromatografia líquida de alta
20 eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (DAD), em 226 nm, empregando-
21 se coluna C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5µm), em temperatura ambiente, com fase móvel eluída em modo
22 gradiente, constituída de mistura de trietilamina 0,1% acidificada a pH 5,5 com ácido fosfórico e
23 acetonitrila, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. O método apresentou

24 linearidade, precisão, exatidão e robustez satisfatórios, além de baixos limites de detecção e
25 quantificação, que demonstram sensibilidade na determinação da tirofibana e impurezas A e C.
26 Apresentou-se seletivo para a determinação do fármaco e impurezas analisadas, sem
27 interferência dos produtos de degradação gerados em condições forçadas, dados que demonstram
28 a capacidade indicativa da estabilidade do método proposto. A tirofibana mostrou-se
29 praticamente estável às condições de estresse oxidativo (H₂O₂ 30% por 24 horas) e térmico
30 (75°C por 24 horas), apresentou degradação frente à luz UVA e hidrólise ácida, obedecendo à
31 cinética de primeira ordem. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância do
32 aprofundamento dos estudos nesta área, no intuito de garantir a qualidade dos produtos
33 farmacêuticos comercializados.

34 *Palavras-chave*

35 Agrastat, Cinética, CLAE, Degradação, Impurezas.

36 *Introdução*

37 Os antiplaquetários são fármacos que têm em comum a propriedade de inibir a
38 formação e agregados plaquetários e de trombo, sem interferir, de forma significativa, nos
39 demais segmentos da cascata de coagulação. Apesar de comprovada eficácia clínica,
40 apresentam algumas limitações, pois a inibição plaquetária é relativamente fraca e podem
41 causar efeitos colaterais sistêmicos, como a inibição irreversível da ciclooxygenase, podendo
42 ocasionar úlcera péptica, acarretada pela administração da aspirina, ou ainda, a administração
43 da ticlopidina, associada à agranulocitose ^[1].

44 A descoberta do receptor glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) como via final comum da
45 agregação plaquetária gerou interesse na investigação de antagonistas para este sítio, visando
46 efeitos mais específicos e minimizando as reações adversas. Os receptores podem ser
47 bloqueados/antagonizados por diversos agentes terapêuticos, como abciximab (anticorpo
48 monoclonal), o eptifibatide (heptapeptídeo sintético) e a tirofibana (não-peptídico intravenoso
49 mimético dos sítios da sequência de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido Aspártico
50 (RGD))^[2].

51 A tirofibana é um antagonista não-peptídico dos receptores GP IIb/IIIa derivado da
52 tirosina. Ela mimetiza a geometria, estereoatividade e características elétricas do RGD,
53 interferindo na agregação plaquetária ^[1,2]. Devido a sua atuação específica foi rapidamente
54 adotado como tratamento da síndrome coronária aguda e tornou-se o fármaco mundialmente
55 mais utilizado para este tratamento ^[3]. Atualmente, o fármaco é comercializado no Brasil
56 devido à parceria entre as indústrias farmacêuticas Aspen Pharma e Merck Sharp & Dohme,
57 com o nome comercial de Agrastat[®], na forma farmacêutica injetável (0,25 mg.mL⁻¹).

58 Considerando que mesmo pequenas alterações nas formulações farmacêuticas podem
59 provocar alterações significativas na segurança do medicamento, são necessárias atualizações

60 constantes de metodologias analíticas, visando garantir a sua qualidade e eficácia. A fim de
61 garantir a segurança do consumidor as metodologias desenvolvidas devem apresentar a
62 capacidade indicativa da estabilidade e possibilitar a identificação e determinação dos níveis
63 de impurezas farmacêuticas e produtos de degradação nas formulações comerciais ^[4].

64 Encontram-se relatos na literatura de métodos utilizando cromatografia líquida de alta
65 eficiência para a determinação de tirofibana em forma farmacêutica ^[5,6,7,8,9,10,11,12] e matriz
66 biológica ^[13,14,15,16,17,18,19]. Todavia é observada uma escassez de trabalhos sobre a
67 determinação do cloridrato de tirofibana na presença de impurezas de síntese e produtos de
68 degradação. O fármaco foi avaliado presença da tirosina ^[12], todavia, faz-se necessário
69 método analítico capaz de determinar diferentes impurezas, já que diferentes rotas sintéticas
70 para a concepção de um mesmo fármaco podem gerar impurezas distintas ^[20]. Além disso, são
71 necessários métodos que possam avaliar o cloridrato de tirofibana na presença de seus
72 produtos de degradação, que também são impurezas, mas obtidas da decomposição do
73 fármaco.

74 Neste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e validação de método
75 indicativo da estabilidade por cromatografia líquida para determinação de tirofibana e
76 impurezas de síntese, bem como realizar estudo preliminar da estabilidade e determinar a
77 cinética de degradação relacionando com os principais fatores de degradação.

78

79 *Material e Métodos*

80 *Reagentes*

81 Para o desenvolvimento do método foi utilizado substância química de referência de
82 cloridrato de tirofibana (Toronto Research Chemicals - TRC, Canadá), Impureza A (TRC
83 Canadá) e Impureza C (TRC Canadá), além do fármaco na sua forma comercial Agrastat[®]

84 (Patheon, Barcelona, Espanha). Foram utilizados ainda os seguintes reagentes: acetonitrila
85 grau HPLC (Tedia, OH, USA), ácido cítrico (Vetec, RJ, Brasil), ácido clorídrico (Synth, SP,
86 Brasil), ácido fosfórico (Vetec, RJ, Brasil), citrato de sódio dihidratado (Vetec, RJ, Brasil),
87 cloreto de sódio (Alphatec, Brasil), hidróxido de sódio (Alphatec, Brasil), metanol grau HPLC
88 (Panreac, OH, USA) e trietilamina (CRQ, SP, Brasil).

89 *Condições cromatográficas.*

90 Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta
91 eficiência Thermo Scientific Ultimate 3000 (Dionex) constituído de bomba quaternária (LPG-
92 3400SD), amostrador automático (WPS-3000TSL), compartimento de coluna com
93 controlador de temperatura (TCC-3000RS), coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) (Agela
94 Technologies, Promosil) a temperatura ambiente e detector de arranjo de diodo (DAD-3000) a
95 226 nm. A aquisição e análise de dados foi realizada pelo software Chromeleon versão 6.8
96 (Dionex, Thermo Fisher Scientific Inc.).

97 A fase móvel foi composta de uma fração aquosa de trietilamina 0,1%, acidificada
98 com ácido fosfórico até pH 5,5, e uma fração orgânica composta por acetonitrila grau HPLC.
99 A fase móvel foi filtrada com membrana 0,45 µm (Analítica, SP, Brasil) e sonicada por 15
100 minutos para degaseificação.

101 Utilizou-se o sistema gradiente para eluição da fase móvel, com proporção de 22 % de
102 acetonitrila no período entre 0,0 e 2,5 min, variando para 25 % no período entre 2,6 e 5,9 min,
103 35 % no período entre 6,0 e 16,9 min, retornando à 22 % até o final do tempo de corrida, em
104 20 minutos. Manteve-se a vazão em 1 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. Todas
105 amostras foram filtradas com filtro de seringa de nylon (0,45 µm; 13mm) antes da injeção no
106 cromatógrafo.

107 *Validação da metodologia*

108 A validação do método analítico foi realizada de acordo com o International
109 Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals
110 for Human (ICH) por meio da análise dos seguintes parâmetros analíticos: seletividade,
111 linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção (LD) e limite de quantificação
112 (LQ) ^[21].

113 O cloridrato de tirofibana e as impurezas foram dissolvidos em metanol grau HPLC
114 com posterior sonicação por 5 minutos em banho de ultrassom para obtenção da solução mãe.
115 Posterior diluição em metanol foi realizada a fim de obter as soluções de trabalho de 200
116 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para tirofibana e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as impurezas A e C. A solução de trabalho do
117 fármaco Agrastat[®] foi preparada mediante sua diluição em metanol para obter uma
118 concentração final de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

119 A seletividade do método foi avaliada perante a confirmação de ausência de
120 interferentes inerente dos excipientes da formulação e separação satisfatória dos produtos de
121 degradação formados no estudo preliminar de degradação em relação ao produto farmacêutico
122 e suas impurezas. A amostra simulada de excipientes (ASE) foi composta por cloreto de sódio
123 (8 mg.mL^{-1}), citrato de sódio dihidratado (2,7 mg.mL^{-1}) e ácido cítrico (0,16 mg.mL^{-1}), em
124 base aquosa, utilizando água ultrapurificada ^[22].

125 A determinação do LD e LQ foi realizada a partir do sinal-ruído da corrida analítica,
126 verificado através da linha de base, onde as soluções foram preparadas nas concentrações
127 calculadas e avaliadas experimentalmente para o fármaco e impurezas. O LD foi determinado
128 como sendo a concentração correspondente a 3 vezes o sinal-ruído da linha de base. O LQ foi
129 determinado como a concentração correspondente a 10 vezes o sinal-ruído da linha de base
130 apresentando precisão e exatidão.

131 A linearidade do método foi estabelecida com curvas nas concentrações de 160, 180,
132 200, 220 e 240 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cloridrato de tirofibana e 0,1; 1,5; 5,0; 10,0 e 12,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
133 para as impurezas A e C. Os resultados foram plotados em gráficos das áreas obtidas em
134 função das respectivas concentrações. A linearidade foi avaliada a partir do coeficiente de
135 correlação (r) e da análise de variância por ANOVA, onde foi verificada a regressão linear e
136 desvio de linearidade de três curvas obtidas em dias diferentes para cada analito.

137 A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. Para
138 avaliação da repetibilidade seis amostras ($n = 6$), de concentração 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o
139 cloridrato de tirofibana e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as impurezas A e C, foram preparadas sob as
140 mesmas condições, pelo mesmo analista, em um curto período de tempo. Para determinação
141 da precisão intermediária, seis amostras, nas mesmas concentrações supracitadas foram
142 preparadas sob as mesmas condições, durante três dias diferentes, por dois diferentes analistas
143 ($n = 18$). A análise dos resultados foi realizada mediante cálculo do desvio padrão relativo
144 entre as determinações.

145 A exatidão foi determinada pela porcentagem de recuperação de cloridrato de tirofibana
146 e impurezas, através da adição de concentrações conhecidas de substância química de
147 referência do fármaco (160, 200 e 240 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e das impurezas A e C (8, 10 e 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)
148 na ASE, sendo avaliada a porcentagem de recuperação em cada nível de concentração.

149 A robustez foi avaliada a partir da determinação do fármaco e suas impurezas
150 mediante pequenas alterações nas condições cromatográficas nominais do método
151 desenvolvido. Foram selecionados seis fatores e foram avaliados por delineamento fatorial de
152 Plackett-Burman ($n = 12$). Calcularam-se o efeito (E) de cada fator e o erro experimental
153 estimado (EE) ^[23]. Foram avaliadas alterações no pH da fase móvel ($\pm 0,3$ unidades), vazão (\pm
154 0,05 unidades), proporção de acetonitrila na fase móvel ($\pm 2\%$), comprimento de onda (± 2
155 nm), temperatura de coluna (± 3 °C) e marca de coluna.

156 A partir da avaliação estatística obteve-se um valor numérico-limite, o qual define se a
157 modificação efetuada acarretou em interferência na análise quantitativa. Este valor é
158 geralmente derivado do método analítico *teste t*, conforme a Equação 1:

159 Equação 1:

$$160 \quad t = \frac{|E_x|}{(SE)_e}$$

161 Onde :

162 E_x = efeito de cada fator;

163 SE_e = erro experimental estimado.

164 O efeito é considerado significativo se resultar em $t_{calculado} > t_{crítico}$.

165 *Estudo preliminar de degradação*

166 O estudo preliminar de degradação do cloridrato de tirofibana foi realizado por meio
167 de condições de hidrolíticas (ácida e básica), oxidativa, térmica e fotolítica. A hidrólise ácida
168 ocorreu mediante adição de ácido clorídrico à solução de cloridrato de tirofibana, com
169 concentração final de 1 mol.L⁻¹, durante 2 horas. A hidrólise básica, mediante adição de
170 NaOH à solução de cloridrato de tirofibana com concentração final de 1 mol.L⁻¹, durante 8
171 horas. Decorrido o período de exposição, as amostras submetidas aos estresses hidrolíticos
172 foram neutralizadas. O estresse oxidativo foi realizado mediante adição de peróxido de
173 hidrogênio 30 volumes ao cloridrato de tirofibana, em temperatura ambiente por um período
174 de 24 horas. A degradação térmica ocorreu mediante a submissão do cloridrato de tirofibana à
175 temperatura de 75 °C em estufa de circulação forçada por um período de 24 horas. A
176 degradação fotolítica ocorreu mediante exposição do cloridrato de tirofibana em câmara
177 fotolítica com lâmpada UVA durante 1 hora. Em todas as situações de estresse a concentração
178 final de trabalho do cloridrato de tirofibana foi de 200 µg.mL⁻¹. Depois de cessados os

179 períodos de estresse, para determinação da seletividade foram acrescentadas às amostras as
180 impurezas A e C, ambas na concentração final de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

181 Todas amostras foram filtradas e submetidas a análise cromatográfica. As análises
182 foram realizadas em triplicata em cada condição testada.

183 *Cinética de degradação*

184 As soluções de trabalho de cloridrato de tirofibana e Agrastat[®] foram submetidas à
185 hidrólise ácida, e analisadas ao longo de 7 horas e 72 horas, respectivamente. Foi adicionado à
186 3,0 mL de solução mãe 2,0 mL de ácido clorídrico 5 mol.L^{-1} (para obter concentração após a
187 diluição de 1 mol.L^{-1}) e completou-se o volume de 10 mL com metanol grau HPLC. Foram
188 retiradas alíquotas ao longo do tempo de degradação e neutralizadas com NaOH, filtradas em
189 com filtro de seringa de nylon ($0,45 \mu\text{m}$; 13mm) e analisadas pelo método analítico
190 desenvolvido.

191 Para determinação da cinética de reação em fotólise, além da solução metanólica do
192 princípio ativo, foi também preparada uma solução de cloridrato de tirofibana solubilizada em
193 acetonitrila grau HPLC. A solução foi submetida à sonicação por 15 minutos.

194 A cinética de degradação fotolítica ocorreu mediante a submissão de $750 \mu\text{L}$ da
195 solução de cloridrato de tirofibana solubilizada em metanol e acetonitrila à radiação UVA, em
196 câmara de fotoestabilidade, durante 4 horas e 24 horas, respectivamente. Após o período de
197 exposição, as amostras foram diluídas a 1,0 mL com metanol, obtendo uma concentração de
198 $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $187 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. As amostras foram filtradas com filtro de
199 seringa de nylon ($0,45 \mu\text{m}$; 13mm) e submetidas a análise pelo método analítico
200 desenvolvido.

201 Os valores da constante de velocidade de reação (k), do tempo necessário para que a
202 concentração inicial do fármaco decaia à 90% ($t_{90\%}$) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foram

203 calculados obedecendo ao modelo cinético apresentado nas equações 2, 3 e 4,
204 respectivamente:

205 $\ln C = \ln C_0 - kt$ (equação 2)

206 $t_{90\%} = 0,106 / k$ (equação 3)

207 $t_{1/2} = \ln 2 / k$ (equação 4)

208 Onde: C_0 = concentração dos reagentes no tempo zero;

209 C = concentração após reação no tempo t ;

210 k = constante de velocidade da reação.

211 *Resultados e discussão*

212 *Desenvolvimento e validação de metodologia*

213 A determinação da banda de máxima absorção do cloridrato de tirofibana foi
214 avaliada no produto acabado (Agrastat[®]), originalmente em tampão citrato e no padrão
215 analítico, solubilizados em três solventes distintos: água ultrapurificada, metanol e
216 acetonitrila, através de varredura espectral, na região do ultravioleta visível utilizando o
217 detector de arranjo de fotodiodos, acoplado ao CLAE. Os máximos de absorção encontrados
218 foram de 226 e 276 nm, sem distinção entre os solventes utilizados, inclusive quando
219 comparados aos relatados da literatura em meio aquoso ^[9]. No entanto, foi possível observar
220 que quando utilizado acetonitrila como diluente a absorvidade foi inferior quando
221 comparado aos demais solventes. As impurezas apresentaram máximos de absorção de 224 e
222 276 nm para impureza A e 226 e 255 nm para impureza C. Diante destes resultados,
223 verificou-se a adequabilidade do método de detecção para identificação do cloridrato de
224 tirofibana na forma farmacêutica injetável e duas impurezas de síntese.

225 Para o desenvolvimento de metodologia foram testadas proporções de fase móvel
226 compreendidas entre 50:50 e 90:10, constituídas de trietilamina 0,1% acidificada:acetonitrila,
227 sendo que o pH do constituinte aquoso foi analisado entre 3,0 e 6,0. A eluição no modo
228 isocrático não foi satisfatória para determinação do cloridrato de tirofibana em presença da
229 impureza C, fator corrigido mediante emprego de gradiente.

230 O emprego de gradiente proporcionou boa resolução entre os compostos analisados.
231 A condição cromatográfica de trabalho foi estabelecida na proporção de 78:22 entre 0,0 e 2,5
232 minutos; 75:25 entre 2,6 e 5,9 minutos; 65:35 entre 6,0 e 16,9 minutos, com retorno a
233 proporção inicial entre 17,0 e 20,0 minutos. O fluxo manteve-se constante em 1 mL.min⁻¹ e o
234 volume de injeção empregado foi de 20 µL. Os tempos de retenção para a impureza A,

235 tirofibana e impureza C foram 4,72, 8,38 e 12,88 minutos (figura 1), apresentando eficiência
236 na separação dos compostos, bem como seletividade para diferenciar produtos
237 estruturalmente semelhantes. O sistema cromatográfico apresentou-se adequado, com
238 simetria, número de pratos teóricos e resolução de acordo com o preconizado pela literatura.

239 A avaliação da seletividade do método foi avaliada através da confirmação de ausência
240 de interferentes inerente dos excipientes da formulação e dos produtos de degradação
241 formados em distintas condições de estresse. A forma farmacêutica Agrastat[®] é
242 comercializada no Brasil em tampão citrato, desta forma foi analisado, em triplicata, uma
243 amostra simulada de excipientes (ASE), em base aquosa.

244 Baseado no cromatograma ilustrado na figura 1 é possível verificar que não houve
245 interferência da ASE, tanto em relação ao fármaco, quanto às suas impurezas. A seletividade
246 do método analítico foi avaliada ainda em relação aos produtos de degradação gerados
247 mediante a exposição do cloridrato de tirofibana, solubilizado em metanol, às condições de
248 estresse.

249 Os resultados demonstram suscetibilidade às reações hidrolíticas, sendo que dentre
250 estas, a degradação em meio ácido demonstrou maior influência, acarretando uma degradação
251 de 19,63% da concentração inicial em 2 horas de exposição, enquanto que em meio básico
252 degradou 14,39% em 8 horas de exposição (Figura 1).

253 Em ambas reações de hidrólise foi possível detectar um produto de degradação com
254 mesmo tempo de eluição (16,8 minutos) e mesmos máximos de absorção (227 e 275 nm),
255 sugerindo que ocorre a formação do mesmo PD na hidrólise ácida e básica.

256 A tirofibana mostrou-se também suscetível a fotólise, com decaimento de 11,07% da
257 concentração quando exposta à luz UVA por 1 hora, todavia, a metodologia desenvolvida não
258 foi capaz de detectar os produtos oriundos desta degradação.

259 O fármaco não apresentou decréscimo da concentração, nem surgimento de produto de
260 degradação durante as 24 horas analisadas sob condições drásticas de estresse térmico e
261 oxidativo, podendo ser considerado praticamente estável a estas condições [24].

262 O método mostrou-se seletivo, ou seja, foi capaz de determinar o fármaco e as
263 impurezas A e C na presença do produto de degradação formado (Figura 1). A análise de
264 pureza de pico, avaliada pelo software do equipamento, utilizando o detector de arranjo de
265 fotodiodos, sugere que em todos os casos os picos analisados apresentaram pureza adequada.
266 Diante dos dados obtidos, pode-se afirmar que o método desenvolvido apresenta a capacidade
267 indicativa da estabilidade.

268 LQ e LD encontrados foram, respectivamente, 2,12 e 1,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para tirofibana,
269 0,09 e 0,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para impureza A e 0,08 e 0,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para impureza C. O valor de LQ
270 encontrado para as impurezas foi inferior ao respectivo limite de notificação estabelecido
271 pelas agências reguladoras [28] e, desta forma, a metodologia desenvolvida cumpre seu
272 propósito.

273 A linearidade do método foi estabelecida por meio do ensaio em triplicata, de forma
274 individual para a tirofibana e suas impurezas. Os coeficientes de correlação (r) obtidos para as
275 curvas analíticas, apresentaram valores de 0,9999, 0,9993 e 0,9994 para o cloridrato de
276 tirofibana, impureza A e impureza C, respectivamente. Estes resultados demonstraram uma
277 alta correlação entre a concentração dos analitos analisados e a resposta do equipamento,
278 estando de acordo com a literatura [21]. Na análise estatística por ANOVA (Tabela 1) os
279 resultados demonstraram-se significativos para regressão linear e não significativos para
280 desvio de linearidade, a um nível de significância de 5%, comprovando assim, uma correlação
281 linear entre as variáveis (Tabela 1).

282 A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. Os
283 resultados obtidos (Tabela 1) comprovam que a precisão do método desenvolvido se encontra
284 dentro dos limites aceitáveis, pois apresentou DPR inferior a 2% tanto nas análises de
285 repetibilidade quanto na precisão intermediária [25, 26, 27].

286 A exatidão foi determinada através do ensaio de recuperação, pelo método de adição
287 de padrão na matriz, relacionando a concentração observada e a nominal. As médias obtidas
288 encontram-se descritas na tabela 1. Foi observado satisfatório teor de recuperação para o
289 cloridrato de tirofibana e suas impurezas A e C, de 99,93%, 99,88% e 99%, respectivamente,
290 enquadrando-se com trabalhos da literatura que admitem uma variação de 2% para o produto
291 acabado [25,26], embora alguns autores permitam a expansão deste teor em até 20% para
292 impurezas de síntese [25,27].

293 A robustez do método foi avaliada a partir da determinação do fármaco e suas
294 impurezas mediante pequenas alterações nas condições cromatográficas nominais do método
295 desenvolvido. A tabela 2 apresenta o delineamento fatorial e análise estatística realizada. Os
296 resultados encontrados demonstram que não existe diferença estatística significativa
297 utilizando o teste T de *Student* para $p = 0,05$ (t crítico = 2,57).

298 *Cinética de degradação*

299 A tirofibana foi submetida a hidrólise ácida e fotólise para determinação da cinética de
300 degradação. Foi realizado ainda a degradação por hidrólise ácida do produto comercial -
301 Agrastat®. Os cromatogramas obtidos estão ilustrados na figura 2.

302 Foi possível observar o decaimento da concentração em todas condições
303 experimentadas, além da detecção de um produto de degradação gerado nas hidrólises ácidas,
304 tanto da tirofibana, quanto do Agrastat. Este apresentou tempo de retenção de 16,8 minutos,
305 com máximos de absorção no UV (227 e 276 nm), e pureza do pico igual a unidade. Foi

306 possível observar ainda que a medida que ocorreu o decaimento da concentração do fármaco,
307 ocorreu o aumento proporcional da área obtida para o produto de degradação. A partir destas
308 constatações, sugere-se que se trata do mesmo produto de degradação e, também, que a
309 presença dos excipientes da formulação do Agrastat não interferiu no processo.

310 Foi possível observar maior estabilidade do produto acabado em relação ao cloridrato
311 de tirofibana, quando submetidos às mesmas condições de estresse, sugerindo que os
312 excipientes presentes na forma farmacêutica, por se tratar de um sistema tamponado,
313 protegem o princípio ativo e prolongam o tempo de meia vida do medicamento.

314 Ao comparar o comportamento de fotodegradação do cloridrato de tirofibana com
315 diferentes solventes, pôde-se observar que o processo é acelerado quando em presença de
316 metanol, que atinge 61% de degradação em 4 horas de exposição, enquanto que ao utilizar
317 acetonitrila como diluente, atinge 53% em um período de 24 horas. Sugere-se que a
318 fotodegradação possa ser facilitada no meio mais polar e/ou pela influência que os prótons
319 existentes no metanol possam apresentar. De acordo com Ahmad e colaboradores ^[29], a
320 polaridade, a constante dielétrica e a viscosidade dos solventes são fatores que podem
321 influenciar na fotodegradação dos fármacos. Neste sentido, são necessários mais estudos com
322 solventes de diferentes polaridades para avaliar as influências sobre o fármaco em
323 degradações fotolíticas.

324 Os resultados obtidos estão descritos na tabela 3 e as representações gráficas de ordem
325 zero, primeira e segunda ordem obtidas nas condições estudadas estão representados na figura
326 3.

327 Foi possível observar que em todas condições analisadas o cloridrato de tirofibana
328 apresentou maior coeficiente de correlação quando representado graficamente na cinética de

329 reação de primeira ordem, ou seja, a velocidade de reação é dependente e proporcional à
330 concentração do reagente ^[30].

331 Os valores de k médios encontrados em cada cenário degradativo foram similares aos
332 coeficientes angulares (a) obtidos nas respectivas equações da reta. Os valores encontrados de
333 $t_{90\%}$ e $t_{1/2}$ indicam que a maior influência de degradação foi dada em fotólise, quando o
334 cloridrato de tirofibana foi solubilizado em metanol. Mesmo quando solubilizado em
335 acetonitrila, o fármaco sofreu forte influência do agente indutor de degradação, apresentando
336 valores baixos de $t_{90\%}$ e $t_{1/2}$ (Tabela 3).

337 Em relação à hidrólise ácida, os valores encontrados para o fármaco Agrastat[®]
338 demonstram maior estabilidade, fator positivo para comercialização e garantia de segurança
339 do consumidor. Acredita-se que o fato de o fármaco ser comercializado em tampão citrato
340 trabalha de forma positiva para proteção do medicamento e confere maior resistência à
341 degradação já que o fármaco cloridrato de tirofibana quando submetido a mesma condição
342 apresentou $t_{90\%}$ e $t_{1/2}$ inferiores em relação aos obtidos para o fármaco no produto acabado.

343 Considerando os resultados obtidos, o método desenvolvido e validado por CLAE-
344 DAD mostrou-se efetivo, específico, seletivo, sensível, linear, preciso, exato e robusto para
345 quantificar o fármaco tirofibana, os produtos de degradação gerados em condições de estresse
346 e duas de suas principais impurezas de síntese. Deste modo é apto a ser utilizado como
347 método analítico indicativo da estabilidade no controle de qualidade da matéria-prima de
348 cloridrato de tirofibana, como também, do produto acabado.

349 O cloridrato de tirofibana apresentou menor estabilidade em condições ácidas e frente
350 a luz (UVA), com cinética de primeira ordem, sendo necessário o controle destas condições
351 na manipulação do fármaco, visando garantir a eficácia terapêutica e segurança do produto
352 comercializado.

353 *Agradecimentos*

354 Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado
355 do Rio Grande do Sul – FAPERGS e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
356 Tecnológico - CNPq (Edital ARD/PPP/FAPERGS/CNPq – processo 16/2551-0000185-5).
357 Agradecemos ainda à Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda pela doação das amostras
358 de Agrastat®.

359 Tabela 1. Resultados obtidos para validação de metodologia analítica para determinação de Tirofibrina e impurezas A e C.

Linearidade									
Fontes de variação	Tirofibrina			Impureza A			Impureza C		
	Variância	F	F tab	Variância	F	F tab	Variância	F	F tab
Entre concentrações	669,70	628,95	3,48	13,10	3851,28	3,48	31,10	3920,96	3,48
Regressão Linear	2677,94	2515,0	4,96	52,45	15394,00	4,96	124,41	15673,00	4,96
Desvio da Linearidade	0,23	0,2*	3,71	0,012	3,70*	3,71	0,029	3,70*	3,71

Precisão									
Repetição	Tirofibrina			Impureza A			Impureza C		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3***	Dia 1	Dia 2	Dia 3***	Dia 1	Dia 2	Dia 3***
Média (n=6)	100,21	99,82	99,80	99,49	97,92	97,67	99,88	98,13	99,28
DPR (%)	0,49	0,49	0,44	1,55	1,55	1,18	1,77	1,77	1,78
Média (n=18)		99,94			98,36			99,09	
DPR (%)		0,46			1,43			1,64	

Exatidão									
	Tirofibrina			Impureza A			Impureza C		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	160,0	200,0	240,0	8,0	10,0	12,0	8,0	10,0	12,0
Recuperação (%)	100,19	99,55	100,05	102,12	100,41	97,13	99,22	100,91	96,89
Média** (DPR%)	99,93 (0,34)			99,88 (2,54)			99,00 (2,04)		

360 *Não significativo para $p = 0,05$. **Média de $n = 9$; *** Analista 2.
 361 Legenda: DPR = Desvio Padrão relativo; F= fator F; F tab= Fator F tabelado.

Tabela 2. Parâmetros avaliados e resultados obtidos na análise de robustez, do cloridrato de tirofibana e impurezas A e C.

		pH		Vazão (mL.min ⁻¹)		% ACN		λ (nm)		Temperatura (°C)		Coluna	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Tirofibana	Média (%)*	99,35	100,59	99,99	99,95	99,85	100,10	100,13	99,81	100,02	99,93	99,79	100,16
	DPR (%)	0,81	0,49	0,63	1,20	1,09	0,78	0,53	1,22	0,57	1,22	1,07	0,77
	t calc**	2,53		0,08		0,51		0,65		0,19		0,76	
	p-valor***	0,052		0,941		0,629		0,544		0,85		0,48	
Impureza A	Média (%)*	100,88	101,90	101,27	101,51	101,35	101,43	101,04	101,74	101,56	101,22	101,33	101,45
	DPR (%)	1,87	2,95	1,85	3,07	1,20	3,39	1,85	3,02	1,81	3,09	1,14	3,38
	t calc**	0,51		0,12		0,04		0,35		0,17		0,06	
	p-valor***	0,63		0,91		0,97		0,74		0,87		0,95	
Impureza C	Média (%)*	95,83	99,03	94,04	100,81	95,29	99,57	99,33	95,53	100,16	94,70	96,93	97,93
	DPR (%)	9,83	6,41	4,63	9,34	2,55	10,92	7,09	9,18	10,53	2,61	9,61	7,07
	t calc**	0,69		1,47		0,93		0,82		1,19		0,22	
	p-valor***	0,52		0,20		0,40		0,45		0,29		0,84	

363

* Média de n= 6 ** Não significativo para p=0,05 (p crítico = 2,57) *** Respostas estatísticas da aplicação do teste T de Student através da comparação dos parâmetros avaliados com o parâmetro nominal.

364

365

Legenda: % ACN= porcentagem de acetonitrila na composição da fase móvel; %M= percentual médio; λ= comprimento de onda; DPR= desvio padrão relativo; t calc= valor de t calculado a partir do teste T de Student.

366

Tabela 3. Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação e degradação do cloridrato de tirofibana e Agrastat® ao longo do tempo.

<i>Hidrólise ácida</i>						<i>Fotólise</i>					
	Tempo (h)	Degradação (%)	C (µg.mL ⁻¹)	Ln C	1/C	Tempo (h)	Degradação (%)	C (µg.mL ⁻¹)	Ln C	1/C	
<i>Tirofibana</i>	0,0	0,0	200,00	5,30	0,0050	<i>Tirofibana em Metanol</i>	0,0	0,00	200,00	5,30	0,0050
	1,0	10,82	178,36	5,18	0,0056		0,5	3,65	192,7	5,26	0,0052
	2,0	21,38	157,24	5,06	0,0064		1,0	11,07	177,86	5,18	0,0056
	3,0	30,98	138,04	4,93	0,0072		1,5	29,67	140,66	4,95	0,0071
	4,0	38,67	122,66	4,81	0,0082		2,0	34,34	131,32	4,88	0,0076
	5,0	45,10	109,79	4,70	0,0091		3,0	49,28	101,44	4,62	0,0098
	6,0	50,45	99,10	4,60	0,0101		4,0	61,03	77,94	4,36	0,0128
	7,0	55,63	88,74	4,49	0,0113		$k \bar{X} = 0,1831 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$ $t_{90\%} = 0,58 \text{ h}$ $t_{1/2} = 3,79 \text{ h}$				
$k \bar{X} = 0,1191 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$			$t_{90\%} = 0,89 \text{ h}$		$t_{1/2} = 5,82 \text{ h}$		0,0	0,0	186,80	5,23	0,0054
<i>Agrastat®</i>	0,0	0,0	177,90	5,18	0,0056	<i>Tirofibana em Acetonitrila</i>	0,5	2,86	181,45	5,20	0,0055
	6,0	6,89	165,64	5,11	0,0060		1,0	6,88	173,96	5,16	0,0057
	12,0	14,85	151,48	5,02	0,0066		2,5	11,32	165,66	5,11	0,0060
	24,0	25,19	133,08	4,89	0,0075		4,0	13,10	162,33	5,09	0,0062
	36,0	31,45	121,94	4,80	0,0082		6,0	18,63	152,00	5,02	0,0065
	48,0	38,84	108,80	4,69	0,0092		9,0	25,58	139,02	4,93	0,0070
	60,0	47,41	93,56	4,54	0,0107		12,0	32,35	126,37	4,84	0,0079
	72,0	52,70	84,15	4,43	0,0119		24,0	53,23	87,36	4,47	0,0114
$k \bar{X} = 0,0113 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$			$t_{90\%} = 9,36 \text{ h}$		$t_{1/2} = 61,24 \text{ h}$		$k \bar{X} = 0,043 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$ $t_{90\%} = 2,47 \text{ h}$ $t_{1/2} = 16,12 \text{ h}$				

Legenda: 1/C = Inverso da concentração; C= Concentração; h = horas; k= constante de velocidade de reação; Ln C = Logaritmo natural da concentração; $t_{1/2}$ = tempo meia vida; $t_{90\%}$ = tempo necessário para que a concentração inicial do fármaco decaia à 90 %.

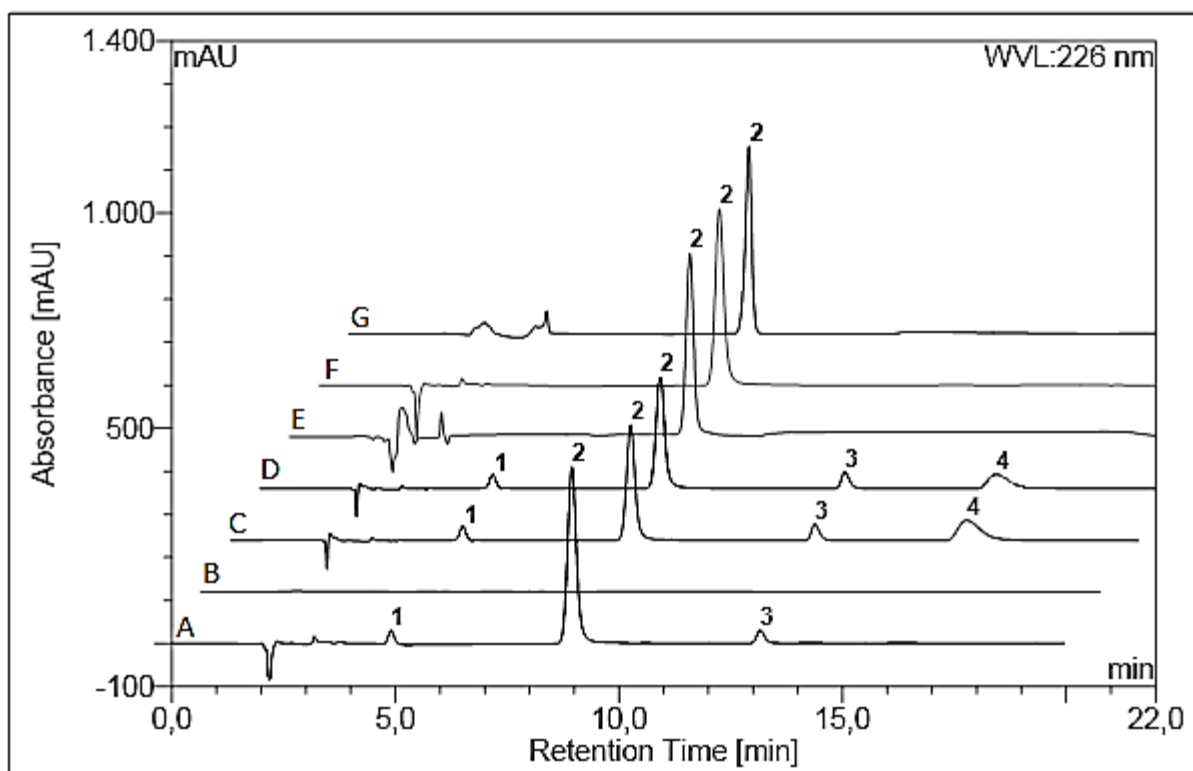


Figura 1. Sobreposição de cromatogramas.

Cromatograma A- Impureza A ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1) , cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 2) e impureza C ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 3).

Cromatograma B – Amostra simulada de excipientes (ASE).

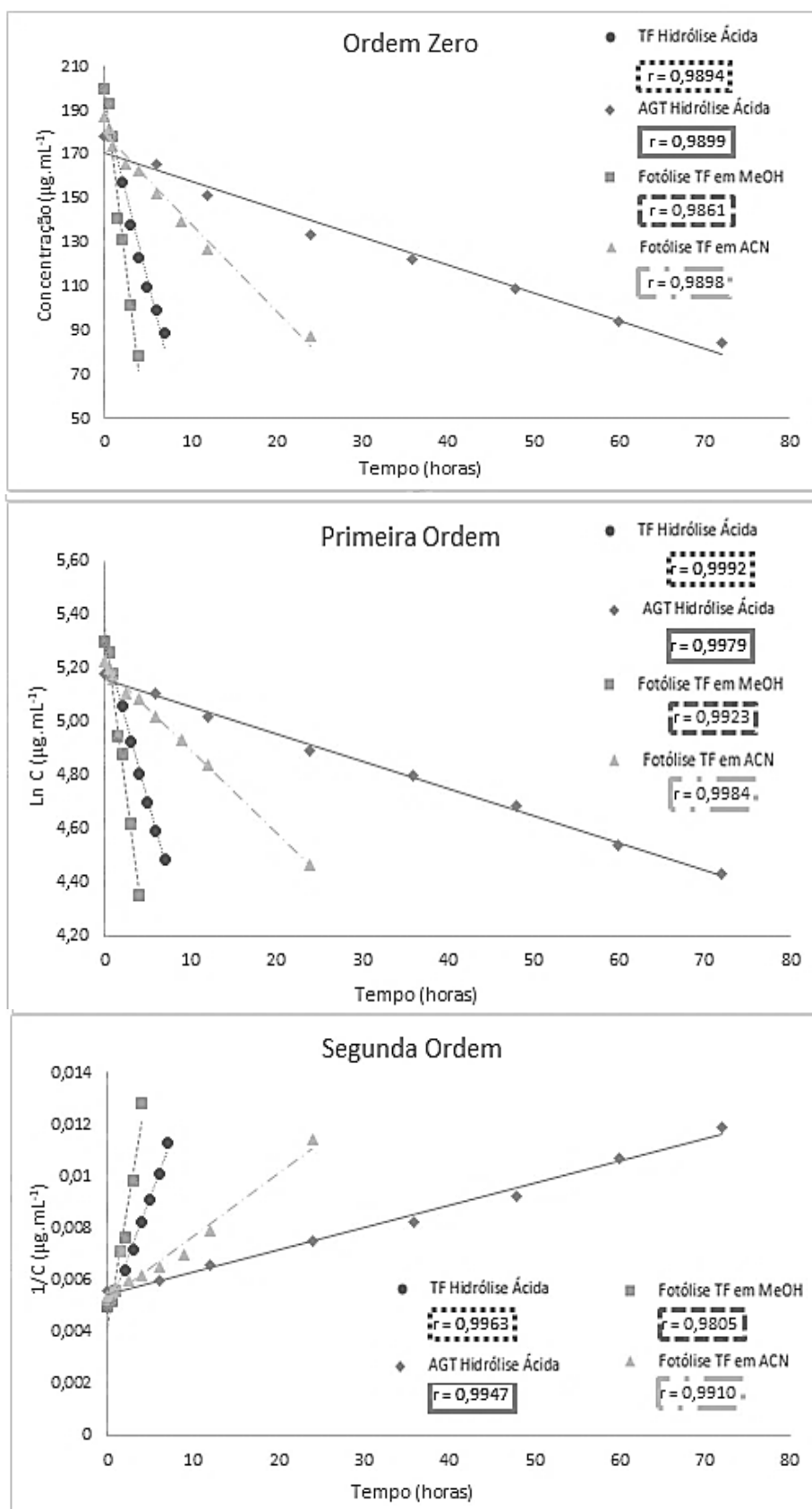
Cromatograma C - Resultante da degradação em hidrólise ácida ($\text{HCl } 1 \text{ mol.L}^{-1}$) durante 2 horas do cloridrato de tirofibana (pico 2), com adição de impureza A ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1) e impureza C ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 3) após neutralização, com surgimento de produto de degradação (pico 4).

Cromatograma D - Resultante da degradação em hidrólise básica ($\text{NaOH } 1 \text{ mol.L}^{-1}$) durante 8 horas do cloridrato de tirofibana (pico 2), com adição de impureza A ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1) e impureza C ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 3) após neutralização e com surgimento de produto de degradação (pico 4).

Cromatograma E - Resultante da degradação em fotólise (radiação UVA) durante 1 hora do cloridrato de tirofibana (pico 2).

Cromatograma F – Resultante da degradação oxidativa (H_2O_2 30%) após 24 horas de exposição do cloridrato de tirofibana (pico 2).

Cromatograma G - Resultante da degradação térmica ($75 \text{ }^\circ\text{C}$) após 24 horas de exposição do cloridrato de tirofibana (pico 2).



370

Figura 2. Cinéticas de reação de ordem zero, primeira e segunda ordem em condições de hidrólise ácida (1M) para Agrastat® e cloridrato de tirofibana, e fotólise (UVA) para o cloridrato de tirofibana em diferentes diluentes, e respectivas equações da reta e coeficiente de determinação.

Legenda: TF= Tirofibana; AGT = Agrastat®, MeOH = metanol; ACN= acetona; R²= Coeficiente de determinação.

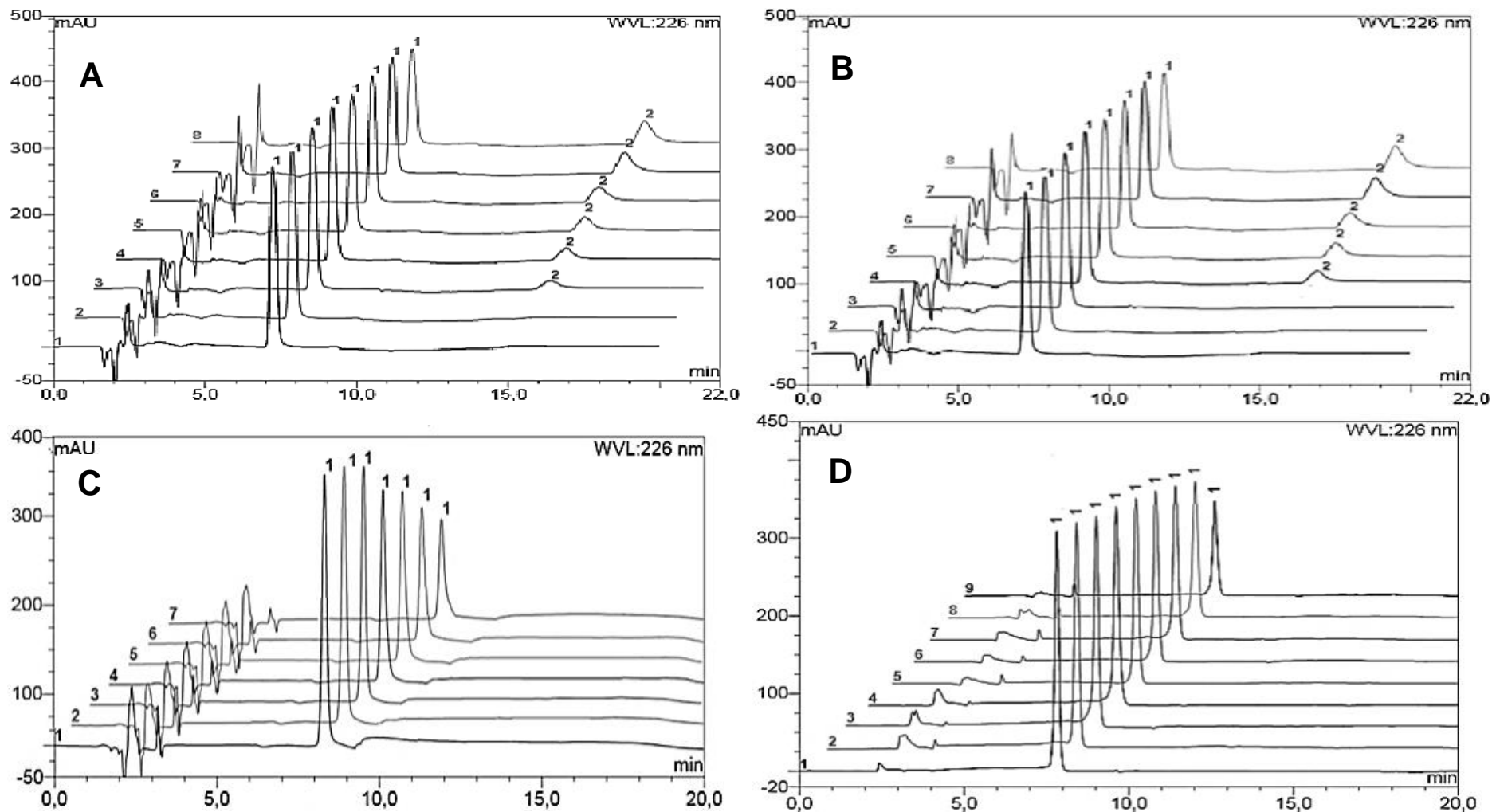


Figura 3. Sobreposição de cromatogramas demonstrando o decaimento da concentração ao longo do tempo resultantes da cinética de degradação em hidrólise ácida e fotólise (UVA)

Cromatograma A- Tirofibana (pico 1) em reação de hidrólise ácida (1M) ao longo do tempo, sendo o cromatograma 1 sem exposição ao agente indutor, e os consecutivos em tempo de 1 h (2), 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, e 7 h, com surgimento de produto de degradação (pico 2) a partir do tempo 2 horas. Cromatograma B – Agrastat® (pico 1) em reação de hidrólise ácida (1M) ao longo do tempo, sendo o cromatograma 1 sem exposição ao agente indutor e os consecutivos em tempo de 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h, com surgimento de produto de degradação (pico 2) a partir do tempo 24 horas. Cromatograma C – Tirofibana em reação de fotólise (UVA), solubilizada em metanol ao longo do tempo, sendo o cromatograma 1 sem exposição ao agente indutor, e os consecutivos em tempo de 30 min, 1 h, 1 h e 30 min, 2 h, 3 h, e 4 h. Cromatograma D – Tirofibana em reação de fotólise (UVA), solubilizada em acetonitrila ao longo do tempo, sendo o cromatograma 1 sem exposição ao agente indutor, e os consecutivos em tempo de 30 min, 1 h, 2 h e 30 min, 4 h, 6 h, 9 h, 12 h e 24 h.

371 *Referências*

- 372 [1] Gomes MEW, Fabris C, Filho JLB, Dreher R, Rosito GA. Antagonistas do receptor
373 plaquetário GPIIb/IIIa, Rev Ass Med Bras.2000;46:255-264.
- 374 [2] Rocha RM. Glicoproteínas IIb/IIIa. Artigo de Revisão.Revista SOCERJ,
375 2001;14:34-40.
- 376 [3] King S, Short M, Harmon C. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: The resurgence of
377 tirofibana, Vasc Pharmacol.2016;78:10-16.
- 378 [4] Barata-Silva C, Hauser-Davis RA, Silva ALO, Moreira JC. Desafios ao controle da
379 qualidade de medicamentos no Brasil. Cad. saúde colet. 2017;25:362-370.
- 380 [5] Bergquist PA, Hunke WA, Reed RA, Manas D, Forsyth RR, Cook J, Holahan M.
381 Compatibility of tirofibana HCl with dopamine HCl, famotidine, sodium heparin,
382 lidocaine HCl and potassium cgloride during simulated Y-site administration. J Clin
383 Pharm Ther.1999;24:125-132.
- 384 [6] Bergquist PA, Manas D, Hunke WA, Reed RA. Stability and compatibility of
385 Tirofiban hydrochloride during simulated Y-site administration with other drugs. Am J
386 Health-Syst Ph.2001;58:1218-23.
- 387 [7] Garabito MJ, Jimenez L, Bautista FJ, Perez-Rodrigo I. Stability of tirofiban
388 hydrochloride in 0,9% sodium chloride injection for 30 days. Am J Health-Syst
389 Ph.2001;58:1850-1852.
- 390 [8] Gandhimathi M, Athoti ST, Ravi TK. Three newer methods for the estimation of
391 tirofiban hydrochloride from pharmaceutical formulation. Indo Am J Pharm
392 Res.2013;3:9310-9315.

393 [9] Henriët T, Secrétan PH, Amrani F, Sadou-Yayé H, Bernard M, Solgadi A, Yagoubi
394 N, Do B. Phototransformation patterns of the antiplatelet drug in aqueous solution,
395 relevant to drug delivery and storage. *New J Chem.* 2016;40:1182-1194.

396 [10] Nataraj KS, Sai Kumar SV, Kalyani NVVS, Badru Duza M. Development and
397 validation of a reverse phase high performance liquid chromatographic method for the
398 estimation of tirofiban in pharmaceutical dosage forms, *Int J Pharm Pharm*
399 *Sci.*2013;5:200-203.

400 [11] Ranjitha KS, Rao AL. Development and validation of new rp-hplc method for the
401 determination of tirofiban in pharmaceutical formulation. *IJPCBS.*2011;1:43-47.

402 [12] El-Bagary RI, Elkady EF, Farid NA, Youssef NF. Stability study and valited
403 reversed phase liquid cromatographic method for the determination of tirofiban
404 hydrochloride in presence of tirosine as a process impurity. *Journal of the Chulean*
405 *Chemical Society.*v.63, n.2, 2018.

406 [13] Di Rago M, Saar E, Rodda LN, Ufus S, Kotsos A, Gerostamoulos D, Drummer
407 OH. Fast targeted analysis of 132 acidic na neutral drugs and poisons in whole blood
408 using LC-MS/MS, *Forensic Sci Int.*2014;243:35-43.

409 [14] Ellis JD, Hand EL, Gilbert JD. Use of LC-MS/MS to cross-validate a
410 radioimmunoassay for the fibrinogen receptor antagonist, Aggrastat (tirofibana
411 hydrochloride) in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.*1997;15:561-569.

412 [15] Oertel R, Köhler A, Koster A, Kirch, W. Determination of Tirofiban in human
413 serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J Chromatogr*
414 *B.*2004;805:181-185.

415 [16] Darkovsaka-Serafimovska M, Janevik-Ivanovska E, Arsova-Sarafinovska Z,
416 Djorgoski I, Ugresic N. Development and validation of reverse phase high performance
417 liquid chromatographic method for determination of tirofiban in serum. Int J
418 Pharm.2014;4:115-120.

419 [17] Darkovsaka-Serafimovska M, Janevik-Ivanovska E, Balkanov T, Ugresic N.
420 Development of alternative HPLC method for the determination of tirofiban in rat
421 serum. Maced J Chem Eng.2016;35:1-8.

422 [18] Vickers S, Theoharides AD, Arison B, Balani SK, Cui D, Duncan CA, Ellis
423 JD, Gorham LM, Polsky SL, Prueksaritanont T, Ramjit HG, Slaughter DE, Vyas KP. In
424 vitro and in vivo studies on the metabolism of tirofibana. Drug Metab
425 Dispos.1999;27:1360-1366.

426 [19] Yang S, Peiwu G, Lin Y, Zhang Z. Bioavailability and pharmacokinetic study of
427 tirofibana in rat by liquid chromatography mass spectrometry. Lat Am J
428 Pharm.2016;35:44-46.

429 [20] Ng L, Lunn G, Faustino P. Organic impurities in drug substance: origin, control,
430 and measurement. In: Analysis of Drug Impurities. SMITH R.J.; WEBB. M.L. Oxford:
431 Blackwell Publishing, 2007. p 1 - 46.

432 [21] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for
433 Registration of Pharmaceuticals for Human Use - ICH. Guideline on Validation of
434 Analytical Procedure–Methodology Q2B(R1). ICH Steering Committee: Switzerland,
435 2005.

436 [22] Merck. Bula do medicamento Aggratad®. 1998. Disponível em:
437 <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/1998/20912lbl.pdf>. Acesso
438 em: maio 2017.

439 [23] Vander Heyden. Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.; Massart,
440 D.; Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. Journal of
441 pharmaceutical and biomedical analysis 2001, 24, 723-753.

442 [24] Sing S, Bakshi M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent
443 Stability of Drugs. Pharma Technol OnLine, 2000:1-14.

444 [25] Ermer J, Miller JHMcB. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide
445 to Best Practice. Eds. Weinheim: Wiley-VCH,2005.

446 [26] Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em
447 métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quím nova. 2004; 27:771-780.

448 [27] Silva AFA, Validação de Métodos analíticos para controlo de Qualidade de um
449 Medicamento, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Dissertação,
450 Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

451 [28] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for
452 Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Substances -
453 Q3A (R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2006.

454 [29] Ahmad I., Bano R., Sheraz M.A., Ahmed S., Mirza T., Ansari S.A.
455 Photodegradation of levofloxacin in aqueous and organic solvents: a kinetic study.
456 Acta Pharmaceutica 2013, 63, 223-229.

457 [30] Allen Jr LV. Introdução à Farmácia de Remington. Porto Alegre: Artmed Editora;
458 2016.

5. DISCUSSÃO GERAL

5.1. Preparo da amostra

Foram preparadas soluções mãe do cloridrato de tirofibana e das impurezas A e C, nas concentrações de $580 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $240 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $280 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, mediante dissolução do pó dos padrões analíticos em metanol, com o auxílio de sonicação por 5 minutos. As soluções foram armazenadas hermeticamente em frasco âmbar e mantidos sob refrigeração.

Para preparar as soluções de trabalho, as soluções mãe foram diluídas em metanol para obtenção das concentrações de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cloridrato de tirofibana e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as impurezas A e C.

A solução de trabalho da amostra comercial foi preparada mediante a diluição do fármaco em metanol para obtenção da solução na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As amostras foram filtradas com filtro de seringa de nylon ($0,45 \mu\text{m}$; 13 mm) antes da injeção no cromatógrafo.

5.2. Desenvolvimento de metodologia.

O desenvolvimento do método analítico envolve a otimização de vários estágios como a separação cromatográfica e a quantificação. Parâmetros como o comprimento de onda, coluna cromatográfica, fase móvel (composição, pH e vazão) devem ser pré-estabelecidos com critério.

Para determinação do comprimento de onda foi realizado uma varredura espectral, na região do ultravioleta, utilizando o detector de arranjo de fotodiodos acoplado ao CLAE. O pico máximo de absorção do cloridrato de tirofibana foi avaliado no produto acabado (Agrastat[®]), e no padrão analítico, solubilizados em três solventes distintos: água ultrapurificada, metanol e acetonitrila (Figura 7).

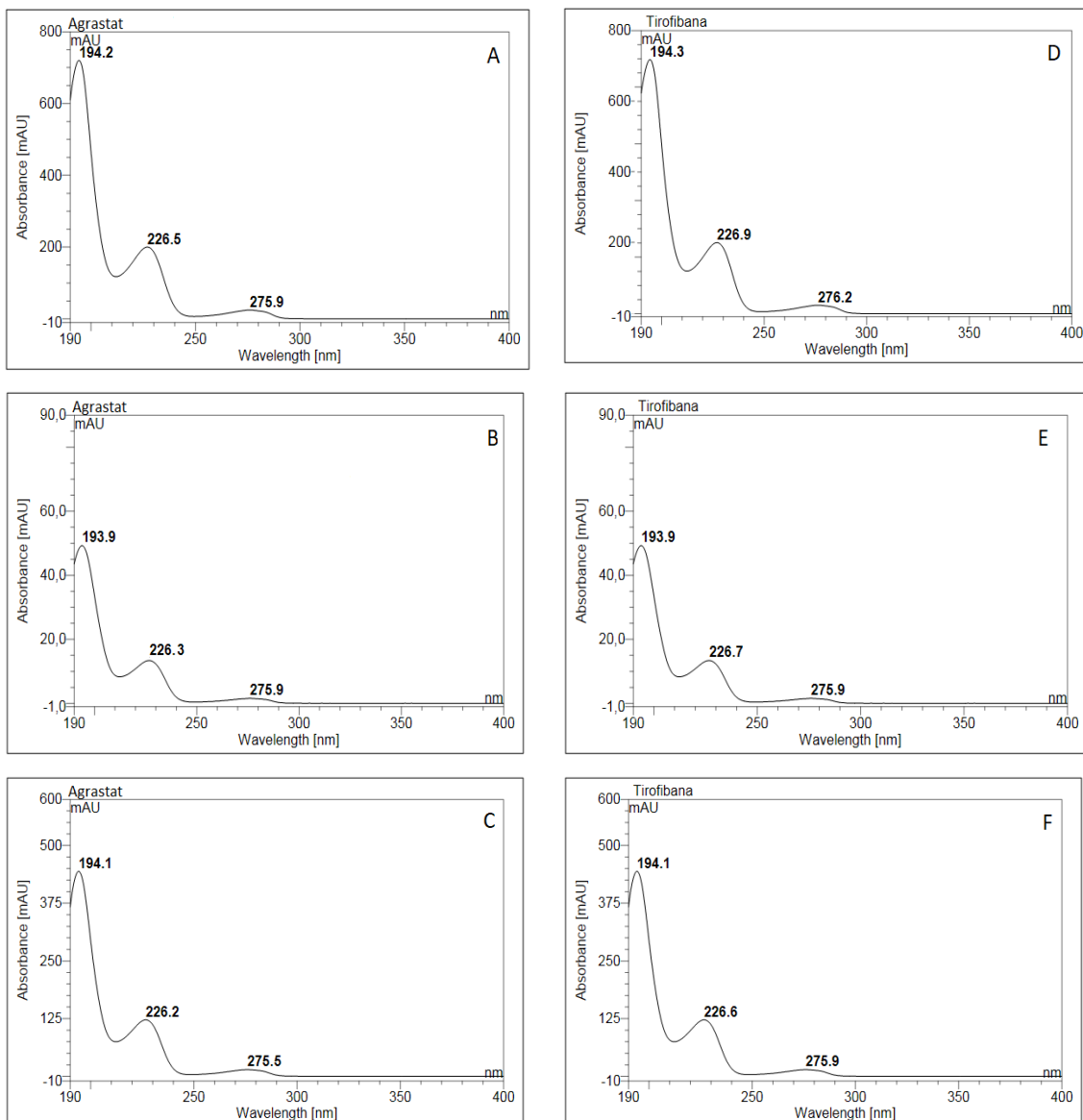


Figura 7. Espectros de absorção do cloridrato de tirofibana, obtidos através de varredura em detector de arranjo de fotodiodos acoplado à CLAE em diferentes diluentes.

- A-** Formulação farmacêutica comercial Agrastat®, em tampão citrato, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando água ultrapurificada como diluente.
- B-** Formulação farmacêutica comercial Agrastat®, em tampão citrato, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando acetonitrila como diluente.
- C-** Formulação farmacêutica comercial Agrastat®, em tampão citrato, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizando metanol como diluente.
- D-** Cloridrato de tirofibana, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com água ultrapurificada como diluente.
- E-** Cloridrato de tirofibana, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com acetonitrila como diluente.
- F-** Cloridrato de tirofibana, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com metanol como diluente.

Os espectros na região do UV, na faixa de 200 a 400 nm, obtidos para o fármaco Agrastat® e para o cloridrato de tirofibana apresentaram máximos e mínimos de absorção em comprimentos de onda muito próximos entre as amostras. Os máximos de absorção encontrados foram de aproximadamente 226 e 276 nm.

Não apresentou, ainda, distinção destes máximos de absorção entre os solventes utilizados, inclusive quando comparados aos relatados por Henriët e colaboradores (2016) que realizaram esta varredura em cloridrato de tirofibana em meio aquoso, mesmo com composição de fase móvel diferente da utilizada neste trabalho. No entanto, foi possível observar que quando utilizado acetonitrila como diluente a intensidade do sinal foi inferior quando comparado aos demais solventes.

O cloridrato de tirofibana apresenta baixa solubilidade em água, pouca solubilidade em acetonitrila e boa solubilidade em metanol. Considerando estas características e os máximos de absorção obtidos, o metanol mostrou-se o solvente mais adequado para realização das análises.

O uso de metodologias por CLAE com coluna de fase reversa octadecilsilano (C₁₈) é largamente empregado na determinação de fármacos (LEITE, 2008). Diversos autores, que desenvolveram metodologia analítica para quantificação e identificação do fármaco cloridrato de tirofibana, como já elucidado na tabela 4, utilizaram coluna com esta característica. Deste modo, selecionou-se a coluna de fase reversa C18 para o desenvolvimento da metodologia analítica.

Considerando a necessidade de ensaios rápidos e eficientes, optou-se pela utilização de uma coluna com menor tamanho de partícula. Esta característica eleva a eficiência de separação, pela redução do diâmetro de partícula do recheio da coluna (LEITE, 2008). Elencou-se, então, uma coluna de proporção 50 x 2,1 mm, com partículas de 3µm (Agela Technologies, Venusil ASB C18), em temperatura ambiente.

A composição da fase móvel foi avaliada em diferentes proporções e pH, utilizando solução aquosa de trietilamina 0,1% acidificada e acetonitrila. O teste de proporção entre a fase aquosa e orgânica compreendeu teores entre 50:50 e 90:10 (v/v). A fração aquosa foi acidificada com ácido fosfórico para obtenção de soluções com pH compreendido entre 2,3 e 5,0. O fluxo foi mantido isocrático em 1 mL.min⁻¹ e o volume de injeção foi de 20 µL. Os cromatogramas obtidos nestas condições encontram-se ilustrados na figura 8.

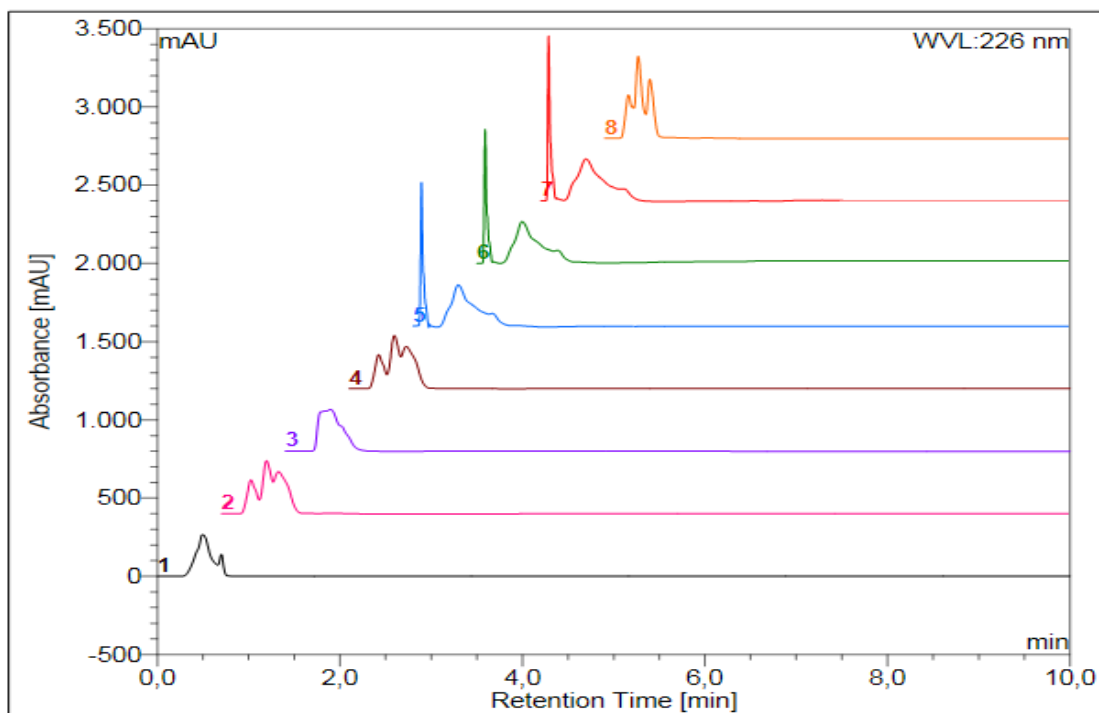


Figura 8. Sobreposição de cromatogramas, de diferentes condições para o desenvolvimento de método. Injeção de 20 μL de Cloridrato de tirofibana $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sob fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C_{18} ($50 \times 2,1 \text{ mm}$, 3μ), detector DAD a 226 nm.

Cromatogramas: 1 - Trietilamina 0,1% pH3,0:Acetonitrila (50:50 (v/v)); 2- Trietilamina 0,1% pH3,0:Acetonitrila (70:30 (v/v)); 3- Trietilamina 0,1% pH3,0:Acetonitrila (90:10 (v/v)); 4- Trietilamina 0,1% pH5,0:Acetonitrila (70:30 (v/v)); 5- Trietilamina 0,1% pH5,0:Acetonitrila (80:20 (v/v)); 6- Trietilamina 0,1% pH4,0:Acetonitrila (80:20 (v/v)); 7- Trietilamina 0,1% pH3,5:Acetonitrila (80:20 (v/v)); e 8- Trietilamina 0,1% pH3,5:Acetonitrila (75:35 (v/v)).

Nestas condições, não foi possível obter uma condição cromatográfica com resultados aceitáveis nos parâmetros de adequabilidade do sistema, sendo necessário readequar a metodologia.

Novos ensaios foram realizados substituindo a coluna cromatográfica. O volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ de amostra foi mantido, e a coluna foi substituída por uma C_{18} ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) (Agela Technologies, Promosil C_{18}), em temperatura ambiente. As condições da fase móvel também foram readequadas, ampliando a faixa de pH estudado (2,5 e 6,0) e a proporção entre trietilamina 0,1% acidificada e acetonitrila foi restringida na faixa entre 65:35 e 75:25 (v/v).

As alterações propostas permitiram maior tempo de retenção do fármaco. Foi observada melhor interação do fármaco com a coluna e a fase móvel, proporcionando maior tempo de retenção do pico do fármaco, que pode ser observado através da sobreposição dos cromatogramas ilustrado na figura 9.

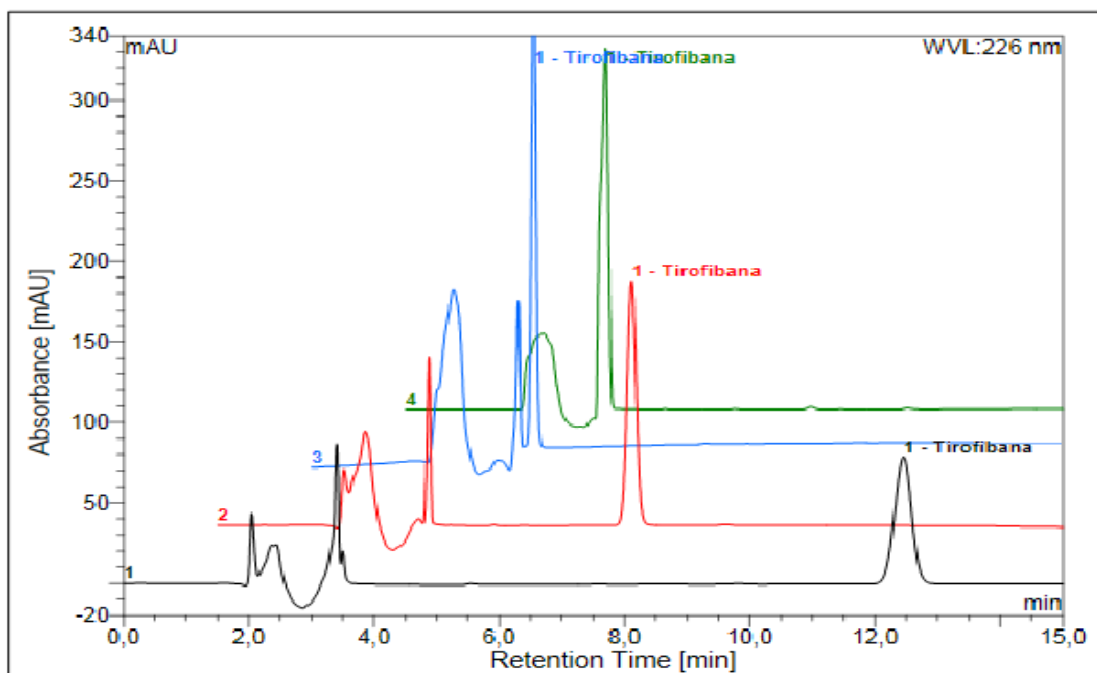


Figura 9. Sobreposição de cromatogramas resultantes de diferentes condições utilizado para o desenvolvimento de método. Injeção de 20 μL de cloridrato de tirofibana $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sob fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C_{18} (250 x 4,6 mm, 5 μm), detector DAD 226 nm. Fase móvel composta por Trietilamina 0,1% pH5,5:Acetonitrila em diferentes proporções: Cromatogramas: 1- (78:22 (v/v)); Cromatograma 2- (75:25 (v/v)); Cromatograma 3- (70:30 (v/v)); Cromatograma 4- (65:35 (v/v)).

Pequenas alterações na proporção da fase móvel proporcionaram mudanças bruscas no tempo de retenção, um fator incomum, não relatado na bibliografia estudada. Enquanto que com a proporção de fase móvel 78:22, o tempo de retenção foi de 12,46 min com redução de apenas 3,0% da fração aquosa, na proporção de 75:25, o tempo de retenção foi reduzido para praticamente a metade (6,61 min). Na proporção de 70:30, com redução de 5,0% da fração aquosa, o tempo de retenção obtido novamente reduziu pela metade, apresentando o pico em 3,55 min. Já na proporção de 65:35, novamente uma redução de 5,0% da fração aquosa, o tempo de retenção apresentou menor oscilação (3,19 min), porém este não apresentou eficiência nem satisfatoriedade em relação ao volume morto.

Esta variação em relação ao tempo de retenção pode ocorrer devido ao caráter da mistura água acidificada e acetonitrila, associada a capacidade de ionização do analito. Quando isolada, o caráter prótico e polar da água (um forte doador de ligações de hidrogênio) é amplificado ao ser acidificada, apresentando maior tendência de doar H ao soluto, enquanto que o solvente acetonitrila (que apresenta caráter pouco menos polar que a água, mas que apresenta H alcano de hibridização) possui capacidade de receber H do soluto (ANAIA, 2014).

Quando em mistura, água e acetonitrila apresentam caráter moderadamente básico, pelos pares elétricos isolados de ambos constituintes, favorecendo que a mistura doe H para o soluto. Esta capacidade sofre grande variação de acordo com a proporção da mistura, com elevação da constante dielétrica na medida em que a fração aquosa é elevada, aumentando também a camada de solvatação, sendo amplificada pela acidificação do meio (ANAIA, 2014).

Estas reações não se limitam a interação solvente/solvente, estendem-se a ligação química com a molécula. A mistura água/acetonitrila é microscopicamente heterogênea e apresenta interação inferior à interação entre agrupamentos de moléculas com acetonitrila (ANAIA, 2014).

Quando a molécula analisada apresenta baixa ionização, a proporção da fase móvel composta por água/acetonitrila apresenta menor interferência, visto que há menor interação molécula/acetonitrila, favorecendo o equilíbrio solvente-solvente, pela solubilidade de Hildebrand, definida pela energia requerida para separar as moléculas do solvente entre si (ANAIA, 2014).

A tirofibana é um ácido fraco e se encontra majoritariamente ionizada, com dependência do pH do meio (O'NEIL, et al., 2013). Apresenta em sua estrutura molecular amina secundária e ácido carboxílico que favorece a protonação e subsequente liberação de hidrogênio para o meio.

Associando esta característica à capacidade da mistura na fase móvel utilizada em receber hidrogênio, sugere-se uma variação na capacidade de solvatação entre a mistura (microscopicamente heterogênea) constituinte da fase móvel. A interação com acetonitrila é favorecida pela força da ligação acetonitrila/molécula apresentando maior interação com a fase móvel, diminuindo o tempo de retenção, em outro momento, a interação com a fase aquosa é favorecida elevando o tempo de retenção. A camada de solvatação da fase aquosa é amplificada quando acidificada, estendendo ainda mais o tempo de retenção, devido a interação da fase molecular não dissociada da tirofibana e a cadeia da fase estacionária.

As fases móveis majoritariamente aquosas são indicadas para compostos neutros, enquanto que para compostos ionizáveis como a tirofibana é preferível o uso combinado com uma fase orgânica e soluções com pH adequado, uma vez que estes

mantêm o grau de ionização das moléculas e evitam os problemas de retenção secundária, responsáveis pela formação de picos com caudas (HARRIS, 2012).

Considerando estas características e os parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos, foi elencada a proporção 75:25 (trietilamina 0,1% acidificada:acetonitrila) (v/v) como fase móvel de trabalho.

O pH da fase móvel aquosa também demonstrou influência sobre o tempo de retenção do cloridrato de tirofibana (Figura 10). Observou-se que o tempo de retenção aumentou bruscamente em pH de 3,0 (15,1 minutos), apresentando simetria de 1,52. Ao elevar o pH da solução de trietilamina ocorreu diminuição no tempo de retenção, apresentando os valores de 7,2 minutos para o pH 4,0; 6,7 minutos para o pH 3,0; 6,6 minutos para o pH 5,0 e pH 5,5; e 6,5 minutos para o pH 6,0. Foi possível também observar melhores simetrias associadas à elevação do pH, sendo de 0,93 para o pH 4,0; 0,99 à pH 4,5 e 1,0 para os demais pH mencionados.

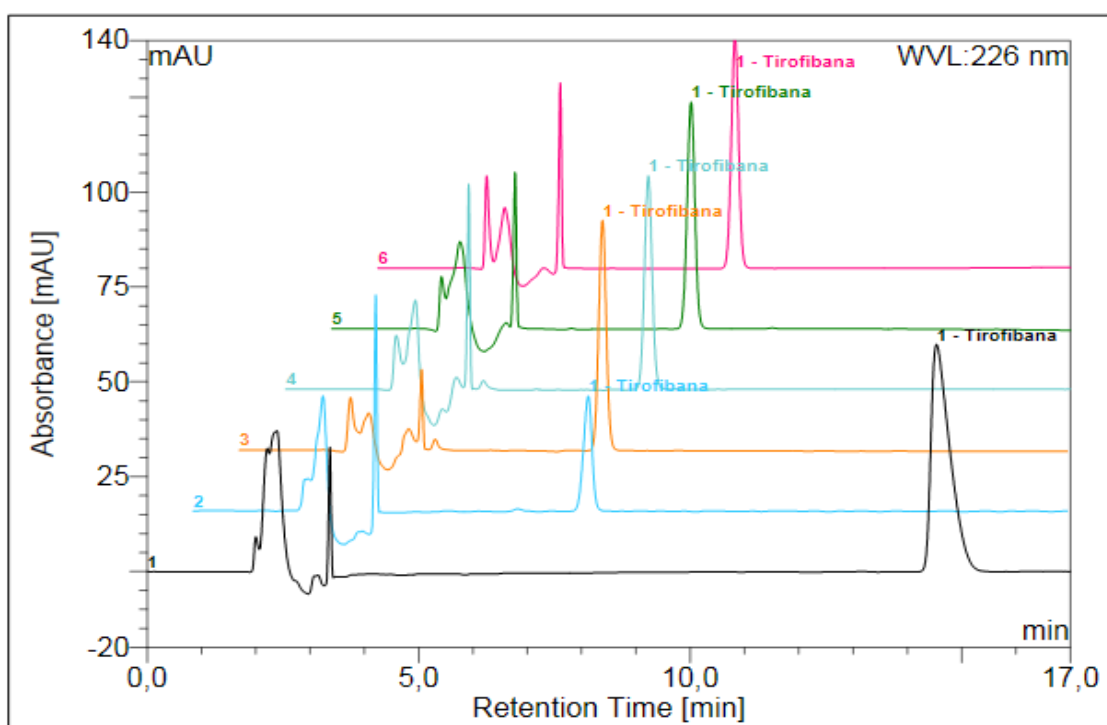


Figura 10. Sobreposição de cromatogramas, com leve deslocamento de tempo e absorvância, de diferentes condições utilizadas para o desenvolvimento de método. Injeção de 20 μL de Cloridrato de tirofibana $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sob fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna C_{18} (250 x 4,6 mm, 5 μm), detector DAD 226 nm. Fase móvel composta por Trietilamina 0,1% acidificada:Acetonitrila (75:25 (v/v)), em diferentes pH.

Cromatogramas: 1- pH 3,0; Cromatograma 2- pH 4,0; Cromatograma 3- pH 4,5; Cromatograma 4- pH 5,0; Cromatograma 5- pH 5,5; e Cromatograma 6- pH 6,0.

A variação do pH da fase móvel permitiu o ajuste do tempo de retenção da tirofibana e, conseqüentemente, a realização de corridas mais curtas. Observou-se que o tempo de retenção é maior em pH ácido que em fases móveis com pH mais elevado, o que era esperado, pois, por se tratar de um ácido fraco (pKa 3,3) a tirofibana encontra-se predominantemente ionizado em valores de pH alcalinos e, desta forma, a interação do fármaco ionizado com a fase reversa é menor e o tempo de retenção provavelmente diminui. De modo contrário, valores de pH ácidos favorecem a forma molecular do fármaco e aumentam a afinidade do mesmo por colunas de fase reversa, elevando o tempo de retenção.

As metodologias analíticas desenvolvidas para análise do cloridrato de tirofibana em forma farmacêutica descritas na literatura relatam, sem exceção, o uso de tampão, porém o pH utilizado variou, sendo em sua maioria ácidos, com pH 2,3 (BERGQUIST et al., 1999; BERGQUIST et al., 2001; GARABITO et al., 2001), pH 3,0 (NATARAJ et al., 2013; RANJITHA & RAO, 2011) e pH 5,0 (GANDHIMATHI et al., 2013).

Por apresentar menor variação no tempo de retenção, melhor simetria e para evitar pH próximo ao pKa do fármaco, optou-se por trabalhar com o pH 5,5 na fase aquosa acidificada, visto que o pH da fase móvel pode deslocar o equilíbrio da ionização do soluto para sua forma molecular.

Dentre as condições testadas, a utilização da fase móvel trietilamina 0,1% pH 5,5 (ajustado com ácido fosfórico) e acetonitrila, na proporção 75:25 sob fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ apresentou melhores resultados nos parâmetros de adequabilidade do sistema, com tempo de retenção de 6,6 minutos e simetria do pico igual a unidade.

A partir desta condição estabelecida, iniciou-se o estudo do perfil cromatográfico das impurezas de síntese. As impurezas A e C foram solubilizadas em metanol para o preparo da solução mãe e posterior soluções de trabalho, nas concentrações 22 µg.mL⁻¹ e 28 µg.mL⁻¹, respectivamente.

A varredura espectral utilizando detector de arranjo de fotodiodo acoplado a CLAE foi realizada na região do ultravioleta (200 - 400 nm) e os máximos de absorção encontrados foram de 224,4 e 276,1 nm para impureza A e 226,7 e 255,6 nm para impureza C (figura 11). Sendo assim, foi mantido o comprimento de onda previamente estabelecido em 226 nm.

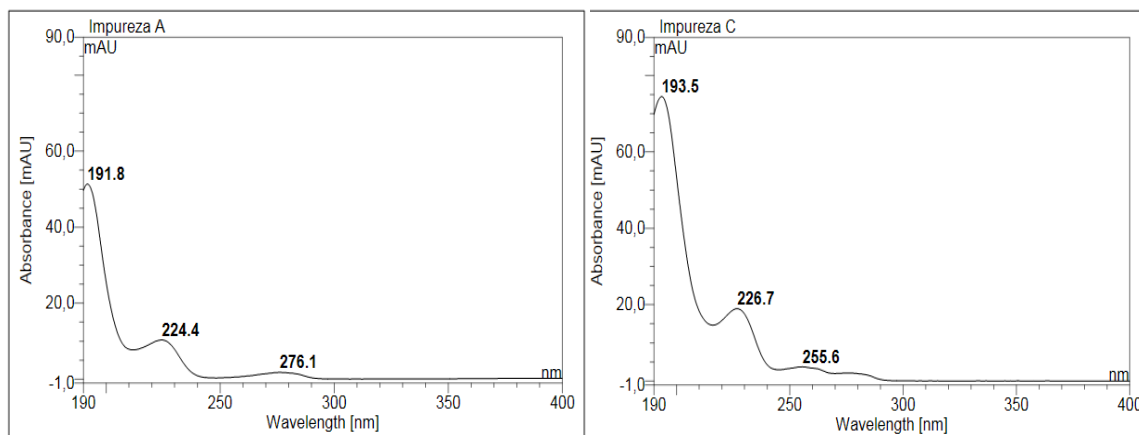


Figura 11. Espectro de absorção das impurezas A e C na concentração de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução metanólica.

Nas condições cromatográficas supracitadas a impureza A apresentou tempo de retenção de 3,8 minutos, com baixo fator de capacidade (k'). A impureza C apresentou tempo de retenção de 78 minutos, ou seja, tempo excessivo para viabilizar a determinação destes compostos em uma rotina analítica. Sendo assim, iniciou-se o desenvolvimento de metodologia com emprego de gradiente.

O emprego de gradiente possibilita obter uma metodologia com boa resolução entre os compostos analisados, com um tempo de corrida inferior, quando comparado com a eluição isocrática. Para eluição das substâncias por gradiente deve ser levado em consideração o tempo de residência da fase móvel que resulta em variações nos tempos de retenção, que pode comprometer a resolução no sinal das alterações dos teores dos constituintes da fase móvel. Visando minimizar o efeito da transição durante a eluição foi realizado um branco, utilizando o solvente diluente do padrão (metanol), para desconto da linha de base.

Para o desenvolvimento do método foram mantidas as variáveis de tipo de coluna, fluxo, volume de injeção e detecção já estipulados. Foram estudados gradientes com variações nas proporções de fase móvel, com alteração em diferentes tempos de corridas, visando obter uma condição que permitisse a detecção da tirofibana e suas impurezas, com adequabilidade do sistema, em um tempo de corrida que permitisse aplicação em rotinas analíticas.

As variáveis experimentadas, bem como respectivos tempos de retenção obtidos para o cloridrato de tirofibana e impurezas A e C estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Diferentes condições de gradiente e respectivos tempos de retenção da Tirofibana e Impurezas A e C.

Condição	Tempo (min)	Trietilamina 0,1% (pH5,5): Acetonitrila	Tempo de retenção (min)		
			Impureza A	Tirofibana	Impureza C
1	0,0 – 2,9	78:22	4,99	8,39	10,60
	3,0 – 6,9	70:30			
	7,0 – 30	50:50			
	30,1 – 35	78:22			
2	0,0 – 2,9	78:22	4,97	8,12	9,78
	3,0 – 6,4	70:30			
	6,5 – 9,9	40:60			
	10,0 – 15,0	78:22			
3	0,0 – 2,9	78:22	4,90	7,32	9,33
	3,0 – 5,9	70:30			
	6,0 – 7,9	40:60			
	8,0 – 15,0	78:22			
4	0,0 – 3,4	78:22	4,88	7,57	9,25
	3,5 – 5,9	68:32			
	6,0 – 6,8	38:62			
	7,0 – 12,0	78:22			
5	0,0 – 3,9	78:22	4,85	8,04	9,27
	4,0 – 5,9	70:30			
	6,0 – 6,8	40:60			
	7,0 – 12,0	78:22			
6	0,0 – 2,9	80:20	5,85	8,40	8,77
	3,0 – 5,9	65:35			
	6,0 – 7,9	38:62			
	8,0 – 12,0	80:20			
7	0,0 – 2,9	79:21	5,30	7,31	8,97
	3,0 – 5,4	69:31			
	5,5 – 7,9	45:55			
	8,0 – 12,0	79:21			
8	0,0 – 2,5	78:22	5,06	7,92	9,75
	2,6 – 4,4	73:27			
	4,5 – 7,5	60:40			
	7,6 – 12,0	78:22			
9	0,0 – 2,0	78:22	5,14	6,56	9,32
	2,2 – 4,4	70:30			
	4,5 – 7,5	68:42			
	7,6 – 12,0	78:22			
10	0,0 – 2,5	78:22	5,03	6,60	8,71
	2,6 – 4,4	70:30			
	4,5 – 7,5	55:45			
	7,6 – 12,0	78:22			
11	0,0 – 2,5	78:22	4,91	8,56	13,25
	2,6 – 5,9	75:25			
	6,0 – 11,9	65:35			
	12,0 – 15,0	78:22			

Nas condições compreendidas entre 1 e 10 (tabela 5) ocorreu co-eluição entre pelo menos um dos compostos analisados, impedindo a correta integração dos picos, sendo esta a principal barreira a ser superada nesta etapa. Foi necessário encontrar a proporção e tempo de alteração ideal, visando completa separação dos compostos analisados, sendo esta condição encontrada no método 11, descrito na tabela 5.

Objetivando um método indicativo de estabilidade, foi realizada a degradação do fármaco em condições forçadas, visando a resolução entre o cloridrato de tirofibana, seus produtos de degradação gerados e as impurezas A e C. O processo de degradação forçada do cloridrato de tirofibana será abordado na íntegra no item 5.3.1 deste trabalho.

A degradação hidrolítica apresentou produto de degradação detectado pela metodologia desenvolvida, porém em tempo de retenção extremamente longo, superando duas horas de corrida analítica, sendo necessário nova readequação.

Utilizando-se da metodologia de gradiente já estabelecida e embasando-se na grande alteração nos tempos de retenção, a partir de pequenas variações na proporção da fase móvel, já discutido anteriormente, alterou-se o gradiente mantendo-se por uma maior parcela de tempo a elevação da proporção orgânica na fase móvel.

Sendo assim, a condição do gradiente manteve as proporções já estabelecidas (78:22; 75:25; 65:35 e 78:22), com modificação na terceira etapa, acrescentando o tempo da proporção 65:35 em 5 minutos (0,0 - 2,5; 2,6 - 5,9; 6,0 - 16,9 e 17,0 - 20,0 minutos).

Esta adequação proporcionou a diminuição do tempo de retenção do pico do produto de degradação gerado pelo estresse hidrolítico, sem alterar os tempos de retenção já estabelecidos para o cloridrato de tirofibana e suas impurezas. Apresentou boa resolução entre os picos em um tempo de corrida total de 20 minutos, tempo aceitável para aplicação em rotinas de análise laboratoriais. Por fim, as condições do método analítico desenvolvido estão descritas na tabela 6.

Tabela 6. Condições cromatográficas utilizadas na validação do método por CLAE-DAD para determinação quantitativa de Tirofibana e impurezas de síntese.

Parâmetro	Descrição
Coluna	C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm (Agela Technologies, Promosil C18)
Temperatura	Ambiente
Fase Móvel	Solução aquosa de Trietilamina 0,1%, pH5,5:Acetonitrila (v/v), na seguinte condição: 0,0 – 2,5 min → 78:22 2,6 – 5,9 min → 75:25 6,0 – 16,9 min → 65:35 17,0 – 20,0 min → 78:22
Vazão	1,0 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Deteção	Luz ultravioleta no detector de arranjo de diodo a 226 nm.
Tempo de corrida	20 minutos

Nas condições citadas na tabela 6, os tempos de retenção para a impureza A, tirofibana e impureza C foram 4,72, 8,38 e 12,88 minutos, apresentando eficiência na separação dos compostos, bem como seletividade para resolver produtos estruturalmente semelhantes (Figura 12).

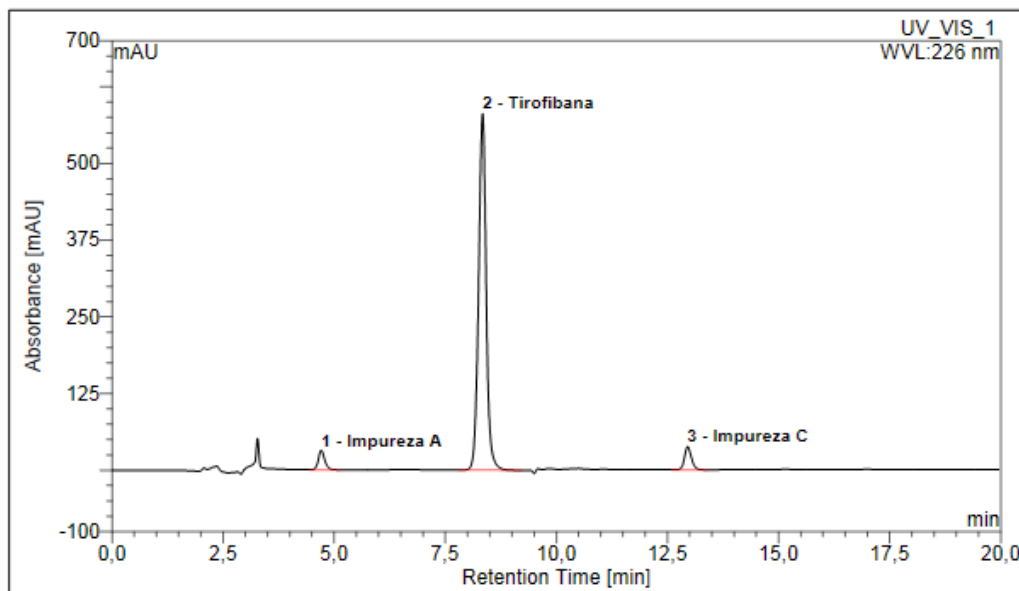


Figura 12. Cromatograma da metodologia desenvolvida para análise de cloridrato de tirofibana e suas impurezas A e C. 1- Impureza A (10 µg.mL⁻¹). 2- Tirofibana (200 µg.mL⁻¹). 3- Impureza C (10 µg.mL⁻¹).

A eluição do cloridrato de tirofibana (padrão) coincidiu com o tempo de retenção apresentado para a formulação comercial Agrastat[®], em 8,40 minutos. Esta semelhança entre os tempos de retenção obtidos no método desenvolvido, bem como a

similaridade entre os respectivos espectros (figura 7) permitiram identificar o cloridrato de tirofibana na forma farmacêutica, demonstrando adequabilidade da metodologia.

A literatura preconiza a verificação dos parâmetros de adequabilidade do sistema após o desenvolvimento e otimização de um método analítico, para posteriormente realizar a validação do mesmo (BRASIL, 2017; ICH 2005). A performance do sistema cromatográfico foi avaliada a partir da observação nos cromatogramas obtidos dos seguintes parâmetros: número de pratos teóricos (N), resolução (R) e fator de cauda (T) (ERMER e MILLER, 2005). A tabela 7 demonstra os valores de adequabilidade do sistema para o método desenvolvido, comparados com a literatura.

Tabela 7. Parâmetros de adequabilidade do sistema para o método analítico desenvolvido e resultados preconizados.

Parâmetro	Preconizado*	Impureza A	Tirofibana	Impureza C
Tempo de retenção (min.)	-	4,72	8,38	12,88
Fator de cauda	$T \leq 2$	1,17	0,96	1,14
Número de pratos teóricos	$N > 2000$	7621	14465	39367
Resolução	$R > 2$	14,85	16,77	-

* (ERMER e MILLER, 2005).

Legenda: min= minutos; T= fator de cauda; N= pratos teóricos; R= resolução.

O método desenvolvido mostrou-se adequado para análise de cloridrato de tirofibana, na presença das impurezas A e C, além de PD oriundo de estresse hidrolítico, com simetria, número de pratos teóricos e resolução adequados, tornando o método indicativo de estabilidade apto a ser validado para aplicações em análises de rotina do fármaco.

5.3. Validação de Metodologia Analítica

A validação do método analítico foi realizada de acordo com a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017) e o ICH (2005) por meio da análise dos seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. Estas análises objetivaram a detecção e a quantificação do fármaco e de suas principais impurezas de síntese.

5.3.1. Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi avaliada através da confirmação de ausência de interferentes inerente dos excipientes da formulação e dos produtos de degradação formados em distintas condições de estresse.

O Agrastat[®] é comercializada no Brasil em tampão citrato, desta forma foi analisado (n=3) amostra simulada de excipientes (ASE), em base aquosa, contendo cloreto de sódio (8 mg.mL⁻¹), citrato de sódio dihidratado (2,7 mg.mL⁻¹) e ácido cítrico (0,16 mg.mL⁻¹) (MERCK, 1998).

Baseado no cromatograma ilustrado na figura 13 é possível verificar que não houve interferência da ASE, tanto em relação ao fármaco, quanto às suas impurezas, demonstrando, assim, que o método analítico é seletivo para a determinação do cloridrato de tirofibana e suas impurezas A e C.

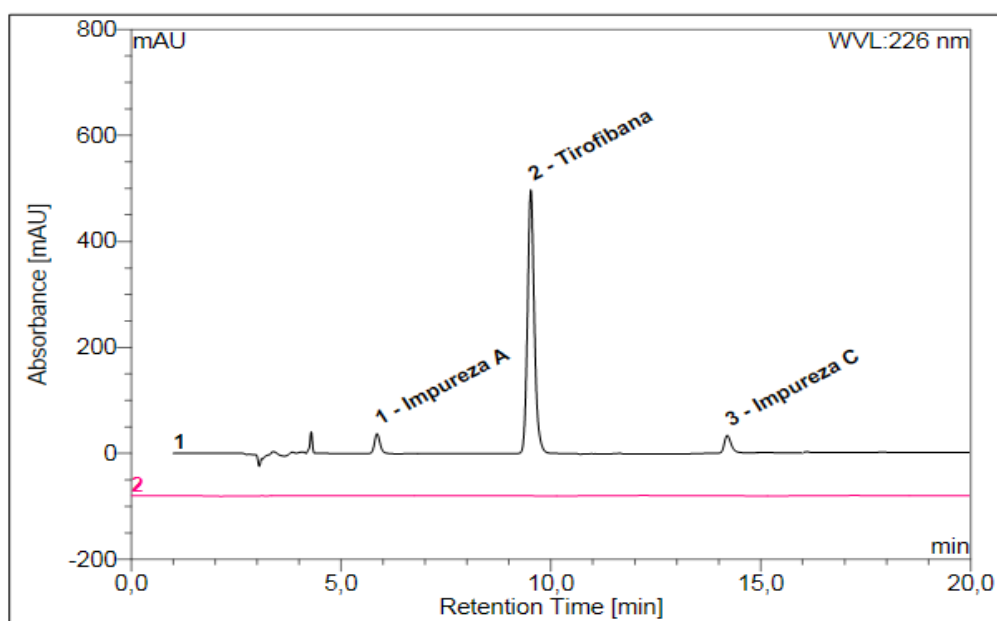


Figura 13. Sobreposição de cromatogramas para determinação de seletividade perante excipientes, com leve deslocamento de tempo e absorbância. Cromatograma 1 – pico 1 Impureza A (10 µg.mL⁻¹), pico 2 Tirofibana (200 µg.mL⁻¹) pico 3 Impureza C (10 µg.mL⁻¹). Cromatograma 2 – Amostra simulada de excipientes.

A seletividade do método analítico foi avaliada ainda em relação aos produtos de degradação gerados mediante a exposição do cloridrato de tirofibana, solubilizado em metanol, às condições de estresse hidrolítico (ácido e base), fotolítico, térmico e oxidativo. Nestas condições de trabalho, objetivou-se a degradação entre 5 a 20% do fármaco, evitando uma degradação muito drástica e, com isto, a própria degradação dos produtos de degradação, gerando produtos intermediários (ALSANTE et al., 2007).

Os ensaios foram realizados em triplicata em cada condição de degradação. Concomitantemente foi realizado um ensaio controle, com substituição da amostra pelo diluente (metanol) e adição do respectivo agente indutor utilizado, respeitando as

proporções utilizadas no preparo da amostra para descontar os sinais obtidos dos cromatogramas com o fármaco degradado.

A porcentagem de degradação obtida em cada condição, bem como a detecção de produtos oriundos do estresse submetido encontram-se elucidados na tabela 8.

Tabela 8. Resultado da degradação forçada de solução metanólica de cloridrato de tirofiban, com concentração final de 200 µg.mL⁻¹.

Condição de degradação	Agente indutor	Volume da amostra	Volume agente indutor	Tempo de exposição	Teor de degradação	Deteção de PD pelo método
Hidrólise Ácida	HCl 5 mol.L ⁻¹ **	3 mL	2 mL	2 horas	19,63%	Sim
Hidrólise Alcalina	NaOH 5 mol.L ⁻¹ **	3 mL	2 mL	8 horas	14,39%	Sim
Oxidação	H ₂ O ₂ 30%	3 mL	1 mL	24 horas	0,00%	Não
		3 mL	3 mL	24 horas	0,00%	Não
		3 mL	6 mL	24 horas	0,00%	Não
Temperatura	35 °C	3 mL	-	24 horas	0,00%	Não
	55 °C	3 mL		24 horas	0,00%	Não
	75 °C	3 mL		24 horas	0,00%	Não
Radiação Ultravioleta	UVA	750 µL	-	1 hora	11,07%	Não

Observação: As amostras foram expostas ao agente indutor em balão volumétrico de 10 mL com ajuste do menisco utilizando metanol, exceto a amostra submetida a radiação ultravioleta, onde utilizou-se de cubetas descartáveis.

** Concentração inicial de agente indutor utilizada para após a diluição obter concentração igual a 1 mol.L⁻¹.

Legenda: PD = produto de degradação; HCl = ácido clorídrico; NaOH = hidróxido de sódio; H₂O₂= peróxido de hidrogênio; °C = graus célsius; UVA= Radiação ultravioleta A; MeOH = metanol.

Os resultados demonstram suscetibilidade às reações hidrolíticas, sendo que dentre estas, a degradação em meio ácido, com concentração final de 1 mol.L⁻¹ demonstrou maior influência, acarretando degradação de 19,63% em 2 horas de exposição.

Em ambas reações de hidrólise foi possível detectar um produto de degradação com mesmo tempo de eluição, aos 16,78 min. A partir da análise do espectro do pico gerado, para os produtos encontrados, em ambas condições de estresse, foi possível detectar dois máximos de absorção, que foram iguais para os produtos de degradação em ambas condições de hidrólise, de 227 e 275 nm (Figura 14). A pureza do pico do produto de degradação foi igual a unidade, analisada com auxílio do detector de arranjo

de fotodiodos na região do UV. O mesmo tempo de retenção e a sobreposição dos espectros sugerem que ocorre a formação do mesmo PD na hidrólise ácida e básica.

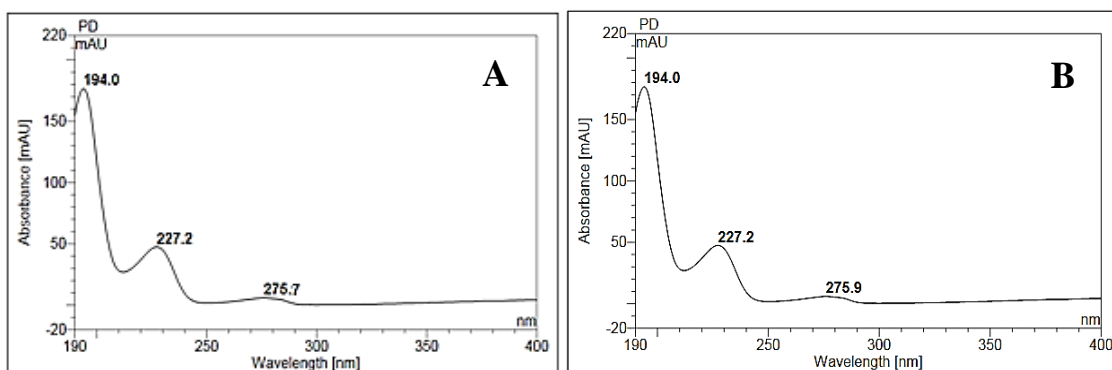


Figura 14. Espectro de absorção do produto de degradação gerado em estresse hidrolítico ácido (A) e básico (B) de cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em solução metanólica).

Mediante presença de PD oriundo do estresse hidrolítico, a metodologia desenvolvida foi capaz de detectá-lo com garantia de seletividade, mediante adição das Impurezas A e C, após interrupção do processo degradativo, através da neutralização da solução. O cromatograma obtido pode ser observado na figura 15.

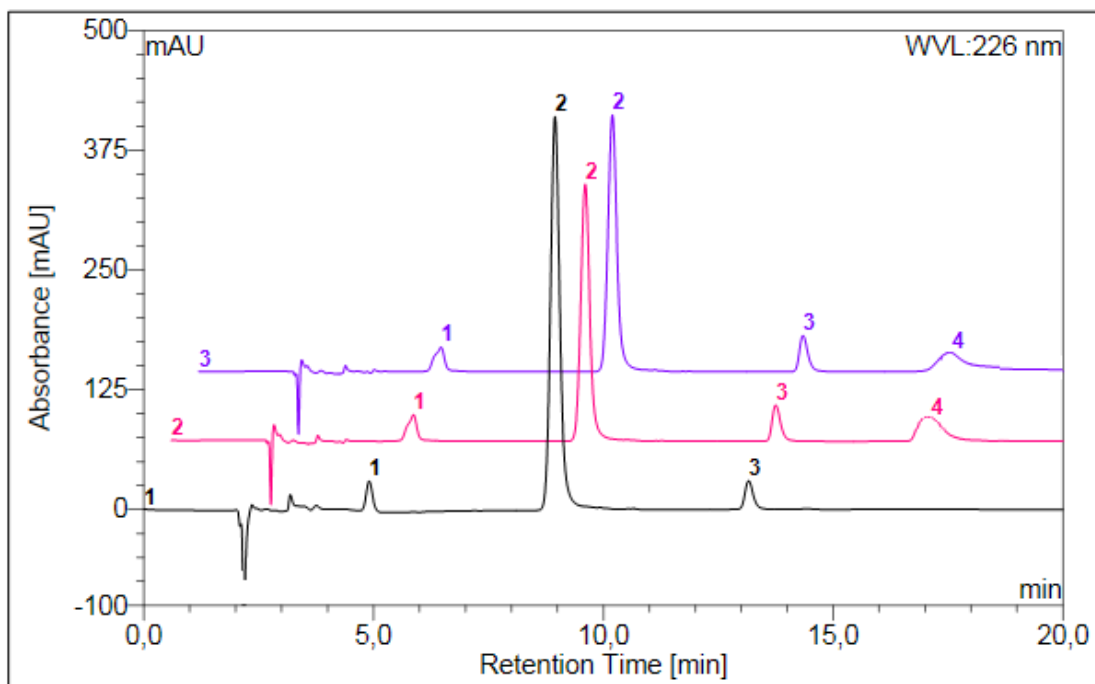


Figura 15. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação hidrolítica do cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (pico 2) mediante adição de impureza A ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (pico 1) e impureza C ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (pico 3).

Cromatogramas: 1 - Cloridrato de tirofibana e suas impurezas antes de submissão às condições de estresse hidrolítico. 2 - Cloridrato de tirofibana submetido ao estresse hidrolítico pela adição de HCl, com concentração final de $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por um período de 2 horas, com surgimento de produto de degradação (pico 4). 3 - Cloridrato de tirofibana submetido ao estresse hidrolítico pela adição de NaOH, com concentração final de $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por um período de 8 horas, com surgimento de produto de degradação (pico 4).

A estabilidade hidrolítica do cloridrato de tirofibana foi experimentada também por El-Bagary e colaboradores (2018), em temperatura ambiente e a 75°C. Os autores encontraram teor de degradação de 53% quando submetido à hidrólise alcalina (1 mol.L⁻¹) em temperatura ambiente, durante 8 horas, e um decaimento de 45% da concentração inicial quando em hidrólise ácida (1 mol.L⁻¹) a temperatura ambiente, durante 8 horas.

A diferença entre os teores de degradação encontrados entre os estudos deve-se provavelmente a utilização de diferentes solventes. Para o presente estudo, utilizamos metanol como diluente do cloridrato de tirofibana em reações de estresse hidrolítico, enquanto que El-Bagary e colaboradores (2018) utilizaram a fase móvel de trabalho, constituída por uma mistura de tampão fosfato pH 3,0 e acetonitrila, na proporção de 70:30 (v/v). O uso de pH próximo ao pKa do fármaco favorecem a sua forma ionizada, o que pode deixar o fármaco mais susceptível ao processo degradativo.

O cloridrato de tirofibana também demonstrou instabilidade frente à luz, como já descrito por Henriet e colaboradores (2016) e El-Bagary e colaboradores (2018), todavia, com resultados distintos de teores de degradação, apresentando uma degradação de 50% em 24 horas e 10,9% em 48 horas, respectivamente. Em ambas metodologias foram detectados produtos de degradação gerados pela condição estudada.

Uma solução metanólica do cloridrato de tirofibana de 200 µg.mL⁻¹ apresentou degradação suficiente para determinação da seletividade (entre 5 e 20%) em 1 hora de exposição, com decaimento de 11,07% da concentração inicial do fármaco. Todavia, a metodologia desenvolvida não foi capaz de detectar os produtos oriundos desta degradação.

Na figura 16 é possível observar a degradação do cloridrato de tirofibana, antes e após submissão ao estresse, com adição das impurezas A e C, ambas na concentração de 10 µg.mL⁻¹ posteriormente à condição degradativa.

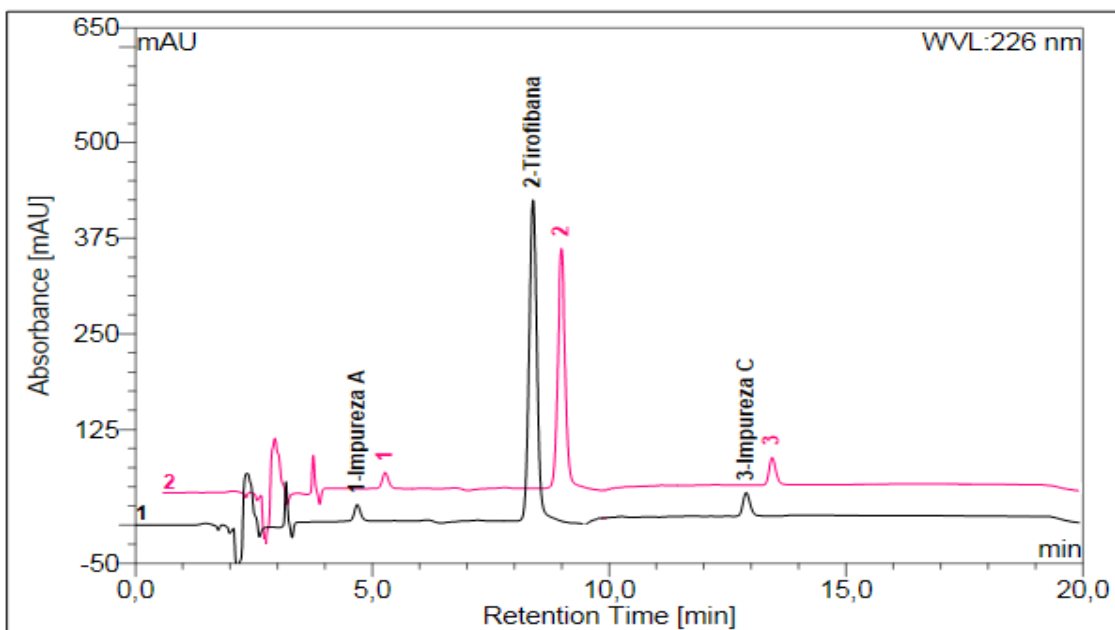


Figura 16. Sobreposição de cromatogramas obtidos através da degradação fotolítica (UVA) do cloridrato de tirofibana $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em diferentes tempos de exposição, com posterior adição de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das impurezas A e C. Os cromatogramas foram levemente deslocados em relação ao tempo e à absorbância para facilitar a visualização. Cromatogramas: 1-Tempo zero, sem exposição ao agente indutor. 2- Após 1 hora de exposição ao agente indutor.

O fármaco demonstrou forte estabilidade frente a frente a degradação térmica em estufa em diferentes temperaturas, em estufa de degradação forçada. O mesmo ocorreu na degradação oxidativa, com adição de diferentes proporções de peróxido de hidrogênio 30% (Tabela 8). Ambas condições de estresse foram avaliadas por um período de 24 horas e não foi detectada degradação do composto, nas condições testadas. Os cromatogramas resultante destas exposições estão dispostos nas figuras 17 e 18.

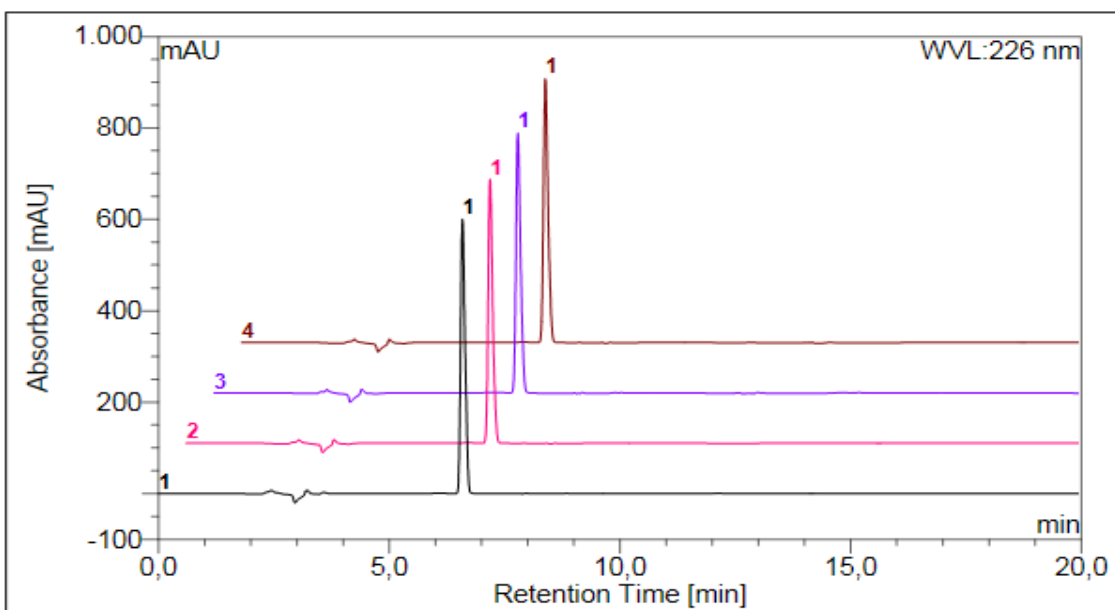


Figura 17. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação térmica do cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (pico 1), por um período de 24h. Cromatogramas: 1 – Sem exposição a temperatura. 2- exposição à 35°C . 3- exposição à 55°C . 4- exposição à 75°C .

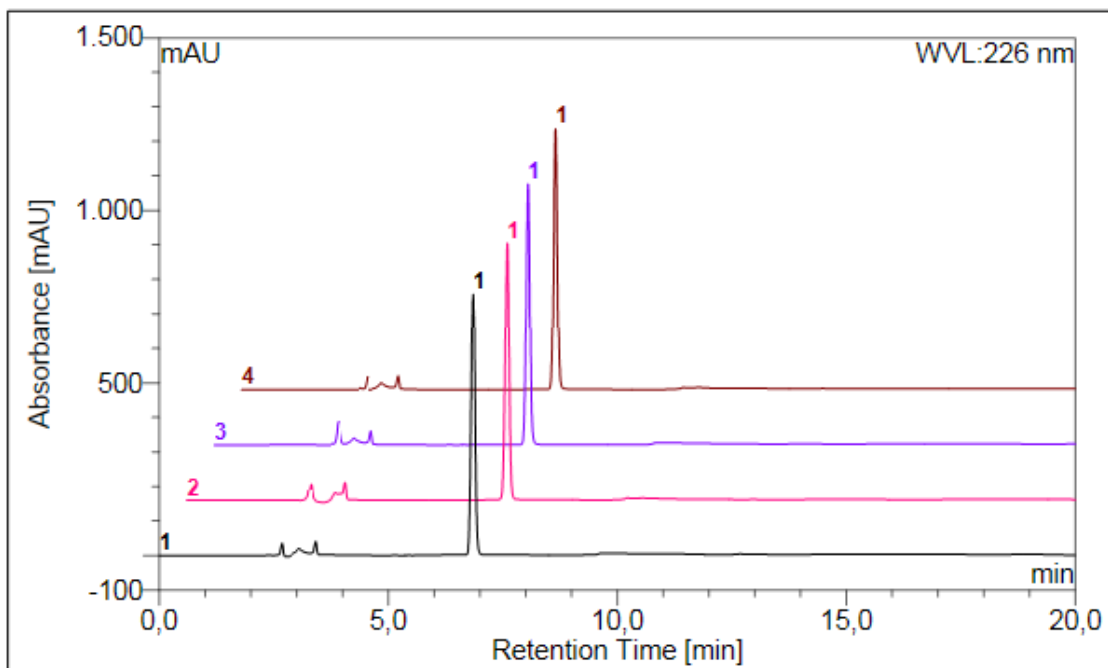


Figura 18. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação oxidativa do cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1), por um período de 24h. Cromatogramas: 1 – Sem adição do agente oxidante. 2- Mediante adição de 1% (v/v) de H_2O_2 30 volumes. 3- Mediante adição de 3% (v/v) de H_2O_2 30 volumes. 4- Mediante adição de 6% (v/v) de H_2O_2 30 volumes.

De acordo com o esquema proposto por Singh & Bakshi (2000), o fármaco pode ser considerado praticamente estável a degradação oxidativa, visto que foi submetido a condições drásticas e demonstrou forte resistência ao agente oxidante.

A avaliação de pureza dos picos de cloridrato de tirofibana e impureza A e C após todas condições de estresse supracitadas, sugere que em todas as condições avaliadas não existiam outras substâncias coeluidando no mesmo tempo de retenção.

Os resultados encontrados diferiram dos apresentados por El-Bagary e colaboradores, que relatam um decréscimo de 51,7% da concentração inicial do fármaco, solubilizado em fase móvel (tampão fosfato pH 3,0 e acetonitrila na proporção 70:30 (v/v)) com adição de peróxido de hidrogênio 3% por 12 horas e de 1,3% em estresse térmico a 55°C por um período de 72 horas. As discrepâncias observadas podem ser derivadas dos diferentes diluentes utilizados e ainda às diferenças entre as metodologias utilizadas para degradação oxidativa.

5.3.2. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites do método foram definidos experimentalmente pela análise de diferentes concentrações do fármaco e de cada impureza, até se obter as relações sinal

ruído pré-estabelecidas. Nos métodos desenvolvidos com intuito de serem indicativo de estabilidade e utilizados para a análise de impurezas de síntese, o LQ é um parâmetro muito importante a ser avaliado, uma vez que nestas análises objetiva-se encontrar quantidades pequenas dessas substâncias nas amostras.

Além disso, é importante que o LQ para as impurezas seja menor que o seu limite de notificação estabelecido pelas agências reguladoras para garantir que a metodologia desenvolvida seja capaz de cumprir com o seu propósito. Na tabela 9 estão elucidados os limites encontrados para o cloridrato de tirofibana e suas impurezas A e C.

Tabela 9. Limite de detecção e quantificação da tirofibana e impurezas obtidos na validação do método analítico.

	Limite de Quantificação		Limite de Detecção	
	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DPR (%)	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DPR (%)
Tirofibana	2,12	0,94	1,00	1,28
Impureza A	0,09	1,05	0,07	1,44
Impureza C	0,08	1,11	0,06	1,53

Legenda: DPR= desvio padrão relativo (n =3)

Sendo assim, os limites de quantificação encontrados para as impurezas A e C foram de $0,09 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Tais valores vão ao encontro do que se verificou desde os testes preliminares ao desenvolvimento do método, onde a impureza A sempre se mostrou com uma menor sensibilidade de detecção quando comparada à impureza C.

5.3.3. Linearidade

A linearidade do método foi estabelecida por meio do ensaio em triplicata nas concentrações de 160, 180, 200, 220 e $240 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o cloridrato de tirofibana e nas concentrações de 0,1; 1,5; 5,0; 10,0 e $12,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as impurezas A e C. Na figura

19, são apresentadas as equações das regressões lineares realizada pelo método dos mínimos quadrados, e os respectivos coeficientes de determinação (r^2).

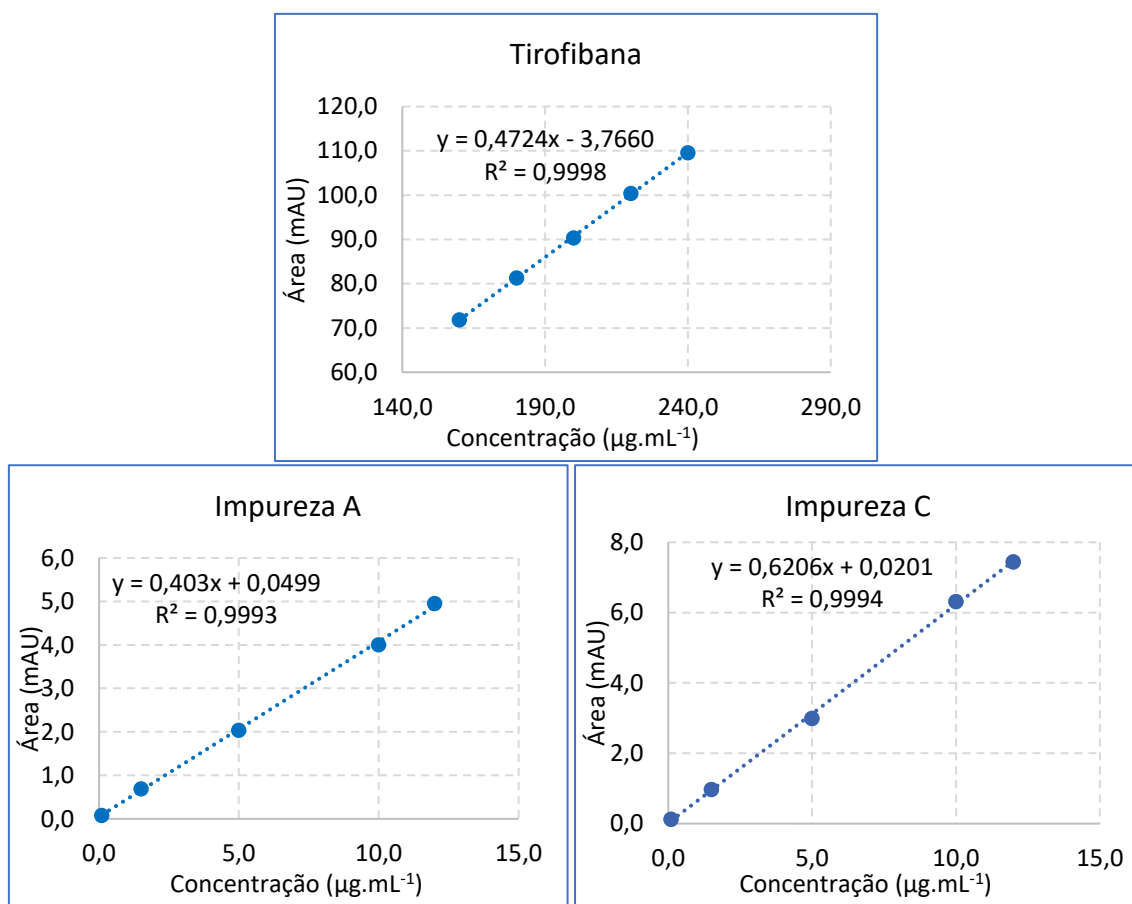


Figura 19. Representações gráficas de linearidades obtidas pelo método desenvolvido para determinação do cloridrato de tirofibana e impurezas A e C.

Os coeficientes de correlação (r) obtidos para as curvas analíticas, apresentaram valores de 0,9999, 0,9993 e 0,9994 para o cloridrato de tirofibana, impureza A e impureza C, respectivamente, valores superiores ao mínimo estabelecido pela legislação de 0,990 (BRASIL, 2017). Estes resultados demonstraram uma alta correlação entre a concentração dos analitos analisados e a resposta do equipamento.

A comprovação da relação linear entre a concentração dos analitos e a resposta do equipamento foi realizada por meio do teste unilateral de análise de variância (ANOVA) (Tabela 10) dos diferentes níveis de concentração do cloridrato de tirofibana e suas impurezas.

Tabela 10. Resultados do teste unilateral de análise de variância (ANOVA) para tirofibana e suas impurezas.

Tirofibana					
Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F	F tab
Entre concentrações	4	2678,60	669,70	628,95	3,48
Regressão Linear	1	2677,94	2677,94	2515,0	4,96
Desvio da Linearidade	3	0,70	0,23	0,2*	3,71
Dentro (resíduo)	10	10,65	1,06		
Total	14	2689,3			
Impureza A					
Entre concentrações	4	52,50	13,10	3851,28	3,48
Regressão Linear	1	52,45	52,45	15394,00	4,96
Desvio da Linearidade	3	0,037	0,012	3,70*	3,71
Dentro (resíduo)	10	0,034	0,003		
Total	14	52,50			
Impureza C					
Entre concentrações	4	124,50	31,10	3920,96	3,48
Regressão Linear	1	124,40	124,41	15673,00	4,96
Desvio da Linearidade	3	0,088	0,029	3,70*	3,71
Dentro (resíduo)	10	0,079	0,008		
Total	14	124,60			

* não significativo para $p=0,05$

Legenda: GL= grau de liberdade; SQ= soma de quadrados; F= fator F; F tab= Fator F tabelado.

Os resultados demonstraram-se significativos para regressão linear e não significativos para desvio de linearidade, a um nível de significância de 5%, comprovando correlação linear entre as variáveis.

5.3.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. Para avaliação da repetibilidade seis amostras ($n = 6$), de concentração $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cloridrato de tirofibana e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as impurezas A e C foram preparadas sob as mesmas condições, pelo mesmo analista, em um curto período de tempo.

Na determinação da precisão intermediária seis amostras nas mesmas concentrações supracitadas foram preparadas sob as mesmas condições, durante três dias diferentes, por dois diferentes analistas (n = 18). Os resultados obtidos para as análises de precisão do cloridrato de tirofibana e suas impurezas A e C estão descritas na tabela 11.

Tabela 11. Resultados de repetibilidade e precisão intermediária obtidos para a validação do método analítico para o cloridrato de tirofiban e impurezas A e C.

Repetibilidade				
Amostra	Tirofibana	Impureza A	Impureza C	
	Teor (%)			
1	99,91	101,01	99,33	
2	100,29	99,38	101,21	
3	100,93	99,29	100,24	
4	99,83	98,83	99,82	
5	100,28	98,36	98,23	
6	100,04	100,05	100,42	
Média	100,21	99,49	99,88	
DPR	0,40	0,94	1,02	
Precisão Intermediária				
	Tirofibana	Impureza A	Impureza C	
	Teor (%)			
Dia 1*	Amostra			
	1	99,91	101,01	99,33
	2	100,29	99,38	101,21
	3	100,93	99,29	100,24
	4	99,83	98,83	99,82
	5	100,28	98,36	98,23
	6	100,04	100,05	100,42
	Média	100,21	99,49	99,88
	DPR	0,40	0,94	1,02
Dia 2*	Amostra			
	1	99,44	98,24	98,88
	2	99,50	100,11	100,73
	3	99,94	97,07	96,10
	4	99,57	95,99	98,81
	5	100,75	99,08	96,36
	6	99,74	97,05	97,90
	Média	99,82	97,92	98,13
	DPR	0,49	1,55	1,77
Dia 3**	Amostra			
	1	99,45	98,79	99,87
	2	99,59	99,24	99,83
	3	100,44	96,36	95,69
	4	99,27	97,00	100,14
	5	99,96	97,79	100,38
	6	100,08	96,85	99,74
	Média	99,80	97,67	99,28
	DPR	0,44	1,18	1,78
Média		99,94	98,36	99,09
DPR		0,46	1,43	1,64

Legenda: DPR = desvio padrão relativo *Analista 1; **Analista 2.

Os resultados obtidos comprovam que a precisão do método desenvolvido se encontra dentro dos limites aceitáveis, com DPR inferior a 2% (ERMER e MILLER, 2005; RIBANI et al., 2004; SILVA, 2016).

5.3.5. Exatidão

A exatidão foi determinada mediante do ensaio de recuperação, pelo método de adição de padrão na matriz, objetivando examinar a relação entre a concentração observada e a nominal. Para isto, realizou o acréscimo de quantidades de padrão, correspondendo aos níveis baixo, médio e alto, sendo a concentração final 160, 200 e 240 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cloridrato de tirofibana e 8, 10 e 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as impurezas A e C. As amostras foram preparadas de forma independente, a partir da respectiva solução mãe. As avaliações de exatidão foram realizadas com três réplicas em cada nível de concentração (n=9). As médias obtidas encontram-se descritas na tabela 12.

Tabela 12. Resultados da exatidão obtidos pelo teste de recuperação para validação do método analítico para determinação de cloridrato de tirofibana e impurezas A e C.

	Nível	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
Tirofibana	Baixo	160,0	100,19 \pm 0,61		
	Médio	200,0	99,55 \pm 0,69	99,93	0,34
	Alto	240,0	100,05 \pm 0,43		
Impureza A	Baixo	8,0	102,12 \pm 1,55		
	Médio	10,0	100,41 \pm 1,87	99,88	2,54
	Alto	12,0	97,13 \pm 0,75		
Impureza C	Baixo	8,0	99,22 \pm 0,67		
	Médio	10,0	100,91 \pm 1,44	99,00	2,04
	Alto	12,0	96,89 \pm 0,41		

Legenda: DPR= desvio padrão relativo

Foi observado um satisfatório teor de recuperação para o cloridrato de tirofibana e suas impurezas, de 99,93%, 99,88% e 99%, respectivamente, enquadrando-se no preconizado pela literatura que admite variação entre 98 e 102%. De acordo com Ermer e Miller (2005) e Ribani e colaboradores (2004) o DPR da recuperação do fármaco é aceito até 2%, sendo mais complacente, expandindo o teor para as impurezas de síntese,

aceitando DPR de até 20%. Silva (2016) estipula uma faixa mais branda de aceitabilidade, admitindo teores até 10%. A faixa ampliada para aceitabilidade das impurezas de síntese é justificada uma vez que, nesses casos, as concentrações usuais dos analitos nas amostras podem ser bastante reduzidas, o que permite que se tenha uma maior variação nos percentuais de recuperação do método. A faixa de recuperação também é estendida para impurezas, sendo aceitos teores entre 80 e 120%, enquanto que para fármacos é restrito a faixa compreendida entre 98 e 102%.

Uma vez que as guias oficiais ainda não estabelecem de forma unânime quais os critérios ideais para a validação de métodos para análise de impurezas, e considerando que os resultados encontrados se enquadram com a literatura, os valores aqui expostos podem ser considerados aceitáveis como demonstrativo da exatidão do método desenvolvido.

5.3.6. Robustez

A robustez foi avaliada a partir da determinação do fármaco e suas impurezas mediante pequenas alterações nas condições cromatográficas nominais do método desenvolvido. Foram selecionados seis fatores e foram avaliados por delineamento fatorial de Plackett-Burman (n = 12). Calcularam-se o efeito (E) de cada fator e o erro experimental estimado (EE) (VANDER HEYDEN et al., 2001). Foram avaliadas alterações no pH da fase móvel ($\pm 0,3$ unidades), vazão ($\pm 0,05$ unidades), proporção de acetonitrila na fase móvel ($\pm 2\%$), comprimento de onda (± 2 nm), temperatura de coluna (± 3 °C) e marca de coluna.

A partir da avaliação estatística obteve-se um valor numérico-limite, o qual define se a modificação efetuada acarretou em interferência na análise quantitativa. Este valor é geralmente derivado do método analítico *teste t*, conforme a Equação 1:

$$t = \frac{|E_x|}{(SE)_e} \quad (\text{equação 1})$$

Onde :

E_x = efeito de cada fator;

SE_e = erro experimental estimado.

O efeito é considerado significativo se resultar em $t_{calculado} > t_{crítico}$.

Os resultados encontrados (Tabela 13) demonstram que não existe diferença estatística significativa na quantificação dos compostos mediante as modificações nas condições analíticas realizadas a nível de significância de $p=0,05$ (t crítico = 2,57).

Tabela 13. Parâmetros avaliados e resultados obtidos na análise de robustez, do cloridrato de tirofibana e impurezas A e C.

		pH		Vazão (mL.min ⁻¹)		% ACN		λ (nm)		Temperatura (°C)		Coluna	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Tirofibana	Média (%)*	99,35	100,59	99,99	99,95	99,85	100,10	100,13	99,81	100,02	99,93	99,79	100,16
	DPR (%)	0,81	0,49	0,63	1,20	1,09	0,78	0,53	1,22	0,57	1,22	1,07	0,77
	t calc**	2,53		0,08		0,51		0,65		0,19		0,76	
	p-valor***	0,052		0,941		0,629		0,544		0,85		0,48	
Impureza A	Média (%)*	100,88	101,90	101,27	101,51	101,35	101,43	101,04	101,74	101,56	101,22	101,33	101,45
	DPR (%)	1,87	2,95	1,85	3,07	1,20	3,39	1,85	3,02	1,81	3,09	1,14	3,38
	t calc**	0,51		0,12		0,04		0,35		0,17		0,06	
	p-valor***	0,63		0,91		0,97		0,74		0,87		0,95	
Impureza C	Média (%)*	95,83	99,03	94,04	100,81	95,29	99,57	99,33	95,53	100,16	94,70	96,93	97,93
	DPR (%)	9,83	6,41	4,63	9,34	2,55	10,92	7,09	9,18	10,53	2,61	9,61	7,07
	t calc**	0,69		1,47		0,93		0,82		1,19		0,22	
	p-valor***	0,52		0,20		0,40		0,45		0,29		0,84	

* Média de n= 6 ** Não significativo para p=0,05 (p crítico = 2,57) *** Respostas estatísticas da aplicação do teste T de Student através da comparação dos parâmetros avaliados com o parâmetro nominal.

Legenda: % ACN= porcentagem de acetonitrila na composição da fase móvel; %M= percentual médio; λ= comprimento de onda; DPR= desvio padrão relativo; t calc= valor de t calculado a partir do teste T de Student.

5.4. Cinética de degradação

A determinação da cinética de degradação do cloridrato de tirofibana (diluído em metanol) e do fármaco Agrastat[®] foi realizada por hidrólise em meio ácido (com concentração final de 1 mol.L⁻¹) e por fotólise em luz ultravioleta (UVA). Foi realizado ainda o estudo da cinética de degradação fotolítica do cloridrato de tirofibana utilizando acetonitrila como diluente.

Os resultados obtidos para a cinética de degradação por hidrólise ácida para o cloridrato de tirofibana estão dispostos na figura 20, onde foram estudados em tempo zero (sem exposição) e após a condição de estresse em diferentes tempos de reação, onde é possível observar o surgimento de um produto de degradação (pico 2) detectado em 16,80 min.

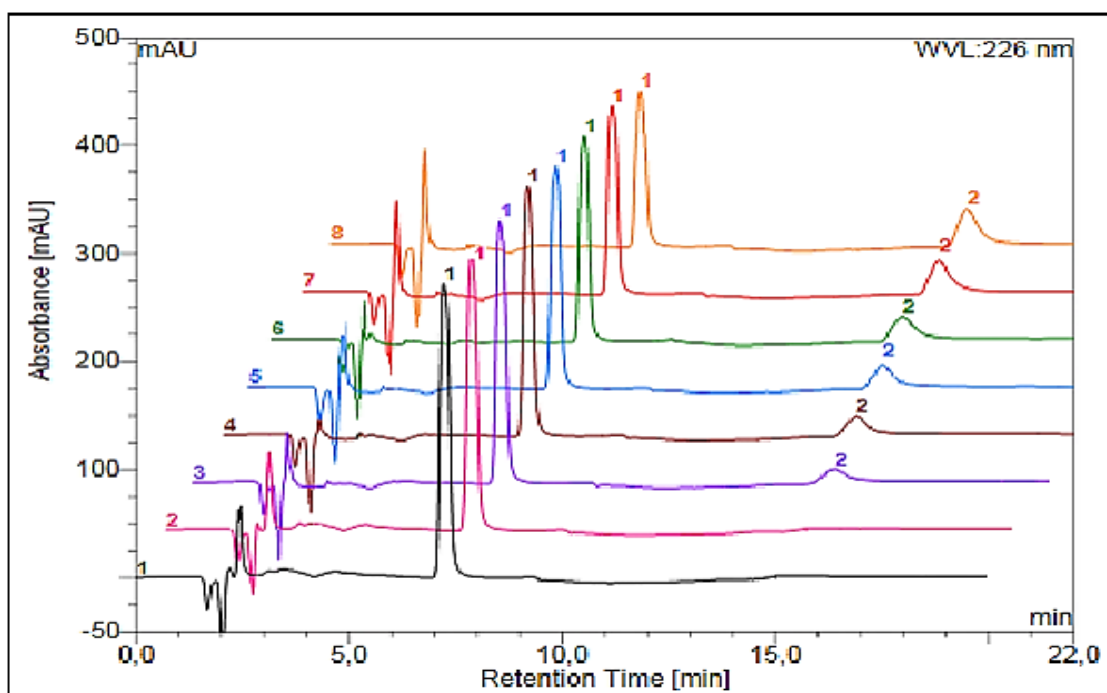


Figura 20. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação da hidrólise ácida com concentração final igual a 1 mol.L⁻¹ do cloridrato de tirofibana (200 µg.mL⁻¹) (pico 1), em diferentes tempos de exposição, com surgimento de produto oriundo da degradação (pico 2) após o tempo 2 horas.

Cromatogramas: 1 – Sem adição de ácido (tempo zero). 2- Após 1 hora de exposição. 3- Após 2 horas de exposição. 4- Após 3 horas de exposição. 5- Após 4 horas de exposição. 6- Após 5 horas de exposição. 7- Após 6 horas de exposição. 8- Após 7 horas de exposição.

A tabela 14 apresenta os valores de concentrações, logaritmo natural da concentração (ln C) e inverso da concentração (1/C) utilizados para a definição da ordem da reação da degradação do cloridrato de tirofibana na condição de hidrólise ácida.

Tabela 14. Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação e degradação do cloridrato de tirofibana sob hidrólise ácida ao longo do tempo.

Tempo (horas)	Degradação (%)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ln C	1/C
0,0	0,0	200,00	5,30	0,0050
1,0	10,82	178,36	5,18	0,0056
2,0	21,38	157,24	5,06	0,0064
3,0	30,98	138,04	4,93	0,0072
4,0	38,67	122,66	4,81	0,0082
5,0	45,10	109,79	4,70	0,0091
6,0	50,45	99,10	4,60	0,0101
7,0	55,63	88,74	4,49	0,0113

Legenda: C= Concentração; Ln C = Logaritmo natural da concentração; 1/C = Inverso da concentração.

A partir dos dados obtidos na tabela 13 foi realizada a representação gráfica da ordem de reação, expressos na figura 21.

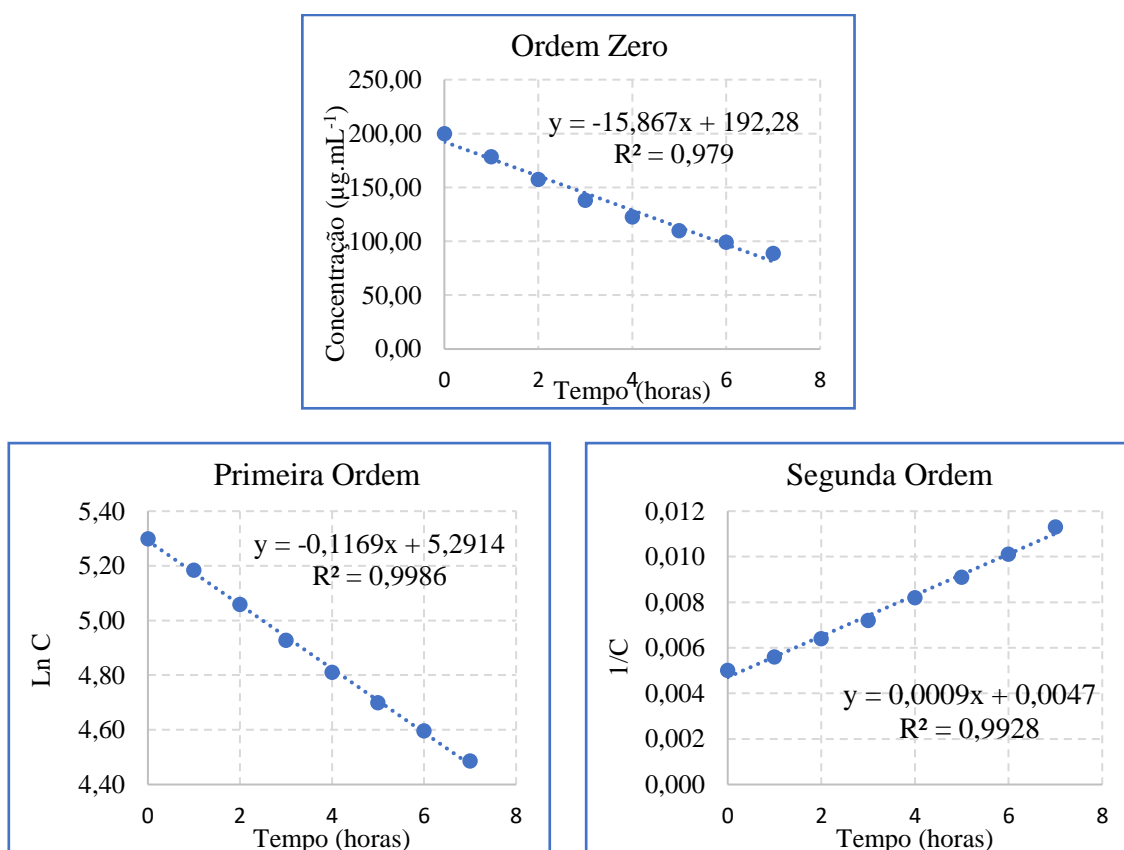


Figura 21. Representações gráficas das cinéticas de degradação de ordem zero, primeira e segunda ordem, com respectivos coeficientes de determinação do cloridrato de tirofibana sob estresse de hidrólise ácida.

Da mesma forma, o ensaio foi realizado para o medicamento Agrastat[®]. No cromatograma disposto na imagem 22 é possível observar o decaimento da concentração do teor do fármaco (pico 1) ao longo do tempo de exposição ao agente de estresse, bem como o surgimento de um produto de degradação (pico 2) aos 16,78 minutos.

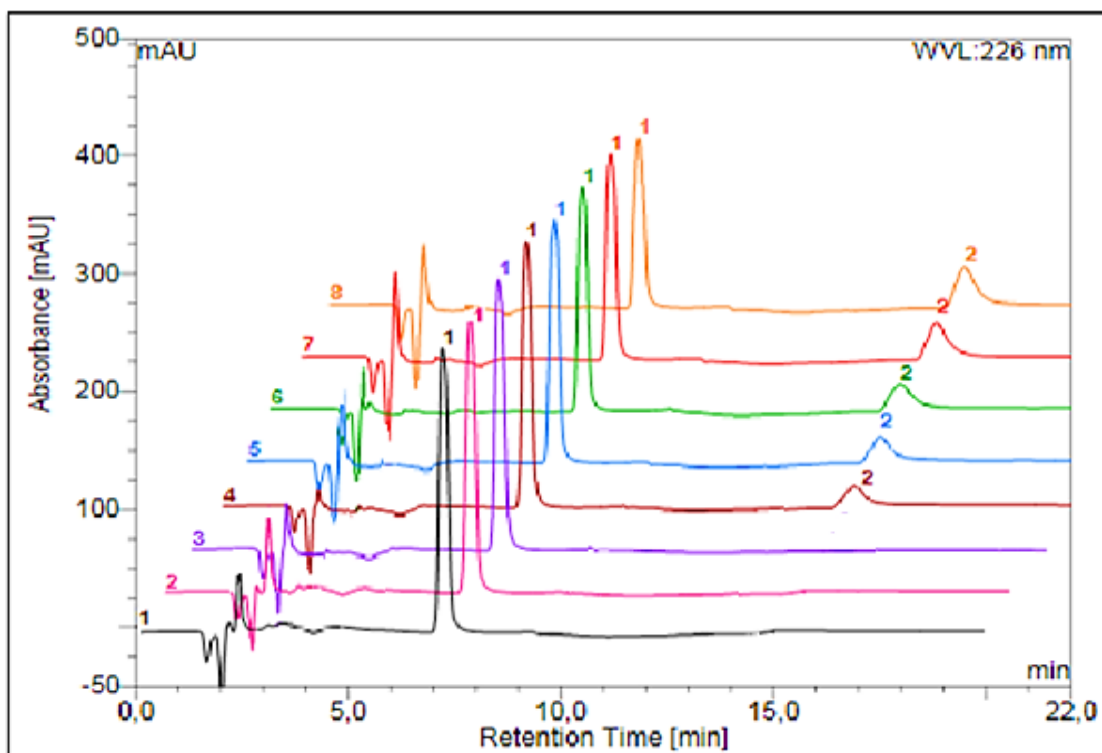


Figura 22. Sobreposição de cromatogramas, resultantes da degradação da hidrólise ácida (1 mol.L^{-1}) do medicamento Agrastat[®] ($180 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) (pico 1), em diferentes tempos de exposição, com surgimento de produto oriundo da degradação (pico 2) após o tempo 24 horas. Cromatogramas: 1 – Sem adição de ácido (tempo zero). 2- Após 6 horas de exposição. 3- Após 12 horas de exposição. 4- Após 24 horas de exposição. 5- Após 36 horas de exposição. 6- Após 48 horas de exposição. 7- Após 60 horas de exposição. 8- Após 72 horas de exposição.

Ao observar o produto formado na degradação hidrolítica do princípio ativo e do medicamento verifica-se que o tempo de retenção coincidem (Figura 23), bem como o espectro do pico (Figura 24). Ambos apresentam pureza de pico igual à unidade. Foi possível observar ainda que a medida que ocorreu o decaimento da concentração do fármaco, ocorreu o aumento da área obtida para o produto de degradação. A partir destas constatações, sugere-se tratar do mesmo produto de degradação, e que a presença dos excipientes na formulação do fármaco não interferiu no processo.

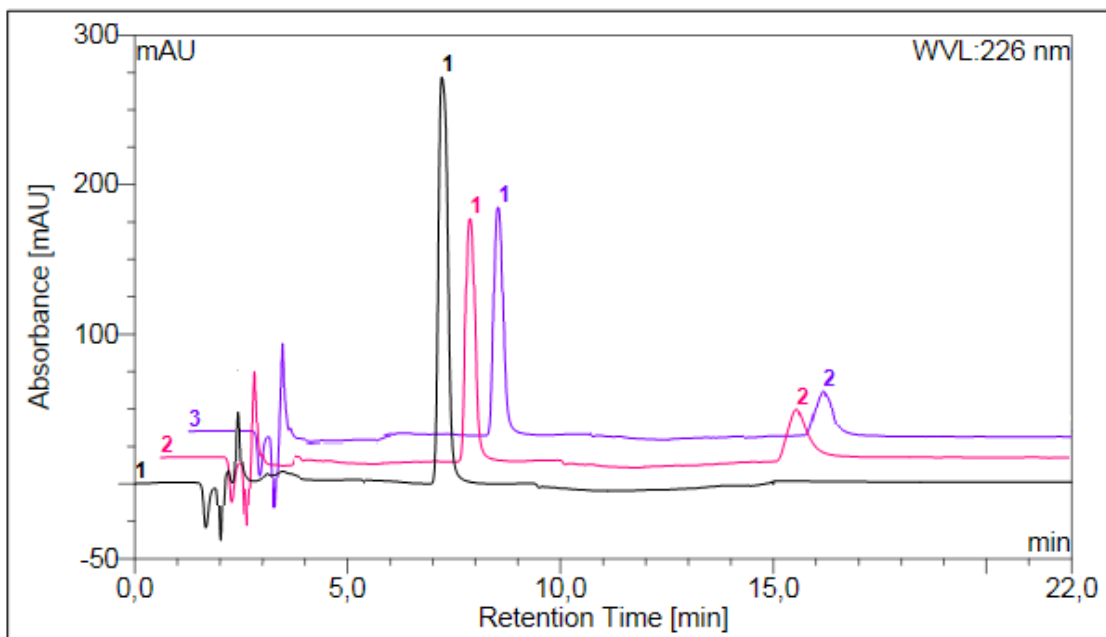


Figura 23. Sobreposição de cromatogramas resultantes da degradação da hidrólise ácida com concentração final de 1 mol.L^{-1} . Cromatogramas: 1- Cloridrato de tirofibana (pico 1) sem exposição do agente indutor. 2- Cloridrato de tirofibana (pico 1) após exposição do agente indutor e decaimento de 50% da concentração inicial, com surgimento de produto de degradação (pico 2). 3- Agrastat[®] (pico 1) após exposição do agente indutor e decaimento de 50% da concentração inicial, com surgimento de produto de degradação (pico 2).

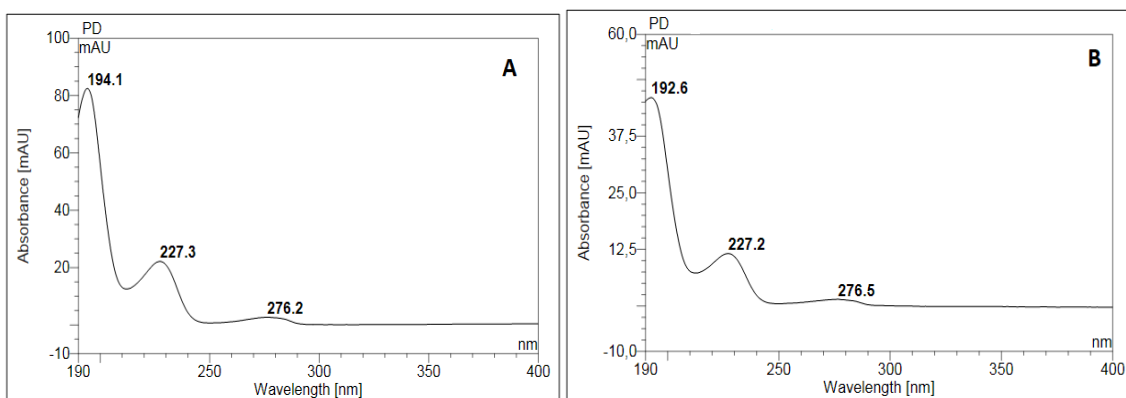


Figura 24. Espectros do pico de produto de degradação do cloridrato de tirofibana (A) e do medicamento Agrastat[®] (B), submetidos à hidrólise ácida até decaimento da concentração inicial

O teor de degradação, decaimento da concentração, logaritmo da concentração e inverso da concentração obtidos na degradação hidrolítica ácida do medicamento estão elucidados na tabela 15.

Tabela 15. Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação e degradação do produto comercial Agrastat® sob hidrólise ácida ao longo do tempo.

Tempo (horas)	Degradação (%)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ln C	1/C
0,0	0,0	177,90	5,18	0,0056
6,0	6,89	165,64	5,11	0,0060
12,0	14,85	151,48	5,02	0,0066
24,0	25,19	133,08	4,89	0,0075
36,0	31,45	121,94	4,80	0,0082
48,0	38,84	108,80	4,69	0,0092
60,0	47,41	93,56	4,54	0,0107
72,0	52,70	84,15	4,43	0,0119

Legenda: C = Concentração; Ln C = Logaritmo natural da concentração; 1/C = Inverso da concentração.

As representações gráficas de ordem zero (concentração *versus* tempo), de primeira ordem (logaritmo da concentração *versus* tempo) e segunda ordem (inverso da concentração *versus* tempo) obtidas para o fármaco Agrastat® nas condições estudadas estão representados na figura 25.

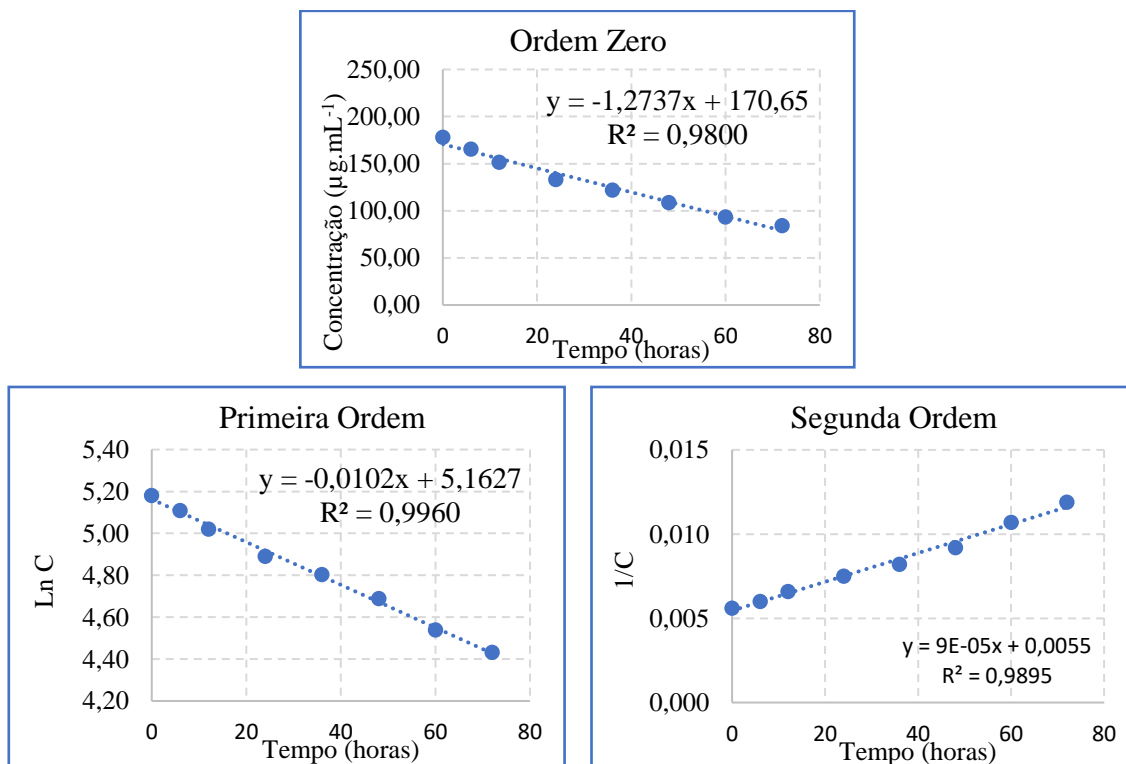


Figura 23. Representações gráficas das cinéticas de degradação de ordem zero, primeira e segunda ordem, com respectivos coeficientes de determinação do produto comercial Agrastat® sob estresse de hidrólise ácida.

Reações em soluções aquosas são, em geral, catalisadas por pH, e monitoradas através da velocidade de degradação, em temperatura, força iônica e concentração de solvente constantes (WELLS, 2005).

O fármaco Agrastat[®] é comercializado em tampão citrato, com pH entre 6,5 e 5,5. Este fato deve ser observado, visto que o tampão tende a aumentar a estabilidade do princípio ativo na formulação, e nas condições degradativas, os íons hidrogênio e hidroxila presentes na solução de armazenamento podem retardar o processo de degradação.

Foi possível observar maior estabilidade do produto acabado em relação ao cloridrato de tirofibana, quando submetidos as mesmas condições de estresse, sugerindo que os excipientes presentes no fármaco protegem o princípio ativo e prolongam o tempo de meia vida do medicamento.

Embora haja um retardamento na velocidade da reação de degradação, os espectros dos produtos de degradação formados na hidrólise ácida do cloridrato de tirofibana e do Agrastat[®], e o mesmo tempo de eluição destes produtos no sistema cromatográfico sugerem que o produto de degradação formado possa ser o mesmo, e que a presença dos excipientes no produto acabado interferiram apenas na velocidade de reação e não nos produtos gerados.

Durante o processo de degradação hidrolítica foi observado ainda o aspecto físico dos objetos de estudo, e não foi constatado mudanças na coloração, nem o surgimento de partículas em suspensão, precipitados ou turvação durante o processo. A ausência de alterações organolépticas a medida em que ocorre a degradação do fármaco é preocupante, visto que não são detectadas facilmente pelo consumidor.

O cloridrato de tirofibana também foi testado na condição de estresse fotolítico, sob radiação UVA, utilizando diferentes diluentes, metanol e acetonitrila. Para tanto a solução mãe de cloridrato de tirofibana, preparada sob dissolução do padrão analítico em metanol e acetonitrila grau HPLC foram expostas a radiação UVA em câmara de degradação fotolítica.

Observou-se grande diferença em relação ao tempo necessário para degradação fotolítica do cloridrato de tirofibana atingir 50%, requerendo menor tempo quando em solução metanólica. O teor degradado, o decaimento da concentração, o logaritmo da concentração e o inverso da concentração encontrados para esta condição estão dispostos na tabela 16.

Tabela 16. Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação e degradação do cloridrato de tirofibana, em solução metanólica, sob estresse fotolítico (radiação UVA) ao longo do tempo.

Tempo (horas)	Degradação (%)	C ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Ln C	1/C
0,0	0,00	200,00	5,30	0,0050
0,5	3,65	192,7	5,26	0,0052
1,0	11,07	177,86	5,18	0,0056
1,5	29,67	140,66	4,95	0,0071
2,0	34,34	131,32	4,88	0,0076
3,0	49,28	101,44	4,62	0,0098
4,0	61,03	77,94	4,36	0,0128

Legenda: C = Concentração; Ln C = Logaritmo natural da concentração; 1/C = Inverso da concentração.

A partir dos dados obtidos na tabela 15 foi realizada a representação gráfica da ordem de reação do cloridrato de tirofibana sob a condições de estresse fotolítica (Figura 26).

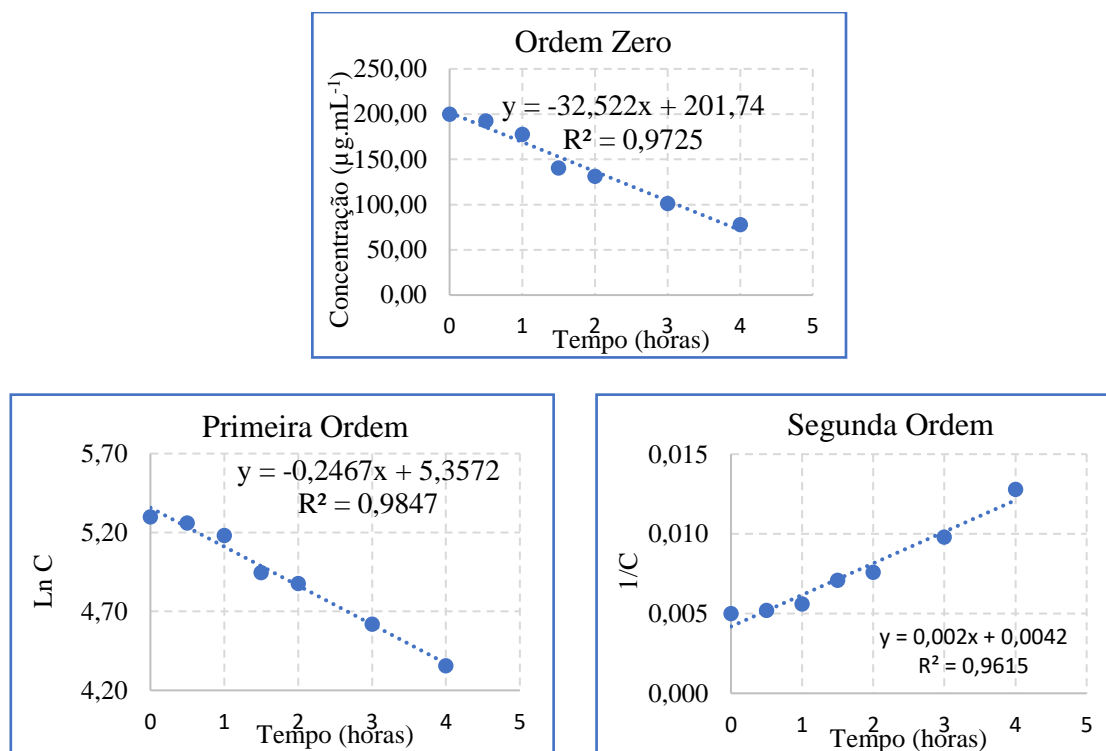


Figura 24. Representações gráficas das cinéticas de degradação de ordem zero, primeira e segunda ordem, com respectivos coeficientes de determinação do cloridrato de tirofibana em base metanólica submetido à fotólise.

Embora o tempo necessário para degradação tenha diferido com os diferentes solventes, em ambos foi possível observar o decréscimo da concentração, mas sem detecção de produtos de degradação pela metodologia analítica desenvolvida. A

sobreposição dos cromatogramas obtidos em diluição com metanol e acetonitrila estão dispostos nas figuras 27, e 28, respectivamente.

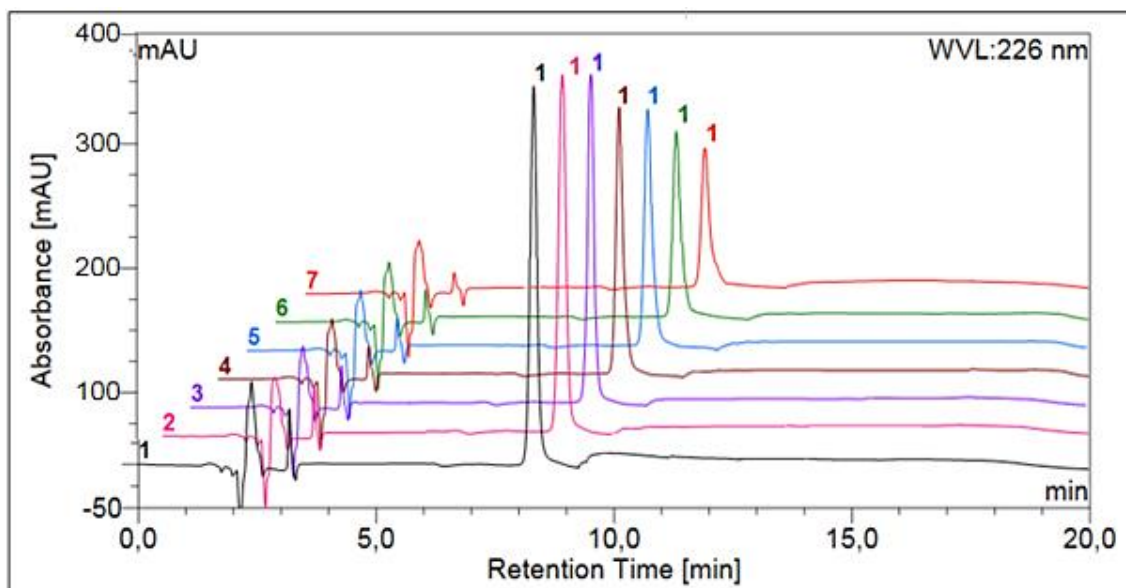


Figura 27. Sobreposição de cromatogramas resultantes da degradação fotolítica do cloridrato de tirofibana ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (pico 1), solubilizado em metanol, em diferentes tempos de exposição. Cromatogramas: 1 – Sem ação do agente indutor (tempo zero). 2- Após 30 minutos de exposição. 3- Após 1 hora de exposição. 4- Após 1 hora e 30 minutos de exposição. 5- Após 2 horas de exposição. 6- Após 3 horas de exposição. 7- Após 4 horas de exposição.

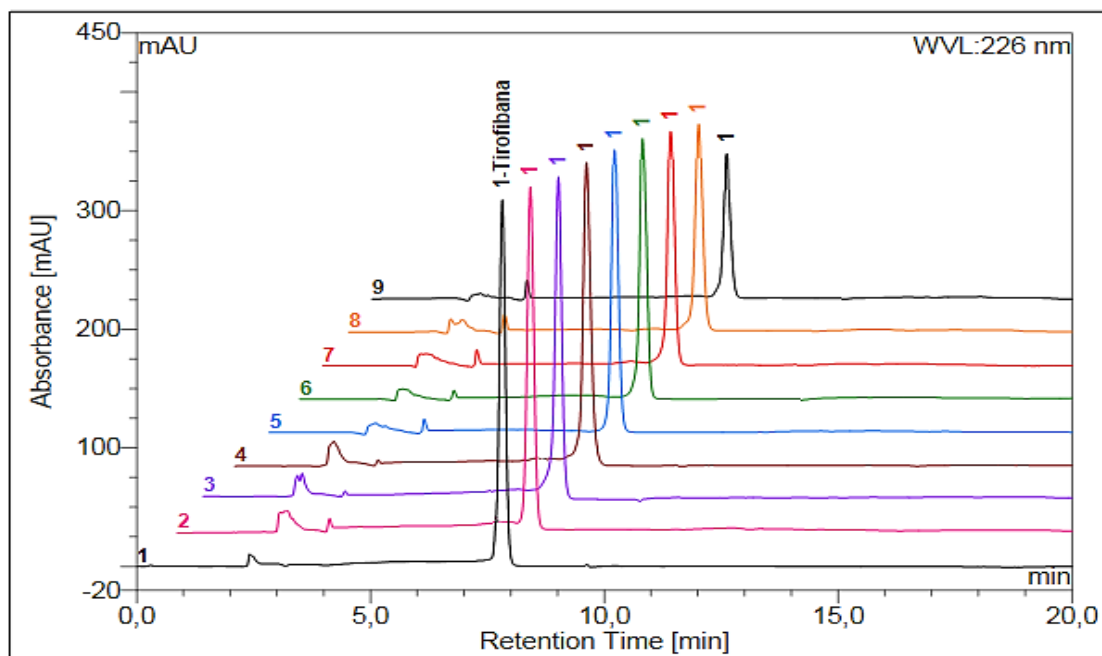


Figura 28. Sobreposição de cromatogramas resultantes da degradação fotolítica do cloridrato de tirofibana ($187 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (pico 1), solubilizado em acetonitrila, em diferentes tempos de exposição. Cromatogramas: 1 – Sem ação do agente indutor (tempo zero). 2- Após 30 minutos de exposição. 3- Após 1 hora de exposição. 4- Após 2 horas e 30 minutos de exposição. 5- Após 4 horas de exposição. 6- Após 6 horas de exposição. 7- Após 9 horas de exposição. 8- Após 12 horas de exposição. 9- Após 24 horas de exposição.

O decaimento da concentração de cloridrato de tirofibana dissolvido em acetonitrila, sob fotólise ao decorrer do tempo está expresso na tabela 17.

Tabela 17. Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação e degradação do cloridrato de tirofibana em solução acetonitrílica, sob estresse fotolítico (radiação UVA) ao longo do tempo.

Tempo (horas)	Degradação (%)	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ln C	1/C
0,0	0,0	186,80	5,23	0,0054
0,5	2,86	181,45	5,20	0,0055
1,0	6,88	173,96	5,16	0,0057
2,5	11,32	165,66	5,11	0,0060
4,0	13,10	162,33	5,09	0,0062
6,0	18,63	152,00	5,02	0,0065
9,0	25,58	139,02	4,93	0,0070
12,0	32,35	126,37	4,84	0,0079
24,0	53,23	87,36	4,47	0,0114

Legenda: C= Concentração; Ln C= Logaritmo natural da concentração; 1/C = Inverso da concentração.

As representações gráficas de ordem zero, de primeira e segunda ordem obtidas para o cloridrato de tirofibana a partir do explanado na tabela 16 estão dispostas na figura 29.

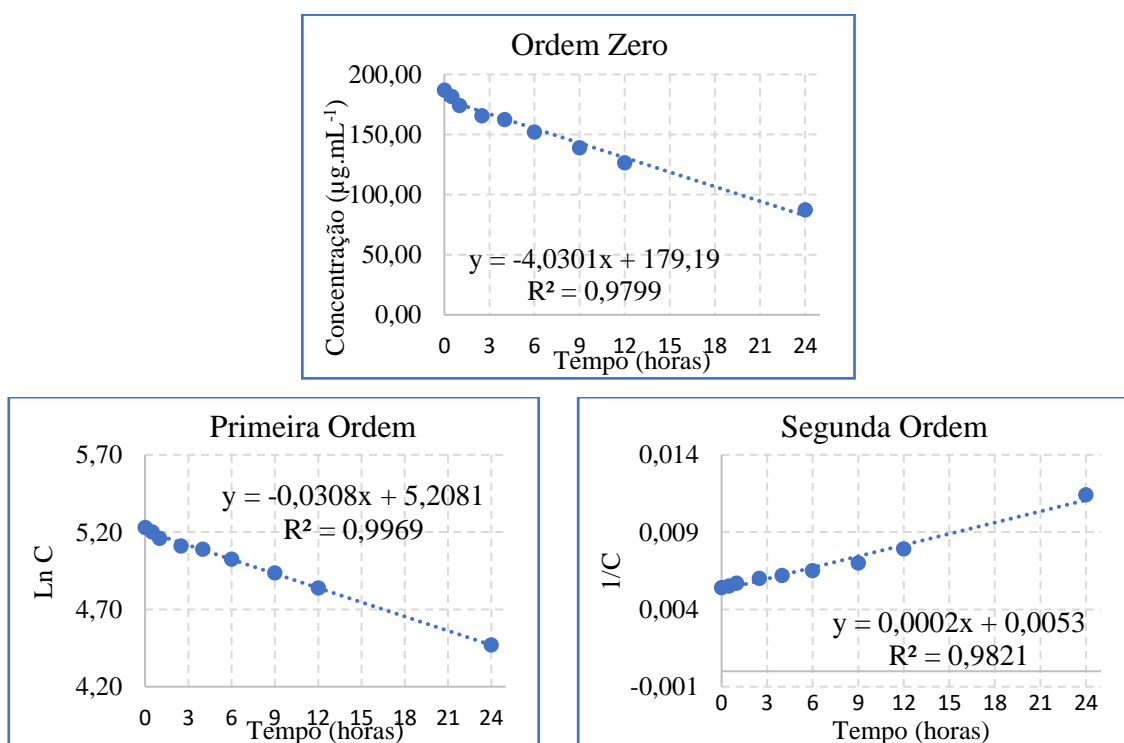


Figura 29. Representações gráficas das cinéticas de degradação de ordem zero, primeira e segunda ordem, com respectivos coeficientes de determinação do cloridrato de tirofibana em solução acetonitrílica quando submetido à fotólise (radiação UVA).

Ao comparar o comportamento de fotodegradação do cloridrato de tirofibana com diferentes solventes, pôde-se observar que o processo é acelerado quando em presença de metanol, que atinge 61% de degradação em 4 horas de exposição, enquanto que ao utilizar acetonitrila como diluente, atinge 53% em um período de 24 horas.

A acetonitrila, por ser um solvente aprótico, apresenta menor influência no processo degradativo, enquanto que o metanol, quando irradiado com luz UV apresenta maior reação, em função da geração de H_2 e respectiva doação destes elétrons (AHMAD et al., 2013; MARQUES, STUMBO & CANELA, 2017).

Reações de fotólise ocorrem pela absorção de energia luminosa, onde o comprimento de onda é inversamente proporcional a potência energética da radiação luminosa. Ao aumentar o conteúdo energético do sistema, pela transferência do fóton ao fármaco, pode acarretar a clivagem de muitas ligações químicas, degradando a molécula, através da quebra de ligações, isomerização, racemização, oxidação, entre outros processos (ALLEN, et al., 2007; (SILVA et al., 2009).

Uma das condições para que a reação química ocorra é que a molécula tenha máximos de absorção de luz na região de comprimento de onda da fonte de radiação. A tirofibana apresenta dois máximos de absorção (Figura 7), de 226 e 275 nm, em face disso submeter o fármaco a radiação UV favorece a ocorrência das reações de fotólise (ABOUNASSIF et al., 2005; BREIER et al., 2006).

Henriet e colaboradores (2016) obtiveram resultados similares quanto ao tempo necessário para que a concentração inicial do fármaco decaísse 50%, porém em comprimentos de onda mais abrangente. Realizaram a degradação do fármaco entre 300 - 800 nm abrangendo as regiões UVA (315 – 400 nm) e UV Visível (400 - 700 nm) além de parte da região UVB (280 – 315 nm) e da região do infravermelho (700 nm – 1 mm), detectando doze produtos de degradação (OKUNO e VILELA, 2005).

O solvente utilizado para a diluição do fármaco também deve ser considerado, pois a polaridade, a constante dielétrica e a viscosidade dos solventes são fatores que podem influenciar na fotodegradação dos fármacos. A acetonitrila é um solvente aprótico e, desta forma, apresenta menor influência no processo degradativo, enquanto que a água sofre fotólise perante radiação UV (AHMAD et al., 2013; MARQUES, STUMBO & CANELA, 2017).

Outro fator a ser ressaltado é o detector utilizado em ambos experimentos, pois o DAD utilizado neste trabalho apresenta seletividade e detectabilidade inferiores ao detector de massas utilizado por Henriet e colaboradores (2016) (OSHITA e JARDIM, 2015).

Henriet e colaboradores (2016) identificaram ainda possíveis rotas para formação dos doze compostos derivados da fotodegradação sendo as principais a foto-oxidação da porção piperidina sem afetar a amina secundária, a hidroxilação do grupo metileno ativado pelo anel aromático, a oxidação do grupo alquil-sulfonamida e também a oxidação descarboxilativa da molécula. Os compostos hidroxilados, geminais e compostos vicinal-diol, foram realçados sugerindo que a maioria dos fotoprodutos formados são mais hidrofílicos do que o fármaco.

Bergquist e colaboradores (1999) realizaram testes de degradação do Agrastat[®] diluído conforme recomendado pela bula para administração intravenosa, sobe luz fluorescente (680nm), em temperatura ambiente, e não observaram alteração da concentração de tirofibana. Foram avaliados também o pH e a turbidez da solução, sendo que estes, do mesmo modo, não apresentaram alterações significativas. Quando combinado a outros fármacos, manteve a estabilidade, armazenada em frascos de vidro por um período de 4 horas (BERGQUIST et al., 2001).

É interessante ressaltar que mesmo com forte tendência à degradação fotolítica do cloridrato de tirofibana, o fármaco Agrastat[®] é comercializado em ampola de vidro cristalino, apenas com indicação na bula para ser mantido ao abrigo da luz. A utilização de vidro âmbar para armazenamento de fármacos é uma alternativa que oferece considerável proteção aos compostos sensíveis à luz ultravioleta, com comprimento de onda inferiores a 470 nm (SILVA et al., 2009).

Após ocorridas as degradações, é possível determinar a ordem de reação através do coeficiente de correlação obtido nas representações gráficas, de cada ordem sendo de ordem zero (concentração versus tempo), de primeira ordem (logaritmo da concentração versus tempo) e segunda ordem (inverso da concentração versus tempo). Os coeficientes de correlação encontrados para cada condição de estresse estudada estão descritos na tabela 18.

Tabela 18. Coeficientes de correlação encontrados para cinética de degradação de ordem zero, primeira e segunda ordem, nas condições de estresse avaliadas.

	Diluyente	Condição de estresse	Coeficiente de correlação (r)		
			Ordem Zero	Primeira Ordem	Segunda Ordem
Agrastat®	MeOH	Hidrólise ácida (1 mol.L ⁻¹)	0,9894	0,9980	0,9946
Tirofibana	MeOH	Hidrólise ácida (1 mol.L ⁻¹)	0,9894	0,9993	0,9965
	MeOH	Fotólise (UVA)	0,9894	0,9923	0,9811
	ACN	Fotólise (UVA)	0,9898	0,9986	0,9902

Legenda: MeOH = metanol; ACN = acetonitrila

Foi possível observar que em todas condições analisadas o cloridrato de tirofibana apresentou maior coeficiente de correlação quando representado graficamente na cinética de reação de primeira ordem, ou seja, a velocidade de reação é dependente e proporcional à concentração do reagente.

Após a determinação da ordem de reação foram calculadas as constantes de decaimento (k), t_{90%} (tempo necessário para que a concentração inicial do fármaco decaia à 90 %) e tempo de meia vida (t_{1/2}), conforme os modelos cinéticos para ordem de reação de primeira ordem (Tabela 3). Estes ensaios são fundamentais para a compreensão do comportamento do fármaco em termos de decomposição química, velocidade de decomposição e determinação de prazo de validade

O valor de k médio foi obtido a partir da média aritmética dos valores para cada tempo de exposição. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 19.

Tabela 19. Resultados dos modelos cinéticos obtidos para as condições degradativas estudadas para o cloridrato de tirofibana e o produto Agrastat®.

	Diluyente	Degradação	k médio ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$)	t 90% (h)	t 1/2 (h)	a
Agrastat®	MeOH	Hidrólise Ácida	0,0113	9,36	61,24	0,0102
Tirofibana	MeOH	Hidrólise Ácida	0,1161	0,89	5,82	0,1169
	MeOH	Fotólise	0,1831	0,58	3,79	0,2467
	ACN	Fotólise	0,0318	2,47	16,12	0,0308

Legenda: MeOH = metanol; ACN = acetonitrila; k= constante de velocidade de reação; $t_{90\%}$ = tempo necessário para que a concentração inicial do fármaco decaia à 90 %; $t_{1/2}$ = tempo meia vida; a = coeficiente angular obtido na representação gráfica da cinética de degradação de primeira ordem.

Os valores de k médios encontrados em cada cenário degradativo foram similares aos coeficientes angulares (a) obtidos nas respectivas equações da reta. Os valores encontrados de $t_{90\%}$ e $t_{1/2}$ indicam que a maior influência de degradação foi dada em fotólise, quando o cloridrato de tirofibana foi solubilizado em metanol. Mesmo quando solubilizado em acetonitrila, o fármaco sofreu forte influência do agente indutor de degradação, apresentando valores baixos de $t_{90\%}$ e $t_{1/2}$.

Em relação à hidrólise ácida, os valores encontrados para o fármaco Agrastat® demonstram maior estabilidade, fator positivo para comercialização e garantia de segurança do consumidor. Acredita-se que o fato de o fármaco ser comercializado em tampão citrato trabalha de forma positiva para proteção do medicamento e confere maior resistência à degradação já que o cloridrato de tirofibana quando submetido a mesma condição apresentou $t_{90\%}$ e $t_{1/2}$ inferiores em relação aos obtidos para o produto acabado.

6. CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado por CLAE-DAD mostrou-se efetivo, específico, seletivo, sensível, linear, preciso, exato e robusto para quantificar o fármaco tirofibana, os produtos de degradação gerados em condições de estresse e duas de suas principais impurezas de síntese. Deste modo é apto a ser utilizado como metodologia analítica indicativa de estabilidade para o controle de qualidade deste produto.

O cloridrato de tirofibana apresentou forte estabilidade frente a degradação térmica e oxidativa enquanto que se mostrou suscetível a reações de estresse hidrolítico e fotolítico. A reação hidrólise, tanto ácida quanto básica, geraram um produto de degradação, de igual tempo de retenção e espectro, que sugerem se tratar do mesmo composto. O produto de degradação formado não interferiu na quantificação do fármaco e das suas impurezas de síntese.

A degradação do cloridrato de tirofibana e do medicamento Agrastat[®] em hidrólise ácida e do cloridrato de tirofibana em fotólise obedeceram a cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade de degradação é diretamente proporcional à concentração do fármaco. A velocidade de reação do cloridrato de tirofibana foi superior quando comparada ao Agrastat[®], indicando que o tampão citrato que compõe a formulação do fármaco corrobora para proteção e aumento de vida útil do medicamento.

No entanto, para melhor entendimento, são necessários mais estudos sobre a degradação do fármaco, para definir as rotas de degradação e sugerir a estrutura química dos produtos de degradação formados, assim como, o estudo de segurança biológica dos degradados e das impurezas de síntese do cloridrato de tirofibana.

7. REFERÊNCIAS

ABOUNASSIF, M. A.; EL-OBEID H. A.; GADKARIEM E. A. Stability studies on some benzocycloheptane antihistaminic agents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 5, p. 1011-1018, 2005.

ADAMO, M.; ARIOTTI, S.; COSTA, F.; et al., Phosphate-or citrate-buffered tirofiban versus unfractionated heparina and its impact on thrombocytopenia and clinical outcomes in patients with acute coronary syndrome. **Cardiovascular interventions**, v.9, n.16, p. 1667-1677, 2016.

ADAMO, M.; BONMASSARI, R.; BERNARDI, G.; et al., Bioequivalenza ed eccipienti: il caso del tirofiban. Um “warning” della Società Italiana di Cardiologia Interventistica (SICI-GISE). **Giornale Italiano di Cardiologia**. v.18 n.2, 2017.

ADIS International. A randomized multicenter, open-label study to evaluate the efficacy of tirofiban using a high-dose bolus plus a shortened infusion duration versus label-dosing eptifibatide in patients undergoing percutaneous coronary intervention. Disponível em: <<https://adisinsight.springer.com/trials/700212804>>. Acesso em: março de 2018.

AHMAD I., BANO R., SHERAZ M.A., AHMED S., MIRZA T., ANSARI S.A. Photodegradation of levofloxacin in aqueous and organic solvents: a kinetic study. **Acta Pharmaceutica**. v.63, n.2, p.223-229, 2013.

AHUJA, S. S.; Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 3-11, 2007.

AKL, M. A.; AHMED, M.A.; RAMADAN, A. The Utility of HPLC-UV Cleaning Validation for the Determination of Tirofiban Residues. **Journal of Chromatography & Separation Techniques**. v. 4, p. 1-5, 2013.

ALCÂNTARA, F. C. et al., Testes de degradação forçada para fármacos e medicamentos. **Revista da Pesquisa e Inovação Farmacêutica**. v.5 n.1 p. 38-48, 2013.

ALLEN, J. L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 8. ed. Artmed, 2007.

ALLEN, J. L.V. **Introdução à Farmácia de Remington**. Artmed Editora, 2016.

ALSANTE, K.M.; ANDO, A.; BROWN, R.; et al.. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 29-37, 2007.

AMSTERDAM, E. A.; WENGER, N. K.; BRINDIS, R. G.; et al..Guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association. **AHA/ACC**. v.130, n.25, p.2354-2394, 2014.

ANAIA, G.C. **Determinação multirresidual de pesticidas por HPLC no contexto de exposição ocupacional**. Tese (Doutorado em Química Analítica)- Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **A Política vigente para a regulamentação de medicamentos no Brasil**, Editora Comin/Anvisa, 2004.

ARAUJO, G.L.B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos da tibolona**. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos Área de Produção e Controle Farmacêuticos) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2009.

ASPEN PHARMA. **Bula do medicamento Agrastat®**. Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda. 2013. Disponível em:<
http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=6692772015&pIdAnexo=2767954>. Acesso em Julho 2018.

ATKINS, P. W. **Físico Química**. v. 1, ed.6, L. T. C. Editora S.A., 1999.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M; REED, R A.; **Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation**, Taylor and Francis Group, New York, 2005.

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.

BARATA-SILVA, Cristiane et al . Desafios ao controle da qualidade de medicamentos no Brasil. **Cadernos de Saúde Coletiva**. v. 25, n. 3, p. 362-370, 2017.

BERGQUIST, P.A.; HUNKE, W. A.; MANAS, D.; et al.. Compatibility of tirofiban HCl with dopamine HCl, famotidine, sodium heparin, lidocaine HCl and potassium cgloride during simulated Y-site administration. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v.24 p.125-132, 1999.

BERGQUIST, P.A.; MANAS, D.; HUNKE, W.A.; REED, R.A. Stability and compatibility of Tirofiban hydrochloride during simulated Y-site administration with other drugs. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 58, p. 1218-23, 2001.

BERNARDO, N.P. **Análise estereosseletiva de cloridrato de *cis*-tramadol e de suas impurezas em matéria-prima e formulações farmacêuticas**. 112f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 01, de 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 ago. 2005.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **Resolução N° 57, de 17 novembro 2009**. Dispõe sobre o regime de insumos farmacêuticos ativos e das outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 nov. 2009.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n° 45, de 09 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2012.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública – CP n° 11, de 23 de janeiro de 2012. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com princípios ativos sintéticos e semi-sintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília; 2012b.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n° 53 de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 234, seção 1, p. 53, 2015.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n° 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2017.

BREIER, A. R.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Photodegradation kinetics of fexofenadine hydrochloride using a LC method. **Chromatographia**, v. 64, p. 725-729, 2006.

BUENO, L.M. **Desenvolvimento de método analítico para avaliação de impurezas orgânicas de Ticagrelor**. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

CANEDO, L. F.; MACHADO, M. A. C.; COELHO, A. M. M.; et al., Efeito protetor de antagonista das glicoproteínas IIb/IIIa nas alterações hepáticas e pulmonares secundárias à isquemia e reperfusão de fígado em ratos. **Experimental gastroenterology**, v.44, n.3, p.276-282, 2007.

CARAMORI, P. R. A.; CASCO, J.R.; ZAGO, A. J.; et al . Inibição do receptor plaquetário glicoproteína (GP) IIb/IIIa em síndromes isquêmicas agudas e intervenções coronárias. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 71, n. 5, p. 725-734, 1998.

CARTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability Principles and Practices**. Third Edition, Revised and Expanded, Ed. Marcel Dekker, New York, p. 773, 2000.

CHAN, C. C.; LEE, Y.C.; ZHANG, X. **Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification**. New York: John Wiley & Sons, 2004.

CHO, Y. D.; LEE, J. Y.; SEO, J. H.; et al., Intra-arterial tirofibana infusion for thromboembolic complication during coil embolization of ruptured intracranial aneurysms, **European Journal of Radiology**, v.81, p. 2833-2838, 2012.

CHUNG, J. Y. L.; ZHAO, D.; HUGHES, S. L.; GRABOWSKI, E. J. J. A practical synthesis of fibrinogen receptor antagonist MK-383. Selective functionalization of (S)-tyrosine. **Tetraedron**. v.49, n.26, p. 5767-5576. 1993.

CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ed., 2004.

DARKOVSAKA-SERAFIMOVSKA, M.D.; JANEVIK-IVANOVSKA, E.; ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; DJORGOSKI, I.; UGRESIC, N. Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatographic method for determination of tirofiban in serum. **International Journal of Pharmacy**; v. 4, p. 115-120, 2014.

DARKOVSAKA-SERAFIMOVSKA, M.D. et al., Development of alternative HPLC method for the determination of tirofibana in rat serum. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**. V.35 n.2 p.1-8, 2016.

DI RAGO, M.; SAAR, E.; RODDA, L. N.; et al., Fast targeted analysis of 132 acidic and neutral drugs and poisons in whole blood using LC-MS/MS, **Forensic Science International**, v.243, p. 35-43, 2014.

DÍAZ, J.F. Papel del tirofiban en la sala de hemodinámica y en la angioplastia primaria. **Revista Española de Cardiología**, v. 11, p. 33-38, 2011.

EL-BAGARY, R. I.; ELKADY, E. F.; FARID, N. A.; YOUSSEF, N. F. Stability study and validated reversed phase liquid chromatographic method for the determination of tirofiban hydrochloride in presence of tyrosine as a process impurity. **Journal of the Chilean Chemical Society**. v.63, n.2, 2018.

ELLIS, J.D.; HAND, E.L.; GILBERT, J.D. Use of LC-MS/MS to cross-validate a radioimmunoassay for the fibrinogen receptor antagonist, Aggrastat (tirofibana hydrochloride) in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 561-569, 1997.

ERMER J.; MILLER J.H. McB. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. A Guide to Best Practice. Eds. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

GARABITO, M. J.; JIMENEZ, L.; BAUTISTA, F. J.; et al. Stability of tirofiban hydrochloride in 0,9% sodium chloride injection for 30 days. **American Journal Health-Syst Pharmaceutical**. v.58 p.1850-1852, 2001.

GANDHIMATHI, M.; ATHOTI, S.T.; RAVI, T.K. Three newer methods for the estimation of tirofiban hydrochloride from pharmaceutical formulation. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 9310-9315, 2013.

GARRET, E. R.; CARPER, R. F. Prediction of stability in pharmaceutical preparations. I. Color stability in a liquid multisulfa preparation. **Journal of American Pharmaceutical Association**. v.44, n.8, p. 515-518. 1955.

GENS, F. M. P. **Perfil de risco de doença cardiovascular em jovens adolescents**. 239 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2016.

GOMES, M. E. W.; FABRIS, C.; FILHO, J. L. B.; DREHER, R.; ROSITO, G.A., Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 255-264, 2000.

GRASSI, E. A.; ARAÚJO, M. C. Antiagregantes plaquetários: Ampliando conhecimento. **Disciplinarum Scientia. Série Ciências da Saúde**. v. 13, n. 1, p. 131-143, 2012.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2012.

HENRIET, T.; SECRÉTAN, P. H.; AMRANI, F.; et al. Phototransformation patterns of the antiplatelet drug in aqueous solution, relevant to drug delivery and storage. **New Journal Chemistry**. v.40 p. 1182-1194, 2016.

HIBBERT, M. Shedding light on stability testing. **Manufacturing Chemist**, v. 62, p. 32-33, 1991.

HUBER, K., HAMAD, B., & KIRKPATRICK, P. Ticagrelor. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10 n. 4, p. 255-256, 2011.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). **ICH Steering Committee**: Switzerland, 2003.

_____. Guideline on Validation of Analytical Procedure–Methodology Q2B(R1). **ICH Steering Committee**: Switzerland, 2005.

_____. Guideline on Impurities in new drug substances – Methodology Q3A (R2) and Impurities in new drug products Q3B (R2). **ICH Steering Committee**: Switzerland, 2006.

KING, S.; SHORT, M.; HARMON, C. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: The resurgence of tirofiban, **Vascular Pharmacology**, v. 78, p. 10-16, 2016.

LACHMAN, L.; DE LUCA, P.; AKERS, M. J. **Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química**. In LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Cauloste Gulbenkian, v. 2, p. 1277-1355, 2001.

LANÇAS, F. M.. The role of the separation sciences in the 21th century. **Journal of the Braziliam Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 183-197, 2003.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Editora Átomo, 2009.

LEITE, E.G. **Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos**. 2005. 199 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 5ª ed. Editora Átomo, 2008.

LEITE, F. Impurezas de degradação. **Scientia Chromatographica**. v.1, n.2, p. 63-72. 2009.

LORGA FILHO, A. M.; AZMUS, A. D.; SOEIRO, A. M.; et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes brasileiras de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes em cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, n.3 p.1-116, 2013.

MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALESUIK, M.D.; PAIM, C.S.; GONCALVES, H.M.; et al. Analysis of photodegradation kinetics of nitazoxanide in pharmaceutical formulations. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, p. 745-748, 2009.

MANOUKIAN, V. A Randomized, Multicenter, Open-Label Study to Evaluate the Efficacy of Tirofiban Using a High-Dose Bolus Plus a Shortened Infusion Duration Versus Label-Dosing Eptifibatide in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention, **ICH GCP**. Disponível em: < <http://ichgcp.net/clinical-trials-registry/research/index/NCT015224172016>.> Acesso em: Fevereiro de 2018.

MASSAROLI, L. C.; SANTOS, L. C.; CARVALHO, G. G.; et al. Qualidade de vida e o IMC alto como fator de risco para doenças cardiovasculares: Revisão sistemática. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v.16, p. 1-10, 2018.

MARQUES, F. C.; STUMBO, A. M.; CANELA, M. C. Estratégias e materiais utilizados em fotocatalise heterogênea para geração de hidrogênio através da fotólise da água. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 561-571, 2017.

MEIRELLES, L. M. A. Estabilidade de medicamentos: Estado da arte. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. XI, n. 4, p. 06-26, 2014.

MELO, S. R. O. **Produtos de degradação: Regulamentação Sanitária**. f. 115. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

MERCK & CO., INC. **Novel sulfonamide fibrogen receptor antagonists**. Patent number 5232756, 25 mar. 1992, 08 mar. 1994.

MERCK. **Bula do medicamento Aggrastat®**. Merck & co., Inc. 1998. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/1998/20912lbl.pdf>. Acesso em: maio 2017.

MOLITERNO, D. J. A randomized two-by-two comparison of high-dose bolus tirofibana versus abciximab and unfractionated heparin versus bivalirudin during percutaneous coronary revascularization and stent placement: the tirofiban evaluation of novel dosing versus abciximab with clopidogrel and inhibition of thrombin (TENACITY) study trial, **Catheterization and Cardiovascular Interventions**, v.77 n.7 p. 1001-1009, 2011.

MÜHLEN, C. V.; LANCAS, F. M.. Cromatografia unificada. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.

NATARAJ, K.S.; SAI KUMAR, S.V.; KALYANI, N.V.V.S.; BADRU DUZA, M. Development and validation of a reverse phase high performance liquid chromatographic method for the estimation of tirofiban in pharmaceutical dosage forms, **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 200-203, 2013.

NAZIF, T. M.; MEHRAN, R.; FAHY, M.; et al., Comparative effectiveness of upstream glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with moderate- and high-risk acute coronary syndromes: an Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy (ACUITY) substudy. **American Heart Journal**, v.167 n.1 p.43-50, 2014.

NEY, L.; KORNER, M.; LEIBIG, M.; HEINDL, B., Traumatic dissection of a coronary artery: Detection by multislice computed tomography and use of tirofibana as a reversible platent inhibitor, **Resuscitation**, v.82, p. 358-360, 2011.

NG L.; LUNN G.; FAUSTINO P. Organic impurities in drug substance: origin, control, and measurement. In: **Analysis of Drug Impurities**. SMITH R.J.; WEBB. M.L. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p 1 - 46.

NIESWANDT, B., PLEINES, I., BENDER, M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.9, p. 92-104, 2011.

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

OCHOA, J.; VELÁSQUEZ, J. G.; CEDANO, J.A; et al., Desenlaces clínicos em uns cohorte de pacientes com síndrome coronário agudo y administración intracoronaria de tirofibana, **Revista Colombiana de Cardiología**, v. 22, n. 1, p. 6-13, 2015.

OERTEL, R.; KÖHLER, A.; KOSTER, A.; KIRCH, W. Determination of Tirofiban in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, v. 805, p. 181-185, 2004.

O’GARRA, P.; KUSHNR, F. G.; ASCHEIM, D. D.; et al.. Guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, **ACCF/AHA**. v.127, n.4, p.529–555, 2013.

OKUNO, E.; VILELA, M. A.C. **Radiação ultravioleta: características e efeitos. Temas atuais de física**. Editora Livraria da Física. Sociedade Brasileira de Física. São Paulo, 1º edição, 2005.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica, **Química Nova**, v.34, n.7, p. 1224-1230, 2011.

O'NEIL, M. J., ed. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**, 15th ed. New Jersey: Merck, 2013.

OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S.F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Química Nova**, v.38, n.10, p. 1273-1281, 2015.

PATEL, K.; HURSTING, M. J., Compatibility of argatroban with abciximab eptifibatide, or tirofibana during simulated Y-site administration, **American Journal Health-System Pharmaceutical**, v. 62, p. 1381-1386, 2005.

PESARO, A. E. P; CAMPOS, P. C. G. D.; KATZ, M.; et al. Síndromes Coronarianas Agudas: Tratamentos e Estratificação de Risco. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.20, n.2, p. 197-204, 2008.

RANJITHA, K. S.; RAO, A. L. Development and validation of new rp-hplc method for the determination of tirofiban in pharmaceutical formulation. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 1, p. 43-47, 2011.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIESS, F. C., Anticoagulation management and cardiac surgery in patients with heparin-induced thrombocytopenia, **Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 17, p. 85-96, 2005.

ROCHA, R. M. Glicoproteínas IIIb/IIIa. Artigo de Revisão. **Revista SOCERJ**. v.14 n.1 p.34-40, 2001.

ROGERS, A. R. As accelerates storage test with prograded temperature rise. **Journal of pharmacy and pharmacology**. v.15, n.S1. 1936.

ROSA, E. Aplicações da cinética química. A estabilidade dos medicamentos. **Boletim SPQ**. v.42 p. 47-53, 1990.

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T; et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo , v. 100, n. 1, supl. 3, p. 1-40, 2013.

SILVA, K.E.R et al., Modelos de Avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.30 n.2 p. 129-135, 2009.

SILVA, M. S.; SILVA, N. B.; ALVES, A. G. P.; et al. Risco de doenças crônicas não transmissíveis na população atendida em Programa de Educação Nutricional em Goiânia (GO), Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 5, p. 1409-1418, 2014.

SILVA, A. F. A. **Validação de métodos analíticos para control de qualidade de um medicamento, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**. f. 73.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica) – Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2016.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1995.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceutical Technology On-Line**. p. 1-14, 2000.

SITTING, M., ed. **Pharmaceutical Manufacturing encyclopedia**, 3rd ed. New York: Willian Andrew Publishing, 2007.

STONE, G. W., BERTRAND, M. E.; MOSES, J. W.; et al., Routine upstream initiation vs deferred selective use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: the ACUITY Timing trial. **Jama**. v. 297 n.6 p. 591-602, 2007.

TEBET, M.A. et al., Angioplastia primária via radial com doses aumentadas de tirofiban: uma técnica segura e efetiva. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**. v.15 p.255-260, 2007.

TONNESEN, H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1-14, 2001.

TOPOL, E. J.; MOLITERNO, D. J.; HERRMANN, H. C.; et al., Comparison of two platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, tirofiban and abciximab, for the prevention of ischemic events with percutaneous coronary revascularization. **New England Journal of Medicine**, v.344 p.1888–1894, 2001.

TORONTO RESEARCH CHEMICALS. Debutylpiperidine Tirofiban. 2015 Disponível em: < <https://www.trc-canada.com/product-detail/?D209750>>. Acesso em maio 2018.

TOWNSEND, N.; WILSON, L.; BHATNAGAR, P.; et al. Cardiovascular disease in Europe: emidemiological update 2016. **European Heart Journal**. v.1 p. 1-14, 2016.

USP 37. **The United States Pharmacopoeia**. 37th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

VANDER HEYDEN. Y., NIJHUIS, A., SMEYERS-VERBEKE, J., VANDEGINSTE, B.; MASSART, D.; Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. v.24, n. 5-6, p.723-753, 2001.

VALGIMIGLI, M.; CAMPO, G.; PERCOCO, G.; et al., Comparison of angioplasty with infusion of tirofiban or abciximab and with implantation of sirolimus-eluting or uncoated stents for acute myocardial infarction: the MULTISTRATEGY randomized trial. **Jama**. v.299 n.15 p. 1788-1799, 2008.

VALGIMIGLI, M.; BIONDI-ZOCCAI, G.; TELBALDI, M.; et al., Tirofiban as adjunctive therapy for acute coronary syndromes and percutaneous coronary

intervention: a metaanalysis of randomized trials. **European Heart Journal**. v. 31 n.1 p. 35-49, 2010.

VALGIMIGLI, M.; TELBADI, M.; CAMPO, G.; et al., Prasugrel versus tirofiban bolus with or without short post-bolus infusion with or without contaminant prasugrel administration in patients with myocardial infarction undergoing coronary stenting : the FABOLUS PRO (Facilitation through Aggrastat By drOpping or shortening Infusion Line in patients with ST-segment elevation myocardial infarction compared to or on top of PRasugrel given at loading dOse) trial. **Cardiovascular Interventions**. v. 5 n.2 p. 268-278, 2012.

VALGIMIGLI, M.; COMPO, G.; GAMBETTI, S.; et al., Three-yeer follow-up of the multicenter evaluation os single high-dose bolus tirofibana versus abciximab with sirolimus-eluting stent or bare-metal stent in acute myocardial infarction study (multistrategy). **International Journal of Cardiology**. v.165 p 134-141, 2013.

VICKERS, S. et al., In vitro and in vivo studies on the metabolism of tirofibana. **Drug Metabolism and Disposition**. V.27 n.11, 1999.

YANG, S. et al., Bioavailability and pharmacokinetic study of tirofibana in rat by liquid chromatography mass spectrometry. **Latin American Journal of Pharmacy**. V.35 n.1 p.44-46, 2016.

YOSHIOKA, S., STELLA, V.J. **Stability of drugs and dosage forms**. New York, Kluwer Academic Publishers. 2002.

YUSUF, S.; HAWKEN, S.; OUNPUU, S; et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet**, 364, 937-952.

WARDEN, B. A., WILLMAN, A. M., & WILLIAMS, C. D. Antithrombotics for secondary prevention of noncardioembolic ischaemic stroke. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 4, p. 223-235, 2012.

WATSON, G. D. High pressure liquid chromatography. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone. Cap. 12, p. 237-276, 2005.

WEITZ, J.I. Coagulação sanguínea e fármacos anticoagulantes, fibrinolíticos e antiplaquetários. In BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. Porto Alegre: AMGH Editora LDTA, p. 849-876, 2012.

WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 124-148.

WHO. World Health Organization (2015). Cardiovascular diseases: Key Facts. Acedido a 26 de dezembro de 2013 em [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

WOOD, D. Established and emerging cardiovascular risk factors. **American heart journal**, v. 141, n.2, p.S49-S57, 2001.

ZHAO, Q.; HE, Y.; MANG, S. X.; et al., Effect of intracoronary plus low-dose intravenous tirofiban in elderly patients with acute myocardial infarction. **Heart Lung and Circulation**. v.24 p. 1062-1067, 2015.