

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

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudos de estabilidade
da Rivaroxabana

NATHALIE RIBEIRO WINGERT

PORTO ALEGRE, 2015

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

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudos de estabilidade
da Rivaroxabana

Tese apresentada por **Nathalie Ribeiro Wingert**, para obtenção do TÍTULO
DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.11.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas S. Loureiro Mendez, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim, Universidade Federal do Pampa;

Profa. Dr. Pedro Eduardo Froehlich; Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CIP - Catalogação na Publicação

WINGERT, NATHALIE RIBEIRO
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
E ESTUDOS DA ESTABILIDADE DA RIVAROXABANA / NATHALIE
RIBEIRO WINGERT. -- 2015.
197 f.

Orientador: MARTIN STEPPE.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. RIVAROXABANA. 2. CLUE-EM/EM. 3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL. 4. CIVIV. 5. ELETROFORESE CAPILAR. I. STEPPE, MARTIN, orient. II. Título.

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

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Martin Steppe pela supervisão científica e dedicação profissional durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meu pai Paulo e minha mãe Sonia, bases que sustentaram meus passos até aqui, razões pelas quais posso sempre mais. Obrigada pelo apoio incondicional, por acima de tudo acreditarem em mim e sempre me receberem com carinho e amor. Aos meus irmãos pelo carinho e compreensão, assim como pela repreensão que nos faz mudar.

Ao meu querido Guilherme, amigo e companheiro, pelo amor e compreensão.

Aos professores Elfrides Schapoval, Nádia Volpato, Tércio Oppe, Cássia Garcia, exemplos de profissionalismo e dedicação.

Aos amigos, colegas e ex-colegas do LCQFar pela troca de conhecimentos e incentivo. Àqueles que acompanharam meus primeiros passos científicos: Clésio, Marcelo, Aline, Rúbia, Alini, Letícia, Diogo, Fernanda, Bárbara, Carem, Mariana e Lorena. Àqueles com quem dividi muitos momentos do doutorado: Alianise, Rita, Amanda, Vítor, Max, Márcia, Jaison. Àqueles que em pouco tempo se tornaram grandes colegas: Rafaela, Lívia, Ida, Letícia, Camila, Julia, Joanna, Elisa, Márcio, Andressa e Sendy. Agradecimento especial às alunas de iniciação científica Natália e Sarah, fundamentais no desenvolvimento desse trabalho.

À amiga e colega Patrícia Gomes, pela atenção, carinho e motivação ao longo de tantos anos.

Ao Prof. Érico Flores, do Departamento de Química Analítica da UFSM pela disponibilidade do equipamento de UPLC-MS/MS e a todo o pessoal do SQIA pela receptividade e aprendizagem.

À Prof. Solange Garcia e ao Marcelo Arbo do LaTox pelo auxílio na condução dos ensaios de cito e genotoxicidade, bem como pela dedicação de todos envolvidos nesse projeto.

Ao Prof. Detlle Belder pela oportunidade de aprendizagem no Instituto de Química Analítica da Universidade de Leipzig. Aos colegas do laboratório pela atenção e conhecimentos transmitidos. Meinen herzlichen Dank an Sandra und Karin.

À UFRGS, pela possibilidade de execução desse trabalho e auxílio em meu desenvolvimento científico.

À CAPES pela bolsa de doutorado e doutorado sanduíche.

Ao DAAD pelo programa de intercâmbio científico de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, a todos os professores e funcionários desta instituição.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

A análise de fármacos é fundamental nas diversas fases do desenvolvimento farmacêutico, tais como estudos de formulação, estabilidade e controle de qualidade do produto. A rivaroxabana (RIV) é um anticoagulante de uso oral indicado para prevenção da formação de coágulos venosos. A literatura pesquisada apresenta poucos relatos de determinação quantitativa e de estudos de estabilidade do fármaco em comprimidos. E ainda nenhum método analítico em compêndios oficiais. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa da RIV por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV e de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas (CLAE-UV e CLUE-EM) e eletroforese capilar (EC). Os resultados encontrados foram adequados conforme o preconizado nos guias oficiais nacionais e internacionais. Foi avaliada também a viabilidade da técnica de eletroforese capilar em *microchip* para análise de RIV. Através de método desenvolvido por CLAE foi realizado estudo de cinética de degradação e posterior avaliação do potencial tóxico *in vitro* das amostras de degradação forçada da RIV. A identificação de três produtos de degradação majoritários da RIV, formados a partir de estresse ácido, alcalino e fotolítico, foi realizada por CLUE-EM/EM, possibilitando a proposição da estrutura molecular de cada produto de degradação. O potencial tóxico da RIV antes e depois da exposição à degradação forçada foi avaliado através dos métodos *in vitro* MTT, Vermelho Neutro, Ensaio Cometa e DNA de baixo peso molecular. Não foram encontrados sinais de dano ao DNA celular, contudo, amostras de RIV expostas ao meio alcalino apresentaram maior redução da viabilidade celular. O trabalho avaliou ainda o perfil de dissolução da RIV em comprimidos baseado nos dados de absorção *in vitro* conforme modelagem *in silico* dos dados, estabelecendo uma correlação linear entre a fração absorvida e fração dissolvida. As diferentes metodologias e técnicas desenvolvidas e aplicadas nesse trabalho contribuem para o desenvolvimento do controle de qualidade farmacêutico na direção de ensaios mais confiáveis que garantam a segurança e eficácia de medicamentos.

Palavras-chaves: rivaroxabana, CLAE, EC, CLUE-MS/MS, identificação de produtos de degradação, CIVIV.

ABSTRACT

Drug analysis is critical at various stages of pharmaceutical development, such as formulation studies, stability and quality control products. Rivaroxaban (RIV) is an oral anticoagulant indicated for prevention of thromboembolism. Literature contains few reports of quantitative determination and drug stability studies of RIV on pharmaceutical formulation. Analytical method for RIV quality control are not evaluable on official guides yet. This research work aimed to develop and validate analytical methods for qualitative and quantitative determination of RIV by high and ultra performance liquid chromatography with UV detection mass spectrometry detection (HPLC -UV and UPLC-MS) and capillary electrophoresis (CE). The results were adequate as recommended in national and international official guides. Reliability of RIV analysis by microchip capillary electrophoresis was also assessed. Through the method developed by HPLC degradation kinetic studies were performed, zero order kinetic has better description of RIV degradation behaviour. RIV toxic potential before and after exposure to forced degradation was assessed by *in vitro* methods of MTT, Neutral Red, Comet Assay, and Low Molecular Weight DNA. There were no signals of DNA damage however, RIV samples exposed to alkaline medium showed increased reduction in cell viability. Identification of RIV degradation products formed after exposure to acid and alkaline media and UVC radiation was performed by UPLC-MS / MS. It was possible to elucidate molecular structures of three major degradation products. This study also assessed the dissolution profile of RIV tablets based on *in vitro* absorption data, a linear point-to-point correlation was found for fraction absorbed and dissolved. Different methodologies and techniques developed and applied in this work can contribute to the development of pharmaceutical quality towards more reliable tests to ensure safety and efficacy of medicines.

Keywords: rivaroxaban, HPLC, UPLC-MS/MS, degradation product identification, CE, IVIVC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.3-1. Estrutura química da Rivaroxabana	36
Figura 4-1. Termograma obtido por DSC para RIV SQR.	48
Figura 4-2. Espectro de IV de RIV SQR.....	49
Figura 4-3. Espectro de massas da RIV SQR por infusão direta e ESI+.....	50
Figura 5-1. Sobreposição dos espectros de absorção de UV de RIV SQR (linha contínua) e RIV amostra de comprimidos (linha tracejada).....	56
Figura 5-2. Cromatogramas resultantes da análise de RIV SQR e RIV amostra dos comprimidos, em CLAE com detecção por UV, em 250 nm.....	58
Figura 5-3. Cromatogramas de massas obtidos por CLUE-EM para RIV SQR (A) e RIV na amostra de comprimidos (B), em 10µg/mL.	59
Figura 5-4. Cromatogramas de RIV SQR (A) e amostra dos comprimidos (B) analisados em CLUE com detecção por UV.	60
Figura 5-5. Eletroferogramas sobrepostos de RIV SQR (linha contínua) e RIV amostra (linha tracejada) a 100 µg/mL.....	62
Figure 6-1. Representative total ion MS chromatogram of RIV standard (m/z 436.1) and IS amitriptyline (m/z 278.2) from UPLC-MS.....	79
Figure 6-2. RIV MS/MS full scan spectrum.	79
Figure 6-4. Electropherogram of RIV 60 µg.mL ⁻¹ analysed on FSCE condition.	95
Figure 6-5. RIV analysis on 13 mM tetraborato pH 9 + 0.81 % octane + 6.61% butanol + 3.31 % SDS microemulsion electrolyte.	96
Figure 6-6. Electropherograms of RIV analysis by MEEKC.	97
Figure 6-7. . Ilustração do microchip utilizado para as análises de MCE-MS.....	106
Figure 6-8. Fotografia do cruzamento entre os microcanais de injeção e separação no momento da injeção.	109
Figure 6-9. Fotografia do cruzamento entre os microcanais de injeção e separação no momento da injeção.	109
Figure 7-1. Pareto chart of effects for RIV concentration assay with Plackett-Burman design for robustness evaluation.....	132
Figure 8-1. Plasmatic profile of RIV 20 mg up to 24 h for in vivo (C _{pe}) and in silico (C _{ps}) data.....	174

Figure 8-2. RIV dissolution profile using apparatus 1, 30 rpm spinning, sodium acetate + 0.2 % SDS, pH 6.5 medium. Samples collected up to 180 min with media replacement. 177

Figure 8-3. In vitro-in vivo profile of RIV tablets. Fraction dissolved represents mean values for six measurements. 178

Figure 8-4. RIV dissolution or absorption fractions available profile along 180 min. 179

LISTA DE TABELAS

Tabela 4-1. Frequência das principais bandas de absorção de RIV e suas respectivas atribuições (STUART, 1996).	49
Tabela 5-1. Condições cromatográficas para identificação de RIV em comprimidos por CLAE.	57
Tabela 5-2. Condições cromatográficas e parâmetros otimizados do espectrômetro de massas para identificação de RIV em comprimidos por CLUE-EM.	59
Table 6-1. Accuracy data of UPLC-MS for RIV in pharmaceutical formulations. 81	
Table 6-2. Selected factors for full factorial design with optimized values and variations (low and high) applied to each factor.	82
Table 6-3. ANOVA results for experimental design model	82
Table 6-4. Method linearity parameters and, LOD and LOQ values of RIV.	98
Table 6-5. Intra-day and inter-day precision of RIV.	99
Table 6-6. Accuracy of MEEKC method for RIV analysis.	99
Table 6-7. Robustness of MEEKC method for RIV.	99
Table 6-8. Condições eletroforéticas otimizadas análise da RIV por MCE.	110
Table 7-1. Scheme adopted to degrade RIV samples in different stress conditions before evaluation of <i>in vitro</i> toxic potential.	127
Table 7-2. HPLC method validation parameters for analysis of RIV.	132
Table 7-3. Resulting effect for Plackett-Burman design.	132
Table 7-4. Average results for performance parameters along robustness evaluation	133
Table 7-5. Kinetic values found for RIV degradation studies.	134
Table 7-6. Profile from RIV degradation products obtained under stress conditions.	154
Table 8-1. Rivaroxaban fraction dissolved (FD), fraction absorbed calculated by deconvolution (FA calc), fraction absorbed determined through IVIV correlation equation (FA pred), and prediction error between FApred and FAcalc (Error, %). ...	178
Table 8-2. Results from evaluated parameters on dissolution method validation.	180

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise da variância;

CE – Capillary electrophoresis;

CL - cromatografia líquida;

CLAE - -Cromatografia líquida de alta eficiência;

CLUE - Cromatografia líquida de ultra eficiência;

Cp - Concentração plasmática;

DPR – Desvio padrão relativo;

DSC -análise térmica por calorimetria exploratória de varredura;

EC - Eletroforese capilar;

EM - Espectrometria de massas;

FEO - Fluxo eletrosmótico;

FXa – Fator de coagulação X ativado;

IV - Espectrofotometria na região do infravermelho;

Ka – constante de absorção;

Ke – constante de eliminação;

LC- Liquid chromatography;

m/z – Relação massa/carga;

MCE – Microchip capillary electrophoresis (eletroforese capilar em microchip);

MEEKC – Microemulsion electrokinetic chromatography (cromatografia eletrocinética em microemulsão);

MEKC – Micelar electrokinetic chromatography (cromatografia eletrocinética em micela);

MS – Mass spectrometry;

PDA - Photodiode array detector;

PI - Padrão interno;

RIV - - Rivaroxabana;

RSD – Relative standard deviation;

SQR - Substância química de referência;

UV - ultravioleta.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	XXIII
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAIS.....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
3.1. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	33
3.2. RIVAROXABANA (RIV)	34
3.3. METODOLOGIAS ANALÍTICAS QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS.....	36
3.4. PLANEJAMENTO FATORIAL.....	40
3.5. ESTUDO DE ESTABILIDADE	40
3.6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE IN VITRO	41
3.7. ENSAIO DE DISSOLUÇÃO	42
4. CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA	
45	
4.1. INTRODUÇÃO	47
4.2. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) DE RIVAROXABANA..	47
4.3. CARACTERIZAÇÃO DA SQR DE RIV	47
4.4. DISCUSSÕES E CONCLUSÕES GERAIS.....	51
5. CAPÍTULO II: ANÁLISE QUALITATIVA DA RIVAROXABANA.....	53
5.1. INTRODUÇÃO	55
5.2. PRODUTO FARMACÊUTICO	55
5.3. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS	55
60	
5.4. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	62
6. CAPÍTULO III: ANÁLISE QUANTITATIVA DA RIVAROXABANA	65
6.1 INTRODUÇÃO	67
6.2. ARTIGO CIENTÍFICO I: Ultra-performance LC-ESI/QTOF MS for rapid analysis of rivaroxaban: method validation using experimental design for robustness evaluation.....	71

6.3. ARTIGO CIENTÍFICO II: Quantitative Analysis of Anticoagulant Rivaroxaban by Microemulsion Electrokinetic Chromatography	87
6.4. Análise de rivaroxabana por eletroforese capilar em microchip	103
6.5 DISCUSSÃO GERAL	112
6.6. CONCLUSÕES	114
7. CAPITULO IV – ESTUDO DA ESTABILIDADE: IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	115
7.1. INTRODUÇÃO	117
7.2. ARTIGO CIENTÍFICO III: Kinetic evaluation of rivaroxaban degradation assessment to <i>in vitro</i> toxicity	121
7.2. ARTIGO CIENTÍFICO IV: Characterization of three main degradation products from novel oral anticoagulant rivaroxaban under stress conditions by UPLC-QTOF-MS/MS	143
7.3. DISCUSSÃO GERAL	160
7.4. CONCLUSÕES	162
8. CAPÍTULO V: ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E CORRELAÇÃO COM DADOS <i>in vivo</i>	163
8.1. INTRODUÇÃO	165
8.2. ARTIGO CIENTÍFICO V: Development of <i>in vitro</i> dissolution method fitted to <i>in vivo</i> absorption of rivaroxaban in pharmaceutical dosage applying <i>in silico</i> modelling	167
8.3. DISCUSSÃO GERAL	185
8.4. CONCLUSÕES	186
9. REFERÊNCIAS	187

1. INTRODUÇÃO

Condições patológicas como no tromboembolismo venoso, a fibrilação atrial e a síndrome coronária aguda levam ao aumento na probabilidade de formação de trombos na circulação sanguínea, podendo levar à ocorrência de embolia pulmonar, trombose venosa profunda e complicações cerebrovasculares como o acidente vascular cerebral.

O risco de trombose venosa profunda após cirurgias ortopédicas de grande porte, como substituição da articulação (artroplastia) de joelho e quadril, existe devido a alterações no fluxo sanguíneo nas veias, facilitando a formação de coágulos (BARROS-SENA e col., 2008).

A rivaroxabana (RIV) é um inibidor seletivo do fator de coagulação X ativado (FXa), possuindo atividade quando o FXa se apresenta livre ou ligado ao complexo pró-trombinase (KAMATA e col., 1998).

A RIV foi aprovada para a prevenção de trombose venosa profunda após artroplastia de quadril ou joelho pelo *Health Canada* em setembro de 2008 e pelo *European Medicines Agency* (EMA) em outubro de 2008. Em julho de 2011, a RIV foi liberada para comercialização pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (HEALTH CANADA, 2008; EMA, 2008; FDA, 2012).

No Brasil, a RIV foi aprovada pela Anvisa no final de 2009, sendo comercializada com o nome Xarelto®, sob forma de comprimidos revestidos com dosagens de 10, 15 ou 20 mg de RIV. Desenvolvido e fabricado pela Bayer HealthCare AG, sendo distribuído pela Bayer S.A.

A análise de fármacos é necessária nas diversas fases de desenvolvimento farmacêutico, tais como estudos de formulação, estabilidade e controle de qualidade. A carência de métodos de domínio público para avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (SWARTZ E KRULL, 1998).

Por tratar-se de um medicamento novo e com recente inclusão no mercado, a RIV não possui monografia em nenhuma farmacopéia nacional e internacional, nem registros oficiais disponíveis para determinações qualitativas e quantitativas deste fármaco. Considerando a necessidade da avaliação continuada da qualidade e segurança de produtos farmacêuticos, os estudos de estabilidade, caracterização e avaliação de produtos de degradação, bem como, informação relativas ao perfil de

dissolução do medicamento são de reconhecida importância e demandam estudos detalhados.

Face ao exposto, justifica-se propor, desenvolver e validar diferentes métodos analíticos, inovadores e exequíveis, para avaliar a qualidade da RIV na forma farmacêutica, assim como, estudar a estabilidade e o perfil de dissolução dessa substância ativa.

Justifica-se, também, o fato do presente projeto vir a contribuir na hipótese do surgimento de medicamentos similares ou genéricos desse fármaco, pois, até a presente data, a RIV é comercializada somente por um laboratório no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia analítica para a caracterização e determinação quantitativa da rivaroxabana em comprimidos revestidos. Estudos da dissolução *in vitro*, bem como conduzir estudos de estabilidade e posterior elucidação dos produtos de degradação majoritários formados e estudo de toxicidade *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a substância química de referência (SQR) por espectrofotometria na região do infravermelho (IV), análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC), espectrofotometria no ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (EM);
- Desenvolver e validar métodos qualitativos e quantitativos para análise da RIV em comprimidos revestidos e SQR e, posteriormente, para os ensaios de estabilidade. Os métodos a serem trabalhados: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), eletroforese capilar (EC) e eletroforese capilar em microchip (ECM);
- Realizar estudo da estabilidade térmica, química e fotoquímica da solução dos comprimidos revestidos de RIV e determinação da cinética de degradação da RIV;
- Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico de soluções de RIV após degradação por estresse;
- Realizar a elucidação estrutural dos produtos de degradação majoritários de RIV através de cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas;
- Desenvolver e validar método de dissolução para os comprimidos revestidos de RIV baseado nos dados *in vivo* e avaliar a correlação da fração dissolvida *in vitro* com a fração absorvida de RIV.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A interrupção do sangramento de vasos sanguíneos lesados é chamada de hemostasia sanguínea. Após um ferimento, há a ocorrência de vasoconstrição seguida de ativação plaquetária e formação de fibrina. A intensidade de cada processo depende do tipo de vaso (arterial, venoso ou capilar) que foi lesado (RANG *et al.*, 2008).

3.1.1. Cascata de coagulação

O sistema de coagulação consiste de uma cascata de enzimas proteolíticas e co-fatores. Precursores inativos são ativados em série, cada um originando maior quantidade do fator seguinte. A última enzima a ser ativada, a trombina, converte o fibrinogênio solúvel em uma trama de fibrina insolúvel que aprisiona as células sanguíneas e forma o coágulo (CASSONE *et al.*, 2002).

A cascata de coagulação ocorre por duas vias: a intrínseca, que opera *in vitro*, e a extrínseca, que opera *in vivo*. Ambas as vias resultam da ativação do fator X (FXa), que se complexa imediatamente com os fosfolipídios teciduais e também com o fator V, formando o complexo denominado ativador de pró-trombina, posteriormente convertido em trombina (GUYTON, 2006).

3.1.2. Trombose

O tromboembolismo venoso (TEV) é uma condição patológica consequente da ativação inadequada dos mecanismos hemostáticos, ocorrendo a formação patológica de um tampão “hemostático” na vasculatura sem a presença de um sangramento. O trombo venoso consiste em uma trama difusa de fibrina na qual os eritrócitos e leucócitos são aprisionados indiscriminadamente (CASSONE *et al.*, 2002; RANG *et al.*, 2008).

As doenças trombóticas e tromboembolíticas são relativamente usuais e apresentam consequências graves, como acidente vascular cerebral, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. Dados epidemiológicos brasileiros de 2008 a 2010 apontam que, dentre os casos de internação pelo SUS por trombose venosa profunda e sua principal complicação, a embolia pulmonar, a taxa de mortalidade foi

de 2,38%. Conforme dados do Ministério da Saúde Brasileiro, entre 2009 e 2010, 21,9% dos pacientes internados com embolia pulmonar morreram. Estima-se que a embolia pulmonar seja responsável por 4% do número total de mortes em hospitais (OKUHARA et al. 2014). Estudos realizados na Europa Ocidental, América do Norte, Austrália e sul da América Latina (Argentina) relativos à prevalência do TEV produziu resultados consistentes, onde as taxas de incidência anuais variam entre 0,75-2,69 por 1000 indivíduos. A ocorrência de casos aumenta para 2 a 7 por mil entre aqueles com idade ≥ 70 anos (ISTH, 2014).

3.2. RIVAROXABANA (RIV)

Os fármacos anticoagulantes, através de diferentes mecanismos da ação, visam alterar o equilíbrio entre as relações pró-coagulantes e anticoagulantes (MAJERUS E TELLEFSERN, 2005).

A RIV foi o primeiro inibidor do fator de coagulação Xa a ser aprovado no Canadá e na União Europeia (MORELL *et al.*, 2010). Conforme afirmado por McBRIDE (2005), a inibição do FXa demonstra ser um alvo de ação mais importante quando comparado com a trombina, uma vez que uma molécula de FXa é capaz de ativar mais de mil moléculas de trombina.

O produto farmacêutico é comercializado na forma de comprimidos orais de 10, 15 e 20 mg. Devido a sua previsibilidade farmacocinética, que é proporcional ao efeito farmacodinâmico, o medicamento não necessita de monitoramento contínuo como outros anticoagulantes (AGNELLI *et al.*, 2007).

3.2.1. Indicações farmacêuticas

A indicação terapêutica inicial da RIV estava relacionada unicamente para a prevenção da formação de coágulos sanguíneos venosos após artroplastia de joelho ou quadril. Atualmente, o medicamento é prescrito também para a prevenção de acidente vascular cerebral (AVC) em pacientes com fibrilação atrial não valvar e tratamento e profilaxia da recorrência de trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP) (JANSSEN PHARMACEUTICAL, 2015).

Sem profilaxia, a TVP pode ocorrer entre 40% a 70% dos submetidos à artroplastia. A formação de trombos está associada à presença da tríade: estase venosa, lesão endotelial e hipercoagulação (CASSONE *et al.* 2002).

A terapia padrão atual para prevenção de trombozes após cirurgias ortopédicas de grande porte recomenda o uso de heparinas de baixo peso molecular (HBPM) como a nadroparina, a enoxaparina e a deltaparina. Porém, esses fármacos apresentam desvantagens como repetida administração subcutânea e dificuldade de avaliação do nível das HBPM no organismo de forma rotineira, impossibilitando a elucidação do perfil farmacocinético no plasma humano (ROHDE, 2008).

3.2.2. Farmacodinâmica e farmacocinética

A RIV é um inibidor direto altamente seletivo do FXa que apresenta alta biodisponibilidade oral. A ativação do fator X por meio das vias intrínseca e extrínseca leva à conversão da protrombina em trombina através do complexo de protrombinase, conduzindo à formação do coágulo de fibrina e à ativação das plaquetas pela trombina. A taxa de reação do FXa ligado à protrombinase aumenta 3×10^5 vezes em comparação à taxa do FXa livre, causando grande aumento geração de trombina. A RIV influencia o tempo de protrombina de modo dose-dependente, apresentando correlação estreita com as concentrações plasmáticas do fármaco ($r = 0,98$) (KUBITZA *et al.*, 2005).

A biodisponibilidade absoluta da RIV está entre 80 e 100% para a dose de 10 mg. O fármaco atinge concentração máxima entre 2 a 4 horas após ingestão do comprimido. A administração da RIV junto a alimentos não afeta a ASC ou o C_{máx}. A variabilidade farmacocinética do anticoagulante é moderada, entre 30 e 40%, exceto em casos que o medicamento é administrado no dia exato ou posterior da artroplastia de quadril ou joelho, quando a variabilidade individual aumenta para 70%. A ligação às proteínas plasmáticas fica entre 92 e 95%, principalmente à albumina sérica. O volume de distribuição no *steady state* é de aproximadamente 50 L. Aproximadamente 38% da RIV administrada é metabolizada pelo fígado, via citocromo P450 3A4 e 2J2, sendo igualmente eliminada via renal e via fecal. O restante de dose administrada é excretado diretamente pelos rins de forma inalterada na urina. A degradação oxidativa da parte morfolinona e a hidrólise das ligações amida são os principais locais de biotransformação da RIV (WEINZ *et al.*, 2009).

3.2.3. Descrição do fármaco

O anticoagulante rivaroxabana (Figura 3-1) apresenta as seguintes características (ROEHRIG *et al.*, 2005):

- Aspecto: pó cristalino branco ou quase branco, não higroscópico;
- Nome químico (IUPAC): (S)-5-Clor-N-{2-oxo-3-[4-(3-oxomorfolin-4-il)fenil]-1,3-oxazolidin-5-ilmetil}tiofen-2-carbamida;
- Fórmula molecular: C₁₉H₁₈ClN₃O₅S;
- Massa molecular: 435,88 g/mol
- Massa molecular monoisotópica: 435,0656 g/mol
- pKa1: 1,01; pKa2: 13,36.
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): 865479-71-6

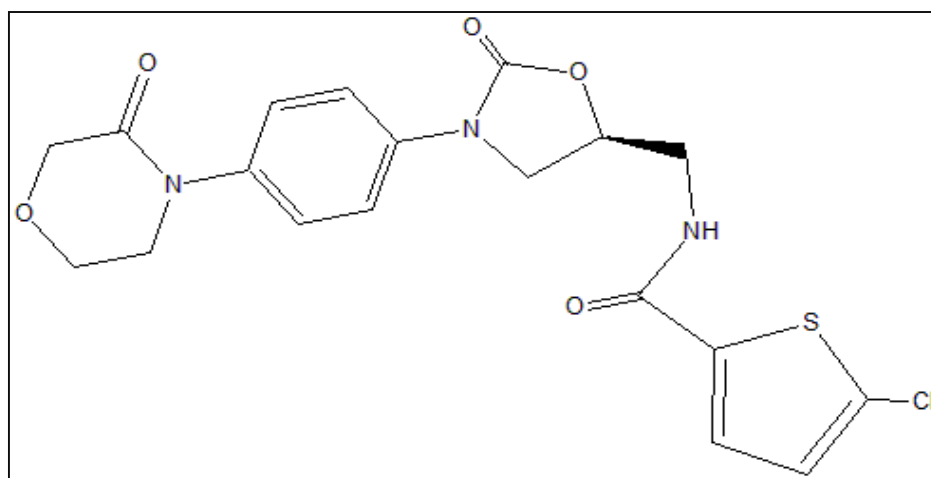


Figura 3-1. Estrutura química da Rivaroxabana

3.3. METODOLOGIAS ANALÍTICAS QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se verifica, através de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico atendem às exigências para a aplicação analítica pretendida (BRASIL, 2003).

Realizar a validação completa dos métodos analíticos é um procedimento importante para comprovar que o método desenvolvido é adequado aos fins que se

destina e tem como objetivo estimar a eficiência dos métodos de rotina em laboratórios. Os parâmetros a serem avaliados dependem das propriedades do método, da complexidade da amostra e também do propósito do método. Desta forma, alguns dos fatores a serem citados a seguir podem não ser avaliados, caso seja mais adequado. Os parâmetros de validação para um método analítico são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez. Além disso, é importante salientar que a qualidade de um método analítico depende majoritariamente de seu desenvolvimento, muito além da validação propriamente dita (ERMER & MILLER, 2005).

A capacidade que um método tem em separar, detectar e quantificar impurezas ou produtos de degradação é também um parâmetro que deverá ser avaliado durante a validação do método (ICH, 2006a; ICH, 2006b). Desta forma, é possível garantir que a técnica analítica será capaz de avaliar a estabilidade do produto farmacêutico, garantindo sua eficácia e segurança.

A utilização de métodos analíticos validados é imprescindível para que o controle de qualidade possa garantir a segurança, eficácia e qualidade total de um medicamento. As diversas metodologias analíticas existentes para utilização na análise farmacêutica, como técnicas cromatográficas, eletroforéticas e espectrais, devem ser consideradas de acordo com as características do fármaco e a análise desejada (GÖRÖG, 2007).

3.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006). A CLAE é a técnica analítica com maior desenvolvimento nas últimas décadas, em grande parte devido ao desenvolvimento de programas mais integrados aos equipamentos e colunas de separação de maior seletividade. Por essa razão a CLAE passou a ser o método de escolha da indústria farmacêutica para a realização do controle de qualidade de seus produtos e é o mais preconizado pelos Códigos Oficiais (WATSON, 2005).

A cromatografia líquida (CL) é a técnica mais utilizada para identificar, quantificar e separar compostos de uma mistura. Dessa forma pode ser considerada a melhor alternativa para avaliação da cinética de degradação de fármacos que, em âmbito geral, formam uma diversidade de produtos de degradação, os quais necessitam estar separados de forma eficiente para que haja uma quantificação correta do fármaco e consequente avaliação da velocidade de decaimento na concentração do fármaco no decorrer do tempo.

3.3.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada a espectrometria de massas (EM)

Em comparação à CLAE, o sistema de CLUE demonstra ser uma técnica de separação com sensibilidade e resolução elevada e tempo de análise reduzido.

A teoria matemática que direciona os métodos de cromatografia líquida (CL) de alta e ultra eficiência é a equação de Van Deemter, que relaciona diversos fatores ligados à coluna cromatográfica, e que somados resultam no valor de altura equivalente do prato teórico (HETP, do inglês *height equivalent to a theoretical plate*). Considerando que o número de pratos teóricos (N) é a fração entre o comprimento da coluna e o número de pratos, quanto menor a HETP, maior será o N em uma coluna. Portanto, a equação de Van Deemter demonstra que há uma relação linear entre o número de pratos e o tamanho da partícula na coluna cromatográfica. Concluindo assim que, se o tamanho de partícula de uma coluna é reduzido pela metade, o valor de HETP será também reduzido à metade, consequentemente aumentando a eficiência da coluna. Contudo, a redução do tamanho de partícula leva a um aumento da pressão no sistema, a qual possui um limite de 6000 psi para os equipamentos de CLAE convencionais (VILLIERS e col., 2006; SWARTZ, 2005).

O sistema de CLUE foi desenvolvido para permitir o uso de velocidades, fluxos e pressões mais elevadas do que as obtidas com os sistemas de CLAE convencionais. Uma das características diferenciais desse sistema é o fato de permitir o uso de colunas cromatográficas com empacotamento que utiliza partículas de 2 µm ou menos, diferente das colunas convencionais para CLAE com partículas de 5 µm. Como referenciado pelo próprio nome, este sistema permite atingir pressões na ordem

de 15000 psi, bastante superior as pressões máximas suportadas pela CLAE (GRUMBACH e col., 2009; MARCOS, 2011).

O desenvolvimento de diferentes interfaces para o acoplamento da técnica de CL à espectrometria de massas foi resultante de anos de pesquisa e desenvolvimento, relacionados ao desafio de tornar as operações em pressão elevada da CLAE e CLUE compatíveis com as baixas pressões aceitas pela EM, dentre outros problemas de acoplamento. Atualmente, as interfaces de CL-EM fornecem uma transferência confiável e eficiente dos analitos da fase aquosa para a fase gasosa. Uma das técnicas de ionização mais empregadas em sistemas hifenizados é a eletronebulização (ESI – *electrospray ionization*), que permite ser utilizado com fluxo elevado de fase aquosa e tampões voláteis (LEE, 2005; SETTLE, 1997; SWARTZ, 2005).

3.3.3. Eletroforese capilar

A utilização da eletroforese capilar (EC) na análise de medicamentos apresentou grande aumento nos últimos anos. Entre as análises realizadas destacam-se a separação quiral de fármacos, quantificação e análise de impurezas (ALTRIA e col., 2008). A EC possibilita uma separação mais eficiente de compostos, pode ser realizada em um curto tempo e requer um volume muito pequeno de solventes (MARSH e col., 2008).

No desenvolvimento do método analítico por EC, visando otimizar o processo de separação e a análise quantitativa, a avaliação de diferentes parâmetros, deve ser realizada. Voltagem aplicada, temperatura, comprimento e diâmetro do capilar devem ser variados durante o desenvolvimento do método, buscando aperfeiçoar a técnica e aumentar tempo de vida útil do capilar. Parâmetros relacionados à solução eletrolítica como tipo e concentração de tampão, pH e presença de fase orgânica devem ser otimizados para garantir uma metodologia reprodutível e confiável (MARSH e col., 2008).

Uma derivação mais recente da EC é a eletroforese capilar em microchip (MCE, *microchip capillary electrophoresis*). A MCE fornece separações rápidas e de alta resolução entre analito, com simplicidade da instrumentação e a vantagem de não

necessitar de componentes adicionais acoplados ao dispositivo, tais como bombas ou válvulas, apenas a integração de eletrodos e a aplicação de corrente elétrica. (BILITEWSKI e col., 2003; PYELL e col., 2003; HENRY e col., 2006). Assumindo o lugar do tradicional capilar de sílica fundida, as separações eletroforéticas são realizadas em canais com dimensões micrométricas, no interior de um microdispositivo planar no formato de *microchip*.

3.4. PLANEJAMENTO FATORIAL

Atualmente, a aplicação de metodologias de planejamento fatorial na análise de dados mais complexos, do ponto de vista matemático e estatístico permite uma maior precisão na estimativa dos efeitos principais dos fatores em análise, possibilitando conclusões mais amplas a respeito dos fatores estudados de forma simultânea, com informações sobre a interação entre os fatores (WISSMANN & GROVER, 2009). O *design* experimental realizado por Plackett-Burman permite avaliar o efeito de cada fator selecionado e estimar o erro experimental. A interpretação estatística (realizada normalmente por teste-t) fornece um limite numérico que possibilita definir quais fatores são significativos, observando que, para determinado valor de α , um efeito é considerado significativo se $t_{\text{calculado}}$ for superior ao $t_{\text{crítico}}$ (HEYDEN e col., 2001).

3.5. ESTUDO DE ESTABILIDADE

O propósito do estudo de estabilidade é prover evidência de como a estrutura de um fármaco varia com o tempo, sob influência de uma variedade de fatores, e estabelecer um período de reteste para a substância ou a vida de prateleira do produto, recomendando as condições de estocagem (ICH, 2003). A validade pode também ser definida como o tempo (em dias, meses, anos), durante o qual a especialidade farmacêutica, ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação.

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser influenciada por uma série de fatores, tais como, temperatura, umidade, luz, gases atmosféricos, solventes, pH, interações, contaminação microbiológica, entre outros. Além disso, fatores químicos, como incompatibilidades, oxidações, reduções, hidrólise e racemizações podem ocasionar a degradação desses produtos (NUDELMAN, 1975). Os testes de estabilidade fornecem informações sobre como a qualidade da matéria-prima ou mesmo do produto acabado varia frente a diversos fatores (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999). A estabilidade depende também das propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos fármacos, excipientes e embalagens utilizados (MATTHEWS, 1999). Estudos de degradação forçada fornecem dados auxiliam na identificação de possíveis degradantes, rotas de degradação e instabilidade intrínseca do medicamento.

O desenvolvimento das técnicas analíticas hifenizadas tem tornado a caracterização de impurezas e produtos de degradação uma tarefa mais simples, em contraponto às demoradas e desgastantes técnicas de isolamento, com posterior aumento da concentração, de substâncias de interesse, até a obtenção de miligramas de produto, para só então realizar análises espectroscópicas (espectrometria de massas, E-UV, ressonância magnética nuclear e infravermelho). A cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CL-EM) é atualmente a mais utilizada dentre as outras técnicas hifenizada, devido à sua elevada sensibilidade e facilidade de uso. Além disso, a CL-EM/EM possui potencial próprio para a caracterização inequívoca de estruturas, desde as mais concentradas até os componentes detectados apenas como traços, exceto para enantiômeros e epímeros (NARAYANAM e col., 2014; JAIN & BASNIWAL, 2013; MEHTA e col., 2010).

3.6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO*

A descrição do perfil toxicológico de uma substância ou uma mistura de compostos é o primeiro passo para uma avaliação de risco. Embora haja um grande número de métodos *in vitro* para estudo toxicológicos, aqueles mais aplicados são o vermelho neutro (NR, *neutral red*) e o MTT (MTT *reduction assay*) para citotoxicidade, e o teste cometa para ensaios de genotoxicidade. Testes *in vitro* desempenham um papel importante na obtenção de informações sobre o mecanismo de toxicidade com

a perspectiva de serem capazes de identificar as vias de respostas tóxicas através da aplicação de técnicas de toxicogenômica (BERNAUER et al., 2004)

3.7. ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

A dissolução de medicamentos pode ser definida como fenômeno em que um fármaco no estado sólido se libera de sua forma farmacêutica de administração e entra em solução. Para medicamentos de administração oral, os parâmetros fundamentais que controlam a taxa e a extensão da absorção são a sua solubilidade aquosa e sua permeabilidade gastrointestinal (AMIDON e col., 1995; KASIM e col., 2003).

A necessidade de realizar o ensaio de dissolução em um método analítico validado representa um fator de extrema relevância para garantir a confiabilidade dos dados obtidos e assegurar a qualidade do fármaco (AUGSBURGER e HOAG, 2007). Uma vez que determinado medicamento cumpri as exigências de agências reguladoras oficiais para dissolução, uma maior segurança é gerada com relação a liberação satisfatória *in vivo* do medicamento de sua forma farmacêutica e consequentemente uma absorção adequada (AULTON, 2005)

Os estudos de dissolução constituem um dos elementos essenciais para avaliar e garantir as propriedades biofarmacotécnicas das formulações.

A classificação biofarmacêutica de fármacos, segundo AMIDON e colaboradores (1995), pode ser feita em quatro categorias:

- Classe 1: alta solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 2: baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 3: alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- Classe 4: baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

A classificação biofarmacêutica pode ser utilizada no desenvolvimento do método de dissolução e verificação da possibilidade de realizar uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV).

O teste de dissolução pode ser ainda mais atrativo quando as condições conseguirem simular o comportamento *in vivo* do fármaco. A existência de uma correlação significativa entre a fração dissolvida do fármaco no teste *in vitro* com a

fração absorvida do fármaco *in vivo* é útil para o desenvolvimento de novas formulações e indicativo do perfil de biodisponibilidade (DRESSMAN *et al.*, 1998).

Quando existe o objetivo de desenvolver uma CIVIV, é necessário trabalhar com dados do medicamento em condições fisiológicas, como a concentração plasmática. A obtenção do modelo de absorção e distribuição compartimental do medicamento, que fornecerá informações necessárias para a continuação dos estudos e CIVIV, é realizada por avaliação *in silico* dos dados experimentais. A expressão *in silico* é utilizada para indicar algo ocorrido “em ou através de simulação computacional” é originalmente utilizada para denotar simulações computacionais que modelam um processo natural ou de laboratório (WEINER, 2006).

Muito além da substituição dos testes de biodisponibilidade, a integração dos conhecimentos do perfil de dissolução de um medicamento com sua distribuição compartimental e dados de concentração plasmática, permitem desenvolver um estudo mais informativo das especificações de dissolução, conhecimento para triagem de novas formulações e auxiliar fortemente no controle de qualidade de medicamentos

**4. CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA
QUÍMICA DE REFERÊNCIA**

4.1. INTRODUÇÃO

De acordo com o FDA, as substâncias químicas de referência (SQR) utilizadas para assegurar a confiabilidade dos resultados de métodos analíticos, exercendo o papel de padrões de referência, podem ser classificadas como compendiais ou não compendiais. No caso das SQR compendiais, não há necessidade de caracterização após serem adquiridas. As SQR não compendiais, no entanto, mesmo com elevado teor de pureza devem ser caracterizadas no intuito de garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998)

4.2. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) DE RIVAROXABANA

A SQR de RIV foi adquirida do laboratório BOC Sciences (New York, USA) apresentando pureza declarada de 99,63 %, tendo a principal impureza teor de 0,31%.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DA SQR DE RIV

4.3.1. Ponto de fusão pelo método capilar

A determinação do ponto de fusão da SQR pelo método do capilar foi realizada em triplicata em um sistema de ponto de fusão FP90, Mettler Toledo, previamente calibrado. Amostras da SQR foram compactadas em tubos capilares com diâmetro de 1 mm e 6 cm de comprimento. A taxa de aquecimento inicial foi de 10 °C/min, passando para incrementos de 2 °C/min entre 225 °C e 233 °C.

O valor obtido para o ponto de fusão da RIV SQR foi 229,5 °C. Esse valor está de acordo com a faixa de fusão referenciada na literatura pesquisada: 228 °C – 230 °C (GRUNENBERG e col., 2011). Não foi observada alteração de cor ou formação de precipitado no capilar, indicando a ausência de decomposição da RIV nas condições do experimento.

4.3.2. Calorimetria exploratória diferencial

A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) realiza a avaliação e comparação do fluxo de calor entre dois porta-amostras, um com a substância em análise e outro selado vazio, enquanto eles são submetidos a um programa de

temperatura controlada. As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Mettler Toledo DSC 1, dotado de sensores de alta resolução FRS5 e HSS8. STAR excellence é o software de controle do equipamento e processamento dos dados.

Para realizar o ensaio, transferiu-se, aproximadamente 2,0 mg da SQR de RIV para porta amostra de alumínio, a qual foi selada e colocada no forno do equipamento de DSC. Foi utilizada uma rampa de aquecimento de 10 °C/minuto, em uma faixa de 30 a 300 °C. A análise foi procedida sob atmosfera inerte de nitrogênio, mantida com fluxo de 50 mL/min. e as análises foram realizadas com e sem prévio aquecimento para evaporação da água de hidratação.

A análise térmica por DSC para determinação da pureza de um fármaco é realizada assumindo que qualquer impureza presente diminuirá e alargará a faixa de fusão característica do produto puro. Sendo verdadeira a afirmação de que o perfil do pico de uma substância pura apresenta perfil bastante delgado em um termograma de DSC. Na presença de impurezas, é possível notar também uma redução na temperatura da faixa de fusão ou, ainda, aparecimento de outros picos (FORD e TINMINS, 1989).

O termograma (Figura 4-1) apontou ponto de fusão da RIV SQR em 229,82 °C. Foi observada durante a análise, a absorção de 118,22 Joules por grama de amostra, demonstrando transição endotérmica na fusão da SQR. O pico detectado apresentou perfil bastante afilado, e não foi verificada a presença de outros picos no termograma. Os valores encontrados na análise por DSC complementam o resultado obtido para determinação do ponto de fusão por capilar, 229,50 °C. Dessa forma os resultados encontrados nas análises térmicas indicam a pureza da SQR analisada.

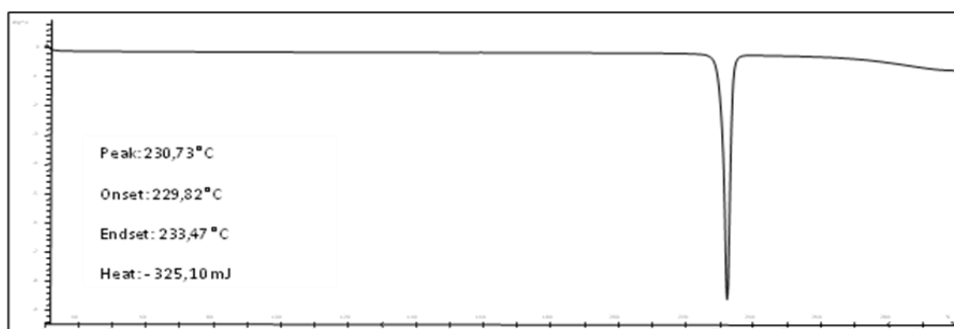


Figura 4-1. Termograma obtido por DSC para RIV SQR.

4.3.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O espectro na região do infravermelho (IV) da RIV SQR sólida foi obtido através da análise por espectrofotômetro ATR FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum BX. As bandas foram detectadas entre 600 e 4000 cm^{-1} (Figura 4.2). E analisadas conforme dados de literatura científica (STUART, 1996).

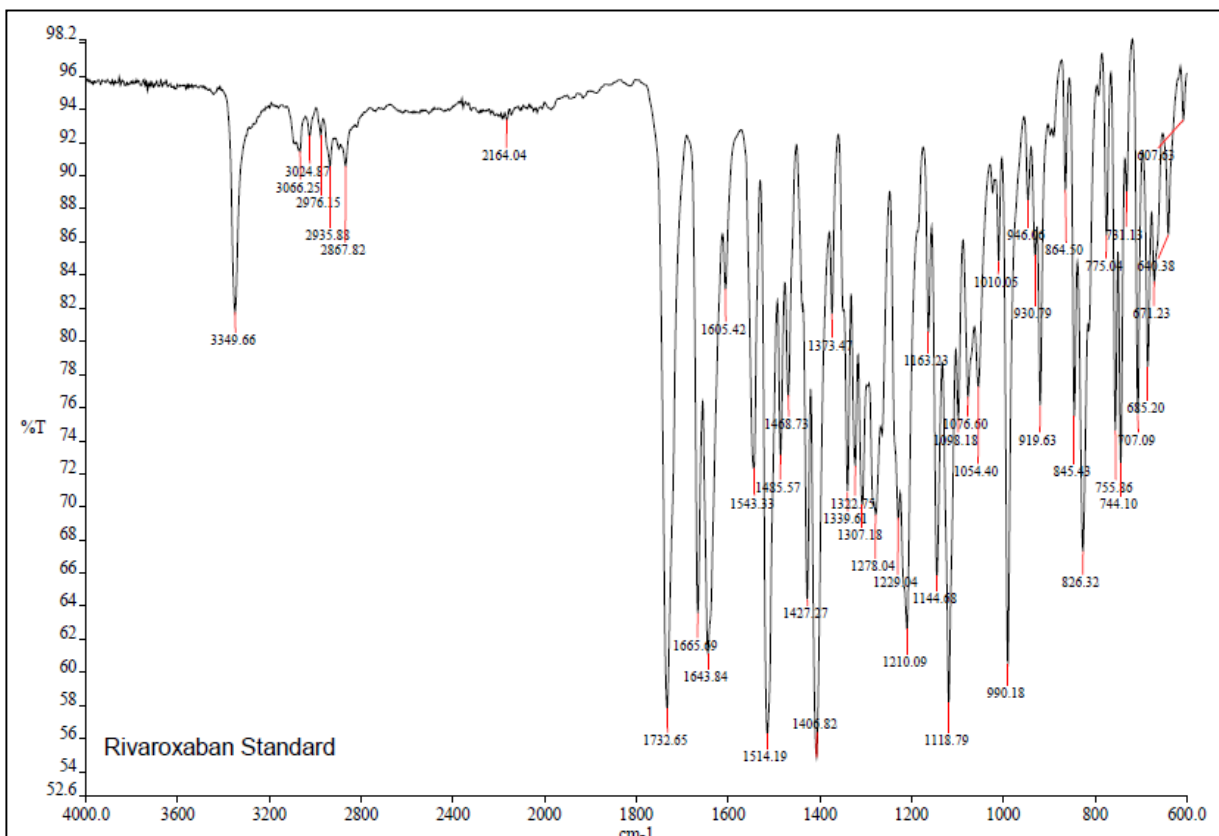


Figura 4-2. Espectro de IV de RIV SQR, com indicação das bandas detectadas.

Tabela 4-1. Frequência das principais bandas de absorção de RIV e suas respectivas atribuições (STUART, 1996).

Frequência (cm^{-1})	Atribuição
3349	Deformação axial de N-H, para amostra sólida
1732	Deformação de lactama em anel de 5 átomos
1665	Deformação axial C=O de lactama
1643	Deformação axial em amida secundária de cadeia aberta, para amostra sólida
1118	Estiramento de C-O para ester
744	Estiramento de C-Cl

A análise do espectro de IV através de atribuições para as bandas referentes aos grupos funcionais característicos da molécula de RIV (Tabela 4-1) auxilia a caracterização da SQR, uma vez que apresenta as bandas de absorção correspondentes à estrutura química da RIV. Uma vez que a espectroscopia no IV fornece informações referentes à composição estrutural das moléculas, a SQR de RIV foi analisada em estado sólido a fim de determinar os grupamentos funcionais presentes em sua estrutura química, através da análise das bandas características absorvidas no IV. Dentre as bandas características observadas, podem ser destacadas aquelas referentes aos grupamentos amida e lactama.

4.3.4. Espectrometria de massas

A determinação da massa molecular da SQR de RIV foi realizada através da análise da razão massa/carga (m/z) referente ao íon molecular detectado em espectrômetro de massas (MS, *mass spectrometry*) Q-Tof Xevo G2 (Waters) equipado com quadrupolo-tempo-de-voo (Q-Tof) e interface de ionização por *electrospray* operado no modo positivo (ESI+). Os parâmetros de análise foram ajustados para as seguintes condições: voltagem do capilar de 3,00 kV, voltagem do cone de 40 V, fluxo do gás de dessolvatação em 300 L/h e do gás do cone em 100 L/h, temperatura de dessolvatação de 250 °C e da fonte de íons em 100 °C.

Solução contendo 5 µg/mL de RIV SQR em acetonitrila e água (50:50, v/v) foi introduzida através de bomba de infusão diretamente no EM. A molécula de RIV apresenta massa isotópica de 435,0657 Da e, conforme apresentado na Figura 4-3, o íon de m/z 436,0727 corresponde ao íon molecular da RIV gerado por ESI+.

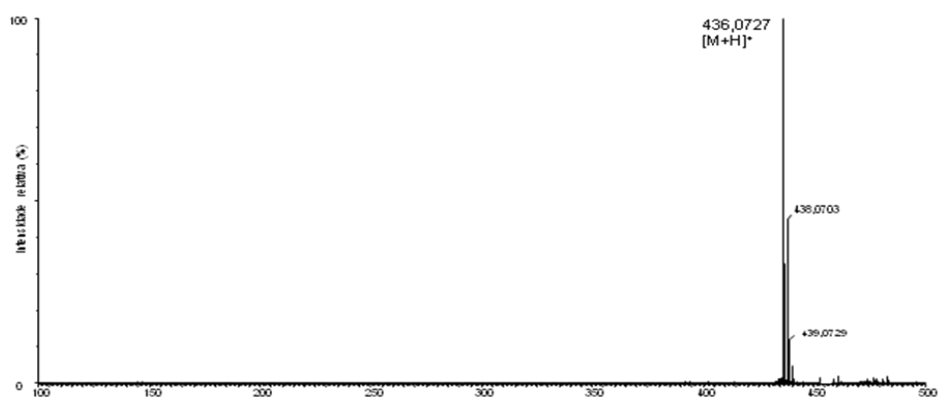


Figura 4-3. Espectro de massas da RIV SQR por infusão direta e ESI+.

4.4. DISCUSSÕES E CONCLUSÕES GERAIS

- De acordo com a curva de aquecimento obtida por DSC, verifica-se que não houve degradação do fármaco. A RIV apresenta faixa de fusão bem definida, passando por fenômeno endotérmico na fusão da SQR. Esses resultados viabilizam a identificação e análise da pureza do fármaco utilizando essa metodologia, sendo considerada uma ferramenta adequada para a caracterização da RIV SQR.
- O resultado obtido pela análise do ponto de fusão de RIV SQR, confirmaram o exposto pelas análises de DSC. Embora não possa afirmar com certeza a identidade de compostos possibilita fazer uma avaliação prévia da pureza da SQR ou matéria-prima, tornando-se assim bastante recomendável para auxiliar na caracterização de RIV SQR.
- Através das análises de interpretação das bandas de absorção do espectro de IV da SQR da RIV, observaram-se sinais característicos dos grupamentos funcionais do fármaco, auxiliando em sua caracterização.
- A análise do espectro de massas para a SQR da RIV demonstrou a apresentação do íon molecular principal m/z 436 $[M+H]^+$, indicando a identidade da amostra de SQR.
- A utilização dos métodos de espectroscopia no IV, espectrometria de massas e faixa de fusão permitiram caracterizar a SQR de RIV como sendo adequada para utilização nos estudos propostos nesta Tese de doutorado. Além disso, há a possibilidade da publicação desses dados, gerando informações úteis para o desenvolvimento de trabalhos científicos com o fármaco.

**5. CAPÍTULO II: ANÁLISE QUALITATIVA DA
RIVAROXABANA**

5.1. INTRODUÇÃO

A identificação de fármacos em produtos acabados é normalmente realizada por meio da aplicação de técnicas cromatográficas (CLAE) e espectrofotométricas (UV e VIS).

A identificação de fármacos por espectrofotometria no UV é realizada através da comparação do espectro da solução amostra com o espectro de uma solução padrão do mesmo fármaco em determinada concentração. Além disso, é possível verificar se os produtos apresentam os mesmos comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção. Mesmo não sendo um método seletivo, possui ampla aplicação nos Códigos Oficiais (WATSON, 2005).

Quando a técnicas analíticas (cromatográficas, eletroforéticas, espectrométricas) são utilizadas para a identificação de fármacos, deve ser realizada a comparação entre os tempos de retenção obtidos para o pico da solução amostra e da solução de SQR do fármaco. Os detectores de arranjo de fotodiodos permitem, além da comparação do tempo de retenção, verificar a similaridade entre os espectros obtidos.

5.2. PRODUTO FARMACÊUTICO

O medicamento Xarelto[®], em apresentações de 10 e 20 mg de rivaroxabana em comprimidos revestidos foram compradas no comércio local. Este produto é fabricado pela Bayer HealthCare AG (Leverkusen, Alemanha) e comercializada pela Bayer S.A. (São Paulo, Brasil). Os excipientes presentes nos comprimidos são: celulose microcristalina, croscarmelose sódica, hipromelose, lactose monoidratada, estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio, óxido férrico vermelho, macrogol e dióxido de titânio.

5.3. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS

5.3.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta (E-UV)

A identificação da RIV nos comprimidos foi realizada em comparação com a SQR, na concentração de 10 µg/mL. Inicialmente, diferentes solventes foram testados:

água, metanol, água acidificada e alcalinizada, porém os melhores resultados foram obtidos com ACN como solvente. Dessa forma, solução estoque de RIV SQR foi preparada em ACN (500 µg/mL), e diluída com água até a concentração de análise. A preparação da solução amostra foi realizada a partir de comprimidos triturados, o pó resultante foi pesado para obtenção de uma solução de 500 µg/mL de RIV, sendo posteriormente filtrada com filtro analítico e diluída com água para 10 µg/mL.

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu modelo IV-1800, equipado com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A mistura de água com ACN foi utilizada como “branco” para zerar a linha de base.

A identificação da RIV na forma farmacêutica foi realizada através da sobreposição dos espectros obtidos no experimento e comparação do perfil dos espectros e comprimento de onda de maior absorção.

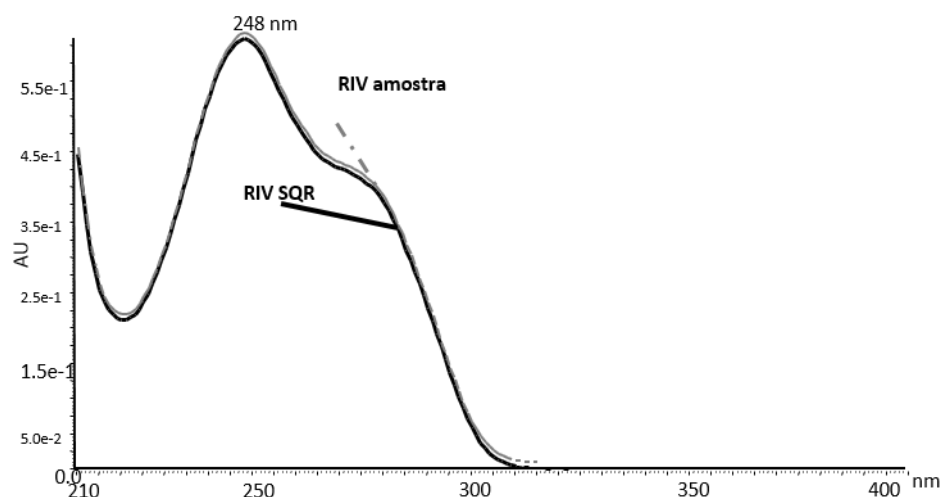


Figura 5-1. Sobreposição dos espectros de absorção de UV de RIV SQR (linha contínua) e RIV amostra de comprimidos (linha tracejada).

A similaridade dos espectros obtidos entre 200 a 400 nm para a solução de RIV SQR e para a amostra de comprimidos, com apresentação de máximo de absorção em 248 nm para as duas soluções demonstra que, mesmo não sendo uma técnica específica, a espectrofotometria no UV pode ser utilizada na identificação de RIV em comprimidos. Conforme apresentado na Figura 5-1 os espectros são perfeitamente sobreponíveis.

5.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Agilent, modelo 1200 Series. As condições analíticas definidas para detecção e identificação de RIV estão apresentadas na Tabela 5-1.

Os componentes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob a ação de vácuo, através de membrana de nylon com diâmetro do poro de 0,45 μm . A SQR foi exatamente pesada, e solubilizada em ACN para uma obtenção solução estoque de 500 $\mu\text{g/mL}$. Uma alíquota de 800 μL foi transferida para balão volumétrico de 20 mL e solubilizada com fase móvel, obtendo solução de RIV a 20 $\mu\text{g/mL}$. O mesmo procedimento foi seguido para a preparação da amostra de RIV com comprimidos, adicionando-se a filtração da suspensão dos excipientes na ACN.

Tabela 5-1. Condições cromatográficas para identificação de RIV em comprimidos por CLAE.

Condições	Descrição
Coluna	Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm), Agilent®
Fase móvel	ACN:ácido fórmico 0,1 %, pH 4 (ajustado com NH_4OH), 37:63, v/v
Vazão	1 mL/min
Injeção	20 μL
Comprimento de onda	250 nm
Temperatura	25 °C

A identificação do fármaco por CLAE foi realizada por meio de comparação dos tempos de retenção da amostra e da SQR de RIV.

Os cromatogramas sobrepostos da SQR de RIV e dos comprimidos com RIV estão apresentados na figura 5.2. A similaridade entre os tempos de retenção obtidos para a RIV SQR e para a solução amostra dos comprimidos demonstra a adequabilidade do método desenvolvido por CLAE para a análise qualitativa de RIV no produto farmacêutico.

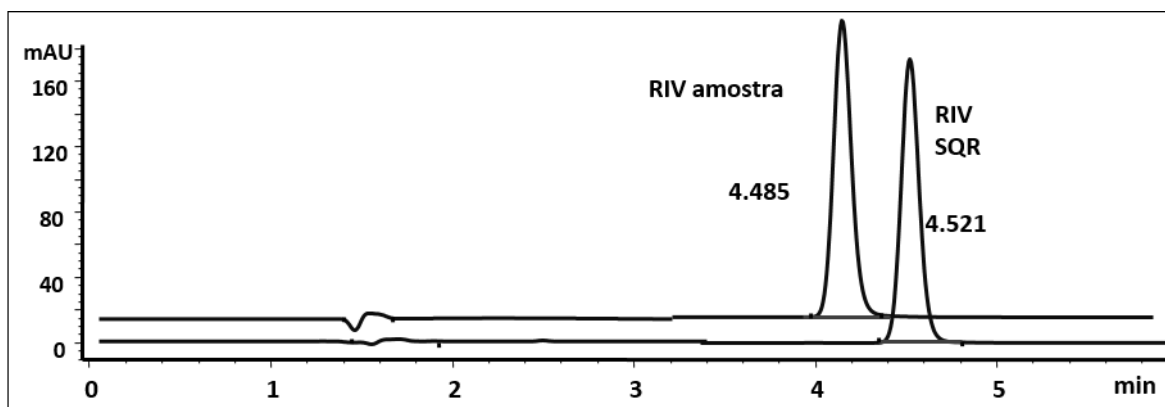


Figura 5-2. Cromatogramas resultantes da análise de RIV SQR e RIV amostra dos comprimidos, em CLAE com detecção por UV, em 250 nm.

5.3.3. Cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas e ultravioleta

As análises cromatográficas foram realizadas em CLUE da empresa Waters, ACQUITY UPLC system. O cromatógrafo foi acoplado a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo-de-voo, Q-Toff Xevo G2, equipado com fonte de ionização por eletronebulização. O sistema foi operado e os resultados processados pelo software Masslynx 4.1. As condições cromatográficas e os parâmetros otimizados para o EM, na análise de RIV SQR e em comprimidos, estão especificados na Tabela 5-2.

Os componentes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob a ação de vácuo, através de membrana de nylon com diâmetro do poro de 0,45 μm . A SQR foi exatamente pesada, e solubilizada em ACN para uma obtenção solução estoque de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Uma alíquota de 400 μL foi transferida para balão volumétrico de 20 mL e solubilizada com fase móvel para obtenção de soluções de RIV 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O mesmo procedimento foi seguido para a preparação da amostra de RIV com comprimidos, adicionando-se a filtração da suspensão dos excipientes na ACN.

A identificação de RIV na amostra de comprimidos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção da amostra e da SQR, tanto para o cromatograma detectado por EM (figura 5.3) quanto para o detectado por UV (figura 5.4).

Tabela 5-2. Condições cromatográficas e parâmetros otimizados do espectrômetro de massas para identificação de RIV em comprimidos por CLUE-EM.

Condições	Descrição
Fase móvel	ACN:água, pH 4 (ajustado com NH ₄ OH, ambas contendo ácido fórmico 0,1 %), 63:37, v/v
CL Coluna	Zorbax Eclipse Plus C18 rapid resolution HD (2,1x50 mm, 1.8 µm) Agilent
Vazão	0,2 mL/min
Temperatura	30 °C
Volume de injeção	1,4 µL
Tipo de ionização	Eletronebulização positiva
Temp. dessolvatação	250 °C
EM Voltagem do capilar	3000 V
Voltagem do extrator	40 V
Temperatura do bloco	100 °C

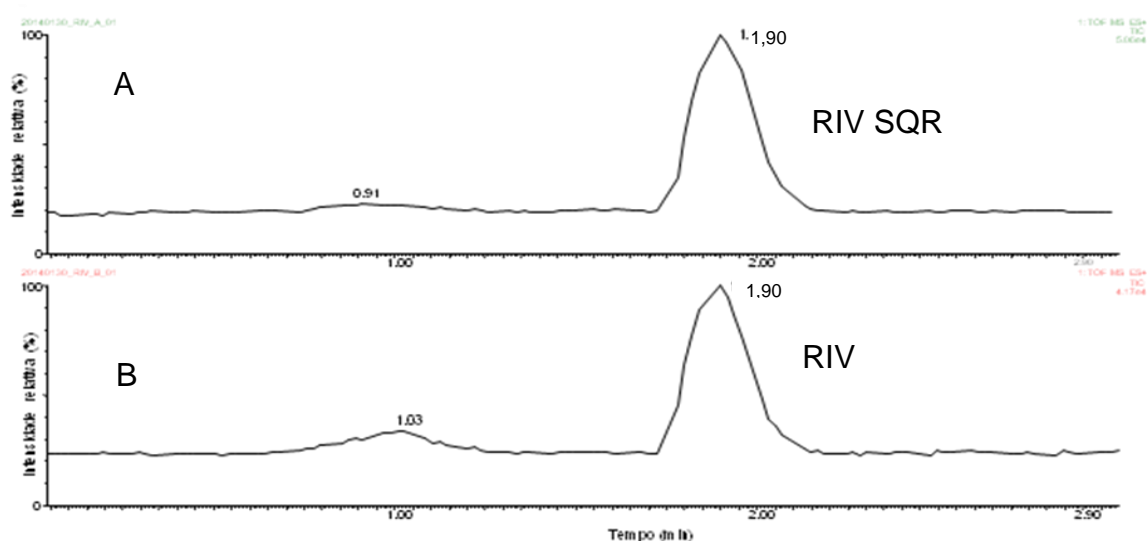


Figura 5-3. Cromatogramas de massas obtidos por CLUE-EM para RIV SQR (A) e RIV na amostra de comprimidos (B), em 10 ug/mL.

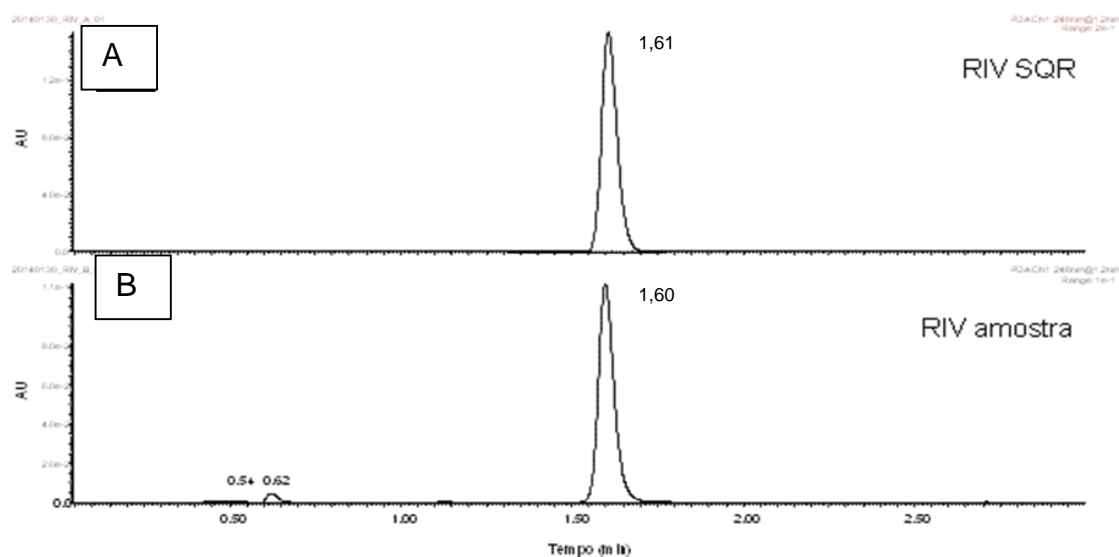


Figura 5-4. Cromatogramas de RIV SQR (A) e amostra dos comprimidos (B) analisados em CLUE com detecção por UV.

RIV SQR e a amostra de comprimidos foram detectadas adequadamente, tanto por detector de massas quanto por detector de ultravioleta. A similaridade entre os tempos de retenção, para ambas as formas de detecção, demonstra que o método desenvolvido para analisar qualitativamente RIV no produto farmacêutico por CLUE-UV-EM é adequado.

5.3.4. Eletroforese capilar (EC)

Os experimentos por EC foram realizados em um equipamento Agilent ^{3D}CE (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com injetor automático, controlador de temperatura e detector de arranjo de fotodiodos. O controle do sistema e o tratamento dos dados foi realizado pelo *software* ChemStation CE.

A identificação da RIV foi obtida através de um sistema eletroforético com modo de separação por cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC) conforme apresentado na Tabela 5-3.

Tabela 5-3. Condições eletroforéticas definidas para identificação da RIV em comprimidos por MEEKC.

Parâmetros	Descrição
Capilar	Capilar de sílica fundida com 48,5 cm de comprimento (40 cm efetivos) 50 µm de diâmetro interno
Temperatura	35 °C
Pré-condicionamento	3 min NaOH 0,1 M; 1,5 min H ₂ O; 3 min eletrólito
Eletrólito	Tetraborato 13 mM pH 9,75 + 1,2% SDS + 1,0% acetato de etila + 2,4% butanol
Injeção	50 mBar por 5 seg
Tensão aplicada	30 kV
Detecção	248 nm

A solução padrão estoque de RIV (1,0 mg/mL) foi preparada pela dissolução com ACN, a qual era filtrada através de um filtro de membrana de 0,45 µm, transferida para âmbar balão volumétrico e mantidos sob refrigeração. A hidroclorotiazida, padrão interno (PI) utilizado no método, foi também preparada estoque (1,0 mg/mL) em ACN seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. Para a preparação das soluções amostra de RIV (1 mg.mL⁻¹), os comprimidos eram pesados e triturados a pó fino. Uma quantidade apropriada foi transferida para balão volumétrico e dissolvido com ACN. A suspensão resultante era filtrada para remoção dos excipientes insolúveis, uma segunda filtração foi realizada através de um filtro de membrana de 0,45 µm. Para preparação das soluções de análise, uma alíquota apropriada da solução estoque RIV era diluída na microemulsão até a concentração desejada, sempre acompanhado do padrão interno em concentração constante.

O eletrólito de microemulsão era preparado diariamente misturando os reagentes na seguinte ordem: acetato de etila e SDS em alta velocidade de agitação, seguido pelo butanol. Ao final era adicionada a solução de tetraborato 13 mM (pH 9,75) previamente preparada. A mistura era mantida em agitação durante dois minutos para obter uma microemulsão estável e opticamente transparente.

A identificação do fármaco nos comprimidos por EC foi realizada pela comparação entre os tempos de migração da amostra com aquele obtido na análise de RIV SQR.

O tempo de migração do padrão interno e da RIV foram de aproximadamente 2,55 e 3,36, respectivamente. Conforme demonstrado na Figura 5-5, RIV amostra e SQR apresentam tempos de migração semelhantes.

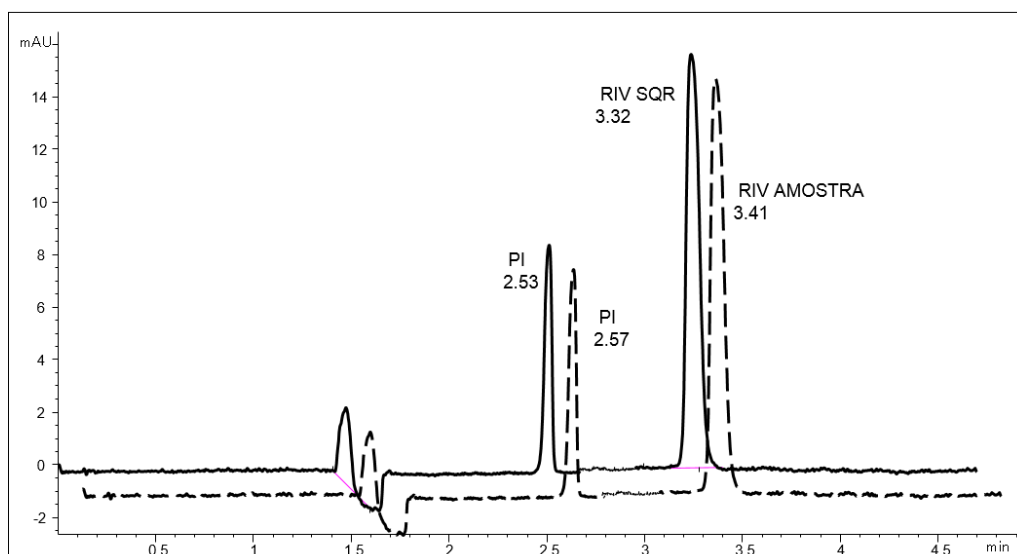


Figura 5-5. Eletroferogramas sobrepostos de RIV SQR (linha contínua) e RIV amostra (linha tracejada) a 100 µg/mL.

5.4. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

- A obtenção dos espectros de UV semelhantes para as soluções de RIV SQR e RIV em amostra de comprimidos demonstrou a viabilidade de utilizar o método desenvolvido para a determinação qualitativa do anticoagulante em sua forma farmacêutica;
- Os cromatogramas obtidos pelas análises em CLAE com detecção por UV apresentaram tempos de retenção similares para os sinais analíticos das soluções de RIV SQR e amostra de comprimidos, permitindo dessa forma identificar a RIV no composto farmacêutico;
- O método proposto para análise de RIV SQR e amostra de comprimidos em CLUE, com detecções por EM e UV, permitiram identificar seletivamente o fármaco anticoagulante em sua forma farmacêutica;

- O método desenvolvido para análise qualitativa da RIV por MEEKC foi executado com sucesso, viabilizando assim a identificação da RIV em comprimidos quando comparada com sua SQR;
- Os resultados obtidos mostram que os métodos desenvolvidos são alternativas confiáveis para a identificação de RIV em comprimidos. Para obtenção de resultados mais confiáveis, algumas vezes é necessário realizar a análise do fármaco por duas ou mais técnicas.
- A comparação dos resultados qualitativos obtidos através da análise do padrão de referência com aqueles obtidos para as amostras teste permite a identificação da substância ativa em formas farmacêuticas. Nesse estudo inicial foram desenvolvidos com sucesso métodos utilizando as técnicas por espectrofotometria no UV, CLAE, CLUE-UV, CLUE-EM e EC para identificação do fármaco no produto farmacêutico.

**6. CAPÍTULO III: ANÁLISE QUANTITATIVA DA
RIVAROXABANA**

6.1 INTRODUÇÃO

Posteriormente ao desenvolvimento analítico, a validação da metodologia é necessária para garantir que o método proposto atende às exigências e atribuições de suas aplicações, assegurando confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2003; ICH, 2005; BOUABIDI e col., 2010).

A cromatografia líquida (CL) tem grande destaque na avaliação de fármacos e se mantém em constante evolução. A CLUE utiliza colunas cromatográficas com partículas menores que 2 μm , podendo assim reduzir diâmetro interno e comprimento. A utilização dessas colunas cromatográficas com fase móvel em alta velocidade produz um aumento na velocidade linear e resolução de compostos, diminuindo assim o tempo de análise e o consumo de reagente (MALDANER e JARDIM, 2009).

Ainda que a CLAE seja o procedimento analítico mais utilizado na quantificação de fármacos, paralelamente a outras técnicas de separação a EC tem alcançado rápido desenvolvimento e ampla aplicação analítica. Essa técnica permite a otimização de diversos modos de separação utilizando o mesmo equipamento e o mesmo capilar, apenas com alterações no eletrólito. A EC apresenta características vantajosas para a análise de medicamentos, como o baixo consumo de amostra e reagentes, alta eficiência de separação e baixíssima produção de resíduos (AHUJA & JIMIDAR, 2008).

Outra metodologia que tem demonstrado ser grande promissora nas ciências da separação é a MCE, uma vez que oferece rapidez, portabilidade, reduzida quantidade de amostra e reagentes necessário para os ensaios. Além disso, existe a possibilidade de acoplamento com diferentes detectores analíticos (GUIHEN, 2014). Uma vez que a detecção por UV pode ser muito restrita devido ao volume reduzido de amostra a utilização de MS acoplada a MCE tem demonstrado ser mais exequível, embora ainda haja problemas relacionados com a confiabilidade e robustez dos resultados para análises quantitativas. Na área farmacêutica, a aplicação de ECM está mais voltada para a análise de DNA, RNA e proteínas (KAILASA e col., 2009; OHLA e col., 2010; UMEMOTO e col., 2009), todavia, estudos recentes demonstraram a viabilidade do uso da tecnologia do *microchip* para a determinação e análise quantitativa de fármacos em fluidos biológicos, assim como em formulações

farmacêuticas (BELDER e col., 2011; HE e col., 2004; CREVCILLÉN e col., 2008; NORDMAN e col., 2011; SONG e col., 2013).

Com relação à quantificação de RIV em fluidos biológicos por métodos cromatográficos, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura científica utilizaram métodos de quantificação por CLAE-EM/EM. Em 2008 foi publicado por G. ROHDE a validação de método por CLAE-EM/EM para análise de RIV em plasma. Em um trabalho conjunto avaliando a metabolização e excreção da RIV em ratos, cães e humanos, foram analisadas amostras de plasma sanguíneo, urina e fezes por CLAE com detecção por UV ou acoplado a MS (WEINZ et al., 2009; LANG et al., 2009). A análise de RIV em urina humana por CLUE-EM/EM foi realizada juntamente a outros dois novos fármacos para o sistema cardíaco, alisquireno e prasugrel (MAGIERA, 2013).

Recentemente, um estudo incluindo a validação de método analítico para quantificação da RIV no produto acabado foi publicado por ÇELEBIER e colaboradores (2013), que validaram um método por CLAE utilizando cafeína como padrão interno para quantificação, coluna cromatográfica Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) para separação de compostos e fase móvel com eluição isocrática composta por ACN e água (55:45, v/v). A análise da RIV em comprimidos foi também desenvolvida por técnica voltamétrica utilizando Tampão Britton-Robinson, pH 8,0 e uma frequência de 80 Hz, com incrementos de varredura de 5 mV e amplitude de pulso de 25 mV (SÜSLÜ *et al.* 2014). Embora validado, o método voltamétrico não é indicativo de estabilidade. Mais recentemente foi publicado o desenvolvimento de métodos para análise de RIV em comprimidos de 10 mg por CLAE e cromatografia em camada delgada (CCD) densitométrica (ABDALLAH et al., 2015), ambos os métodos foram desenvolvidos a partir de amostras de degradação da RIV. A fase móvel do sistema por CL era constituída de tampão fosfato 50 mM (pH 3,0):ACN (70:30) e coluna de separação C18 (150x4 mm). O método por CCD-densitométrico utilizou placas de sílica gel (200x200 x0,25 mm) e um sistema de eluição composto de clorofórmio:metanol:ácido acético glacial (100:5:2) com detecção em 249 nm para separação da RIV.

No presente trabalho de doutorado, o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação quantitativa da RIV em comprimidos revestidos foi realizada utilizando a CLAE com detecção por UV (descrito no cap. IV), CLUE com detecção por EM e também por EC. No método desenvolvido por CLUE, a robustez

da técnica desenvolvida foi avaliada por meio de desenho experimental completo, com dois níveis, quatro fatores (2^4) e um ponto central. Ambas as técnicas de CLUE-EM e EC são indicativas de estabilidade e permitem a análise da RIV junto aos seus produtos de degradação.

As pesquisas relatadas no item 6.4 para análise da RIV por MCE-MS foram realizadas entre abril e novembro de 2014 durante o período de Doutorado Sanduíche (DAAD/CAPES) no Instituto de Química Analítica da Universität Leipzig, em Leipzig, Alemanha, sob supervisão do Prof. Dr. Detlev Belder.

**6.2. ARTIGO CIENTÍFICO I: Ultra-performance LC-ESI/QTOF MS
for rapid analysis of rivaroxaban: method validation using
experimental design for robustness evaluation**

Current Analytical Chemistry, 11 (2), 124-129, 2015.

Ultra-performance LC-ESI/Q-TOF MS for rapid analysis of rivaroxaban: method validation using experimental design for robustness evaluation

N.R. Wingert, M.A.G. Nunes, A.T. Barden, P. Gomes, E.I. Müller, E.M.M. Flores, M. Steppe

Abstract

Sensitive, fast, and precise UPLC-MS/MS analytical method was validated for identification and quantification of the anticoagulant rivaroxaban (RIV) in pharmaceutical dosage form, using a full factorial design for robustness assessment. Chromatographic separation was achieved in 3.5 min on a C18 Zorbax Eclipse Plus (rapid resolution HD) Agilent® column at isocratic elution mode. Ultra pure water adjusted to pH 4.0 with ammonium hydroxide and ACN (63:37), both phases containing 0.1 % formic acid, was used at a flow rate of 0.2 mL/min. Detection of RIV was carried out with a quadrupole time of flight mass spectrometer detector equipped with an electrospray ionization source which was applied on positive mode. Internal standard substance was used to ensure small variations between analyses. Validation parameters were evaluated and the results found within acceptable ranges. Linearity was evaluated from 1.0 – 50.0 µg/mL, presenting a mean of 0.9970 (r^2). Relative standard deviation was within 2.57 % to intra and inter-day, and relative error for accuracy ranged from -0.16 % to 1.85 %. The four factors selected to evaluate method robustness by a full factorial design were flow rate, injection volume, column temperature, and ACN concentration; the responses were found to be not significant for RIV quantification. The proposed UPLC-MS/MS method was successfully validated regarding linearity, specificity, sensitivity, precision, accuracy and robustness, allowing fast and reliable analysis of RIV along with multiple compounds (impurities and degradation products) simultaneously, affording the use of an hyphenated technique in quality control studies.

Keywords: Experimental design, mass spectrometry, rivaroxaban, ultra performance liquid chromatography.

1. Introduction

Rivaroxaban (RIV) is a novel, oral anticoagulant currently approved by the main agencies of surveillance and control of drugs in the world. RIV once-daily tablet is recommended for the prophylaxis of deep vein thrombosis and pulmonary embolism in patients undergoing hip or knee replacement surgery, it is the first oral direct factor Xa (FXa) inhibitor, acting in both intrinsic and extrinsic coagulation pathways [1, 2]. FXa inhibition appears to be a most promising target compared to thrombin, whereas one molecule of FXa is able to activate more than one thousand thrombin molecules [3].

Different studies involving RIV analysis in biological matrices, such as blood plasma, by high performance liquid chromatography (HPLC) tandem MS have been published in the last few years [4 – 7] demonstrating the potential and reliability of applying LC-MS technique in detection and quantification of RIV. More recently, analysis of RIV in urine along with another novel cardiac drugs was performed by ultra-high performance liquid chromatography tandem multistage mass spectrometry (UPLC-MS/MS) using multiple reaction monitoring (MRM) in quantification process [8].

Ultra performance liquid chromatography (UPLC) takes the advantages of high technology to apply the van Deemter equation which states that - as the particle size decreases to less than 2.5 μm , there is a significant gain in efficiency, and this efficiency does not diminish as linear velocity increases [9]. By using UPLC systems, separations can be performed in chromatographic columns packed with smaller particle sizes and/or higher flow rate speed, allowing an elevated speed analysis with superior resolution. The combination of UPLC with mass spectrometer (MS) promotes a sensitive and reproducible technique that gathers the possibility of quantifying and identifying a wide range of substances all together.

The use of a suitable internal standard can control possible variation in extraction method, sample injection and ionization. Analytical techniques which make use of mass quadrupole – time of flight (Q-ToF) detector may undergo greatly benefits with the use of an internal standard substance [10], as well as in other quantification techniques [11]. Quantification of compounds in complex mixtures using LC-MS have improved substantially in the last two decades, although the methods of compounds concentration determination remains the same: selection ion/reaction monitoring (SIM or SRM), and peak area from mass chromatogram. Those techniques are considered

significantly different but equally efficient [10], while SIM or SRM has a great sensitivity, the quantification by peak areas of mass chromatograms leads to a faster and simpler process of quantification, particularly important when the aim is to analyse and to quantify pharmaceutical compounds and formulations, which require greater speed and higher accuracy. Therefore, the analysis of commercially evaluable drugs undergoes large improvement over time and reliability [12, 13]. UPLC-MS also stands out due to its advantageous system that allows reduced production of environmental dangerous organic residues.

Thus, the aim of this work was to develop and fully validate a specific and reproducible high-throughput UPLC-MS method for quantitative analysis of RIV in tablets. Robustness of the method was assessed by experimental design in order to promote a more detailed analysis of the effects of chromatographic factors on RIV quantification.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Samples of Xarelto® - RIV 10 mg (Bayer Schering Pharma AG, Leverkusen, Germany) were purchased in local market and standard substance acquired from BOC Science (NY, USA). Internal standard (amitriptyline) was acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). HPLC-grade acetonitrile (ACN) was purchased from Tedia (Fairfield, OH, USA), formic acid was supplied by LabSynth (Diadema, SP, Brazil), and ammonium hydroxide was acquired by Fmaia (São Paulo, SP, Brazil). Ultrapure water prepared by using Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA)

2.2 UPLC system

Chromatographic analyses were performed by the ACQUITY™ UPLC system from Waters Corp. (Milford, MA, USA) equipped with sampler manager, column heater, quadrupole time of flight (Q-Tof) MS detector, and binary solvent manager. A Zorbax Eclipse Plus C18 rapid resolution HD Agilent® (Santa Clara, CA, USA) column (2.1x50 mm, 1.8 µm) was used for separation of components.

2.3 Mass spectrometric conditions

The Q-ToF Xevo G2 mass spectrometer (Milford, MA, USA) was equipped with an electrospray ionization source (ESI). ESI-MS and ESI-MS² detections were performed in positive ion mode and resolution mode. Optimized MS conditions were: capillary voltage 3.00 KV, cone voltage 40 V, desolvation gas 300 L/h, cone gas 100 L/h, desolvation temperature 250 °C, source temperature 100 °C, and extractor cone 3.30 V. Acquisition mass range was monitored from 50 to 1000 Da. System control and data acquisition were performed using MassLynx V 4.1 software.

2.4 Solutions

RIV standard and quality control (QC) sample solutions were obtained by dissolving the powder material in ACN, and filtrating with analytical filters. Standard and QC stock solutions (RIV 500 µg/mL) were diluted with mobile phase up to the required final concentration. Internal standard (IS) was also prepared in ACN as stock solution and diluted along with standard or QC solutions, always until a final concentration of 2.0 µg/mL.

Placebo solution was prepared with a mixture of excipients (in-house blend of all the tablet excipients specified by the manufacturer of the marketed drug) according the scheme mentioned above.

2.5 Method validation

The analytical method was developed and validated according to International Conference on Harmonization (ICH) guidelines recommendations [14].

Internal standard was used to normalize RIV response through peak area ratio determination, thereby reducing the relative standard deviation among analyses.

Important system suitability parameters, such as tailing factor, theoretical plate number, retention time, and resolution, were controlled in order to assess system performance.

To evaluate the extent to which mobile phase and placebo components could interfere in detection and quantification of RIV and IS, six blank samples were analysed and the resultant values compared to limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). Post-preparative stability was assessed by storing QC samples in three different concentration levels at 25 °C and 4 °C, both protected from light.

Ion suppression effect was evaluated spiking RIV standard and IS stock solutions on blank placebo solutions. RIV peak area ratios were measured and compared to those of standard solution with similar concentration.

Linear regression and deviation from linearity were evaluated by plotting three standard curves with five concentrations ranging from 1.0 to 50.0 µg/mL RIV standard solutions, each point analysed in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) was used for data evaluation.

LOD and LOQ values must follow the requirement that peak signal intensity should be 3 and 10 times greater than background noise (signal-to-noise ratio), respectively [15]. Six blank samples were used as reference to find the mean value of background noise. LOD and LOQ concentrations were calculated for an approximated value, but the exact amount was determined experimentally by injecting minor concentrations until LOD had the proportion 3:1 relative to noise signal, and LOQ 10:1.

Method precision (intra-day and inter-day) was evaluated through the relative standard deviation (RSD). QC samples at mean concentration were analysed in a single day (n = 6) for the determination of within-day precision. Inter-day RSD was calculated by the analysis of RIV standard solution prepared in three concentration levels (low, medium, and high) in three different days.

In order to estimate the accuracy of developed method, simulated placebo solutions were spiked with RIV standard stock solution in concentrations corresponding to 25, 50, and 75 % of the highest point on calibration curve. RSD and relative error were used to evaluate accuracy.

Considering that factorial design is a great tool to measure simultaneously the effects of distinct factor-level combinations on a response value [16], a 2-Level 2⁴ (sixteen experiments) full factorial design was used to screen and evaluate parameters with significant role in RIV qualitative and quantitative analysis. Four selected factors (column temperature, flow rate, injection volume, and ACN concentration) were studied at high and low levels. The results were processed by using Minitab[®] 15 statistical software (Minitab Inc, State College, USA).

3. Result and discussion

3.1 Method development and optimization

Method validation started with HPLC-UV to UPLC-MS method migration from a previously validated HPLC-UV method. Chromatographic conditions were mathematically scaled [17] and performed regarding mobile phase composition, sample injection, flow rate and RIV concentration. Although good performance has been found from the first test, different solvent proportions and mobile phase elution conditions were assessed in order to determine great analytical conditions.

After method optimization, chromatographic system was set to operate isocratically with a binary gradient mobile phases, comprising water adjusted to pH 4.0 with ammonium hydroxide as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B, both solutions containing 0.1 % v/v formic acid. Continuous flow rate was eluted at 0.20 mL/min, with 63 % of mobile phase A and 37 % of mobile phase B, during the total time of 3.5 min. Temperature of column and auto-sampler was maintained at 30 °C and 20 °C, respectively. Injection volume was 1.4 µL.

Since an internal standard may offer a reliable MS response, different drug substances (acetaminophen, caffeine, carbamazepine, lovastatin, amitriptyline, and duloxetine) were tested. Selection was based on the observation of retention time, resolution, and peak intensity. The last item has great importance whereas the concentration of IS should be above LOQ value but not so high that could suppress RIV ionization. Tricyclic antidepressant amitriptyline was selected as the best IS for the method.

RIV chromatographic peak was detected at 1.66 min and IS, amitriptyline, at 2.20 min (Figure 6-1). Their identification was confirmed through molecular ions detected in full scan mode after positive ESI ionization. RIV and IS engender positive protonated molecules $[M+H]^+$ ions at m/z 436.1 and m/z 278.2, respectively.

Multiple reaction monitoring was used to confirm identity of the main compound, RIV on tablet samples, observing the transition of precursor ion m/z 436.1 to produce precursor ion m/z 144.9 with collision energy of 20 eV (Figure 6-2). Chlorothiophene carbonyl ion m/z 144.9 was chosen due its intensity and reproducibility of its formation [4, 8].

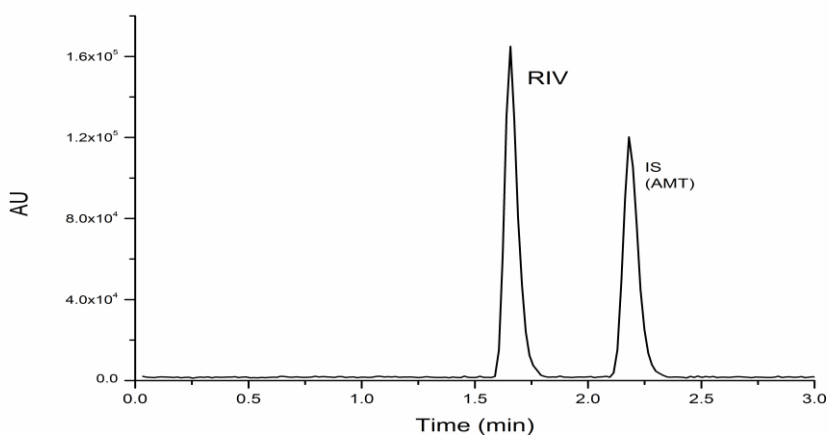


Figure 6-1. Representative total ion MS chromatogram of RIV standard (m/z 436.1) and IS amitriptyline (m/z 278.2) from UPLC-MS analytical method with mobile phase containing A:B (63:37), where A: water pH 4.0, and B: ACN, both with 0.1% formic acid.

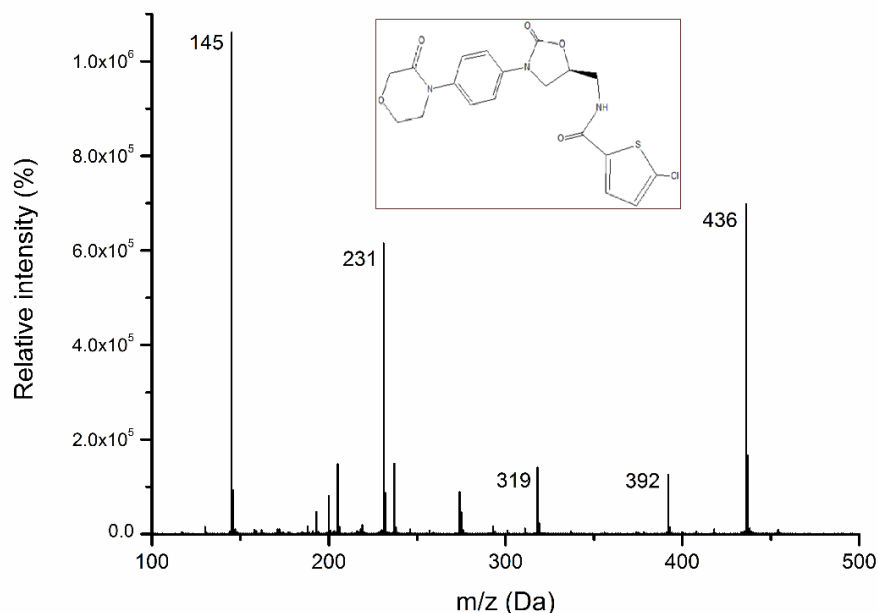


Figure 6-2. RIV MS/MS full scan spectrum. Precursor ion: m/z 436.1 and product ions. Fragment ion: m/z 144.9, formed through the rupture of amide group. ESI on positive mode, capillary voltage: 3.0 KV, cone voltage: 40 V, desolvation gas: 300 L/h, and desolvation gas: 300 L/h, and desolvation gas: 300 L/h, and desolvation temperature: 250 °C.

3.2 Method validation

Quantification of RIV based on peak areas from MS chromatograms is a great alternative for drug monitoring and pharmaceutical analysis. Short time of analysis (3.5 min) is possible due the fast elution of RIV and IS and allows the analysis of several samples with trustful results. Coupling chromatography to mass spectrometry benefits detection and identification of impurity and degradation products in every analysed sample.

Evaluation of RIV standard at each analysis day provided mean values applied on system suitability: 2572.49 for theoretical plates and 1.15 as tailing factor. Resolution between RIV and IS was 1.96. Tested parameters are within the usual acceptable range for pharmaceutical analysis.

3.2.1 Specificity

Analysis of six blank samples demonstrated neither excipients from pharmaceutical formulation or components of mobile phase interfered in the detection and quantification of RIV and IS. QC samples stored with and without refrigeration presented intact chromatograms, no impurity was detected and RIV concentration was the same as on first day. RIV recovery at ion suppression evaluation was found to be $99.84 \pm 1.24 \mu\text{g/mL}$, which indicates that system presented any considerable matrix suppression.

3.2.2 Linearity

Three standard curves for RIV were plotted with the following concentrations: 1, 5, 10, 20, and 50 $\mu\text{g/mL}$. Proposed method was found to be linear ($R^2 = 0.9970$) and the standard curve represented by equation $y = 0.0645x - 0.0151$. Analysis of variance showed that obtained results correspond to a linear regression ($F_{\text{calc}} 1761.9 > F_{\text{tab}} 2.61$) with adequate fitting ($F_{\text{calc}} 2.03 < F_{\text{tab}} 2.84$), $\alpha = 0.05$.

3.2.3 LOD and LOQ

Evaluation of limits of detection and quantification in pharmaceutical analysis can enforce method sensitivity. Six blank samples were analysed and mean intensity

values used for signal-to-noise approach. Experimentally determined LOD and LOQ concentrations were 0.22 and 0.65 µg/mL, respectively.

3.2.4 Precision

Intra-day precision data was achieved among method application results. Six QC samples of RIV in tablet dosage forms were analysed in a concentration of 20 µg/mL. Mean assay result was 101.14%, RSD values were found from 0.83% to 3.99%.

Inter-day RSD of the method ranged between 1.87 – 3.17%. Values found for RSD are within the desirable for precise methods, considering intrinsic variability of the technique.

3.2.5 Accuracy

Method accuracy, assessed in three different concentrations (low, medium, and high), had results expressed as relative error ranged from - 0.16% to 1.85% (Table 6-1). Accuracy values along with precision results demonstrate the reliability of the developed method.

Table 6-1. Accuracy data of UPLC-MS for RIV in pharmaceutical formulations.

Nominal Amount Add	Concentration range ^a (µg/mL)	RSD ^b (%)	Accuracy ^c (E, %)
25 %	12.52 - 12.92	1.71	1.85
50 %	25.00 - 25.21	1.23	- 0.16
75 %	37.14 - 38.26	1.60	0.19

^aMean of three replicates

^bRelative standard deviation

^cExpressed as relative error

3.2.5 Robustness

In order to assess significance of four factors on RIV analysis (concentration relative to the label claimed), full factorial was designed with two levels, central point, and one block of randomized runs with one replicate for corner point. Chromatographic

factors and variants selected to evaluate robustness of the method are specified in Table 6-2.

Table 6-2. Selected factors for full factorial design with optimized values and variations (low and high) applied to each factor.

Factors	Optimal	Low Level	High Level
Column temperature (°C)	30	28	32
Flow rate (mL.min ⁻¹)	0.2	0.18	0.22
Injection volume (µL)	1.4	1.2	1.6
Organic concentration (%)	37	35	39

Regression analysis was performed to evaluate the fitness of the model. It was found a Fit value of 20.7696 with SE Fit of 0.0465 demonstrating no evidence of lack of fit ($P > 0.05$). The F-test results for the model (Table 6-3) presented $F_{\text{observed}} < F_{\text{tab}}$ values ($\alpha = 0.05$). These analyses stated the adequacy of proposed model to evaluate quality of the method.

Table 6-3. ANOVA results for experimental design model

Source	DF	SS	MS	F value
Main Effects	4	0.0808	0.0202	0.57
2-Way interaction	6	0.1834	0.0303	0.86
Residual error	5	0.1777	0.0355	
Total	16	0.4429		

*DF: degrees of freedom; SS: sum of squares; MS: mean squares (PRESS = 0,7571).

Pareto chart of effects (Figure 6-3) presents significance of selected factors up to order four by the ratio of absolute value of estimated effects to the pseudo standard error defined by Lenth (Lenth's PSE) [18]. Length of each bar represents the effect of a single factor or interaction of factors, thus interaction of ACN concentration in mobile phase, flow rate, and column temperature is here presented as the stronger response on assay (%), although none of the parameters evaluated alone or all together

presented a significant interference on concentration of RIV. Therefore, robustness of the method can be assumed at assessed conditions.

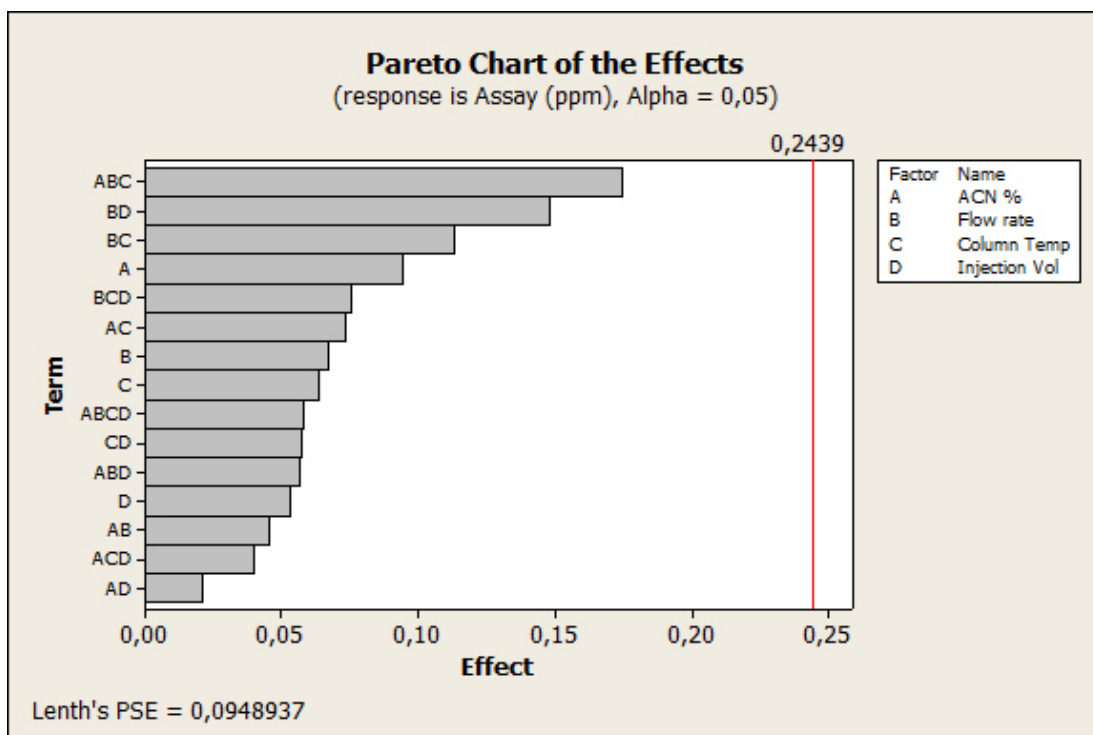


Figure 6-3. Pareto chart of effects and table of estimated effects for the 2-Level full experimental design, applied to evaluate is small changes on pre-selected parameters are significant on RIV qualitative and quantitative analysis.

Quality control of medicines and bulk substances is admittedly of great importance for assurance of effective and secure treatment of patients. Improvements on detection and separation techniques have increased the sophistication of equipment evaluable to pharmaceutical industries worldwide, hence the demands regarding accuracy and sensitivity are constantly growing. Furthermore, great emphasis is now being given to detection and characterization of impurities and degradation products. UPLC-MS/MS is an example of how important hyphenated techniques have become in the last year. UPLC allows fast and reliable analysis of multiple compounds simultaneously and coupling to multistage mass spectrometry enables determination of fragmentation mechanisms and elucidation of structures, such as impurities and degradations products. Thus, the use of hyphenated techniques will become essential in coming years.

4. Conclusion

Proposed and validated high-throughput UPLC-MS method was successfully validated regarding linearity, specificity, sensitivity, precision, accuracy, and robustness. System is within desirable conditions for pharmaceutical analysis and therefore can be applied as a suitable method for quality control of RIV in tablets. Among other advantages, validated method can be considered environmental friendly due its low consumption of organic solvents, thus a reliable alternative to analysis and quality control of drugs.

Acknowledgment

LCQFar – UFRGS, SQIA – UFSM, financial support from CAPES/Brazil.

References

- [1] Kamata, K.; Kawamoto, H.; Honma, T.; Iwama, T.; Kim, S.H.P. Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Natl Acad Sci USA*, **1998**, *95*, 6630-6635.
- [2] Samama, M.M. The mechanism of action of rivaroxaban – an oral, direct Factor Xa inhibitor – compared with other anticoagulants. *Thromb Res*, **2011**, *127*, 497-504.
- [3] McBride, B.F. Preliminary assessment of the critical differences between novel oral anticoagulants currently in development. *J Clin Pharmacol*, **2005**, *45*, 1004-1017.
- [4] Rohde, G. Determination of rivaroxaban – a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromat B*, **2008**, *872*, 43-50.
- [5] Weinz, C.; Schwarz, T.; Kubitzka, D.; Mueck, W., Lang, D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos*, **2009**, *37*, 1056-1064.
- [6] Kubitzka, D.; Becka, M.; Mueck, W., Halabi, A.; Maatouk, H.; Klause, N.; Lufft, V.; Wand, D.D.; Philipp, T.; Bruck, H. Effects of renal impairment on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Brit J Clin Pharmacol*, **2010**, *70*, 703-712.
- [7] Asmis, L.M.; Alberio, L.; Angelillo-Scherrer, A.; Korte, W.; Mendez, A.; Reber, G.; Seifert, B.; Stricker, H.; Tsakiris, D.A.; Wuillemin, W.A. Rivaroxaban: quantification by

anti-Fxa assay and influence on coagulation test: a study in 9 Swiss laboratories. *Thromb Res*, **2012**, 129, 492-498.

[8] Magiera, S. Fast, simultaneous quantification of three novel cardiac drugs in human urine by MEPS-UHPLC-MS/MS for therapeutic drug monitoring. *J Chromat B*, **2013**, 938, 86-95.

[9] Gritti, F; Guiochon, G. The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography. *J Chromat A*, **2013**, 1302, 1-13.

[10] Hites, R.A. Gas Chromatography Mass Spectrometry. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, 1st ed.; Settle, F.A. Eds; Prentice Hall, Virginia, **1997**.

[11] Wingert, N.R.; Barth, A.B.; Gomes, P.; Schapoval, E.E.S.; Steppe, M. Quantitative analysis of duloxetine and 1-naphtol by capillary micellar electrokinetic chromatography. *Curr Anal Chem*, **2011**, 7, 184-193.

[12] Li, L.; Luo, G.; Liang, Q.; Hu, P.; Wang, Y. Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q-TOF-MS. *J Pharmaceut Biomed*, **2010**, 52, 66-72.

[13] Puchalska, P.; Marina, M.L.; García, M.C. Development of a high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry methodology for the determination of three highly antihypertensive peptides in maize crops. *J Chromat A*, **2013**, 1285, 69-77.

[14] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for the Human Use Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), November, **2005**.

[15] Lee, M.S. LC/MS - Application in drug development. In: Method Validation in Pharmaceutical Analysis, 1st ed. Ermer, J.; Miller, J.H.McB.; Eds.;Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.

[16] Montgomery, D.C. Design and Analysis of Experiments, 7th ed.; John Wiley & Sons, New York, **2009**.

[17] Swartz, M. Contemporary liquid chromatographic systems for method development. *Separ Sci Technol*, **2007**, 8, 145-187.

[18]. Lenth, R.V. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. *Technometrics*, **1989**, 31, 469-473.

6.3. ARTIGO CIENTÍFICO II: Quantitative Analysis of Anticoagulant Rivaroxaban by Microemulsion Electrokinetic Chromatography

A ser submetido para publicação no periódico Electrophoresis

Quantitative Analysis of Anticoagulant Rivaroxaban by a Developed Stability Indicating Microemulsion Electrokinetic Chromatography Method

Wingert, N.R.; dos Santos, N.O.; Campanharo, S.C.; Steppe, M.

Abstract

Microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) is proposed for analysis of hardly ionisable anticoagulant rivaroxaban (RIV). A simple and rapid stability indicating MEEKC method was developed and validated for the analysis of RIV in pharmaceutical formulation. Separation was performed in a fused-silica capillary with applied voltage of 30 kV. Microemulsion system consisted of 13 mM tetraborate, pH 9.75 + 1.2% SDS + 1.0% ethyl acetate + 2.4% butanol. Linear calibration range was 25 – 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, with $r=0.9982$. Drug degradations were performed in acid and basic media (HCl 1 M and NaOH 0.1 M, respectively), oxidation with H_2O_2 3%, temperature at 60 °C and exposure to UV-C radiation. No interferences with RIV or internal standard peaks were detected. Trueness values between 100.49% and 100.68% were obtained with repeatability, and accuracy standard error ranged from 0.66 to 1.45%. Developed method was found appropriate for quality control of RIV tablets, as a reliable analytical technique and less aggressive to environment.

Keywords: rivaroxaban, MEEKC, electrophoresis.

1 Introduction

Application of capillary electrophoresis (CE) in pharmaceutical analysis includes assays of drugs, chiral separation, analysis of pharmaceutical excipients and determination of drug related impurities [1]. CE separations are generally more efficient, can be performed on a faster time scale and require only nanoliter injection volumes [2]. Reduced sample volume and low consumption of reagents and organic solvents, may reduce the cost of analysis and promote less environmental damage. Microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) is a surfactant-based CE technique. Cosurfactants, usually short chain alcohols, along with surfactants are used to reduce surface tension between oil and water, producing nanometre sized oil droplets. MEEKC system provides efficient separation for charged and neutral compounds based on drug partitioning into the droplet [3; 4].

Rivaroxaban (RIV) is a novel oral anticoagulant indicated for prophylaxis of thromboembolism and deep vein thrombosis [5]. RIV molecule presents high ultraviolet absorption, which assist the development of analytical methods with UV detectors. However, it also presents issues related to its lower water solubility and reduced ionization in usual analytical pH. These circumstances can increase the complexity to develop a reliable quantitative method to analysis of RIV. Chromatographic methods have been reported for analysis of RIV pharmaceutical dosage form by high and ultra performance liquid chromatography [6; 7]. However, CE method for RIV has not been published elsewhere until now. In this context, the objective of this study was to develop and validate a stability indicating method based on MEEKC system to quantify RIV in pharmaceutical formulation in order to assess drug quality, assuring safety treatments.

2 Experimental

2.1 Chemical and Reagents

RIV reference standard substance (99.63%, v/v) was obtained from BOC Science (New York, USA), and hydrochlortiazide reference substance, applied as internal standard (IS), was supplied by USP (Rockville, USA). Xarelto® tablets (Bayer Schering Pharma AG, Germany) containing 20 mg of RIV per dose were obtained from commercial sources. Excipients contained in the pharmaceutical dosage form (croscarmellose sodium, hypromellose, microcrystalline cellulose, iron oxide red,

lactose monohydrated, macrogol, magnesium stearate, sodium lauril sulphate, titanium dioxide) were all of pharmaceutical grades and acquired from different distributors. Acetonitrile (ACN) obtained by Merck (Darmstadt, Germany) were HPLC grade. N-butanol, Ethyl acetate, sodium tetraborate, and Sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Synth (São Paulo, Brazil). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bradford, USA).

2.2 Apparatus

CE experiments were performed on an Agilent ^{3D}CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with a photodiode array detector (DAD), an automatic sample injector, a temperature controlling system (4 – 60 °C), and power supply able to deliver up to 30 kV. Data acquisition and analysis were done by CE ChemStation software (Agilent Technologies).

2.3 Solutions

2.3.1 Standard and sample stock solutions

Standard stock solution of RIV (1.0 mg.mL⁻¹) was prepared in ACN. Solution was filtered through a 0.45 µm membrane filter, transferred to amber volumetric flask and kept under refrigeration. Hydrochlorothiazide (IS) stock solution (1.0 mg.mL⁻¹) was also prepared in ACN following the same procedures described above. For analyses, an appropriate aliquot from RIV stock solution, spiked with IS stock solutions, was diluted in microemulsion electrolyte. To prepare RIV sample solutions (1 mg.mL⁻¹), tablets were weighed and crushed to fine powder. An appropriate amount was transferred to amber volumetric flask and dissolved with ACN. Resultant suspension was filtered to remove insoluble excipients, a second filtration was performed through a 0.45 µm membrane filter. For analysis, an appropriate aliquot from RIV stock solution, spiked with IS stock solutions, was diluted in microemulsion electrolyte to desired concentration.

2.3.2 Preparation of microemulsion electrolyte

Optimized electrolyte was daily prepared mixing with high speed ethyl acetate with SDS, followed by butanol. Previously prepared 13 mM tetraborate solution (pH

9.75) was added at final. Mixture was kept stirring for more two minutes to obtain a stable and optically transparent microemulsion electrolyte.

2.4 Electrophoretic procedure

Separations were carried out with an uncoated fused-silica capillary (Agilent Technologies, Germany) of 50 μm id and 48.5 cm total length (40 cm effective length). Before the first use, capillary was conditioned flushing with 1.0 M NaOH for 45 min, and then with water for 15 min. In the beginning of each working day, capillary was rinsed with 0.1 M NaOH for 15 min, water for 10 min and then with microemulsion for 10 min. Before each analysis, capillary was conditioned by rinsing the with 0.1 M NaOH for 3 min, water for 1.5 min, and microemulsion for more 3 min.. Vials with microemulsion were replaced for new ones every tree analysis. Samples were injected using the hydrodynamic procedure for 5 s at 50 mbar. UV detector was set at 250 nm. Capillary temperature was kept constant at 35 °C and voltage applied was 30 kV.

2.5 Validation of MEEKC method

Validation of the proposed method was performed following the analytical parameters: selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy and robustness for RIV according to the ICH Guidelines [8; 9].

2.5.1 Selectivity

Method selectivity was evaluated to ensure the absence of interferences on RIV quantification. Placebo sample was tested to assess whether excipients contained in the pharmaceutical product could impair RIV or IS detection. The excipients powder mixture was produced following the usual concentrations [10]. Forced degradation protocols were performed to evaluate the analytical conditions for stability study of RIV and to ensure that degradation products (DPs) do not interfere on RIV or IS migration times. Drug stock solutions at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ were prepared in ACN for the stress degradation studies. Appropriated aliquots were diluted with pure water, 1 M HCl, 0.1 M NaOH, and 3% H_2O_2 media to a final concentration of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. These solutions were kept at 60 °C up to 10 hours or until reach 50 % drug degradation. RIV concentration was analysed for each time sample. Acid and alkaline solutions were neutralized to stop reaction. RIV photostability was tested exposing drug solution to

UVC radiation at room temperature in a mirrored chamber (1.0 x 0.12 x 0.17 m) equipped with UVC lamps (Ecolume ZW[®], 254 nm, 15 W). For CE analyses, appropriated aliquots of the above solutions were spiked with IS solution and diluted to RIV theoretical concentration of 100 µg.mL⁻¹. Peak purity of RIV and DPs detected on electropherograms was determined using the Agilent Chemstation software tools.

2.5.2 LOD and LOQ

Limits of quantification and detection (LOQ and LOD) were obtained based on the linear regression approach, applying standard error of the response and slope of linear calibration curve values, according to ICH Q2 (R1) guideline [8].

2.6.3 Linearity

Compliance of method linear response was evaluated by linear regression analysis calculated by the least square regression and by ANOVA (analysis of variance) ($\alpha = 0.05$). Standard plots were constructed with six concentrations of RIV from 25 to 150 µg.mL⁻¹, analysed in three consecutive days.

2.5.4 Precision

Precision of the method for quantification of RIV was verified through repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) analyses. Results were expressed as relative standard deviation (RSD). Six independent samples were prepared on the same day according 2.3.1 item at final concentration of 100 µg.mL⁻¹. Intermediate precision was assessed by carrying out the analysis on three different days.

2.5.5 Accuracy

Method accuracy was determined through recovery of RIV reference standard add to placebo solution. Samples were prepared in tree levels (low, intermediate, and high) equivalent to 50, 100, and 150 µg.mL⁻¹ of RIV, and always spiked with IS at 100 µg.mL⁻¹ (n=3, to each added concentration). Accuracy was calculated as percentage of drug added recovered from the placebo solution.

2.5.6 Robustness

Method robustness was assured analysing the effect of small changes in method parameters and drug quantification. RIV quantification and repeatability on injections were evaluated using both sample and standard (RIV 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) solutions spiked with IS (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

2.5.7 System Suitability

System suitability parameters were monitored to ensure that CE system and developed method are capable of provide data with reliability and quality based on USP 32 requirements [11]. Theoretical plates (N), migration time (T_m), tailing factor (USPt), and resolution were verified after RIV reference standard and sample analysis. These parameters were accessed in different days of method validation, through Agilent Chemstation software.

3 Results and discussion

3.1 Optimization of electrophoretic conditions

In this study, several electrolyte solutions were tested in order to achieve the highest sensitivity and shortest analysis time for RIV assessment. Moreover, the influence of different analytical parameters on resolution, generated electric current and peak symmetry were considered over method optimization. Free solution CE (FSCE) methodology has an easy implementation and wide application on pharmaceutical analysis[12]. FSCE condition was tested using different aqueous solutions with diverse pH ranges and concentrations. Once RIV has extreme pKa values (1.01 and 13.36), its full ionization in aqueous media with usual pH values is quite limited. Therefore, RIV molecule is mainly non ionized when applying FSCE conditions and ionic separation is unfeasible. As can be seen on figure 1, RIV migration on FSCE electrolyte (50 mM ammonium acetate, pH 7) happens along with electroosmotic flow (EOF) signal, preventing proper drug quantification. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) mode applies micellar solutions of ionic surfactants for compound separation and has become one of the most popular techniques for the separation of small neutral molecules [13]. Analysis of RIV on MEKC electrolytes was tested unsuccessfully. Although micellar technique is frequently used

for non ionized pharmaceutical compounds, RIV did not presented a coherent detection on MEKC mode (Figure 6-4).

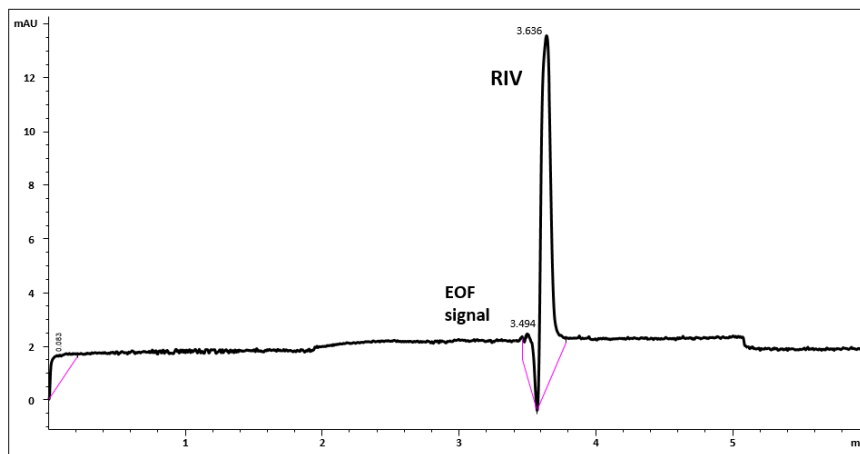


Figure 6-3. Electropherogram of RIV 60 µg.mL⁻¹ analysed on FSCE condition.

Another separation approach, MEEKC has been mostly applied to pharmaceutical analysis [3] especially due its capacity of elucidate both water-soluble and insoluble drugs. Droplets have a more flexible surface, which allows an easier penetration of solutes and therefore, a more stable interaction of hydrophobic substances with oily core. MEKC micelles on the other way present a rigid structure engendered by surfactant and aqueous media, providing a more hostile environment to the analysis of molecules with hydrophobic characteristics such as RIV. Majority of published works applying MEEKC made use of aqueous solution with high pH [14; 15; 16; 17]. As already presented in scientific literature [6; 7], RIV hold some instability on alkaline pH. In order to access the feasibility of RIV analysis under high pH, RIV liability was tested in alkaline solutions (pH from 8 to 10) protected from light, up to 6 hours at 30 °C. According to analysis performed on a previously validated HPLC method, RIV remained stable and without reduction on its content. Therefore, alkaline aqueous solutions were tested without major concerns, always with drug sample freshly prepared on electrolyte. Prior to initial tests, it was observed from relevant literature which microemulsion systems are prevalent on pharmaceutical analysis with MEEKC mode [14; 18; 19; 20]. Different microemulsions were tested. Main variations were proposed on the constitution, pH and concentration of aqueous solutions, and types of cosurfactants and lipophilic phase. Microemulsion constituted of 13 mM tetraborate pH 9 + 0.81 % octane + 6.61% butanol + 3.31 % SDS (Figure 6-5), presented reproducible

results however with undesirable high current generated, 98 μA for 22 kV applied, and overly long migration time for RIV (8.9 min). Alternatively, ethyl acetate has a lower surface tension when compared to heptane and octane oils. Hence, surfactant concentration can be reduced and consequently, voltage applied across the capillary may be increased without generation of over high current. Microemulsion system consisting of 13 mM tetraborate solution (pH 9.75), 1.0% ethyl acetate, 2.4% butanol, and 1.2% SDS showed great results for RIV analysis. Applied voltage was switched to 30 kV, reducing drug migration time to 3.4 min, with resultant stable current of 56 μA . Temperature was increased from 25 to 35 $^{\circ}\text{C}$, improving peak signal.

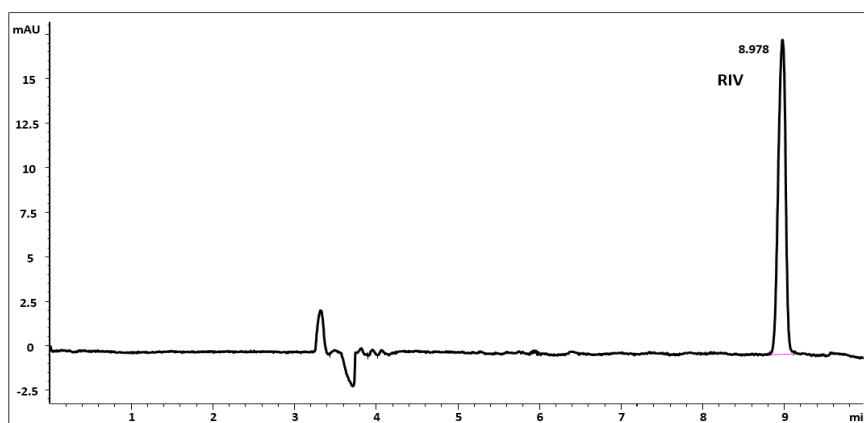


Figure 6-4. RIV analysis on 13 mM tetraborato pH 9 + 0.81 % octane + 6.61% butanol + 3.31 % SDS microemulsion electrolyte.

Apply an IS is highly recommended at CE quantitative analysis to correct intrinsic errors caused by variability at pressure injection mode, voltage and EOF [21]. An ideal IS presents good absorption at selected wavelength, IS peak must have a proper resolution in relation to analyte and degradation products ($R \geq 2$), and should not increase analysis time. Prior to method validation procedure, several pharmaceutical compounds (glibenclamide, duloxetine, hydrochlorothiazide, ranitidine, atenolol, prasugrel chlorhydrate, and clopidogrel) were investigated as IS. Hydrochlorothiazide standard substance presented the most suitable results. Therefore, RIV assays were always evaluated according RIV/IS areas ratio. IS migration time was reproducible at 2.6 min (Figure 6-6A).

3.3 Method Validation

Interference of pharmaceutical excipients from RIV formulations was evaluated and no interference was detected for RIV and IS peaks. Exposure of RIV sample solutions to UVC radiation caused drug photolysis (Figure 6-6D), generating two detectable DPs at 1.9 and 2.1 min. Drug concentration had a reduction of approximately 28 % after 2 h. Hydrolysis was achieved after drug exposure to 0.1 M NaOH and 1 M HCl, both at 60 °C. In alkaline medium, RIV reached 25 % degradation after 0.5 h with formation of one DP detected at 3.6 min (Figure 6-6C). Whereas in acid medium, after 4 h RIV concentration had reduced around 24 % and one DP was detected at 2.4 min (Figure 6-6B). RIV exposure to thermal and oxidative stress did not result in drug degradation and DP formation, respectively.

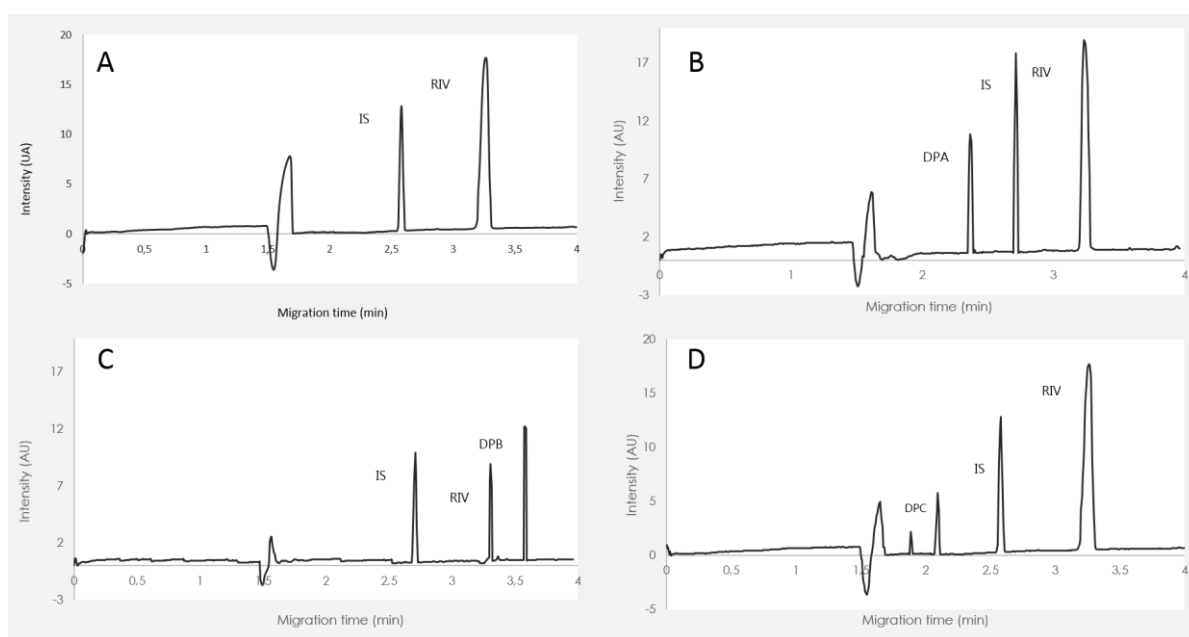


Figure 6-5. Electropherograms of RIV analysis by MEEKC. A) RIV standard substance; B) RIV under 1 M HCl medium at 60 °C; C) RIV exposure to 0.1 M NaOH medium under 60 °C; D) RIV solution after exposure to UVC radiation. All the electropherograms were performed at nominal conditions 13 mM tetraborate (pH 9.75), 1.0% ethyl acetate, 2.4% butanol, and 1.2% SDS microemulsion; 35 °C capillary temperature and 30 kV of applied voltage.

Under the optimum analysis conditions, method calibration curve was obtained with conventional least-squared linear regression using the six concentration levels (25, 50, 100, 125, and 150 µg/mL). As shown at Table 1, developed method exhibited adequate linearity ($r = 0.9982$). According ANOVA statistical evaluation, method

presented significant linear regression ($p < 0.05$) and non significant deviation from linearity ($p > 0.05$). Values obtained for RIV LOD and LOQ based on linear regression approach are also exposed in Table 6-4.

Table 6-4. Method linearity parameters and, LOD and LOQ values of RIV.

Parameters	RIV data
Concentration range ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	25.0 - 150.0
Intercept	-0.0736
Slope	0.0355
Coefficient of correlation (r)	0.9982
LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	3.40
LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10.32

^aMean of three replicates.

Repeatability and intermediate precision results were expressed as RSD. Values presented in Table 6-5 were under 1.0 % for both cases, which demonstrates adequate precision of developed method. Method accuracy was evaluated using RIV reference standard recovery at three concentration levels, which were added to drug placebo solution IS (Table 6-6). The mean recovery data for RIV was within 99.05-100.66%, satisfying the acceptance criteria for the study. Small but deliberate variations important parameters were implemented to assess method robustness. Tetraborate concentration (11 and 15 mM), electrolyte solution pH (9.5 and 10), percentage of SDS (1.0 and 1.4 %), ethyl acetate (0.8 and 1.2 %), and butanol (2.2 and 2.6 %) were the variations performed. Results of these changes are summarized in Table 4. RIV quantified were evaluated and are within the acceptable deviation (RSD < 2 %). Those results ensure the capability of the method to remain unaffected after the enforced variations.

System suitability was evaluated through monitoring electrophoretic parameters along method development. Average values of RIV migration time (3.36), theoretical plates (19267), peak symmetry (1.37), and resolution (9.00) demonstrate the qualification of electrophoretic system for pharmaceutical analysis.

Table 6-5. Intra-day and inter-day precision of RIV.

	Intra-day (n= 6)			Inter-day (n=18)
	Day 1	Day 2	Day 3	
RIV (assay, %)	100.49	100.68	100.54	100.57
RSD (%)	0.70	0.24	0.96	0.66

Table 6-6. Accuracy of MEEKC method for RIV analysis.

Nominal concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Mean concentration found ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recovered Amount (%)	RSD (%)
50.56	50.90	100.66	0.66
101.13	100.17	99.05	0.96
151.69	151.33	99.76	1.45

^aPrepared in three replicates.

Table 6-7. Robustness of MEEKC method for RIV.

Variable	Range investigated	RIV std RSD (%)	RIV content ^a	Sample RSD (%)
Tetraborate (mM)	15	0.86	99.85	0.75
	11	1.62	99.93	0.67
SDS (%, w/w)	1.4	1.44	99.81	1.86
	1.0	1.40	100.91	1.76
Ethyl Acetate (%, w/w)	1.2	1.63	99.18	1.75
	0.8	0.99	100.70	0.56
Butanol (%, w/w)	2.6	0.80	100.89	0.80
	2.4	1.09	100.22	1.70
Electrolyte pH	9.5	1.43	100.62	1.26
	10	1.33	100.40	1.56
	Nominal ^b	1.16	100.61	0.78

a) RIV content regarding amount declared by manufacturer; b) Nominal Microemulsion: 13 mM tetraborate pH 9.75 + 1.2% SDS + 1.0% Ethyl acetate + 2.4% butanol.

4 Concluding remarks

A stability indicating method based on MEEKC was developed for quantitative determination of RIV in pharmaceutical formulation. Method performance in terms of accuracy and precision with analysis time of less than four minutes demonstrate that microemulsion systems can be successfully applied in drug analysis. According to statistical analysis, developed method was found to be sensitive, specific, robust, and linear for intended aim. Therefore, MEEKC method with PDA detection can be applied as a reliable and simple technique in quality control of RIV tablets, presenting itself as an analytical alternative with reduced environmental damages and financial costs.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES and UFRGS.

References

- [1] Altria, K., Marsh, A., Griend, C. S. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. *Electrophoresis*, 2006, 27, 2263-2282.
- [2] Holland, L. A., Chetwyn, N. P., Perkins, M. D., Lunte, S. M. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Pharmaceutical Research*, 1997, 14, 372-388.
- [3] Altria, K.D. Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000, 892, 171–186.
- [4] Ryan, R., Donegan, S., Power, J., Altria, K. Advances in the theory and application of MEEKC. *Electrophoresis* 2010, 31, 755–767.
- [5] McBride, B.F. Preliminary assessment of the critical differences between novel oral anticoagulants currently in development. *J. Clin. Pharmacol.* 2005, 45, 1004-1017.
- [6] Çelebier, M., Reçber, T., Koçak, E., Altinöz, S. RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 49.
- [7] Wingert, N.R., Nunes, M.A.G., Barden, A.T., Gomes, P., Muller, E.I., Flores, E.M.M. Steppe, M. Ultra-performance LC-ESI/Q-TOF MS for the Rapid Analysis of

Rivaroxaban: Method Validation Using Experimental Design for Robustness Evaluation. *Current analytical chemistry* 2015, 11, 124-129.

[8] ICH (2005) Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedure: text and methodology Q2 (R1). Geneva, Switzerland.

[9] ICH (2003) Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drug Substance and Products: methodology Q1A (R2).

[10] Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed Pharmaceutical Press, Berlin, Germany, 2009.

[11] USP. The United States Pharmacopeia 37th Rockville, MD, 2014.

[12] Altria, K.D., Elder, D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. *Journal of Chromatography A* 2004, 1023, 1–14.

[13] Altria, K. D., *Capillary Electrophoresis Guidebook*, 52th vol. Human Press: New Jersey, 1996.

[14] Mahuzier, P.E., Aurora Prado, M.S., Clark, B.J., Kedor-Hackmann, E.R.M., Altria, K.D. An introduction to the theory and application of microemulsion electrokinetic chromatography. *CE currents* 2003.

[15] T. Wen, T., Zhao, X., Luo, G., Wang, J., Wang, Y., Yao, B. et al. Comparison of microemulsion electrokinetic chromatography and solvent modified micellar electrokinetic chromatography on rapid separation of heroin, amphetamine and their basic impurities. *Talanta* 2007, 71, 854–860.

[16] Lynen F., Saavedra L., Nickerson B., Sandra P. Evaluation of a multiarray system for pharmaceutical analysis by microemulsion electrokinetic chromatography. *Talanta* 201, 84, 724-729.

[17] Nussbaumer, S., Fleury-Souverain, S., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Bonnabry, P. Quality control of pharmaceutical formulations containing cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin by micellar and microemulsion electrokinetic chromatography (MEKC, MEEKC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011, 55, 253–258.

[18] Miola, M.F., Snowden, M.J., Altria, K.D. The use of microemulsion electrokinetic chromatography in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998, 18, 785–797.

[19] Yu, L., Chu, K., Ye, H., Liu, X., Yu, L., Xu, Chem, G. Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 2012, 34, 140 – 151.

[20] Yang, H, Ding, Y., Cao, J., Li, P. Twenty-one years of microemulsion electrokinetic chromatography (1991–2012): A powerful analytical tool. *Electrophoresis* 2013, 34, 1273–1294.

[21] Jouyban, A., Kenndler, E. Impurity analysis of pharmaceuticals using capillary electromigration methods. *Electrophoresis*, 2008, 29, 3531-3551.

6.4. Análise de rivaroxabana por eletroforese capilar em microchip

INTRODUÇÃO

A técnica de análise por eletroforese capilar em microchip (MCE, *microchip capillary electrophoresis*) foi introduzida no início dos anos 1990 por Andreas Manz, um dos precursores no desenvolvimento de trabalhos com micro sistemas analíticos (micro total analysis system - μ TAS) (MANZ, 1992). A utilização de micro sistemas analíticos permite a redução do consumo de amostra e reagentes, bem como em um aumento na velocidade de análise (VILKNER et al., 2004). A MCE é umas das técnicas mais bem sucedidas em microfluidos, apresentando diversas vantagens e ainda muitos desafios (GUIHEN, 2014).

Na MCE (e na microfluídica em geral) o fluxo eletrosmótico (FEO) reduz o tempo de separação e pode controlar a direção e magnitude do fluxo entre canais conectados. Dois fatores chave no controle do FEO são: o campo de força aplicado; a espessura da dupla camada de interface com capilar/solução (HENRY, 2006). Os microchips de vidro possuem a mesma superfície química que os capilares utilizados na CE, uma vez que a sílica fundida confere ao vidro alta resistência térmica e mecânica.

Uma vez que o volume de análise é reduzido a nanolitros na MCE, é necessário um sistema de detecção com alta sensibilidade, sendo fluorescência o método mais utilizado (COLTRO *et al.*, 2004). Porém, compostos não fluorescentes só poderiam ser analisados através de técnicas derivativa, aumentando o tempo de preparo de análise além de conferir maior possibilidade de erros. Dessa forma, a detecção por espectrometria de massas (MS, *mass spectrometry*) tem demonstrado resultados promissores para análise de uma quantidade muito maior de compostos separados por MCE (OHLA et al., 2012).

A análise quantitativa de fármacos é parte fundamental no controle da qualidade de medicamentos, desta forma, a busca pela implementação da tecnologia analítica da MCE pode ser vista como um avanço para as áreas da indústria e da pesquisa. A análise de produtos farmacêuticos por MCE acoplada a MS (MCE-MS) tem sido bem-sucedida, mas ainda muito pouco explorada (BELDER et al., 2010; NORDMAN et al., 2011; HE et al., 2004). Portanto, o objetivo do trabalho abaixo relatado foi a avaliação da viabilidade da MCE-MS com ionização por electrospray (ESI, *electrospray ionization*) na análise de fármacos, utilizando o anticoagulante rivaroxabana (RIV) em sua forma farmacêutica.

Interface MCE-ESI-MS

Conforme a teoria de microssistemas, um spray com diâmetro menor pode levar a uma maior sensibilidade na MCE-MS em comparação com diâmetros maiores, isso ocorreria devido a formação de gotas menores com densidade de carga elevada, resultando em uma melhor dessolvatação e maior eficiência de ionização. No interior do microcanal de separação, as substâncias em análise migram por influência do FEO em direção à ponta do spray, onde o processo de aspensão ocorrerá. De maneira geral, quando o eletrólito utilizado é composto por uma solução tampão compatível com a ionização por MS gotículas quimicamente carregadas são formadas na ponta do spray, criando assim um campo elétrico. Quando a força eletrostática se torna igual à tensão superficial do líquido a gota toma um formato elíptico (cone de Taylor) que é conduzido em direção ao MS. Para otimização da criação do cone de Taylor no espaço entre a ponta do spray e o orifício de entrada os MS, deve haver uma distância entre 3 – 6 mm e perfeito alinhamento entre as duas extremidades (SCHAPPLER et al., 2008; BILITEWSKI et al., 2003). Caso o eletrólito de separação no microchip não seja suficiente ou reduza a ionização dos compostos em análise, a utilização de uma solução de revestimento (*sheath liquid*) introduzida através de uma conexão extra no terço final do canal de separação do microchip é recomendável.

Fabricação e manutenção do *microchip* de vidro

Microchips de vidro são tradicionalmente fabricados utilizando fotolitografia, explorando tanto a cobertura com película quanto com moldes de metal para a transferência do design, e a gravação da superfície com abrasivos químicos para criação da estrutura do microchip. Independentemente do tipo de molde utilizado, o desenho a ser impresso no chip é criado a partir de softwares que possuam o design para os canais, câmaras e reservatórios do microchip desejado (LANDERS, JP 2008).

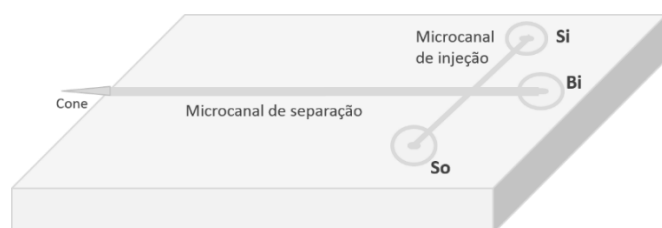


Figure 6-6. Ilustração do microchip utilizado para as análises de MCE-MS. Si: vial de entrada da amostra; Bi: vial de entrada do eletrólito; So: vial de saída da amostra.

Na MCE-MS, para que ocorra a transferência da solução no interior do microchip para o MS é necessário que exista um prolongamento com formato de cone ao final do microcanal de separação do chip (Figura 6-7). Em um laboratório de mecânica fina é realizada a inserção de uma extensão de vidro na parte final do microcanal, a qual será posteriormente moldada no formato de um cone. Para obter o formato alongado e fino do cone, um pequeno pedaço cilíndrico de vidro de borossilicato é unido à extensão por fusão do vidro. Esse procedimento ocorre da seguinte forma: as duas pontas de vidro são unidas e é feito o aquecimento para fusão da região. Ainda quente, a parte contendo a ponta cilíndrica adjacente é solta no ar e por ação do peso a região fundida toma o formato de um cone. Porém, esse cone formado na ponta do microcanal ainda está maciço e precisa ser aberto para a passagem de solução. O processo de criação de um microcanal no cone é chamado de *etching* (gravação em uma superfície sólida utilizando solução corrosiva). A ponta do microchip contendo o cone de vidro é mergulhada em uma solução de ácido fluorídrico enquanto gás nitrogênio é bombeado para dentro do sistema. Esse procedimento é realizado por aproximadamente 5 min, quando começam a ser visualizadas bolhas de nitrogênio saindo através da ponta do cone, resultando em um microcanal de aproximadamente 10 μm . A confirmação da eficácia do processo é realizada através de visualização em microscópio e pela injeção de água através do *vial*.

Uma vez que os *vials* existentes no microchip limitam muito o volume de amostra e eletrólito, é comum a colocação de *vials* de vidro como uma prolongação dos orifícios já existentes. Esses *vials* são cilindros ociosos de vidro aderidos ao microchip com Elastosil E43 (Wacker Silicons, Riemerling, Alemanha), uma cola de silicone autonivelante capaz de secar em temperatura ambiente.

Instrumentação

Para a observação dos canais e estrutura do microchip, bem como otimização dos modos de injeção e separação foi utilizado um sistema que inclui lâmpada de mercúrio, tubo fotomultiplicador e uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio Olympus IX 50 (Olympus, Hamburgo, Alemanha). Os experimentos de MCE-MS foram realizados em um espectrômetro de massas com quadrupolo simples LCMS 2010 EV Shimadzu (Tóquio, Japão) e sistema de interface de fabricação própria.

O potencial elétrico necessário para os modos de injeção e separação eletroforética foi fornecido pela fonte de alta voltagem HCV 40M-10000 (FUG Elektronik, Rosenheim, Alemanha) com quatro canais contendo eletrodo. Desta maneira é possível ajustar a tensão aplicada por cada eletrodo (kV) e visualizar a respectiva corrente gerada (mA).

O principal microchip utilizado nos experimentos (Figura 6-7) constituí-se de sílica fundida com canais em formato de cruz simples. Os microcanais de injeção e separação possuíam 8 e 80 mm de comprimento, respectivamente, com dimensão interna aproximada de 50 μm de largura e 20 μm de profundidade. A dimensão dos orifícios correspondentes aos vials de entrada de amostra (Si, *sample inlet*), entrada do eletrólito (Bi, *buffer inlet*) e saída de amostra (So, *sample outlet*) era de 1.1 mm de profundidade por 2 mm de largura.

Na MCE-MS, a interface do microchip com o MS é diferente da convencional utilizada para análises em ESI-MS, uma vez que não há um posicionamento ortogonal (90 °) do spray em relação ao MS. A interface MCE-MS ocorre através do cone no final do microcanal (emissor do electrospray) diretamente em direção ao MS (180 °). Dessa maneira, o microchip fica disposto sobre uma plataforma móvel, manualmente regulável através de um micromanipulador. A posição do cone emissor do *electrospray* em relação à entrada do MS pode ser visualizada através de duas câmeras microscópicas com exibição das imagens em um monitor adjacente.

Procedimentos experimentais

Devido à escala bastante reduzida do *microchip*, todas as soluções foram inseridas diretamente nos *vials* utilizando micropipetadores. Com a colocação dos extensores, a capacidade volumétrica dos *vials* passou de 7 para 70 μL . Para promover o fluxo das soluções através dos canais, foi promovida a sucção dos líquidos com uma mangueira acoplada à bomba de vácuo, geralmente posicionada junto ao cone no final do microcanal.

Antes de iniciar as análises, os grupos silanois dos canais do microchip foram ativados com NaOH 0,1 M, seguido de água ultra pura. O sistema foi também condicionado com o eletrólito de escolha. Após as análises era procedida a limpeza dos canais, realizada com fluxos de metanol, água ultra pura, NaOH 0,1 M, seguido de outro enxague com água e esvaziados. Caso fossem realizadas análises no dia

seguinte, o microchip era preenchido com uma solução corrosiva de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio (1:3, v/v). A utilização de tal solução objetiva prevenir a obstrução dos microcanais pelo depósito de proteínas.

Floating injection, que pode ser traduzido como injeção oscilante, foi o modo selecionado para realizar a injeção das amostras. Esse modo de injeção requer o controle da voltagem apenas nos eletrodos posicionados no Si e So, onde deve haver uma diferença de tensão entre eles, promovendo a migração da amostra do Si para o So. A injeção é realizada na mudança de voltagem do sistema, os eletrodos Si e So passam a ter a mesma voltagem, e o eletrodo no Bi aumenta a magnitude de sua carga, promovendo a entrada e migração da amostra através do canal de separação até o cone (TAN et al., 2002).

Uma vez que a RIV não promove emissão de luz e não pode ser detectada por fluorescência, foi necessário realizar a otimização do modo de injeção através de um analito modelo (composto detectável por fluorescência). A 7-amino-4-metilcumarina foi a substância de escolha para a visualização do fluxo no interior do chip tanto no modo de injeção quanto de separação (Figuras 6-7 e 6-9).

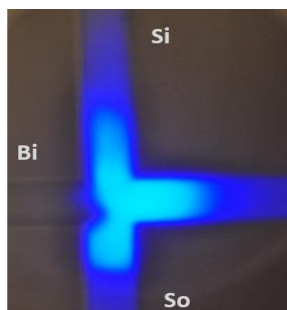


Figure 6-7. Fotografia do cruzamento entre os microcanais de injeção e separação no momento da injeção.

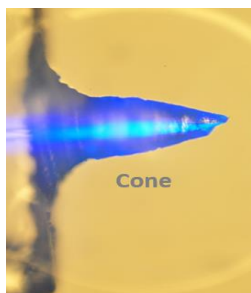


Figure 6-8. Fotografia do cruzamento entre os microcanais de injeção e separação no momento da injeção.

A otimização da tensão aplicada pelos eletrodos, bem como o tempo nas fases de injeção e separação (Tabela 6-8) é fundamental para garantir o sucesso da análise e evitar problemas que possam danificar o sistema, pois ao serem criados campos de tensão muito elevados, a condutividade do eletrólito deve ser a mais baixa possível para assim manter o aquecimento (efeito Joule) reduzido e assim minimizar a possibilidade de curtos-circuitos no interior do microchip. A presença de bolhas no interior dos microcanais, muitas vezes geradas devido ao uso de correntes muito elevadas, pode ser detectada através da variação da corrente nos canais pelos eletrodos. Em um sistema estável, durante a fase de separação a soma das correntes em cada eletrodo deve ser igual a zero.

Table 6-8. Condições eletroforéticas otimizadas análise da RIV por MCE.

Parâmetros	Sistema 1	Sistema 2
Eletrólito	Acetato de amônio 25 mM + ácido fórmico 0.5 %, pH4,7	Ácido fórmico 0.1 % + hidróxido de amônio, pH 3,5 : Metanol (70:30)
Voltagem de injeção (kV)	Si: 0; Bi: 0; So: -0,520	Si: 0,05; Bi: 0,07; So: -0,180
Voltagem de separação (kV)	Si: +1; Bi: +3,1; So: +1	Si: +0,05; Bi: +3,50; So: +0,5
Tempo de migração do analito modelo (s)	150	200

Após a otimização dos modos de injeção e separação foi iniciada a avaliação da técnica de separação com identificação da RIV por MS. Embora diversos testes tenham sido realizados em MCE-MS, devido a problemas de reprodutibilidade e instrumentação, não foi possível a obtenção de espectros de massas confiáveis com relação a detecção do fármaco.

Uma vez que o tempo de desenvolvimento do trabalho foi limitado a oito meses, e que durante este período foi necessário conhecer e aprender as técnicas a serem executadas, bem como o envolvimento no processo de fabricação do microdispositivo, este projeto não pode ser totalmente concluído ao final do prazo do doutorado sanduíche.

Contudo, o trabalho realizado foi de grande valia para o desenvolvimento de conhecimentos e técnicas inovadoras para o controle de qualidade farmacêutico, o qual requer técnicas capazes de rapidamente identificar e determinar a pureza de fármacos.

A MCE-MS é uma técnica analítica recente que tem demonstrado grande variedade de aplicações na química analítica. O contato com diferentes técnicas e equipamentos, bem como pesquisadores e metodologias de pesquisa justificam o período de estágio no exterior, uma vez que possibilitou ampliar a qualificação e interação científica da pesquisadora, bem como de todo o laboratório de controle de qualidade farmacêutico da UFRGS..

6.5 DISCUSSÃO GERAL

Medicamentos com entrada recente no mercado mundial costumam não possuir métodos analíticos validados e reportados em compêndios oficiais. Esse é o caso do anticoagulante oral RIV, comercializado em comprimidos de 10, 15 e 20 mg. Devido à indisponibilidade de metodologias analíticas oficiais que verifiquem a qualidade das formas farmacêuticas comercializadas, o objetivo deste trabalho contempla o desenvolvimento e validação de métodos analíticos indicativos de estabilidade para análise de RIV em comprimidos.

Os dois métodos analíticos desenvolvidos e validados (CLUE e EC) apresentados nesse capítulo ainda são pouco utilizados no controle de qualidade de rotina das indústrias farmacêuticas. Porém, ambas as técnicas apresentam como indiscutível vantagem o menor consumo de amostra e reagentes quando comparadas com a CLAE. Esse menor consumo representa redução de custos e menor produção de resíduos, fatores de grande relevância para as indústrias farmacêuticas e os laboratórios de pesquisa.

Ambas as metodologias analíticas desenvolvidas possibilitam a separação da RIV e seus produtos de degradação em condições de estresse sendo assim classificados com o métodos indicativos de estabilidade, com intensa aplicação para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

O método desenvolvido e validado em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas para análise de RIV SQR e em comprimidos apresenta-se como técnica alternativa para quantificação de RIV com ainda mais rapidez que a CL convencional. A quantificação da RIV foi realizada através da padronização interna, utilizando amitriptilina (AMT) para o cálculo de proporção de áreas (Área RIV/Área AMT). Utilizou-se uma coluna C18 com dimensões de 2,1x50 mm e partícula interna com 1,8 μm para separação dos compostos. Em um tempo de análise de 3 minutos, RIV e AMT foram detectadas. A robustez do método por CLUE-EM foi avaliada através de design experimental de fatorial completo, 2^n , onde “n” corresponde ao número de fatores avaliados em dois níveis. Conforme demonstrado no gráfico de Pareto, nenhum dos fatores modificados (temperatura da coluna, vazão da fase móvel, volume de injeção e concentração de ACN) ou suas interações demonstraram influência significativa na quantificação da RIV em comprimidos.

Através da ANOVA foi comprovado que a análise fatorial utilizada para avaliação da robustez do método por CLUE-EM é um modelo adequado para tal fim.

A eletroforese capilar tem como princípio a separação de compostos ionizados pela diferença de cargas. Compostos não ionizados são comumente analisados por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), a qual promove a formação de uma pseudo-fase estacionária. Em sistemas utilizando EC em zona livre, a RIV apresentou sua migração juntamente com o FEO, inviabilizando a quantificação da mesma. Embora a MEKC representasse uma opção viável na teoria, na prática não foram encontrados resultados adequados para análise da RIV. Por características inerentes à metodologia, a cromatografia eletrocínética em microemulsão (MEEKC) demonstrou ser adequada à análise de RIV. Pois além de proporcionar um sistema eficiente para a migração de moléculas não ionizadas, a estrutura mais maleável formada pelo tensoativo e co-tensoativo permitem uma interação facilitada entre compostos pouco hidrofílicos, como a RIV, e o núcleo oleoso microemulsionado.

O método desenvolvido e validado para análise de RIV em comprimidos utilizou uma microemulsão constituída por tetraborato 13 mM como fase aquosa, acetato de etila como fase oleosa, tensoativo SDS e co-tensoativo butanol estabilizando as duas fases. O sistema de separação apresentou melhores resultados utilizado pH 9,75. Todavia, tendo em vista a conhecida instabilidade da RIV nos testes de degradação forçada em meio alcalino, foi procedido o teste da susceptibilidade da molécula em soluções com pHs 8, 9 e 10 por até 6 horas. Uma vez verificada a estabilidade do composto, o processo de validação foi conduzido, sempre com amostras preparadas no máximo 3 horas antes da análise. A hidroclorotiazida foi o fármaco selecionado para utilização como padrão interno. O tempo de migração da RIV foi de aproximadamente 3,36 min, e em até 4 min foi possível analisar a RIV juntamente com o PI e os produtos de degradação forçada em condições ácida, alcalina e radiação UVC.

A eletroforese capilar em microchip (MCE), por sua vez, é uma técnica bastante recente e ainda pouco utilizada na análise de fármacos em formas farmacêuticas. A fim de proceder a análise de RIV por MCE, foram testados desde a constituição do microchip (vidro ou acrílico), o tipo de detecção (fluorescência e MS), modos de injeção e separação, a composição do eletrólito. Ainda que o método desenvolvido utilizando microchip de vidro borossilicato, utilizando *floating injection* otimizada através de um analito modelo detectável por fluorescência, as análises por MCE-MS

utilizando o método desenvolvido mostraram-se inconclusivas, não sendo possível confirmar a capacidade da técnica para analisar a RIV de forma reprodutível.

6.6. CONCLUSÕES

- O método desenvolvido por CLUE, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear, específico, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de RIV em comprimidos;
- A avaliação da robustez através do planejamento fatorial permitiu uma análise mais ampla da influência parâmetros analíticos na quantificação do fármaco;
- O método proposto para análise de RIV em sua forma farmacêutica por EC apresentou-se específico, linear, preciso, exato, sensível e robusto. Desta forma considerado adequados para a determinação quantitativa de RIV no produto farmacêutico;
- Ambos os métodos validados, CLUE-MS e EC-UV, são indicativos de estabilidade, uma vez que não há interferência dos produtos de degradação forçada detectados com os picos de RIV ou dos padrões internos utilizados;
- Os métodos desenvolvidos e validados apresentados nesse capítulo representam técnicas alternativas para o controle de qualidade de fármacos. Ambos demandam uma menor quantidade de amostra e reagentes, reduzido os custos e danos ambientais pela produção de resíduos.
- O método de análise da RIV por MCE-MS foi desenvolvido porém não pode ser concluído em tempo hábil. Porém, o contato com pesquisadores com diferentes experiências e conhecimentos trouxe novas ideias e propostas para a área de controle de qualidade de medicamentos. A diversificação de contatos científicos é bastante oportuna para desenvolvimento de futuros projetos conjuntos na área de controle de qualidade, ou ainda, multidisciplinares, tanto para o laboratório de controle de qualidade farmacêutico como para o programa de pós-graduação da UFRGS.

**7. CAPITULO IV – ESTUDO DA ESTABILIDADE:
IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

7.1. INTRODUÇÃO

Assim como o controle de qualidade é fundamental durante todas as fases do desenvolvimento farmacêutico, desenvolver métodos analíticos indicativos de estabilidade garante que a presença de possíveis produtos de degradação junto ao medicamento poderá ser monitorada com confiança. Dessa forma, os estudos de degradação forçada e de especificidade são realizados para garantir a seletividade do método analítico desenvolvido.

Atualmente, as análises farmacêuticas são predominantemente realizadas por CLAE com detecção de UV, isso ocorre devido a vantagens como simplicidade operacional, reduzido custo de amostra, alta reprodutibilidade e compatibilidade com a grande maioria dos produtos farmacêuticos (COLLINS et al., 2006).

A estabilidade de um medicamento pode ser avaliada através de ensaios de degradação forçada, os quais permitem avaliar o efeito de condições extremas de estresse sobre o produto farmacêutico. Esse recurso também é utilizado para a pesquisa dos mecanismos de degradação de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação. Dentre aos processos de degradação forçada aos quais os medicamentos são expostos, os principais são degradação térmica, hidrólise ácida e alcalina e decomposição oxidativa e fotolítica (SINGH e BAKSHI, 2000).

A cinética de degradação compreende o estudo da velocidade de degradação, ocorrendo por um ou mais mecanismos, e podendo ser calculada matematicamente. Esse estudo é fundamental para avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos e apresenta como principal objetivo obter, experimentalmente, dados cinéticos e correlaciona-los através de equações matemáticas. Tal informação será precursora de maiores estudos sobre os mecanismos das reações de degradação, podendo com essas informações acelerar ou reduzir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975; KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

Considerando a concentração do fármaco ao longo do estudo de degradação é possível determinar a ordem de reação. Para uma reação de ordem zero ($C = C_0 - kt$), cujo gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) será uma reta, e sua inclinação corresponde a constante de velocidade de reação (k), a velocidade de reação independe da concentração da substância ativa. Quando a velocidade da reação é ditada pela concentração de um dos reagentes, ela segue cinética de

primeira ordem ($\ln C = \ln C_0 - kt$) apresentando perfil logarítmico. A cinética de segunda ordem, por sua vez, apresenta-se quando a reação é dependente da concentração de dois reagentes ou a segunda ordem de um deles, esse modelo cinético é representado pela equação $1/C = 1/C_0 + kt$ (NUDELMAN, 1975; LACHMAN et al., 2001).

Conforme as Guias ICH Q3A(R2) e Q3B(R2), a elucidação estrutural e determinação da segurança biológica de impurezas e produtos de degradação em fármacos e produtos acabados é de extrema importância, especialmente quando presentes em quantidades superiores às especificadas.

A literatura científica atual emprega com crescente confiabilidade ensaios *in vitro* que visam substituir ou reduzir o número de animais nos testes de toxicidade. Os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* mais utilizados para prever a toxicidade de uma substância ou mistura de compostos (MARTINEZ-HIDALGO, 2007). Os testes de genotoxicidade *in vitro* são utilizados para detectar compostos indutores de dano genético expondo as células diretamente no meio teste. Diferentes testes podem ser aplicados para a avaliação da genotoxicidade, sendo necessário mais de um resultado positivo para afirmar dano ao material genético.

As etapas para identificação e caracterização de impurezas e produtos de degradação, por análise em CL-EM, envolvem a obtenção dos dados do íon molecular e posterior fragmentação por espectrometria de massas em tandem (EM/EM ou EM²), tanto para o fármaco quanto para os produtos de degradação. Dados mais exatos referentes às massas detectadas podem ser obtidos com espectrômetros de alta resolução (Tof, Q-Tof, triplo quadrupolo ou Orbitrap), que fornecem resultados com limite de erro em unidades de mili massa ($10^{-3} m/z$) (SINGH et al., 2012; PAN et al., 2012; BRISTOW et al., 2005).

Muitas vezes, a estrutura de uma impureza ou produto de degradação é estabelecida baseando-se no perfil de seus fragmentos de massa em comparação ao íon molecular e fragmentos moleculares do fármaco. Fragmentos de maior intensidade relativa, ou valor de m/z diferencial podem levar à proposição de diferentes quebras e rearranjos. A estrutura do composto em análise é usualmente confirmada uma vez que seja possível fornecer um mecanismo que explique sua origem.

Neste capítulo são apresentados dois artigos científicos relacionados ao estudo dos produtos de degradação forçada da RIV nos meios ácido e alcalino e exposição à radiação UVC. A avaliação da cinética de degradação foi realizada quantificando o

decaimento na concentração de RIV em método validado por CLAE com detecção por PDA. O potencial tóxico das amostras degradadas de RIV em diferentes condições foi avaliado por testes *in vitro* de cito e genotoxicidade com células HepG2.

Ainda que na literatura científica já houvessem relatos sobre a instabilidade da RIV em determinadas condições de estresse (ÇELEBIER *et al.*, 2013) e a cinética de degradação da RIV em meio alcalino tenha sido avaliada por CLAE e CCD-densitométrica (ABDALLAH *et al.*, 2015), a pesquisa aqui relatada foi o primeiro estudo avaliando a cinética de degradação da RIV em suas três principais condições de vulnerabilidade com posterior avaliação do potencial tóxico da RIV após exposição a essas situações de degradação forçada.

RAMISETTI e KUNTAMUKKALA reportaram em 2014, juntamente com um método para análise da RIV por CLAE-UV, a identificação por CLAE-EM e RMN de dois produtos de degradação originadas a partir da degradação alcalina.

No segundo artigo científico desse capítulo está reportada a identificação e caracterização dos três principais produtos de degradação forçada provenientes do anticoagulante RIV, quando exposto aos meios de degradação ácido e alcalino e exposição à radiação UVC, utilizado um CLUE acoplado à EM² como técnica analítica.

7.2. ARTIGO CIENTÍFICO III: Kinetic evaluation of rivaroxaban degradation assessment to *in vitro* toxicity

A ser submetido para publicação no periódico European Journal of Pharmaceutical Sciences

Kinetic evaluation of rivaroxaban degradation process with assessment to *in vitro* toxicity

Nathalie R. Wingert; Marcelo D. Arbo; Gabriela Göethel; Bárbara da Costa; Louise F. Altknecht; Solange C. Garcia; Martin Steppe.

Abstract

Degradation kinetic of oral anticoagulant rivaroxaban (RIV) was assessed in acid and alkaline media and UVC radiation exposure. Among all stress conditions tested, kinetic degradation process was better described by zero-order model. A stability indicating method was validated for the analysis of the anticoagulant rivaroxaban in tablets by high performance liquid chromatography using PDA detection. Robustness was evaluated by the two-level Plackett-Burman experimental design. *In vitro* tests were applied to assess toxic effect of RIV exposed to stress degradation on human hepatoma HepG2 cell line, compared to RIV intact drug. MTT reduction, neutral red uptake, and low molecular weight DNA diffusion assays were employed for cytotoxicity evaluation. Genotoxic potential was assessed by comet assay. A direct relationship between increased amount of alkaline degradation products and higher cytotoxic potential was found. Results obtained by viability assay investigations support the concerns on risks associated with acute toxicity and genotoxicity of pharmaceutical samples containing degradation products as impurities.

Keywords: rivaroxaban, degradation kinetic, *in vitro* toxicity, degradation products.

1. Introduction

Most drugs have their stability affected by conditions they are exposed, such as solvent, pH, temperature, radiation energy, and the presence of catalysts. The harmonization of drug stability tests at a global level has improved the quality control of pharmaceutical products. Moreover, drug regulatory authorities have become more demanding regarding the evaluation of degradation substances and impurities. Currently a developed analytical method can only be totally trusted when comprising the properties of a stability indicating method.

ICH guidelines Q3A and Q3B (2006) classify starting materials and degradations products as organic impurities and establish specific requirements regarding the quantification of those impurities on analytical methods. Accordingly, the capacity of detect and quantify pharmaceutical active ingredients with their impurities or degradants by simple analytical methods have been substantially explored along the last years (Wingert et al., 2011; Alsante et al., 2011; Jahsay et al., 2013)

Safety of a drug formulation is assured not only for the quality of active pharmaceutical ingredients, but also by absence of toxic effect from impurities and/or degradation substances (Jain et al., 2013). Stress testing is one of the first strategies to evaluate drug stability and to predict stability-related troubles (Baertschi and Jansen, 2005). The susceptibility of drug compounds can be observed by forced degradations assays through the kinetic studies and, in some cases, support the identification of degradation products (DPs).

The assessment of biological security drugs containing impurities and degradants can be evaluated regarding residual organic solvents, genotoxicity, and cytotoxicity. The application of in vitro toxicity methods as a toll for prediction of toxic behaviour has increased its scientific significance and importance (Galloway, 2000; Martinez-Hidalgo, 2007; Paim et al. 2013). Cytotoxic effects of chemical substances can be evaluated by diverse and interdependent techniques, such as lactate dehydrogenase (LDH) assay, 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) reduction analysis, sulforhodamine B test, and clonogenic assay (Riss et al., 2004).

Rivaroxaban (RIV) is an anticoagulant molecule responsible for the selective inhibition of factor Xa in the coagulation cascade (Kamata et al., 1998; Piccini et al., 2008). RIV drug formulation is an oral agent for the treatment of deep vein thrombosis

and pulmonary embolism and for extended risk reduction. It should be taken daily, usually for a long time.

The purpose of this work was the development and validation of a stability indicating LC method for the analysis of RIV in pharmaceutical formulation, allowing quick and reliable assessment of stress degradation samples. Kinetic tests were performed on RIV exposed to acid and alkaline media and UVC radiation to assist the understanding of drug degradation process. Cyto- and genotoxic assays were performed exposing human cells to RIV and DPs in solution, aiming the evaluation of toxic potential of RIV stressed solutions.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

RIV standard substance (99.63 %, w/w) was obtained from BOC Sciences (NY, USA) and RIV 10 mg tablets Xarelto® were purchased in local pharmacies (Bayer Schering Pharma AG, Germany). Acetonitrile (ACN) from Tedia (Fairfield, USA) was HPLC-grade. Further reagents consumed over the method validation were analysis grade. Neutral red, 3-(4,5 dimethyl thiazole-2 yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Dubelcco minimal Eagle's medium (DMEM) and phosphate buffer solution were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was from Synth (Diadema, SP, Brazil) and dimethylsulphoxide (DMSO) from Dinâmica (Diadema, SP, Brazil). Water was purified by Milli-Q system from Millipore (Bedford, USA).

2.2. Method validation and kinetic evaluation

ICH Q2(R1) guideline (2005) was adopted as a meaningful directive for HPLC method validation. Method selectivity was assessed by verifying the interference of mobile phase, pharmaceutical excipients, and degradation products on RIV quantification (Ermer and Burgess, 2005). Method linearity was evaluated by the construction of three standard curves. Linear regression and deviation from linearity were assessed by analysis of variance (ANOVA) LoD and LoQ were experimentally assessed after determination of noise value through signal-to-noise approach. Intra-day and inter-day precision were evaluated the analysis of RIV samples prepared independently in three different days. To evaluate method accuracy, placebo mixture

solutions were spiked with RIV standard solution in three concentration levels, percentage of RIV recovered after LC analysis was assessed. Plackett-Burman experimental design was applied to evaluate method robustness. Four factors were modified and studied at two levels. Selected response was RIV sample concentration (relative to label claimed amount). Experimental settings and data evaluation were performed with Minitab® 15 statistical software (Minitab Inc, State College, USA).

Degradation kinetic evaluations were conducted by monitoring reduction rate of RIV amount in solution, on three different stress conditions: stress degradation on acid medium (SDAc), stress degradation on alkaline medium (SDAI), and stress degradation by UV-C radiation (SDUV). It was also assessed the increasing rate of three different degradation products, one in each stress condition.

2.2.1. Chromatographic system and conditions

Agilent 1200® HPLC system equipped with a photodiode array detector (PDA) set at 250 nm was employed along with an Agilent® Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm) separation column. Mobile phase containing acetonitrile (ACN) and 0.10 % formic acid aqueous solution adjusted to pH 4.0 with ammonium hydroxide (37:63, v/v), with a flow rate of 1.0 mL/min at 25 °C presented the best system suitability. Data were processed with Agilent 1100/1200 HPLC ChemStation software.

2.2.2. Standard/sample solutions and degradation conditions

Tablets of RIV were ground to fine powder and solubilized with acetonitrile. Resultant suspension was filtered to remove insoluble excipients. RIV 500 µg/mL stock solution was kept under refrigeration. Same procedure was applied for standard substance stock solution preparation, skipping filtering step. Solutions were diluted to final concentration with mobile phase prior to LC determinations.

SDAc was performed diluting RIV 500 µg/mL stock solution on 1 M HCl (3:1, v/v) at 60 °C up to 48 h. Reaction was stopped with 1 M NaOH at each aliquot removed. Previous studies demonstrated a major liability of RIV to alkaline medium. SDAI was conducted exposing RIV 500 µg/mL stock solution to 0.1 M NaOH (3:1, v/v) up to 60 min at 60 °C, samples were neutralized with 0.1 HCl to stop degradation process. In order to monitor the effect of temperature (60 °C) on SDAc and SDAI experiments, RIV

stock solution was diluted in water (3:1, v/v) and kept with other samples until final analysis.

Kinetic degradation effect of UVC radiation on RIV sample solution was assessed by exposing RIV 250 µg/mL stock solution to UVC radiation in acrylic buckets on a photostability chamber up to 210 min. After each time point, SDUV aliquots were kept away from light until final dilution with mobile phase. A control solution was maintained protected from light inside photostability chamber and analysed at the end of experiment.

2.3. *In vitro* toxicity assays

Applied *in vitro* tests are especially useful to assess experimentally the toxic potential of drug substances. Stress degradation experiments were conducted according the particularities of each degradation profile, so that major DPs were in solution at 50 and 100% of its maximum formation capacity, according to experimental terms, for each stress condition.

In order to raise the required amount of DPs with higher purity, RIV standard substance was dissolved with DMSO to 80 mM. All stock solutions were stored at 4°C and freshly diluted on the day of the experiment. Test sample solutions are specified on Table 7-1 considering stress condition and exposition time. Initial concentration was higher than that used for kinetic evaluation in order to optimize degradation process. Hydrolytic reaction was stopped by neutralization. Final samples for every experiment were previously analysed with HPLC method to confirm RIV concentration and presence of DPs.

Table 7-1. Scheme adopted to degrade RIV samples in different stress conditions before evaluation of *in vitro* toxic potential.

Degradation condition	DP formation (%)	Temperature (°C)	Time (h)
3 M HCl	50	60	12
	100	60	24
0.5 M NaOH	50	60	0.5
	100	60	1.5
UVC radiation	50	25	4
	100	25	8

2.3.1. Cell culture

Human hepatoma HepG2 cells were routinely cultured in 75 cm² flasks using DMEM with high glucose medium, supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic solution. Cells were maintained in a humidified 5% CO₂ – 95% air atmosphere at 37 °C. Medium was changed every 2-3 days. Cultures were passaged by trypsinization (0.25% trypsin/1 mM EDTA) when cells reached 70 - 80% confluence, and were subcultured over a maximum of 10 passages.

2.3.2. Cytotoxicity assay

For cytotoxicity assays, cells were seeded at a density of 50,000 cells/well onto 96-well plates (Nest Biotech CO. Ltd., China) in a volume of 200 µL of complete culture medium, to obtain confluent monolayers within 24 hours. The following day cells were incubated with test drug solutions in cell culture medium. Initially, HepG2 cells were exposed in six replicates from 0.1 to 500 µM RIV at 37°C for 24 hours, in four independent experiments, in order to choose the best concentrations of stressed solutions. Subsequently, RIV intact solutions at 100 and 500 µM, and drug degradation samples with 50 or 100% of its degradation products at a theoretical concentration of 100 and 500 µM regarding amounts of RIV were tested. Working solutions were prepared by diluting the stock solutions DMSO, and these were diluted in cell medium. DMSO concentration in cell culture medium was never higher than 0.6%. To prevent any effect of the DMSO, a solvent control of 0.6% DMSO in culture medium was used in all experiments. Triton X-100 1% was applied as a positive control. All drugs were tested in three independent experiments with each concentration in six replicates within each assay.

2.3.3. MTT Reduction Assay

MTT reduction assay measures cellular dehydrogenases activity, an indicator of metabolically active mitochondria, and therefore of cell viability. After the 24 h incubation period, cells were incubated at 37 °C with PBS containing 0.5 mg/ml MTT. After 2 h incubation, cell culture medium was removed, and formazan crystals produced were dissolved in DMSO. Absorbance was measured at 585 and 600 nm in a multiwell plate reader (SpectraMax M2e, SoftMax® Pro 5, Molecular Devices,

Sunnyvale, CA, USA). Results were presented as a percentage of cell death versus concentration.

2.3.4. Neutral Red Uptake Assay

Neutral red dye (NR) is incorporated through passive transport by cell plasmatic membrane and kept inside lysosomes. Therefore, intact cell can incorporate the dye, while dead or damaged cells cannot. At the end of 24 h incubations of HepG2 cells, medium was replaced by PBS containing 50 µg/ml NR. Cells were incubated at 37°C for 3 h and thereafter, rinsed with PBS and 1% CaCl₂/0.5% formaldehyde solution and lysed with a 50% ethanol/1% glacial acid acetic solution. Absorbance was measured at 540nm in a SpectraMax M2e multiwall plate reader. Percentage of cell death relative to the control was used as cytotoxicity measure.

2.3.5. Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) Formation

Intracellular reactive oxygen and nitrogen species production was monitored by means of the dichloro-dihydrofluorescein diacetate assay as previously reported by Arbo *et al.*, 2014. Cells were seeded as described for cytotoxicity and incubated with RIV intact and after degradation procedure at 100 and 500 µM for 24 h at 37°C. Paraquat (400 µM) was used as positive control. Fluorescence was recorded on a SpectraMax fluorescence microplate reader set to 485nm excitation and 530 nm emission 24 h after incubation. Obtained data were calculated as fold increase over control conditions from four independent experiments with each concentration tested in six replicates within each assay.

2.3.6. Genotoxicity

Cells were seeded in 12-well plates (Nest Biotech Co., Ltd, China) at a density of 200,000 cells/well, and grown to 80 – 90% confluence overnight. After 24 hours, medium was aspirated and cells were incubated with previously described intact and stressed test solutions at 37°C for 24 h. Methyl methanesulfonate (MMS) 100 µM was used as positive control. Alkaline comet assay followed the method described by Tice *et al.* (2000) and was performed according to general comet assay guidelines. This assay is used to determine primary damage to DNA, caused by alkylating, intercalating and oxidant agents, detecting single and double-stranded DNA breaks, alkali-labile

regions, such as apurinic and apyrimidinic sites, oxidative DNA damage, and crosslinks (DNA–DNA, DNA–protein, DNA–drug). Comet assay also detects indirect damage caused by methylation and adducts. Prior to comet assay, wells were rinsed three times with PBS buffer. Next, treated cells were trypsinized and centrifuged (400×g, 5 min, 4°C). Cell pellets were resuspend in low-melting-point agarose (0.75%, 150 µL) and then 60 µL aliquots were placed on two slides coated with 1% normal-melting agarose. Samples were incubated in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris–HCl, distilled water, 10% DMSO and 1% Triton X-100) at 4 °C overnight, followed by unwinding for 20 min in alkaline electrophoresis running buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13). Electrophoresis was performed for 20 min at 25 V (0.9 V/cm) and 300 mA, on ice, using alkaline buffer. Cells were neutralized with 0.4 M Tris–HCl for 15 min protected form light, and stained with ethidium bromide (20 g/mL) before image analysis. DNA migration was observed at 400x magnification using fluorescence microscope (Olympus, Japan) equipped with an excitation filter of 510-550 nm connected to a camera. Images were evaluated by Comet Score™ software, obtained from public domain (http://www.tritekcorp.com/products_cometscore.php). DNA damage was quantified measuring the DNA percentage in the tail (% DNA). Low molecular weight (LMW) DNA diffusion assay is a test able to detect pre-lethal DNA breaks cause by cytotoxic compounds (Vasquez, 2010). Extra slides prepared for comet assay were concurrently applied to LMW assay, without electrophoresis process.

2.3.7. Statistical Analysis – Data analysis

Experiments involving cytotoxicity analysis were performed independently with three repetitions under the same conditions. For statistical evaluation, a one-way analysis of variance (ANOVA) was used. Results were evaluated considering the mean difference regarding control sample. Statistically significant difference was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Method development and validation

Chromatographic system was optimized aiming fast, reproducible, and reliable analytical methodology. A system with simple transposition to LC coupled to mass

spectrometer for further characterization of DPs was one of the concerns on mobile phase development, therefore applying volatile buffers and solutions. Ammonium acetate, formic acid, and acetic acid solutions were tested. Aqueous medium with faster peak elution and higher signal intensity was obtained with 0.1 % formic acid. Different proportions of solvents were tested and best chromatographic system was set to operate isocratically as specified in item 2.3. System suitability parameters were verified and presented mean values of 1.98 for capacity factor, 1.09 of tailing factor, 9994 as number of plates, and 4.3 was the mean retention time for RIV peak. Experimental results demonstrate that tested parameters have a RSD <2.0%, indicating the adequacy of developed method for the intended analyses.

DPs were detected when RIV solution was diluted in acid and alkali media, and exposed to UVC radiation. RIV initial concentration was not changed and no degradant was detected when sample was exposed to high temperature only, according experimental conditions. Method specificity was evaluated by software peak purity tool. Results showed peak purity index higher than 0.999 for all conditions tested, demonstrating the absence of coeluting substances along with RIV peak. No interferences were also detected when the analysis of placebo mixture was preceded. Method linearity was assessed in six levels (1.0; 5.0; 10; 20; 40; and 60.0 µg/mL). ANOVA demonstrated that obtained values correspond to a linear regression ($F_{\text{calc}} 2470787 > F_{\text{tab}} 2.61, \alpha=0.05$) with no deviation from linearity ($F_{\text{calc}} 2.41 < F_{\text{critical}} 2.84, \alpha=0.05$). Relative standard deviation (RSD) and relative error were significantly small, as expected for a reliable analytical method. All results related to LC method validation are exposed at Table 7-2. All results were within the acceptable conditions for a reliable analytical method.

Robustness of the method was evaluated by an experimental design analysis with four factors in two level and a central point (optimal). Formic acid concentration (0.08 and 0.12 %), pH (3.8 and 4.2), organic proportion on mobile phase (35 and 39 %), and flow rate (0.8 and 1.2 mL/min) were the analytical factors selected. Plackett-Burman experimental design allowed the screening of modified factors and their interactions along 13 experiments in triplicate. Analysis sequence was randomized, reducing introduction of bias in the experiment. Pareto chart of effect (Figure 7-1) and t-test statistical evaluation (Table 7-3) demonstrate that none of alterations promoted a meaningful effect on RIV quantification ($\alpha = 0.05$).

Table 7-2. HPLC method validation parameters for analysis of RIV.

Parameters	Factors	Results
Linearity	regression curve	$y = 60.32x - 2.73$
	R^2	0.99998
Limit of detection	RVX (ng/mL)	10.0
Limit of quantification	RVX (ng/mL)	35.0
Intra-day precision (n=6)	Average content ($\mu\text{g/mL}$)	102.18
	RSD (%)	0.57
Inter-day precision (n=18)	RSD (%)	0.62
	Low level	0.08
Accuracy relative error (%)	Mid level	0.20
	High level	0.36

System suitability parameters, retention time (T_r), capacity factor (k'), tailing factor (USP_t) and efficiency (N) were also monitored during the designed experiment (Table 7-4). All the collected results were within the observed chromatographic pattern.

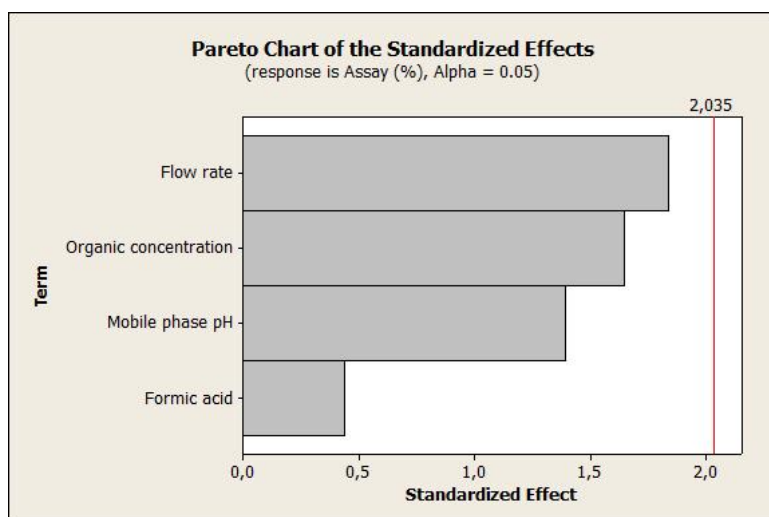


Figure 7-1. Pareto chart of effects for RIV concentration assay with Plackett-Burman design for robustness evaluation.

Table 7-3. Resulting effects of Plackett-Burman experimental design.

Factor	Effect	T _{critical}
Flow rate	-0.133	1.84
Organic phase	0.199	1.65
pH	0.100	1.39
Formic acid	0.032	0.44

Table 7-4. Average results for performance parameters along robustness evaluation

Parameter	Average results
Retention time	3.2 < Tr < 6.4
Tailing factor	USP _t < 1.4
Retention factor	1.6 < k' < 2.4
Efficiency	N > 4200

3.2. Stress degradation kinetic

Results of kinetic assays were calculated according reduction in drug concentration along time (Figure 7-2). Through the evaluation of determination coefficients, it could be concluded that, for all stress conditions studied, RIV degradation behavior was better described by a zero-order kinetic model, represented by the equation $C = C_0 - kt$. Values related to determination coefficient (R^2), apparent degradation rate (k), and t_{90} (time were 90 % of the drug initial concentration remains intact) are presented in Table 7-5. Kinetic curves resulting from RIV degradation studies (SDAc, SDAI, and SDUV) are plotted in Figure 7-2, and chromatograms from degradation analysis exposed in Figure 7-3. SDAc and SDAI tests included high temperature as an additional stress condition, to keep track whether the degradation behavior was due acid and alkali conditions and not temperature, RIV sample in ACN was diluted in water and maintained in stove until final kinetic assay. RIV had no signs of degradation. Information provided by degradation kinetic evaluation can supply an initial understanding for the study of RIV degradation pathway under instable conditions.

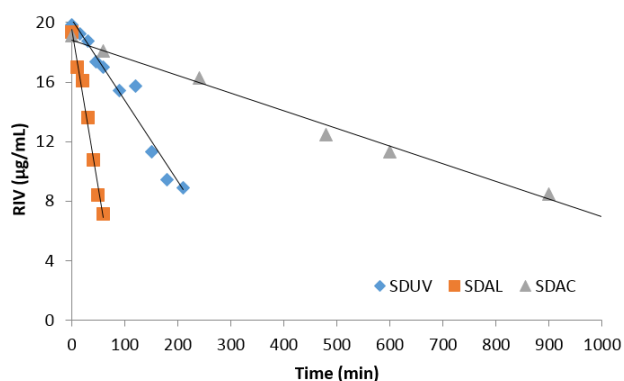


Figure 7-2. Degradation curves from kinetic study of RIV degradation.

Table 7-5. Zero order kinetic values found for RIV degradation studies.

	R ²	k	t ₉₀ (min)
SDAc	0.9828	- 0.0109	138.83
SDAI	0.9794	- 0.2004	9.16
SDUV	0.9598	- 0.0543	36.50

Regarding DPs raised over stress degradation process, every assay had the emergence of one major peak (Figure 7-4), named DPAc (from SDAc), DPAl (from SDAI), and DPUV (from SDUV). The increasing rate on DPs formation was also followed throughout experiments. DPAc formation follows the acid concentration in solution. On experimental conditions (1 M HCl, up to 42 h), RIV degradation and formation of DPAc took place until RIV reduction to approximately 70 % (24 h sample time point), from there to next 24 h, none difference regarding increasing on DPAc or reduction on RIV concentration was noticed. However, in other conditions studied (data not shown), whenever RIV solution was exposed to HCl with increased molarity (e.g.: 3 M HCl), degradation kinetic followed a linear kinetic profile, as well as DPAc formation, until complete consumption of drug product. Those finding evidence the reagent dependent behaviour of this reaction. DPUV had a restrained formation compared to others, its rising kinetic followed a logarithmic profile ($r^2=0.9682$), whereas RIV degradation kinetic was linear. Those characteristics associated with multiple peaks detected through SDUV assay demonstrate that exposure of RIV to intense radiation leads to formation of one main DP and approximately four minor DPs. Nevertheless, exposition of RIV to alkaline media presented linear kinetic for both drug degradation and DPAl formation. Besides main DP, DPAl is also quite stable and could be detected with increased concentrations until RIV complete consumption (or below LoD concentration).

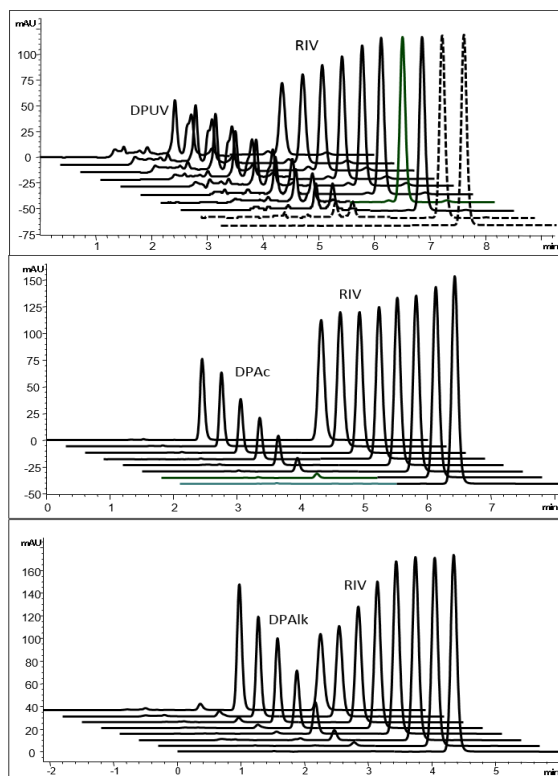


Figure 7-3. RIV chromatograms from degradation kinetic studies in UVC radiation, acid medium, and alkaline medium (from top to bottom).

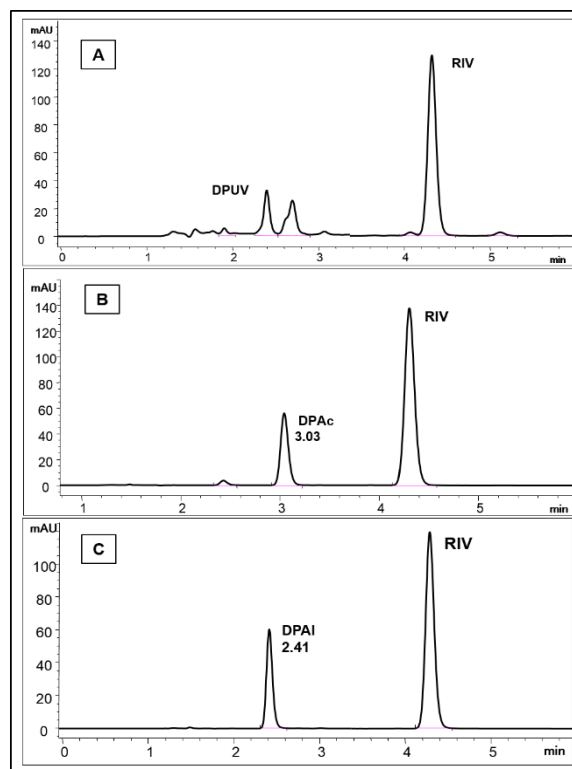


Figure 7-4. RIV under degradation stress conditions. A: UVC radiation 90 min, RIV 22% degraded; B: 1 M HCl medium 300 min, RIV 28% degraded; C: 0.1 M NaOH medium 30 min, RIV 25% degraded.

3.3. *In vitro* toxicity assays

Oral anticoagulant RIV has a posology of daily administration in generally debilitated patients. Therefore, the assessment of *in vitro* toxic potential of RIV intact substance and in presence of its main DPs has great relevance to a safe treatment.

Cytotoxicity assay was performed to evaluate whether RIV stressed samples (containing DPs) would reduce or increase toxic potential of RIV intact sample in solution. Viability test MTT reduction and NR uptake, along with LMW DNA diffusion assays were chosen to conduce cytotoxicity assessment. RIV test samples were also subjected to evaluation of ROS formation. Genotoxicity tests was performed by comet assay.

In order to set the toxic concentration of RIV intact solution, screening tests with drug concentrations from 0.1 to 500 μM were performed. As exposed on Figure 7-5A,

RIV promoted a relevant reduction on HepG2 cell in concentrations at 100 and 500 μM for MTT reduction test, but only at 500 μM concentration for NR uptake test (Figure 7-5B). Accordingly, the following tests were performed with RIV stressed solution in theoretical concentrations of 100 and 500 μM intending the evaluation of possible variations on toxic potential after formation of DPs.

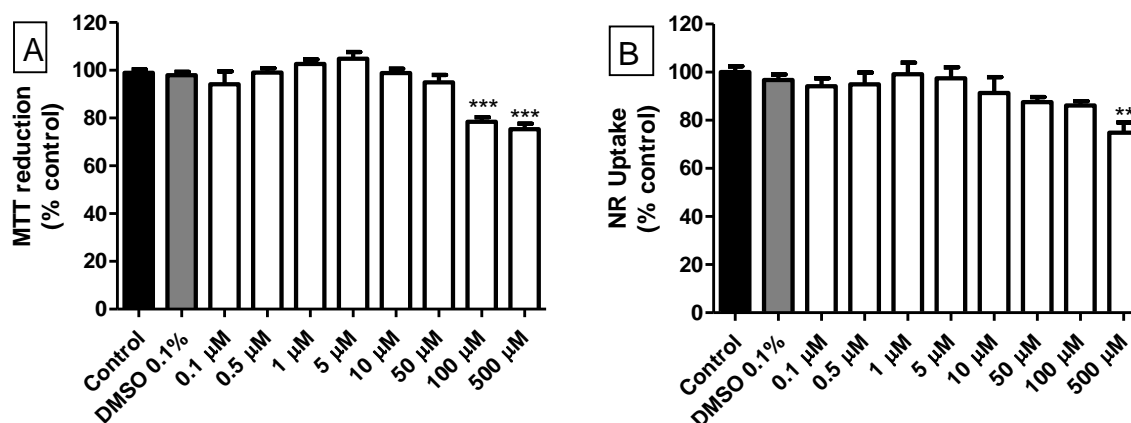


Figure 7-5. Cell viability assays of RIV (0.1- 500 μM) in vitro cytotoxicity by A: MTT reduction and B: NR uptake assays in HepG2 cells at 24 h exposure time. Control represent cells without treatment and solvent control was assessed with 0.1 % DMSO solution (n=4; * = $p > 0.05$; ** = 0.01; * = 0.001).**

Under experimental conditions used in our study, DSAI solution at 50% and 100% degradation state significantly induced cell death for both concentrations (100 and 500 μM) at MTT reduction assay. Although on NR uptake assay this situation was only detected at 500 μM , DSAIk presented a reproducible cytotoxic behavior after 24 h treatment of HepG2 cells. (Figure 7-5A and 7-5B). Difference between DSAI at 50% and 100% was not significant ($p < 0.05$). These findings indicate the toxic potential of RIV after exposure to alkaline medium.

MTT reduction assay demonstrated that RIV 100 μM intact solution has a harmful potential to cellular mitochondrial activity (Figure 7-5A). Since DSUV and DSAC solutions at 100 μM resulted in a less toxic environment for HepG2 cells, it is possible to assert that RIV degradation reduced the cytotoxic potential, and DPs present in both solution were not in toxic levels. Yet, NR uptake assay could not detect such behavior regarding overall RIV intact and stressed solutions at 100 μM . Nevertheless, a certain level of inconsistency is quite common between viability tests (Kim et al., 2009; Pohjala et al., 2007; Arbo et al., 2014).

Both MTT reduction and NR uptake assays reveal potential cytotoxicity of RIV at 500 μM as intact compound or in presence of DPs (except for DSUV 50%). It is possible to conclude that, although RIV concentration was reduced over stress degradations, the arising of DPs kept the cytotoxic potential and, in some cases, even increased this response after 24 h incubation with HepG2 cells. As regards ROS test, there was no significant induction to formation of reactive oxygen species due to exposition to RIV intact or within DPs when compared to control (Figure 7-6C).

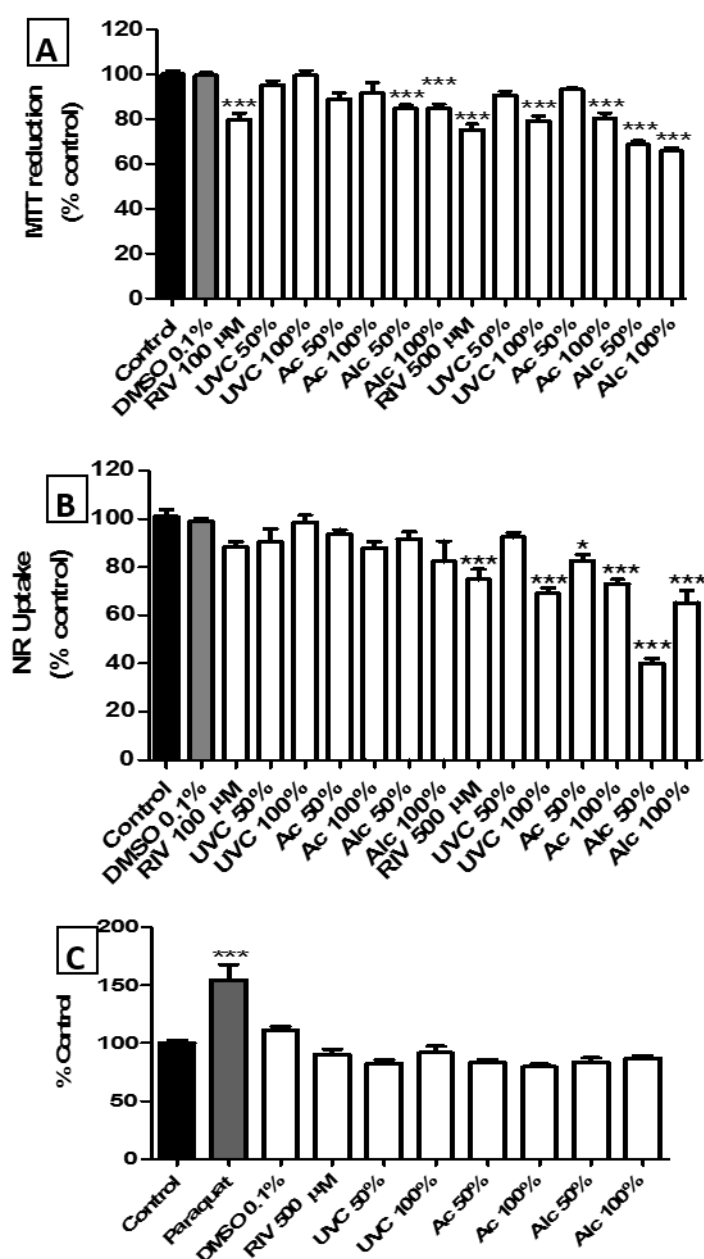


Figure 7-6. The effects of RIV alone and in the presence of its stress degradation products after A: MTT reduction assay; B: NR uptake assay; C: ROS formation treatment of HepG2 cells at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24h (n=3; * = $p > 0.05$; ** = 0.01; *** = 0.001).

Alkaline lysis and electrophoresis are the last procedures on comet assay. Images obtained did not reveal DNA damage caused by RIV intact or stressed samples solution compared to control positive ($p > 0.05$) as presented on Figure 7-7. Once LMW assay detects DNA damages at early stages of cell injury prior to cell death, it is proposed as an alternative to histopathology evaluation (Vasquez, 2010; Vasquez, 2012). LMW assay can assist the verification whether comet assay responses are only affected by genotoxicity, once DNA fragmentation can lead to formation of cytotoxic compounds who may interfere on comet assay as false positive/negative results (Vasquez, 2010). LMW assay pointed toxic effect to cellular DNA only for UVC 100 % degradation solution, reaching levels superior to MMS 10 control treatment (Figure 7-7).

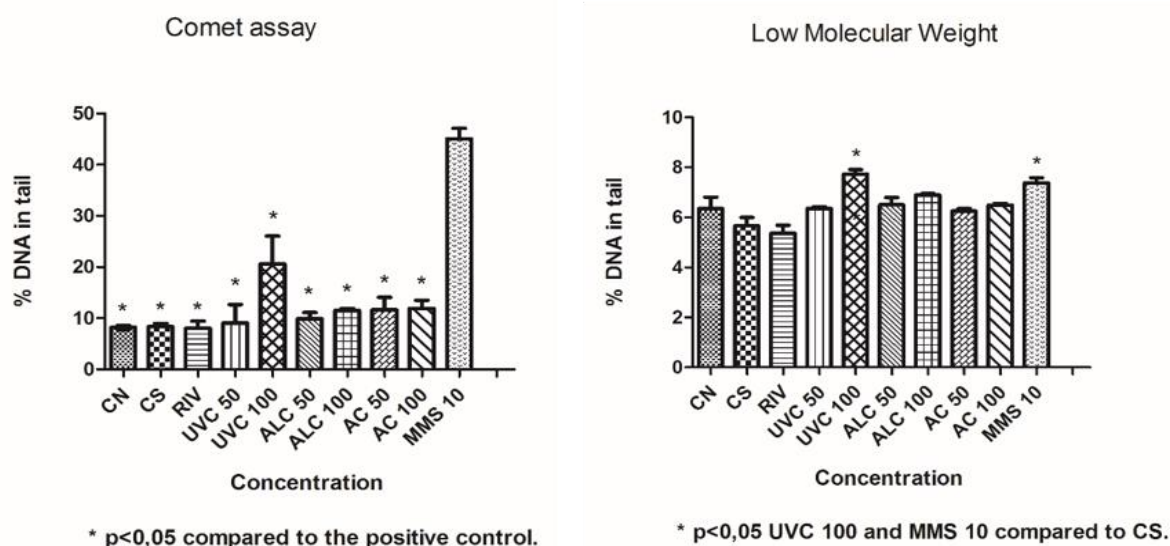


Figure 7-7. Genotoxicity assessment of RIV sample solutions of rivaroxaban 100 μ M (RIV); and after exposition to stress conditions (considering the formation of main degradation products, for each case). UVC light at 50 % (DSUV 50) and 100 % (DSUV 100) degradation product formation; alkaline hydrolysis at 50 % (DSAlk 50) and 100 % (DSAlk 100) degradation product formation; and exposure to acid media after at 50 % (DSAc 50) and 100 % (DSAc 100) degradation product formation. CN: control negative; CS: control solvent. (n=3; *: $p > 0.05$)

4. Conclusion

A simple, reliable, precise and fast analytical method was developed and validated for the analysis of RIV in tablets by HPLC according to the official guides using Plackett-Burman design robustness assessment. It is a suitable stability

indicating method for routine quality control of the pharmaceutical formulation. Study of RIV degradation kinetic in three different conditions resulted in degradation profiles fitted to zero-order model. Such information can help the elucidation of drug behavior under stressful conditions, as well as the factors involving formation of DPs. MTT reduction and NR uptake assays showed evidences of significant cytotoxic potential to HepG2 cells from RIV under alkaline stress conditions, where in presence of its main DP. Moreover, we demonstrated for the first time the cytotoxic potential of RIV alkaline degradation product. Comet assay revealed the absence of DNA damage after samples were treated with RIV alone or in presence of its DPs. However, LMW assay detected cytotoxicity from SDUV solution at 100% condition. Pharmaceutical drugs and specially those administered more often need a strict control of its safety, thus the performed study may be a tool to monitor potential toxic behavior of RIV unstable samples. The assessment of cytotoxic potential of stressed drug solutions is an initial step to evaluate possible biological harm caused by degraded samples.

Acknowledgement

Authors would like to thank LCQFar and LaTox – UFRGS and financial support from CAPES/Brazil.

References

Alsante, K.M., Baertschi, S.W., Coutant, A., Marquez, B.L., Sharp, T.R., Zelesky, T.C., 2011. Separation Science and Technology: Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates, in: Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, S. Ahuja, S. Scypinski. Academic Press, 2^o ed. 59-169.

Arbo, M.D., Silva, R., Barbosa, D.J., Dias da Silva, D., Rossato, L.G., Bastos, M.L., Carmo, H., 2014. Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast h9c2 cells through mitochondrial impairment. *Toxicol. Lett.* 229, 178-189.

Bernauer, U., Oberemm, A., Madle, S., Gundert-Remy, U., 2006. The use of in vitro data in risk assessment. *Basic clin. Pharmacol.* 96, 176-181.

Ermer, J., Burgess, C., 2005. Method validation in pharmaceutical analysis. A guide to best practice, J. Ermer and J.H.McB. Miller, Wiley-Vch Verlag & Co., Weinheim 101-119.

Baertschi, S.W., Jansen, P.J., 2005. in: Pharmaceutical Stress Testing. Baertschi, S.W. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. 13-60.

Galloway, S.M., 2000. Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in aberration assay. Environ. Mol. Mutagen. 35, 191-201.

ICH. Impurities in new drug substances Q3A (R2), 2006. International Conference on Harmonization. Geneva, Switzerland.

ICH. Impurities in new drug products: methodology Q3B (R2), 2006. International Congerence on Harmonizagion. Geneva, Switzerland.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), 2005. International Conference on Harmonization. Geneva, Switzerland.

Jain, D., Basniwal, P.K., 2013. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives, J. Pharmaceut. Biomed. 86, 11-35.

Kahsay, G., Adegoke, A.O., Schepdael, A.V., Adams, E., 2013. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of griseofulvin and impurities. J. Pharmaceut. Biomed. 80, 9-17.

Kamata, K., Kawamoto, H., Honma, T., Iwama, T., Kim, S.H., 1998. Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. P. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 6630-6635.

Kim, H; Toon, SC; Lee, TY; Jeong, D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. Toxicol. Lett., 184, 13-17, 2009.

Martinez-Hidalgo, M.P.V., 2007. Alternativas a la experimentación animal em toxicologia: situación actual. Acta Bioeth. 13, 41-52.

Paim, C.S., Nogueira, D.R., Mitjans, M., Lopez, D.R., Perez, J.L., Steppe, M., Schapoval, E.E.S., Vinardell, M.P., 2013. Biological safety studies of gemifloxacin mesylate and related substances. Photoch. Photobio. Sci. 12, 805-812.

Piccini, J.P., Pattel, M.R., Mahaffey, K.W., Fox, K.A., Califf, R.M., 2008. Rivaroxaban, an oral direct factor Xa inhibitor. Expert Opin. Inv. Drus. 17, 925-937.

Pohjala, L; Tammela, P; Samata, SW; Yli-Kauhaluoma, J; Vuorela, P. Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell clines and cytotoxicity assays. Anal. Biochem. 362, 221-228, 2007.

Riss, T.L., Moravec, R.A., 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev. Techn.* 2, 51–62.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.

Vasquez, M.Z. 2010. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis* 25, 187-199.

Vasquez, M.Z., 2012. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. *Mutat. Res.* 747, 142–156.

Wingert, N.R., Barth, A.B., Gomes, P., Shapoval, E.E.S., Steppe, M., 2011. Quantitative analysis of duloxetine and 1-naphthol by capillary micellar electrokinetic chromatography. *Curr. Anal. Chem.* 7, 184-193.

7.2. ARTIGO CIENTÍFICO IV: Characterization of three main degradation products from novel oral anticoagulant rivaroxaban under stress conditions by UPLC-QTOF-MS/MS

Submetido para publicação no periódico Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

**CHARACTERIZATION OF THREE MAIN DEGRADATION PRODUCTS FROM
NOVEL ORAL ANTICOAGULANT RIVAROXABAN UNDER STRESS CONDITIONS
BY UPLC-Q-TOF-MS/MS**

N.R. Wingert, M.A.G. Nunes, N.O. dos Santos, P. Gomes, E.I. Müller, E.M.M. Flores,
M. Steppe

Abstract

Evaluation of synthesis and degradation impurities is substantial to guarantee drug safety and successful pharmaceutical therapy. New oral anticoagulant rivaroxaban (RIV) presents no scientific studies regarding its degradation behavior and characterization of degradation products (DPs). Therefore, the present work evaluated and characterized the main DPs formed after drug exposition to stress conditions: 1.0 M HCl, 0.1 M NaOH, and UVC radiation. Samples under acid and alkaline hydrolysis were placed inside laboratory stove and microwave oven, in order to evaluate effect of microwave radiation on stressed samples. Analyses were performed in UPLC coupled to quadrupole time-of-flight MS. ESI was applied in positive mode, and C18 Agilent® column (2.1x50 mm, 1.8 µm) used for separation of compounds. RIV molecular ion $[M+H]^+$ (m/z 436.07) was fragmented under 20 kV, best energetic condition to obtain clear and reproducible fragmentation pattern, assisting identification of RIV DPs. With support from UPLC separation and specific detection by MS, three main degradation products (DP-1, DP-2, and DP-3) formed under stress conditions were successfully characterized. Presented study agrees with requirements for analytical assessment of impurities in pharmaceutical formulations, ensuring quality of pharmaceutical substances.

Keywords: degradation products, chemical characterization, rivaroxaban, UPLC-MS/MS.

1 Introduction

Rivaroxaban (RIV) is a once-daily oral anticoagulant approved for prophylaxis of venous thromboembolism and pulmonary embolism after hip or knee replacement surgery [1]. RIV acts in coagulation intrinsic and extrinsic pathways by inhibiting factor Xa (FXa) action [2, 3]. FXa inhibition has great influence since it is the first site responsible for amplify thrombin generation, whereas one molecule of FXa inactivated can disable formation of one thousand thrombin molecules [4, 5].

RIV analysis by liquid-chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) has been described in scientific papers with different aims. Pharmacokinetic evaluation of RIV was performed at LC-MS with blood plasma from animals [6] and humans [7, 8]. Additionally, another paper described the development and validation of an analytical method for analysis of RIV in biological matrices by LC-MS [9]. RIV and other novel cardiac drugs were detected and quantified in human urine by ultra-high performance liquid chromatography coupled to multiple ionization mass spectrometry (UPLC-MS/MS) using multiple reaction monitoring (MRM) in quantification process [10]. In vitro metabolites of RIV were identified and characterized after LC-MS analyses [11]. Ramisetti, N. *et al.* have presented two RIV degradation products with unrelated chemical structures, none of them formed under photolysis conditions, and emphasizing method validation for RIV and process related impurity [12]. Nevertheless, critical analysis of RIV degradation pathway and a broader presentation of characterization process of it degradation products remains prominent.

A few years ago, identification of degradation products (DPs) coming from pharmaceutical compounds was mostly performed by tiring and time consuming process of separation and isolation of interest substances by chromatographic techniques, such as preparative thin layer chromatography and preparative column, followed by purification processes, and just then analysed with spectroscopic methods. With development of more sensitive and precise mass analysers and improvement of LC-MS techniques, isolation and fraction collection steps could be eliminated from DPs characterization process [13].

Analytical methods developed in LC-MS for identification and characterization of DPs from pharmaceutical drugs usually make use of atmospheric pressure ionization, especially electrospray ionization (ESI), to nebulize samples and ionize molecules in analysis [14]. Although numerous methods have been developed with ion

trap as mass analyser [15-17], quadrupole time-of-flight (Q-ToF) is the most used tool to analyse mass fragments from DPs [18-21] mainly due to its high resolution and accuracy in weight measurements, with mass error minor than 1 ppm [22].

The aim of present study was to identify and characterize degradation products (DPs) of anticoagulant RIV formed under stress conditions: acid and alkaline mediums and UVC radiation exposition. Chromatographic separation of RIV and DPs were performed in a UPLC using high resolution column coupled to mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) source. DPs were analysed through multistage mass spectrometer (MS/MS) and their structures elucidated considering characteristics of degradation conditions, fragmentation profile of RIV, and data from scientific literature.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Samples of Xarelto® - RIV 10 mg in tablets (Bayer Schering Pharma AG, Leverkusen, Germany) were purchased in local market and standard substance was acquired from BOC Science (NY, USA). Acetonitrile (ACN) and 96 % formic acid HPLC-grade from Tedia (Ohio, USA), ammonium hydroxide ACS grade by MP Biomedicals (Ohio, USA), and Milli-Q water from Millipore (Bedford, MA, USA) were the reagents used over analytical procedures.

2.2 Chromatographic and mass spectrometric equipment and conditions

Chromatographic analyses were conducted in an ACQUITY™ UPLC system from Waters Corp. (Milford, MA, USA). Oven temperature was set to 30 °C and separation performed in a Zorbax Eclipse Plus C18 rapid resolution HD Agilent® (Santa Clara, CA, USA) column (2.1x50 mm, 1.8 µm). Injection volume was 1.4 µL and auto-sampler temperature maintained at 20 °C. Binary solvent pump operated isocratically the mobile phase proportion of solvent A:solvent B (63:37, v/v), water adjusted to pH 4.0 with ammonium hydroxide as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. Both solutions containing 0.1 % formic acid, at flow rate of 0.2 mL/min. UPLC-MS conditions had been previously settled and the analytical method fully validated according ICH recommendations [23].

UPLC system was coupled to Q-ToF Xevo G2 mass spectrometer, equipped with an electrospray ionization source (ESI). ESI-MS/MS detection was performed in

positive ion mode with capillary voltage of 3.00 KV, cone voltage of 40 V, and extractor of 3.30 V. Desolvation gas and cone gas flow rate were 300 L/h and 100 L/h, respectively. Desolvation temperature was set to 250 °C and source temperature to 100 °C. Mass spectra was acquired from 50 to 1000 Da. System control and data acquisition were performed using MassLynx V 4.1 software. Mass instrument was calibrated in order to enhance accuracy and precision of mass values.

2.3 Solutions

RIV standard substance and pharmaceutical grounded tablets were dissolved in ACN in order to obtain working solutions. Grounded tablets after mixed with ACN had to be filtrated with analytical filters for separation of insoluble excipients. Stock solutions were maintained in concentration of 500 µg/mL.

Blank solutions were prepared with in-house blend of all tablet excipients specified by manufacturer, according scheme mentioned above.

2.4 Stress degradation assays

In order to induce degradation of RIV and produce DPs for following characterization by UPLC-MS/MS, both RIV standard and grounded tablets were exposed to stress conditions. Time exposition to degradation conditions and molarity of acid and alkaline mediums were previously determined by our research group, through study of RIV degradation kinetics in HPLC. In order to improve chromatographic resolution and MS signal intensity, samples had a final dilution with mobile phase. RIV control samples were included within degradation samples. Stress physical-chemical media adopted for assays are set out below:

2.4.1 Acid and alkaline medium

RIV working solutions of 500 µg/mL were diluted with 1.0 M HCl (3:1, v/v) and kept in a stove at 60 °C to accelerate degradation process. After 6 to 24 hours, 1.0 M NaOH was added to sample solution to stop degradation reactions.

As well as in acid degradation, RIV working solutions were diluted with 0.1 M NaOH (3:1, v/v) and kept in a stove set to 60 °C. Alkali hydrolysis was usually performed between 1 to 6 hours, depending on percentage of RIV degradation intended. Hydrolytic process was stopped by neutralizing solution with 0.1 M HCl.

RIV degradation behavior was also evaluated by microwave assisted hydrolysis. RIV samples were diluted with 1.0 M HCl and 0.1 M NaOH (according scheme above), and exposed to microwave radiation within quartz vessels in an Anton Paar Multiwave™ 3000 system, with a pre-established temperature of 60 °C. Samples were exposed to stress conditions for 60 minutes with 4 min heating ramp, cooling for 10 min and pressure kept in 12 bar.

Exposition of samples in stress medium to higher temperature were just intended to accelerate degradation process.

2.4.2 UVC radiation

RIV samples of 250 µg/mL were stored in transparent acrylic cells and sealed to avoid ACN evaporation. Exposition to UVC radiation (254 nm) was performed in a photodegradation chamber between 2 and 5 hours.

2.5 Ions suppression

Effect of ion suppression by excipients was evaluated by spiking RIV standard stock solution in blank solutions. RIV MS peak intensity was measured and compared with standard solution with same concentration.

2.6 Characterization of degradation products

Firstly, chromatographic method was optimized assuring reproducibility of analysis, specificity of RIV detection, and resolution of DPs. Once characteristic fragment ions can lead or indicate DPs and degradation pathways, MS peak $[M+H]^+$ corresponding to RIV was selected and fragmented under different collision energy, in order to identify RIV fragmentation pattern.

After achievement of well-developed chromatographic and spectra data for all degradation conditions, detected DPs were studied regarding degradants formed, detected MS peaks, and MS/MS spectra obtained from most abundant molecular ion peaks. In order to characterize and suggest identity of main DPs, usual reactions and rearrangements properties for each functional grouping in drug molecule were considered, along with data from scientific literature.

3 Result and discussion

3.1 Method optimization

Along method optimization, different variables, such as organic solvent, aqueous buffer, flow, and cone voltage, were observed and tested in order to obtain better analysis results.

ACN as organic solvent and 0.1 % formic acid as aqueous phase are quite usual in MS analysis, differential condition found to RIV analysis was addition of ammonium hydroxide until solution reaches pH 4.0, which demonstrated an improvement in peak resolution and intensity of RIV and its degradation products. Concentration of 20 µg/mL was chosen for analysis of RIV and stress samples (theoretical). Considering the reduced injection volume and dilution under mobile phase, actual RIV concentration to reach MS detector was approximately 100 times lower.

Although RIV molecule is difficult to ionize in water, when exposed to ESI ionization, RIV was ionized and detected in both positive and negative modes, characteristic behaviour of pharmaceutical compounds like sulfonamides, penicillins, corticosteroids, and others [24]. Positive mode was chosen due to its higher sensitivity regarding ionization of pharmaceutical drugs, typically weak bases. No ionization suppression (or enhancement) was found in experimental conditions.

RIV exact molecular weight is 435.0646, and in order to assess mass accuracy, relative error (ppm) and absolute error (milli mass unit – mmu) calculations [25] were applied after mass instrument calibration, using RIV theoretical and measured mass to apply mass error calculation. Found results were -1.83 ppm and -0.8 mmu, values that according to researched scientific literature demonstrate accuracy of mass data [22].

3.2 RIV analysis and fragmentation pattern

RIV positive ion generated a MS chromatogram peak in 1.90 min (Figure 7-8A), correspondent to MS peak, $[M+H]^+$, m/z 436.07 which was followed by characteristic $m/z+1$ and $m/z+2$ peaks from neutral isotopic abundance from atoms, e.g. carbon - ^{12}C , ^{13}C ; oxygen - ^{16}O , ^{17}O ; hydrogen - 1H , 2H . Precursor ion m/z 436.07 when fragmented with 20 eV produced following characteristic product ions: m/z 392, m/z 318, m/z 231, and m/z 145 (Figure 7-8B). Last product ion refers to chlorothiophene carbonyl ion, which presents high abundance and stability, and has been applied to quantify RIV in human plasma through selective reaction monitoring (SRM) [9, 10].

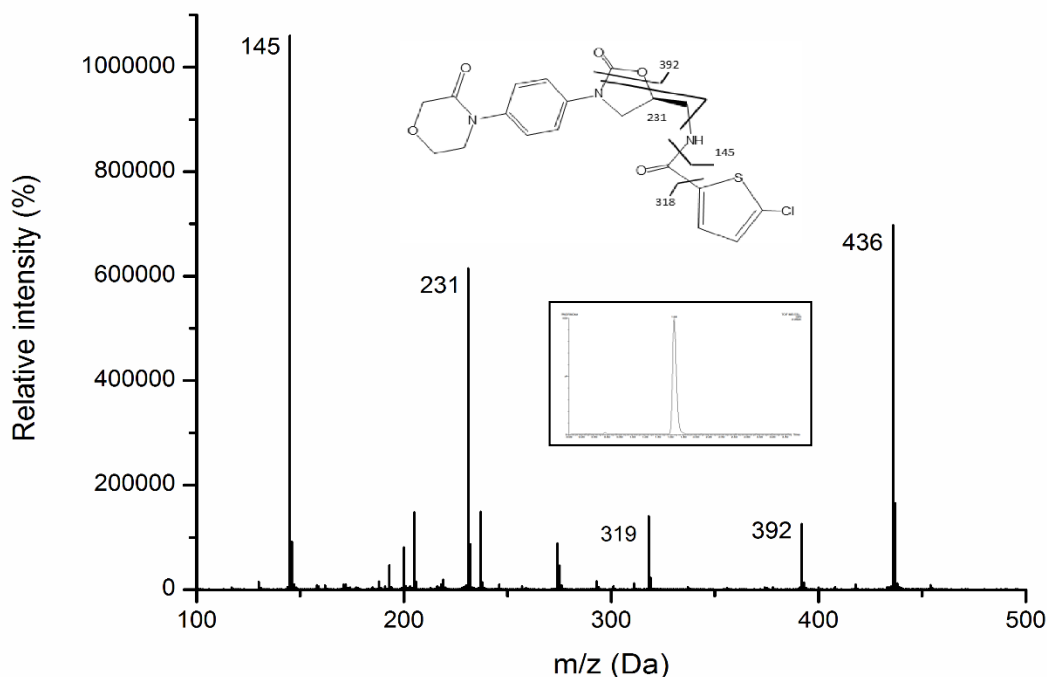


Figure 7-8. Representative total ion chromatogram of RIV standard substance (within m/z peaks). MS/MS fragmentation pattern of RIV molecular ion, m/z 436. Analyses were performed at a UPLC system coupled to Q-ToF mass spectrometer, ESI in positive mode with applied voltage of 20 eV for ion fragmentation. Capillary, cone, and extractor voltage of 3.0 KV, 40.0 V, and 3.3 V, respectively. Desolvation gas and cone gas flow rate were 300 L/h and 100 L/h, respectively. Desolvation temperature was set to 250 °C and source temperature to 100 °C

3.3 Stress degradation assays

3.3.1 Acid medium

RIV molecule is reasonably stable when exposed to low pH aqueous mediums. Nevertheless, RIV concentration is reduced once added to high concentration chloridric acid (1 and 2 M) for a long time. Over degradation process of RIV, a single prominent peak (Figure 7-9A), with maximum UV absorption at 262 nm, eluted first than RIV (1.43 min). Same peak had already been detected in other stability tests and kinetic studies in acid medium (data not shown) and therefore came to be called DP1. MS spectra presented molecular ion peak at m/z 454.

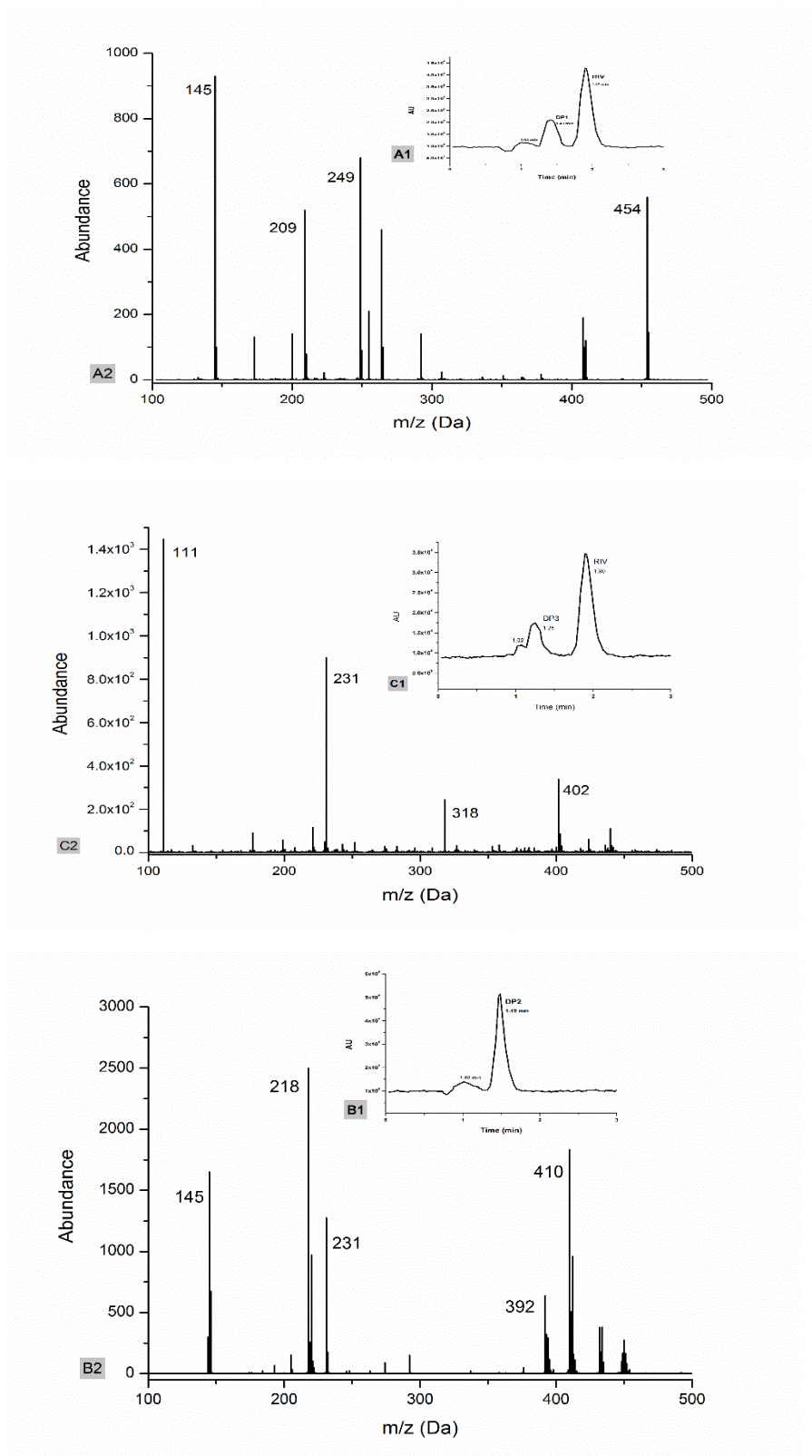


Figure 7-9. Total ion chromatograms and MS² spectra scans relative to RIV stressed pharmaceutical samples. A1: TIC of RIV exposed to 1 M HCl, 60 °C for 10 h, A2: MS² from DP1 molecular ion *m/z* 454. B1: TIC of RIV after 4 h exposition to 0.1 M NaOH, 60 °C, B2: MS² from DP2 molecular ion *m/z* 410. C1: TIC of RIV under UVC radiation exposition for 3 h, C2: MS² from DP3 molecular ion *m/z* 402.

3.3.2 Alkaline medium

Throughout stress and stability studies, drug molecule demonstrated higher liability under alkaline conditions. RIV degradation was detected when mixed with sodium hydroxide even at room temperature. After elapsed four hours of experiment (at 60 °C), RIV molecule peak was no longer detected on MS chromatogram, only a major peak at 1.45 min, named DP2 (figure 7-9B), with maximum UV absorbance at 258 nm and presenting a m/z of 410.

3.3.3 UVC radiation

Effect of UVC radiation on RIV molecule was evaluated by exposing dissolved drug stored in transparent acrylic buckets to UVC light. In order to assess whether RIV diluted in water was more susceptible to degradation (hydrolysis) than drug in organic medium, RIV working solution was diluted with pure water and exposed to test conditions as well. No difference was observed between degradation profiles of RIV in different dilution media. After 3 h of exposition to UVC radiation RIV molecule was still detected, but in lower concentration. Resultant chromatograms presented a prominent peak at 1.26 min (DP3). Whenever working with commercial sample, another peak was detected at 1.03 min (Figure 7-9C). MS spectra analysis of DP3 pointed m/z 402 as ion mass.

3.4 Characterization of degradation products

MS spectra of DPs detected in stressed samples were fragmented by multistage mass spectrometry (MS^2 or MS/MS) at 20 and 25 eV. According to mass error and absolute error evaluation (Table 7-6), all detected and analysed DPs had an accurate measurement ($ppm < 10$). DPs chemical structures and fragmentation patterns are presented within scheme in figure 3.

Blank samples received same stressful treatment as RIV samples in order to assess if any excipient was being detected along with DPs. MS chromatograms and MS spectra acquired from commercial tablet samples were compared with those from blank samples. Another chromatographic peak was detected at 1.02 min on blank and sample solutions. MS analyses indicated two main m/z values, 252 and 230, since

those are the most representative m/z found in blank MS analysis, they are assigned as pharmaceutical excipients.

Table 7-6. Profile from RIV degradation products obtained under stress conditions.

Stress Condition	DP	Retention Time (min)	Measured Mass (m/z)	Monoisotopic Mass ^a (m/z)	Mass Error (ppm)	Absolute error (mmu)	MS ² fragment ions (m/z)	Molecular difference
Acid medium	DP1	1.43	454.07	454.08	-9.69	-4.80	249; 209; 145	+H ₂ O
Alkaline medium	DP2	1.45	410.09	410.09	7,32	3.00	392; 231; 145	- CO ₂ (+H ₂ O)
UVC radiation	DP3	1.26	402.10	402.11	-6,96	-2.80	318; 231; 111	Cl↔H

a. Values relative to molecular ion [M+H]⁺.

3.4.1 Acid medium

Major degradation peak of RIV in acidified solution, DP1, presented m/z value superior to RIV molecular ion (m/z 436 < m/z 454), with mass gain of 18 Da (Figure 7-10, AC-V) and could be explained by formation of water adducts. However, no other H₂O addition was detected in any RIV standard or sample analysis or whenever drug was exposed to UVC radiation in aqueous media. Hence, addition of 18 Da is justified through hydrolysis followed by hydration of a susceptible bond in RIV molecule. Hydrolysis at morpholinone moiety along with bonding of OH⁻/H⁺ is consistent with chemical structure of RIV metabolite M-5 (m/z 454), described by Lang, D. et al., 2009 [26]. Accordingly, DP1 product ion m/z 249 is 18 Da above RIV characteristic product ion m/z 231, thus corroborating with proposed molecular structure of DP1. At fragmentation step AC II (Fig. 3), amide bond is undone through a McLafferty rearrangement [27], producing high intensity m/z 145 peak. AC III (Fig.7-10) represents decarboxilation at oxazolidinone ring [28], with loss of m/z 44, corresponding to CO₂ withdraw. Last elucidated fragment, AC IV (Fig 7-10), demonstrates that hydration remains stable during fragmentation process. RIV solution exposed to microwave assisted acid degradation had same major degradation peak DP1 (1.4 min, m/z 454), nevertheless it was found that RIV degradation rate was improved when placed in

microwave oven, in comparison to usual laboratory stove, and additionally another ion peak was detected with m/z 410. More intense degradation in microwave assisted experiment was likely due higher efficiency of converting microwave radiation into heat and much faster heating speed compared to conventional thermal increment [27]. Detected peak m/z 410 has a difference of 26 Da from RIV molecular ion m/z 436, and of 44 Da from DP1 ion peak. Value of 44 Da may represent the loss of a neutral CO_2 from hydrolyzed RIV molecule (AC III, Fig. 3), which is also in agreement with structures presented by Lang, D. et al., 2009 for fragments of different RIV metabolites (M-1, M-6, and M-15) [26].

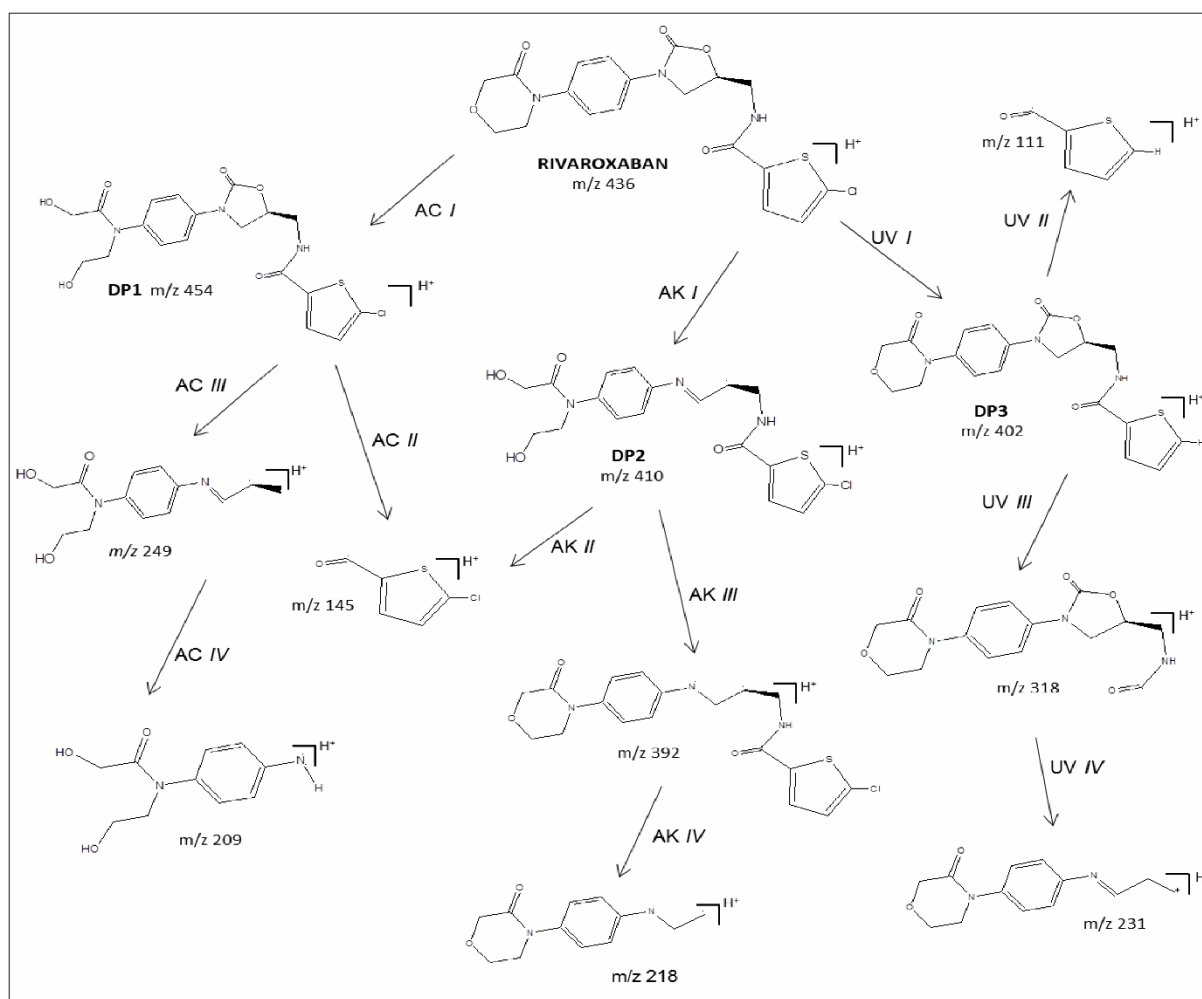


Figure 7-10. Elucidation of fragmentation pattern (in four stages) for the proposed degradation products of RIV - DP1, DP2, and DP3 - formed after drug exposure to stress conditions: acid hydrolysis (AC), alkaline hydrolysis (AK), and photodegradation (UV), respectively.

3.4.2 Alkaline medium

Total ion chromatogram (TIC) of RIV sample stressed with elevated pH presented main peak at 1.49 min (DP2). MS spectrum presented ion peak of m/z 410. According to stated in item 3.4.1., DP2 is originated from decarboxilation at oxazolidinone ring (-44 Da) in RIV molecule already hydrolyzed/hydrated at morpholinone moiety (+18 Da), as presented in step AK I of Figure 7-10. Furthermore, whenever RIV suffers a minor alkaline degradation (0.1 M NaOH, 60 °C, up to 2 h) ion peak m/z 454 can be detected, evidencing probable relation between DP1 and DP2 formation in solutions with extreme pH values. Great difference from DP1 fragmentation pattern is dehydration of DP2 and formation of product ion m/z 392 (AK III, Fig. 3). Product ion m/z 145 was the most intense ion peak detected after DP2 fragmentation. Regarding microwave assisted alkaline degradation, RIV was no longer detected after one hour of reaction. Main chromatographic MS peak presented m/z 410, as expected.

3.4.4 UVC radiation

DP3, detected at 1.25 min TIC of RIV photodegradation, exhibited m/z 402. As presented in table of mass fragmentation and neutral loss (Table 1), reduction of 34 Da in RIV molecule corresponds to exchange of one chlorine for one hydrogen (UV I, Fig. 3). At fragmentation step UV II (Fig. 3), loss of chlorine becomes apparent by presence of fragment ion m/z 111 as most intense, and absence of characteristic product ion m/z 145 (chlorothiophene carbonyl). Fragmentation steps UV III and UV IV (Fig. 3) represented usual fragmentations of RIV, thus evidencing no other structural modification in RIV molecule after exposure to UVC radiation.

4 Conclusions

UPLC-MS/MS Q-Tof-ESI technique proved to be very powerful tool for characterization and identification of three major degradation products of anti-clotting agent, rivaroxaban, in three different stress conditions. Although DPs had different structures, m/z values and retention times, fragmentation patterns of three compounds were quite similar. MS scan from RIV product ion assisted changes in DPs molecules. DP1 and DP2 were formed by hydrolysis of RIV in acid and alkaline mediums, respectively. DP3 came from exchange of chlorine to hydrogen when RIV suffered

photodegradation under UVC radiation. It was also found that dissolution of RIV working solution in water before exposition to UVC light did not promote drug hydrolysis. Through degradation and analysis of blank solutions, it was concluded that some excipients of commercial evaluable tablets were detected on MS chromatogram with peak of precise retention time and *m/z* values, which were kept unchanged along experiments. Elucidation of RIV degradation products enables major access and knowledge regarding drug stability, increasing tools for quality control and safer treatments.

Acknowledgments : LCQFar (Laboratory of Pharmaceutical Quality Control) - UFRGS, SQIA – UFSM, financial support from CAPES/Brazil

References

- [1] J.I. Weitz, New oral anticoagulants in development, *Thromb. Haemostasis*, 103 (2010) 62-70.
- [2] K. Kamata, H. Kawamoto, T. Honma, T. Iwama, S.H.P. Kim, Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa, *Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1998) 6630-6635.
- [3] M. M. Samama. The mechanism of action of rivaroxaban – an oral, direct factor Xa inhibitor – compared with other anticoagulants, *Thromb. Res.*, 127 (2011) 497-504.
- [4] B.F. McBride, A preliminary assessment of the critical differences between novel oral anticoagulants currently in development, *The J. Clin. Pharmacol.*, 45 (2005) 1004-1017.
- [5] K.G. Mann, K. Brummel, S. Butenas, J, What is thrombin for?, *J. Thromb. Haemostasis*, 1 (2003) 1504-1514.
- [6] C. Weinz, T. Schwarz, D. Kubitzka, W. Mueck, D. Lang, Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans, *Drug Metab. Dispos.* 37 (2009) 1056-1064.
- [7] C. Weinz, U. Buetehorn, H.P. Daehler, C. Kohlsdorfer, U. Pleiss, S. Sandmann, K.H. Schlemmer, T. Schwarz, W. Steinke, *Xenobiotica*, 35 (2005) 891-910.
- [8] L.M. Asmis, L. Alberio, A. Angelillo-Scherrer, W. Korte, A. Mendez, G. Reber, B. Seifert, H. Stricker, D.A. Tsakiris, W.A. Wuillemin, Rivaroxaban: quantification by anti-

Fxa assay and influence on coagulation test: a study in 9 Swiss laboratories, *Thromb. Res.*, 129 (2012) 492-498.

[9] G. Rohde, Determination of rivaroxaban – a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor – in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 872 (2008) 43-50.

[10] S. Magiera, Fast, simultaneous quantification of three novel cardiac drugs in human urine by MEPS-UHPLC-MS/MS for therapeutic drug monitoring, *J. Chromat. B*, 938 (2013) 86-95.

[11] D. Lang, C. Freudenberger, C. Weinz, In vitro metabolism of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in liver microsomes and hepatocytes of rats, dogs and humans, *Drug Metab. Dispos.*, 37 (2009) 1046-1055.

[12] N.R. Ramiseti, R. Kuntamukkala, Development and validation of a stability indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process related and stress degradation products of rivaroxaban. *RSC Adv.* 4 (2014) 23155-23167.

[13] Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM: Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Exp. Bot.*, 56 (2005) 219-243.

[14] M. Holcapek, R. Jirásko, M. Lísa. Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3908-3921.

[15] M.-J. Galmier, B. Bouchon, J.-C. Madelmont, F. Mercier, F. Pilotaz, C. Lartigue, Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 38 (2005) 790-796.

[16] S.D. Sawant, V.U. Barge, Identification and characterization of forced degradation products of paliperidone using LC-APCI-Ion Trap-MS, *Journal of Pharmacy Research*. 6 (2013) 39-47.

[17] M.S. Sangoi, V. Todeschini, B.K. Goelzer, M. Steppe, Photochemistry of a novel antimuscarinic drug fesoterodine and identification of its photodegradation products by LC-ESI-MS, *J. Photochem. Photobio. A*, 256 (2013) 16-22.

[18] U. Arroyo-Abad, J. Mattusch, M. Möder, M.P. Elizalde-González, F.-M. Matysik, Identification of degradation products of phenylarsonic acid and o-arsanilic acid in contact with suspensions of soils of volcanic origin, *Talanta*, 99 (2012) 310-315.

- [19] Z. Bourezg, N. Cartiser, L. Ettouati, j. Guillon, A. Lacoudre, N. Pinaud, M. Le Borgne, H. Fessi, Structural elucidation of two photolytic degradation products of tetrabenzazine, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 91 (2014) 138-143.
- [20] B.I. Cioroiu, M.I. Lazar, M.A. Bello-López, R. Fernandez-Torres, Identification of the specified impurities of silver sulfadiazine using a screening of degradation products in different stress physico-chemical media, *Talanta*, 116 (2013) 653-662.
- [21] P. Zalewski, R. Skibinski, J. Cielecka-Piontek, Stability studies of cefpirome sulfate in the solid state: Identification of degradation products, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 92 (2014) 22-25.
- [22] M. Narayanam, T. Handa, P. Sharma, S. Jhajra, P.K. Muthe, P.K. Dappili, R.P. Shah, S. Singh, Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 87 (2014) 191-217.
- [23] N.R. Wingert, M.A.G. Nunes, A.T. Barden, P. Gomes, E.I. Müller, E.M.M. Flores, M. Steppe, Ultra-performance LC-ESI/Q-TOF MS for the Rapid Analysis of Rivaroxaban: Method Validation Using Experimental Design for Robustness Evaluation. *Curr. Anal. Chem.* 11 (2015) 124-129.
- [24] J.J. Jones, H. Kindwell, D.E. Games, Application of atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry in the analysis of barbiturates high-speed analytical counter current, *Mass Spectrom.*, 17 (2003) 1565-1572.
- [25] A.G. Brenton, A.R. Godfrey, Accurate mass measurement: terminology and treatment of data, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 21 (2010) 1821-1235.
- [26] D. Lang, C. Freudenberger, C. Weinz, In vitro metabolism of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in liver microsomes and hepatocytes of rats, dogs, and humans, *Drug Metab. Dispos.*, 37 (2009) 1046-1055.
- [27] C. Ludlow-Palafox, H.A. Chase, Microwave-induced pyrolysis of plastic wastes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40 (2001) 4749-4756.
- [28]. C. Shimasaki, F. Hirata, H. Ohta, E. Tsukurimichi, T. Yoshimura, Thermal behavior and mass spectrometry studies of 2-oxazolidinone derivatives, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 24 (1993) 291-300.

7.3. DISCUSSÃO GERAL

O controle de qualidade de produtos farmacêuticos é indispensável para garantir a segurança e eficácia dos tratamentos. A correta aplicação de métodos analíticos confiáveis pode garantir produtos mais eficazes, seguros, menos tóxicos e mais estáveis em todas as etapas do desenvolvimento e fabricação.

Através da CLAE foi desenvolvido e validado o método com a utilização de coluna cromatográfica C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) e detector PDA, sem a necessidade de adição de sais para tamponamento da fase móvel ou PI, que permitiu a determinação qualitativa e quantitativa da RIV SQR e amostra de uma maneira rápida e eficiente.

A determinação quantitativa da RIV em comprimidos foi realizada em método indicativo de estabilidade validado em CLAE-UV. A robustez do método foi avaliada por desenho experimental Plackett-Burman em dois níveis para cada parâmetro e um ponto central. Desta forma, foi possível avaliar o efeito de cada fator nos principais parâmetros cromatográficos, com ênfase no valor obtido para a concentração de RIV na solução amostra.

Os estudos de degradação forçada proporcionaram o conhecimento dos principais fatores de degradação. Os resultados obtidos nos ensaios de degradação demonstraram a instabilidade de RIV nas condições ácida, alcalina e fotolítica. A avaliação da pureza dos picos de RIV obtido nas diferentes condições de degradação através do *software* ChemStation demonstraram a seletividade do método por CLAE.

Nos estudos de cinética de degradação, a RIV SQR e amostra de comprimidos, foi degradada em pelo menos 50 % para obtenção de um perfil mais representativo da degradação do fármaco. A cinética de degradação em condições de estresse forçado apresentou cinética de ordem zero para todos os casos analisados, permitindo prever o grau de transformação ocorrido durante o período do estudo de estabilidade da RIV.

Para os ensaios de segurança biológica relacionados às amostras de degradação forçada (meios alcalino e ácido e sob radiação UVC) de RIV, foram realizados testes *in vitro* com soluções aquosas do fármaco RIV (máximo de 5 % de fase orgânica). A RIV foi testada nas condições intacta e degradada (50 % e 100 % da capacidade de formação dos produtos de degradação). O objetivo foi verificar o potencial tóxico das soluções em presença dos PDs da RIV em comparação com

soluções de RIV intacta. Os resultados demonstraram que, em uma concentração teórica de 500 μM tanto a RIV intacta quanto as amostras 50 e 100% de RIV degradação alcalina apresentaram morte celular significativa nos testes de MTT e NR. Para a condição de degradação UVC 50%, foi observado uma redução da morte quando comparada com a RIV intacta, também para ambos os testes. Não foram encontradas quantidades significativas de oxidantes após exposição aos compostos teste. Com relação ao ensaio de genotoxicidade, nenhuma amostra demonstrou efeito danoso ao material genético celular. Para o teste de DNA de baixo peso molecular, a amostra de RIV degradação UVC 100% demonstrou potencial citotóxico na condição estudada.

As análises de identificação dos principais produtos de degradação formados partir de RIV degradada nos meios ácido e alcalino e sob radiação UVC, foram realizadas em CLUE acoplado a MS. A separação prévia das amostras e posterior eletronebulização, facilitou a análise dos produtos de degradação, auxiliando suas análises e escolha do m/z para fragmentação por EM/EM. Através das análises dos espectros de massas e fragmentação dos íons moleculares em destaque, sempre considerando a fragmentação da RIV e dados da literatura, foi possível sugerir a formação de um produto de degradação para cada condição de estresse. DP1 (ácida), de m/z 454, foi formado a partir da hidrólise do grupamento morfolinona na molécula de RIV. O DP2 (alcalina), de m/z 410, demonstra ter sua formação originada da hidrólise do grupamento morfolinona e adicionalmente da decarboxilação do grupamento oxazolidona da molécula de RIV. O DP (UVC)3, m/z 402, apresenta estrutura praticamente igual à RIV, a exceção do átomo de cloro, do grupamento clorotiofenocarbonil, que foi substituído por um hidrogênio. Analisando esses resultados frente a outros da literatura científica, Ramisetti e colaboradores (2014) apresentaram dois produtos de degradação RIV com estruturas químicas diferentes, e nenhum deles formado sob condições de fotólise. Não obstante, no trabalho aqui apresentado foi realizada uma análise crítica do perfil de degradação da RIV e uma apresentação mais ampla do processo de caracterização dos produtos de degradação do fármaco.

7.4. CONCLUSÕES

- O método proposto e validado por CLAE apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Sendo adequado para a determinação quantitativa de RIV no produto farmacêutico e avaliação da estabilidade;
- No estudo da cinética de degradação da RIV nas condições forçadas de degradação: solução ácida, solução alcalina e fotodegradação, foi observado que o modelo que melhor representa o decaimento da concentração da RIV em razão do tempo é o de ordem zero, para as três condições de estresse.
- Através do teste de citotoxicidade in vitro MTT e NR foi possível verificar que, dentre as soluções de degradação da RIV, a que demonstrou maior potencial citotóxico foi a degradação alcalina tanto em 50 quanto 100 %.
- O teste de genotoxicidade apontou não haver indução de dano do DNA pela RIV intacta ou após degradação;
- As amostras degradadas de RIV em condições forçadas: ácida, solução alcalina e fotodegradação, formaram os respectivos produtos de degradação: DP1, m/z 454. DP2, m/z 410 e DP3, m/z 402, cujas estruturas químicas foram sugeridas após estudos de EM/EM.

**8. CAPÍTULO V: ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E
CORRELAÇÃO COM DADOS *in vivo***

8.1. INTRODUÇÃO

Através do ensaio de dissolução é possível avaliar a taxa de liberação de um fármaco a partir de sua forma farmacêutica, para uma solução aquosa no decorrer do tempo. Fatores que podem afetar a liberação do fármaco *in vivo*, podem também ser observados *in vitro* ao utilizar ensaios apropriados.

Fatores que afetam a velocidade de dissolução devem ser considerados ao longo do desenvolvimento de um ensaio de dissolução. Solubilidade, hidrofobicidade, higroscopia e presença de polimorfismo estão relacionados ao fármaco. Fatores relacionados ao equipamento (temperatura, velocidade de agitação, filtro, tempos de coletas) e ao meio de dissolução (volume, presença de gases, pH) devem ser observados e bem delineados para estabelecer um método reprodutível.

Além da aplicação dos controles de qualidade lote a lote, o ensaio de dissolução pode ser utilizado para desenvolver uma correlação dos dados de dissolução *in vitro* com os de absorção *in vivo* (CIVIV). Fármacos com classificação biofarmacêutica 2 (baixa solubilidade e alta permeabilidade) apresentam a solubilização como etapa limitante na dissolução do fármaco, podendo estabelecer uma correlação com os dados de absorção (AMIDON, 1995). Para obtenção de uma CIVIV é necessário a obtenção dos dados de concentração plasmática, procedendo então a modelagem dos dados conforme o modelo compartimental. Os valores de C_p são calculados para fração absorvida do medicamento, esperando a obtenção de uma reta na correlação com os dados de fração dissolvida.

Recente estudo realizado por TAKÁCS-NOVÁK e colaboradores (2013) avaliou a solubilidade da RIV, junto a outros três fármacos de baixa solubilidade, utilizando método *shake-flask*, e os seguintes meios de dissolução: fluido gástrico simulado, fluido intestinal simulado em estado de jejum (FaSSIF) e alimentado (FeSSIF) e tampões correspondentes. Ao final de 2014 foi publicado na literatura científica o desenvolvimento de um método de dissolução em aparato 2 da USP (50 rpm) para RIV em comprimidos de 10 mg. O meio de dissolução constituía de tampão acetato, pH 4,5 + 0,4 % de SDS e a quantificação das amostras avaliadas até 60 min de dissolução foi feita por espectrofotometria de UV em 248 nm (ÇELEBIER et al., 2014). Contudo, não existem relatos do estudo do perfil de dissolução da RIV em função de seus dados *in vivo*.

8.2. ARTIGO CIENTÍFICO V: Development of *in vitro* dissolution method fitted to *in vivo* absorption of rivaroxaban in pharmaceutical dosage applying *in silico* modelling

Artigo a ser submetido para publicação.

Development of *in vitro* dissolution method fitted to *in vivo* absorption profile of rivaroxaban in pharmaceutical dosage applying *in silico* modelling

Nathalie R. Wingert, Natália O. dos Santos, Sarah C. Campanharo, Nadia M. Volpato, Martin Steppe

ABSTRACT

Oral drugs with high permeability but poorly soluble in aqueous media, such as the anticoagulant rivaroxaban (RIV) in immediate-release tablets, have a major potential to reach high level of *in vitro* and *in vivo* (IVIV) correlation. Currently, there is no information on scientific literature regarding the evaluation of RIV dissolution based on its *in vivo* performance. This study aimed the development and validation of an *in vitro* dissolution method based on *in silico-in vivo* data to determine whether an IVIV relationship could be established for RIV tablets. Drug plasmatic concentration (C_p) values were modelled using computational simulation with adjustment of pharmacokinetic properties. C_p was converted into fraction of drug absorbed (FA) by Wagner-Nelson deconvolution approach. Gradual and controlled dissolution of RIV tablets was obtained with 30 rpm basket on 50 mM sodium acetate + 0.2 % SDS, pH 6.5 medium. Dissolution was conducted for up to 180 min. FA was plotted against fraction dissolved, and a linear point-to-point regression ($R^2=0.9961$) was obtained. Therefore, designed *in vitro* dissolution method promoted a more appealing dissolution profile of RIV tablets, once it can be related with *in vivo* performance.

Keywords: rivaroxaban; *in vitro-in vivo* correlation; *in silico* modelling; dissolution.

INTRODUCTION

Dissolution profile provides information regarding drug dissolution towards time and, therefore, provides a more detailed information concerning pharmaceutical parameters. Likewise, the definition of dissolution specifications based on drug solubility, permeability, and pharmacokinetic might lead to more reliable results [1]. FDA defines *in vitro-in vivo* correlation as the relationship of *in vitro* properties and relevant *in vivo* behaviour of a drug in the same dosage form, described by a predicted mathematical model [1].

In silico terminology implicates the use of computer simulation to model natural or experimental processes. In order to model physiological behaviours, such as absorption and distribution profile of an oral drug, pharmacokinetic properties have to be assessed [2; 3]. Application of mathematical tools for predicting *in vivo* parameters and relate them with *in vitro* data have been demonstrating high significance and applicability in scientific works with different approaches in recent years [4; 5; 6; 7].

Biopharmaceutical classification system (BCS) categorizes drug products regarding permeability and solubility, and throughout those characteristics, whether an *in vitro-in vivo* (IVIV) correlation can be expected [8]. The ability of a drug to be solubilized in absorption site and thereon to permeate gut membrane are the main steps to influence *in vivo* behaviour of an orally administered compound, therefore these characteristics are key points for a drug to achieve IVIV correlation. Pharmaceutical compounds with high permeability and low solubility have an increased chance on achieving high level IVIV correlation, whereas *in vitro* dissolution rate can be modulated towards *in vitro* dissolution process [9; 10] in case of dosage forms without controlled release.

Rivaroxaban (RIV) is an oral anticoagulant inhibitor of factor Xa on in intrinsic and extrinsic coagulation pathways [11; 12]. According to literature, RIV has a predicted logP around 2 and bioavailability equal or superior to 90 % for 10 mg immediate-release (IR) tablets. As for 15 and 20 mg dosage, it is recommended to administrate medicine with food in order to keep high absorption [13; 14]. These features allow RIV to be classified as high permeable substance. On the other hand, RIV is a poorly water soluble compound [15] which makes dissolution process the limiting step on drug absorption rate [16; 17]. Hence, RIV oral dosage can be designated as class II drug by BSC and presents an advantage in order to obtain a

good *in vitro-in vivo* correlation profile. A simple dissolution method with UV detection for RIV routine quality control was recently published [18]. To the best of our knowledge, the relationship of RIV *in vitro* and *in vivo* data, as well as the *in silico* modelling of RIV absorption behaviour has not yet been published or described in literature.

The present work aimed the establishment of a reasonable relationship between *in vitro* dissolution profile of RIV tablets and *in vivo* plasmatic data. RIV dissolution was monitored by high performance liquid chromatography (HPLC) along several sampling points. Through method optimization, different conditions were evaluated in order to obtain a continuous and controlled dissolution of RIV IR tablets. *In silico* modelling was applied to plasmatic concentrations and deconvolution technique employed to obtain RIV fraction absorbed. The level of relationship between fraction of drug absorbed (FA) and fraction of drug dissolved (FD) was evaluated by linear regression.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and materials

Samples of RIV 20 mg tablets, Xarelto® (Bayer Schering Pharma AG, Leverkusen, Germany) were purchased in local market. Reference standard substance with 99.63 % RIV content was acquired from BOC Science (NY, USA). HPLC-grade acetonitrile (ACN) and sodium acetate came from Sigma Aldrich (Germany). Ammonium hydroxide ACS grade by MP Biomedicals (Ohio, USA), formic acid and sodium dodecyl sulfate (SDS) by LabSynth (Diadema, SP, Brazil) were the reagents consumed over dissolution studies and quantitative analysis. Water was purified by Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

Pharmacokinetic data and computer simulation

RIV plasmatic concentrations (C_p) values were obtained from Mueck *et al* (2011) pharmacokinetic study with typical atrial fibrillation patients monitored for 24 hours after receiving single tablet of RIV 20 mg [19]. Fraction bioavailable (F) and distribution volume (V_d) were taken from literature [13; 14; 20]. Method of residuals was initially applied to estimate absorption (k_a) and elimination (k_e) constants. *In silico* mathematical modelling was applied to define C_p versus time data through the non-linear regression software Scientist® 2.0 (MicroMath Research, USA). Input

parameters Vd, ke, and ka were estimated by simplex fit and least square fit. Dosage and F were fixed. RIV compartmental model was assessed by model selection criterion (MSC), a reciprocal modification of Akaike information criterion, evaluating goodness-of-fit for *in vivo* Cp data and modelled values [21; 22].

$$MSC = \ln \left(\frac{\sum_i w_i [c_{pm}(t_i) - \bar{c}_{pm}(t_i)]^2}{\sum_i w_i [c_{pm}(t_i) - c_{ps}(t_i)]^2} \right) - 2 \frac{p}{n} \quad (1)$$

Equation 1 was applied to calculate MSC, where w_i : weights for each data sample; C_{pm} : measured plasmatic values; C_{ps} : simulated plasmatic values; p : number of fitted parameters; n : number of independent measurements in the model. Value of MSC over 4 represent good model fitting. [22]

Analytical methodology

Evaluation of RIV dissolution studies was performed by a previously validated stability-indicating HPLC method. Reversed phase C18 (150x4.6 mm; 5 μ m) Zorbax Eclipse Plus column (Agilent technology, USA) was employed for compounds separation in an Agilent 1200[®] HPLC system equipped with photodiode array UV detector set at 248 nm. Mobile phase containing ACN and a solution of 0.10 % formic acid adjusted to pH 4.0 with ammonium hydroxide (37:63, v/v) was eluted at 1.0 mL/min flow rate at 25 °C. Acquired data was processed with ChemStation software. Standard substance stock solution in ACN was diluted to final volume with dissolution media, and in order to reduce analytical error, samples withdrawn from dissolution vessel were only filtered through 0.45 μ m analytical filter prior LC analysis.

Dissolution studies

Solubility and sink status

Solubility tests was performed in different dissolution media (0.01 M and 0.1 M HCl, 50 mM sodium acetate and ammonium acetate, 0.1 and 0.6 % SDS) to observe which conditions were propitious to RIV. Drug samples were added to tested media in conditions that mimic dissolution media (2 h continuous agitation at 37 °C). Final solutions were prepared and analysed by HPLC.

Sink conditions were evaluated only after initial solubility assessments. Shake flask method was applied to optimized media and RIV standard substance. Resultant dispersions were placed in 5 mL tubes and submitted to mild and continuous agitation at 37 ± 0.5 °C for up to 3 h. After centrifugation, supernatant solution was filtered and analysed by HPLC.

Dissolution equipment and apparatus

In vitro dissolution studies of RIV 20 mg were performed in a Vankel® VK 7010 (Varian, USA) multi-bath dissolution test station with automated sampling. USP apparatus 1 and 2 (basket and paddle, respectively) were available to perform dissolution. Different media volumes were tested in amber vessels with capacity for 1000 mL. Chosen conditions were those who lead to a better reproduction of *in vivo* modelled behaviour.

In vitro-in vivo relationship

In order to assess IVIV relationship, C_p predicted values at defined time points have to be converted into FA. In deconvolution procedure, Wagner-Nelson and Loo-Riegelman are the most common model dependent techniques applied to obtain the percent of drug absorbed as output function using plasma concentrations [23]. FA was plotted against FD for the same time points. Resulting values were evaluated by linear regression, in order to assess the extent of *in vitro* and *in vivo* relationship.

Dissolution test validation

Dissolution method was validate based on current international guidelines [24; 1], evaluating specificity, linearity, accuracy, precision, robustness, and stability of sample solutions. Influence of media deaeration, cannula filter, and media replenish were also assessed. Method validation assures that developed methodology is suitable for intended application and assures safe and reliable results.

RESULTS AND DISCUSSION

Modelling RIV pharmacokinetic data

In silico modelling of RIV plasmatic concentration behaviour was based on *in vivo* data considering Vd of 55 L and bioavailability of 0.9 [13,14, 20]. After applying data to non-linear regression software, model that better described RIV *in vivo* behaviour and had best fitting with Cp data was one compartment open model with first order input/output. Mathematical parameters were formerly assessed, MSC result around 4 and correlation coefficient of 0.9926 indicate a reasonably well fitted model [21], as shown in Figure 8-1.

$$Cp = \frac{F.Ka.D}{Vd.(Ka-Ke)} \cdot (e^{-Ke.t} - e^{-Kat}) \quad (2)$$

Equation 2 was applied to estimate intermediate plasmatic concentration data points. RIV bioavailability is designed by F; Ke and Ka represent elimination and absorption rate constants, respectively; Vd: volume of distribution; D: dose. Figure 8-1 presents the plasmatic profiles of RIV observed and modelled data along 24 h.

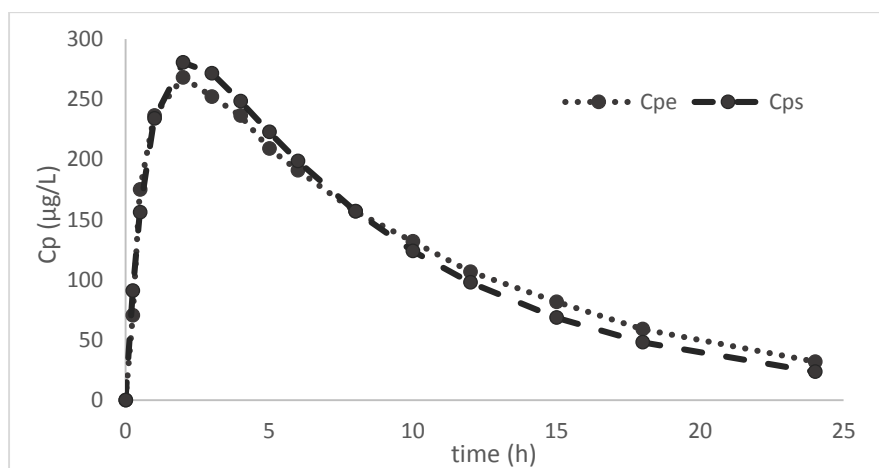


Figure 8-1. Plasmatic profile of RIV 20 mg up to 24 h for *in vivo* (Cpe) and *in silico* (Cps) data.

***In vitro* dissolution method**

Solubility and sink conditions

Performed tests confirmed the low solubility of RIV in aqueous media. Maximum dissolution in acid media (pH 2.4 – 5.0) was 66.2% of dose. Surfactants, such as anionic SDS, have their application on facilitating *in vitro* dissolution process of poorly water soluble substances well established and have been widely explored along the years [25]. Only through addition of surfactant, RIV presented a better solubility and recovery over 86% in 0.1% SDS and 98% in 0.5% SDS.

Work within sink conditions (three times the saturation volume for a defined dose) is recommended, but not mandatory. Work outside sink conditions is justified whenever this behaviour represents gains on acquisition of a desired dissolution profile, without reaching media saturation [1]. Furthermore, although not attending to sink condition, RIV was soluble on tested media and without risks of saturation.

Dissolution method design and optimization

Throughout development of dissolution method, it was necessary to focus on distinct but related factors. Optimized conditions were planned to provide a progressive dissolution of RIV IR tablets along time samplings, reaching at least 80 % of drug amount dissolved at final point [26]. These characteristics are in line with the development of a reliable *in vitro* method able to describe *in vivo* absorption.

Considering the low dosage of RIV tablets, initial considerations regarding media volume pointed to 500 mL media (RIV final concentration of 40 µg/mL). After solubility investigation, limited dissolution of RIV in aqueous solution lead to test medium with 900 mL. Since RIV has reduced aqueous solubility, the utilization of substances that promote drug solubilization is particularly important. Surfactants are considered physiologically relevant, once compounds with same characteristics are naturally present in gastrointestinal tract, improving dissolution and absorption of drugs [27]. Different media compositions were tested. Dissolution profiles in 0.1 – 0.6 % SDS solution alone or together with salt solutions of sodium acetate, sodium citrate, ammonium acetate, among others, and simulated gastric fluid (0.01 M HCl + 0.01 % triton X + 0.02 % NaCl, pH 2.16) [28] were assessed. Although the adjustment of pH can increase drug solubility of ionizable compounds, pH variations on physiological

range does not present a major influence on RIV (pka 1.01 and 13.36) dissolution behaviour, therefore there was no special need for a buffered media. In order to assure reliability of dissolution process, all media tested were deaerated by sonication and heating, thereby preventing air bubbles to behave as barriers to dissolution procedure.

Ten sampling points of 5 mL each, along 3 hours of dissolution process were performed with automatic sample collectors previously calibrated. Medium replenish was chosen as strategy to reduce proximity of media saturation. Cannula filters with pore size of 10, 35, and 70 μm were tested by filtering different concentration of RIV tablet samples and analysing through HPLC. It was not found significant difference between filters and none of them presented evidence of drug adsorption or lack of selectivity. Intermediate pore size, cannula filter with 35 μm was employed in this work.

Hydrodynamic properties resulting from variation in stirring speed are one of the most determinant factors on dissolution behaviour of solid pharmaceutical formulations [6] Compared with pH variation and salt concentration, speed rotation had a greater influence on RIV dissolution rate. Although the use of apparatus I (basket) is more common for capsules, it is also accepted for tablets dissolution [29]. Moreover, basket has advantages such as less sensitivity to tilting effect [9]. When compared to paddle apparatus, both with reduced stirring velocity, basket demonstrated a higher capability to guarantee a gradual dissolution of RIV tablets. Notwithstanding, basket apparatus has a reduced mixing capacity at low velocity [30]. D'Arcy *et al.* (2006) demonstrated by computational fluid dynamics that even in low velocities, the vicinity of basket was exposed to tablet content within 30 s [31]. Different authors intending a more descriptive dissolution profile have employed the approach of reducing the stirring of dissolution apparatus [32; 33; 34].

After method design steps, *in vitro* drug dissolution profile (Figure 8-2) was performed on 50 mM sodium acetate + 0.2 % SDS pH 6.5 media at 37 °C. Employing basket apparatus with 30 rpm stirring.

Aiming an infinity time point after the end of dissolution, speed was increased to 75 rpm and a last sample collected after 30 min. Although there is no requirement for 100 % dissolution in the profile [29], the increment of speed rotation secured the completed dissolution of RIV tablet, allowing evaluation of content uniformity.

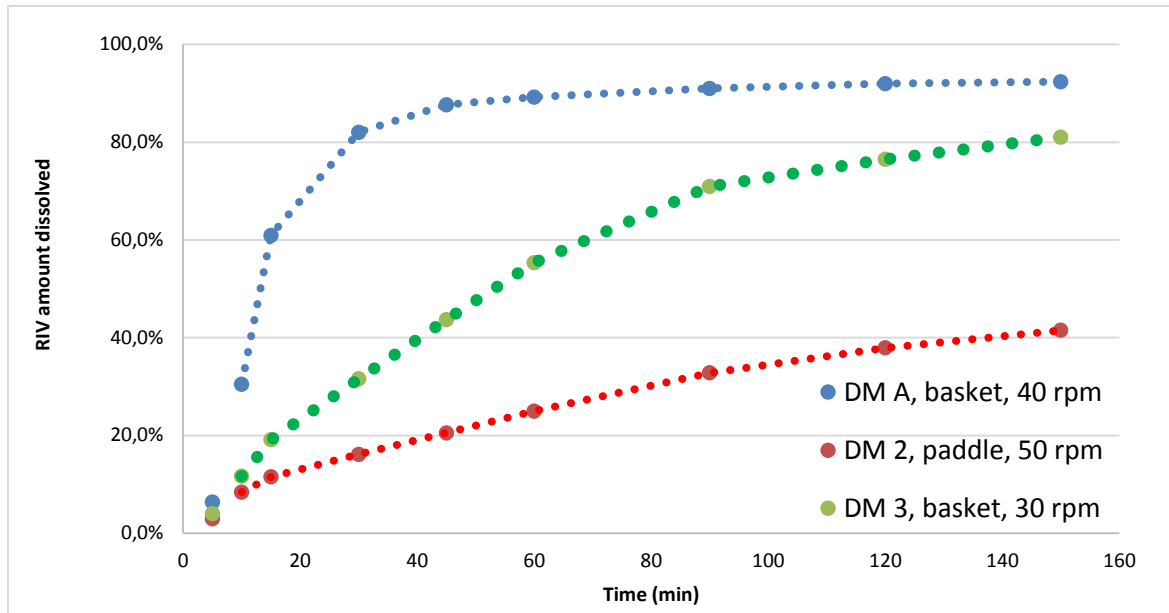


Figure 8-2. RIV dissolution profile for three tested conditions. Dissolution medium (DM) 1: 0.4% SDS, pH 4. DM 2: 25 mM sodium citrate + 0.2% SDS, pH 6.5. DM 3: 50 mM sodium acetate + 0.2% SDS, pH 6.5 (n=6).

In vitro-in vivo correlation

Based on *in silico* modelling of RIV *in vivo* data, one compartment open model had the best description of RIV absorption and distribution profile. Therefore, deconvolution approach by Wagner-Nelson equation was applied on predicted C_p values in order to obtain FA. It was possible to achieve a point-to-point linear relation between fraction of drug absorbed (FA) and fraction of drug dissolved (FD). R^2 of 0.9961 indicates the achievement of high level correlation for *in vitro* dissolution data and *in vivo* modelled values (Figure 8-3), such condition represents a more attractive description of dissolution profile. Given the analogy with *in vivo* data, the visualization of changes on oral absorption (extension and velocity) is facilitated, and therefore can proceed *in vivo* tests. An internal validation was performed to establish the accuracy of correlation model applied [35, 36]. Throughout IVIV correlation equation, predicted FA was determined. The prediction error between predicted and calculated FA was employed to measure the consistency of developed IVIV relationship. As shown in Table 8-1, prediction error was below 10 % for all data evaluated, proving the validity of designed correlation (Figure 8-4).

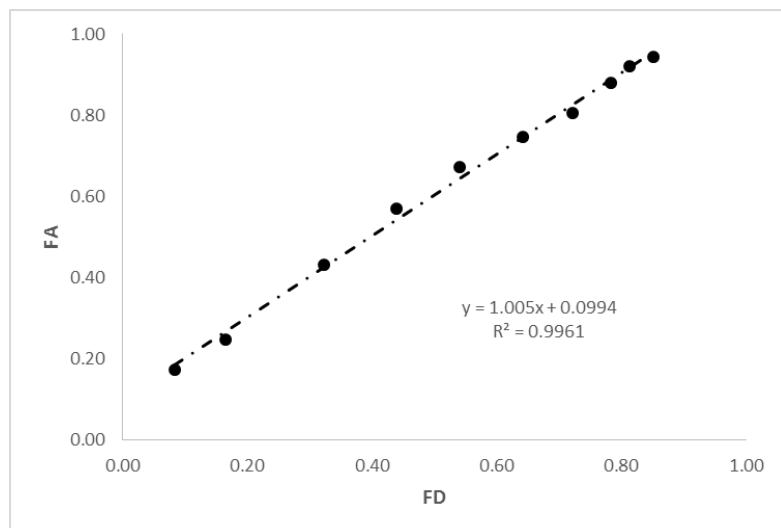


Figure 8-3. In vitro-in vivo profile of RIV tablets. Fraction dissolved represents mean values for six measurements.

Table 8-1. Rivaroxaban fraction dissolved (FD), fraction absorbed calculated by deconvolution (FA calc), fraction absorbed determined through IVIV correlation equation (FA pred), and prediction error between FApred and FAcalc (Error, %).

Time (min)	FD	FA calc	FA pred	Error (%)
10	0.0839	0.1726	0.1837	6.44
15	0.1655	0.2471	0.2658	7.55
30	0.3238	0.4313	0.4248	1.52
45	0.4394	0.5688	0.5410	4.88
60	0.5409	0.6713	0.6430	4.21
75	0.6416	0.7477	0.7442	0.48
90	0.7212	0.8048	0.8242	2.41
120	0.7835	0.8789	0.8868	0.90
150	0.8141	0.9202	0.9176	0.28
180	0.8508	0.9431	0.9544	1.20

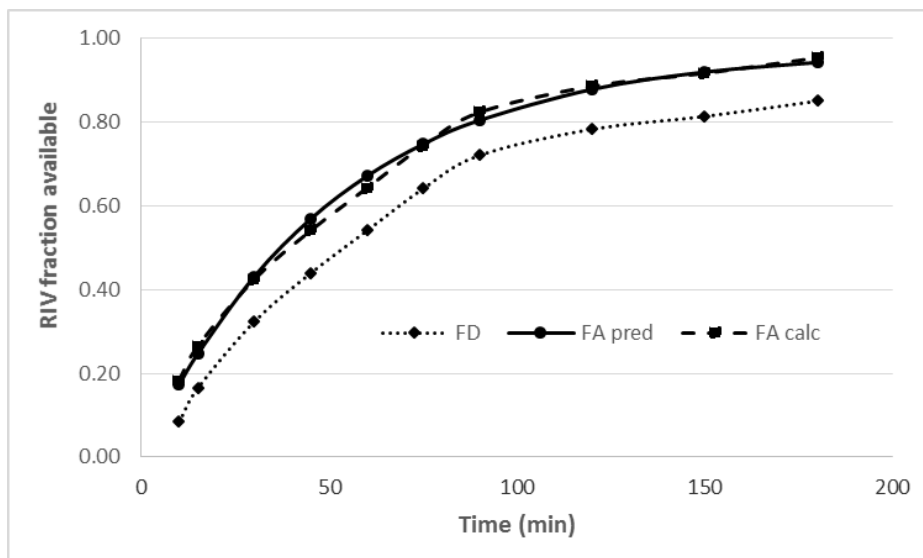


Figure 8-4. RIV dissolution or absorption fractions available profile along 180 min.

Validation of dissolution methodology

RIV stability in dissolution media was evaluated by keeping last sample point for more 24 h in room temperature. There was no evidence of degradation or reduction of content. Placebo blend in concentrations consistent with RIV tablets and blank solution, which was the dissolution media, were also evaluated in order to monitor possible interference on drug analysis. None of them presented interference on RIV quantification.

Linearity range was established considering the initial point as equivalent to 1 % of RIV tablet dissolved in media and last point with a concentration higher than RIV 20 mg tablet fully dissolved. RIV standard stock was prepared in ACN and diluted to final concentrations (0.22, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, and 30.0 $\mu\text{g/mL}$) with dissolution medium. Regression curve and determination coefficient are shown in table 8-2. It was evidenced by analysis of variance (ANOVA) that results present significant linear regression ($p < 0.05$) and no significant deviation from linearity ($p > 0.05$).

Repeatability of analysis was performed with standard solution in nine determinations. Concentration points of 1.01, 10.11, and 20.22 $\mu\text{g/mL}$ presented relative standard deviation (RSD) of 0.97, 0.93, and 0.66 %, respectively. Due reduced spinning and complex hydrodynamics inside the vessel, special attention was taken regarding homogenous dissolution profile for each collected sample from different vessel, for that reason, intraday and interday precision were evaluated by repeatability

of dissolution results, considering all sampling points of six vessels along three different days. RSD values should be lower than 20 % for time points up to 10 min, and no more than 10 % for later time points [1]. Results are presented at Table 8-2.

Recovery evaluation was performed with vessels containing placebo blend (equivalent to amount present in drug tablets) spiked with RIV standard solution levels 5, 15, and 25 µg/mL. Organic solvent in final dissolution media was less than 1%. Further results are presented in Table 8-2.

Assessment of influence of filters with different pore size (70 µm) and media without deaeration on drug dissolution was performed applying these modifications on developed dissolution procedure. Samples withdrawn after 180 min were analysed by HPLC regarding the amount of RIV detected and compared with other samples from vessels in developed conditions. Values of RSD between validated and modified conditions were 3.17 % using cannula filter with 70 µm and 3.05 % with non-deaerated dissolution media. Hence, obtained values do not represent a significant different from the ones found in developed conditions.

Table 8-2. Results from evaluated parameters on dissolution method validation.

Parameters	Factors	Results
Linearity	regression curve	$y = 60.831x - 0.6506$
	R ²	0.9999
Intra-day dissolution precision* (RSD, %)	Day 1	84.04 % (3.44)
	Day 2	83.20 % (3.32)
	Day 3	85.52 % (2.99)
Inter-day dissolution precision (n=18 vessels)	10 min Sampling RSD (%)	16.45
	180 min sampling RSD (%)	3.27
Recovery (RSD, %)	Low level	98.98 % (1.26)
	Mean level	99.01 % (0.69)
	High level	98.88 % (0.94)

* average RIV content at 180 min sampling, n = 6 vessels per day

CONCLUDING REMARKS

The development and validation of a reliable IVIV correlation for dissolution methodology is an overwhelming task even for drug compounds from BCS class II. Mathematical processing of *in vivo* data provides important information towards *in silico* modelling of pharmacokinetic parameters. The work performed supports bioassessment based on *in vitro* reports. A point-to-point linear *in vitro-in vivo* relationship was established for RIV 20 mg tablets based on modelled *in silico* values, equation that correlates FA and FD is: $FA = 1.005FD + 0.0994$. Developed *in vitro* dissolution method was successfully validated and can be applied as a prognostic tool for drug absorption performance representing valuable data for quality control and drug development.

REFERENCES

1. Food and Drug Development. The Dissolution Procedure: Development and Validation, USP 36, 2013.
2. van de Waterbeemd, H; Gifford, E. ADMET *in silico* modelling: Towards prediction paradise? *Drug discovery*, 2, 192-204, 2003.
3. Wagner, C; Dressman, JB. *In vitro-in silico* tools to predict pharmacokinetics of poorly soluble drug compounds. In: Wang, J and Urban, L (Ed.). Predictive ADMET: integrative approaches in drug discovery and development. John Wiley & Sons, 1st ed. 2014. p. 235-261.
4. Berthelsen, R; Sjögren, E; Jacobsen, J; Kristensen, J; Holm, R; Abrahamsson, B; Müllertz, A. Combining *in vitro* and *in silico* methods for better prediction of surfactant effects on the absorption of poorly water soluble drugs— a fenofibrate case example. *International Journal of Pharmaceutics*, 473, 356–365, 2014
5. Ilic, M; Duris, J; Kovacevic, I; Ibric, S; Parojcic, J. *In vitro – in silico – in vivo* drug absorption model development based on mechanistic gastrointestinal simulation and artificial neural networks: nifedipine osmotic release tablets case study. *European journal of pharmaceutical sciences*, 62, 212 – 218, 2014.

6. Kambayashi, A; Dressman, JB. An *in vitro*–*in silico*–*in vivo* approach to predicting the oral pharmacokinetic profile of salts of weak acids: Case example dantrolene. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84, 200–207, 2013.
7. Tsume, Y; Langguth, P; Garcia-Arieta, A; Amidon; GL. *In silico* prediction of drug dissolution and absorption with Variation in intestinal ph for bcs class ii weak acid drugs: Ibuprofen and ketoprofen. *Biopharm Drug Dispos.* 33, 366–377, 2012. doi:10.1002/bdd.1800.
8. Amidon, GL; Lennernäs, H; Shah, VP; Crison, JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution an *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, Vol 12, n 3, 1995.
9. Shargel, L; Yu, ABC. Applied biopharmaceutical and pharmacokinetics. 5th ed. Appleton & Lange, USA, 2005.
10. Sirisuth N, Eddington ND. The influence of first pass metabolism on the development and validation of an IVIVC for metoprolol extended release tablets. *Eur J Pharm Biopharm*, 53, 301-309, 2002.
11. Weitz, JI. New oral anticoagulants in development. *Thrombosis and Haemostasis*. 103, 62-70, 2010.
12. Samama, MM. The mechanism of action of rivaroxaban – an oral, direct factor Xa inhibitor – compared with other anticoagulants. *Thrombosis Research*, 127, 497-504, 2011.
13. Kubitzka, D; Becka, M; Zuehlsdorf, M; Wensing, G. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single dose of BAY 59-7959, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Clin Pharmacol Ther*, 78, 412-421, 2005.
14. Gnoth, MJ; Buetehorn, U; Muenster, U; Schwarz, T; Sandmann, S. *In Vitro* and *in vivo* P-Glycoprotein Transport Characteristics of Rivaroxaban. *J Pharmacol Exp Ther*, 338, 372-380, 2011.
15. Takács-Novák, K; Szőke, V; Völgyi, G; Horváth, P; Ambrus, R; Szabó-Révész, P. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83, 279-285, 2013.
16. Aulton, ME; Taylor, K. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 4th ed. Churchill Livingstone Elsevier, London, 2013.
17. Allen, LV; Popovich, NG. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 9th ed, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2011.

18. Çelebier, M; Kayanak, MS; Altinöz, S; Sahin, S. UV spectrophotometric method determination of the dissolution of rivaroxaban. *Dissolution technologies*, 56-59, 2014.
19. Mueck, W; Lensing, AWA; Agnelli, G; Decousus, H; Prandoni, P; Misselwitz, F. Population pharmacokinetic analyses in patients treated for acute deep-vein thrombosis and exposure simulations in patients with atrial fibrillation treated for stroke prevention. *Clin Pharmacokinet*, 10, 675-686, 2011.
20. Gong, IY; Kim, RB. Importance of pharmacokinetic profile and variability as determinants of dose and response to dabigatran, rivaroxaban, and apixaban. *Canadian journal of cardiology*, 29, 24-33, 2013.
21. Newman, MC. Bioaccumulation. In: Quantitative Ecotoxicology, 2° ed 2012. CRC Press, USA.
22. Wagner, JG. Pharmacokinetics for the pharmaceutical scientist. Technomic publishing company, USA. 1993.
23. Emami, J. *In vitro - in vivo* Correlation: From Theory to Applications. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 9, 169-189, 2006.
24. ICH. Validation of analytical procedures: Text and methodology (Q2R1). International conference on harmonization, Geneva, Switzerland, 2005.
25. Noory, C; Tran, N; Ouderkirk, L; Shah, V. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. *Dissol Technol*, 7, 16-21, 2000.
26. ICH. Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances (Q6A). International conference on harmonization, Geneva, Switzerland, 1999.
27. Shah, VP; Noory, A; Noory, C; McCullough, B; Clarke, S; Everett, R; Naviasky, H; Srinivasan, BN; Fortman, D; Skelly, JP. *In vitro* dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 125, 99–106, 1995.
28. Dressman, JB; Reppas, C., *In vitro – in vivo* correlations for lipophilic, poorly water soluble drugs. *European journal of pharmaceutical sciences*, 11, 73-80, 2000.
29. The United States Pharmacopeia, 37th ed. (USP 37). United States Pharmacopeia convention, Rockville, MD. 2014.
30. Banaker, U.V. Pharmaceutical Dissolution Testing. Marcel Dekker Inc., New York 10016, USA, 1992.
31. D’Arcy, DM; Corrigan, OI; Healy, AM. Evaluation of hydrodynamics in the basket dissolution apparatus using computational fluid dynamics—Dissolution rate implications. *European journal of pharmaceutical sciences*, 7, 259–267, 2006.

32. Kostewicz, ES; Abrahamsson, B; Brewster, M; Brouwers, J; Butler, J; Carlert, S; Dickinson, PA; Dressman, J; Holm, R; Klein, S; Mann, J; McAllister, M; Minekus, M; Muenster, U; Mullertzm, A; Verwei, M; Vertzoni, M; Weitschies, W; Augustijns, P. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, 342–366, 2014.
33. Baxter, JL; Kukura, J; Muzzio, FJ. Shear-induced variability in the United States Pharmacopeia Apparatus 2: modifications to the existing system. *AAPS J*, 7, E857–E864, 2005.
34. Rostami-Hodjegan, A; Shiran, MR; Tucker, GT; Conway, BR; Irwin, WJ; Shaw, LR; Grattan, TJ. A new rapidly absorbed paracetamol tablet containing sodium bicarbonate. II. Dissolution studies and in vitro/in vivo correlation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 533–543, 2002.
35. Takka, S; Sakr, A; Goldberg, A. Development and validation of an *in vitro-in vivo* correlation for buspirone hydrochloride extended release tablets. *Journal of Control Release*, 88, 147-157, 2003.
36. Todeschini, V; Sangoi, MS; Goelzer, GK, Machado, JC; Paim, CS; Araujo, BV; Volpato, NM. Dissolution method for delapril and manidipine combination tablets based on absorption profile of manidipine. *Journal of pharmaceutical analysis*, 2015.

8.3. DISCUSSÃO GERAL

O teste de dissolução é uma importante ferramenta para a avaliação da qualidade e conformidade de um produto farmacêutico.

A solubilidade e permeabilidade de um fármaco são considerados parâmetros chave para a absorção de um medicamento. Da mesma maneira, esses aspectos podem informar o quanto viável é o desenvolvimento de uma correlação entre os dados de dissolução *in vitro* e absorção *in vivo*. De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutico, substâncias que se encontram na classe 2 (baixa solubilidade e alta permeabilidade) possuem maior possibilidade de apresentarem CIVIV. Embora a RIV não possua classificação oficial, seus dados farmacológicos apontam para uma fração biodisponível de 0,9 e, como exposto por outros experimentos, a solubilidade da RIV em meio aquoso é bastante limitada, podendo ser classificada como classe 2.

Para obtenção dos valores de fração absorvida, partiu-se de valores de concentração plasmática (C_p) da RIV 20 mg em comprimidos monitorados por 24 h segundo Mueck e colaboradores (2011). A fração biodisponível e o volume de distribuição foram obtidos da literatura e as constantes k_e e k_a estimados pelo método dos resíduos. A modelagem *in silico* foi aplicada a esses valores para obtenção dos dados de C_p conforme o tempo a partir do software de regressão não linear Scientist® 2.0. O critério de seleção do modelo (MSC) foi utilizado para definição de qual modelo compartimental melhor definia os valores modelados. Com valor de MSC igual a 4, o modelo de um compartimento primeira ordem mostrou-se o mais adequado. Por essa razão, a equação de Wagner-Nelson foi aplicada para deconvolução dos dados de C_p e obtenção da fração absorvida.

Para o desenvolvimento dos testes de dissolução foi necessário avaliar a solubilidade da RIV em diferentes meios de dissolução, foram testadas soluções de HCl 0.01 M e 0.1 M, acetato de sódio e de amônio 50 mM, porém apenas com o acréscimo de um tensoativo (SDS) no meio foi possível obter completa dissolução da RIV. Os testes de avaliação da condição *sink* foram realizados com o meio de dissolução escolhido e, embora as exigências para uma condição *sink* não fossem atendidas, a RIV também não estava em situação de saturação nas condições em estudo.

O método de dissolução foi desenvolvido visando uma melhor correlação com os valores de fração absorvida. Para obtenção de uma dissolução mais gradual, a velocidade de agitação foi reduzida para 30 rpm. O meio de dissolução foi composto de acetato de sódio 50 mM + SDS 0,2%, pH 6,5 utilizando aparto 1 da USP. Com alíquotas coletadas até 180 min, foi possível estabelecer uma correlação linear ponto a ponto ($R^2=0,9961$), demonstrando assim que, nas condições experimentais, há uma correlação satisfatória entre os dados de dissolução *in vitro* e absorção *in vivo*.

Para garantir a reprodutibilidade do ensaio de dissolução, bem como avaliar a especificidade e robustez da técnica o método de dissolução foi validado. Um método previamente desenvolvido por CLAE foi utilizado para avaliação dos parâmetros de validação. O método demonstrou ser linear, preciso, exato, robusto e específico para dissolução de RIV em comprimidos de 20 mg.

8.4. CONCLUSÕES

- Foi utilizada modelagem *in silico* dos dados de C_p para obtenção dos dados farmacocinéticos da RIV 20 mg em comprimidos;
- Conforme modelagem por programa de regressão não-linear, a absorção da RIV é melhor descrita como de primeira ordem com um compartimento;
- Os valores de fração absorvida forma obtidos a partir da deconvolução dos valores de C_p aplicando equação de Wagner-Nelson;
- A utilização de acetato de sódio 50 mM + SDS 0,2%, pH 6,5 com velocidade de agitação das cestas em 30 rpm permitiu a obtenção de um perfil de dissolução cuja fração dissolvida possui correlação linear com a fração absorvida da RIV, obtendo assim uma CIVIV.
- O método foi validado de acordo com os parâmetros preconizados para um ensaio de dissolução, e as amostras quantificadas por um método previamente validada por CLAE.

9. REFERÊNCIAS

-
- ABDALLAH, M.A., AL-GHOBASHY, M.A., LOTFY, H.M. Investigation of the profile and kinetics of degradation of rivaroxaban using HPLC, TLC-densitometry and LC/MS/MS: Application to pre-formulation studies. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 53, p. 53–61, 2015.
- AGNELLI, G.; GALLUS, A.; GOLDHABER, S.Z; HAAS, S.; HUISMAN, M.V.; HULL, R.D. Treatment of proximal deep-vein thrombosis with the oral direct factor Xa inhibitor rivaroxaban (BAY 59–7939): the ODIXa-DVT (Oral Direct Factor Xa Inhibitor BAY 59–7939 in Patients With Acute Symptomatic Deep-Vein Thrombosis) study. **Circulation**, n. 116, v. 2, p. 180–187, 2007.
- AHUJA, S.; JIMIDAR, M.I. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis**. Ed. 1. Academic Press: San Diego, USA. 2008.
- AUGSBURGER, L.L.; HOAG, S.W. **Pharmaceutical dosage forms: tablets**. 3 ed. Taylor & Francis, p. 153-190, 2007.
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2ed. Artmed, 2005.
- BARROS-SENA, M.A., GENESTRA, M. Profilaxia da trombose venosa profunda em pós-operatório de cirurgias ortopédicas em um hospital de traumatologia-ortopedia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**; v. 30, p. 29-35, 2008.
- BELDER, D.; TOLBA, K.; NAGL, S. Rapid quantitative determination of ephedra alkaloids in tablet formulations and human urine by microchip electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 32, p. 440-447, 2011.
- BERNAUER, U., OBEREMM, A., MADLE, S.; GUNDERT-REMY, U. The Use of *in vitro* Data in Risk Assessment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, V.96, P. 176-181, 2005.
- BILITEWSKI, U.; GENRICH, M.; KADOW, S. Biochemical analysis with microfluidic systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 556-569, 2003.
- BOUABIDI, A.; ROZET, E.; FILLET, M.; ZIEMONS, E.; CHAPUZET, E.; MERTENS, B.; KLINKENBERG, R.; CECCATO, A.; TALBI, M.; STREEL, B.; BOUKLOUSE, A.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3180-3192, 2010.
-

BRASIL. Agência nacional de vigilância Sanitária. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun., 2003.

BRISTOW, A.W.T.; NICHOLS, W.F.; WEBB, K.S.; CONWAY, B. Evaluation of protocols for reproducible electrospray in-source collisionally induced dissociation on various liquid chromatography/mass spectrometry instruments and the development of spectral libraries. **Mass Spectrometry**, v. 16, p. 2374-2386, 2002.

BUDZIKIEWICZ, H., SCHAFFER, M. **Massenspektrometrie – Eine Einführung**, 5^o ed. Wiley-VCH: Weinheim, Alemanha, 229-32, 2005

CARSTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. **Drug Stability: Principles and practices**. 3^o ed. Marcel Dekker: Nova York – Basel, 2000.

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

ÇELEBIER, M.; RECBER, T.; KOÇAK, E.; ALTINÖZ, S. RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 359-366, 2013.

systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 377, p. 556-569, 2003.

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

COLTRO, W.K.T. **Fabricação e avaliação de microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

CREVCILLÉN, A.G.; PUMERA, M.; GONZÁLES, M.C.; ESCARPA, A. Carbon nanotube disposable detectors in microchip capillary electrophoresis for water-soluble vitamin determination: analytical possibilities in pharmaceutical quality control. **Electrophoresis**, v. 29, p. 2997-3004, 2008.

ERMER, J.; MILLER, J.H.M. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. A guide to best practice. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

EUROSTAT. European Commission. Statistics on health and safety. Luxemburgo, 2001.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/000944/WC500059301.pdf. Acessado em dezembro de 2013.

FDA. **Food and Drug Administration**. Guidance for industry: Extended release oral dosage forms: Development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations. 1997.

FDA. **Food and Drug Administration**, Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee. 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/cardiovascularandrenaldrugsadvisorycommittee/ucm305922.pdf>. Acessado em janeiro de 2014.

GÖRÖG, S. The changing face of pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n. 1, p 12-17, 2007.

GRUMBACH, E.S.; ARSENAULT, J.C.; McCABE, D.R. **Beginners Guide to UPLC**. Waters Corporation. 2009.

GRUNENBERG, A.; FÄHNRICH, K; QUECKENBERG, O.; REUTE, C; KELL, B.; GUSHURST, K.S.; STILL, W.J. **Co-crystal compound of rivaroxaban and malonic acid**. United States Patent Application Publication. n. 12/994,474, 2009.

GUIHEN, E. Recent advances miniaturization – the role of microchip electrophoresis in clinical analysis. **Electrophoresis**, 35, 138-146, 2014.

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

HE, F.Y.; LIU, A.L.; XIA, X.H. Poly(demethylsiloxane) microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection for rapid measurement of acetaminophen and its hydrolyzate. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, p. 1062-1067, 2004.

HEALTH CANADA. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/sbd-smd/phase1-decision/drug-med/sbd_smd_2009_xarelto_119111-eng.php. Acessado em julho de 2011.

HENRY, C.S. **Microchip capillary electrophoresis: methods and protocols**. New Jersey: Human Press Inc., p. 1-3, 2006.

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

ICH. Harmonized Tripartite Guideline. Guideline on Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1(R2). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2003.

ICH. Harmonized Tripartite Guideline. **Validation of Analytical methods text and methodology** Q2(R1). In: Internacional Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

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

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

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

JACOBSON, S.C.; HERGENRODER, R.; KOUTNY, L.B.; RAMSEY, M.J. High-speed separations on a microchip. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 1114-1118, 1994.

JAIN, D.; BASNIWAL, P.K. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 11-35, 2013.

JANSSEN PHARMACEUTICAL, INC. **Xarelto information for US healthcare professionals**. <http://www.xareltohcp.com/about-xarelto/about-xarelto.html> (Acessado em 15/11/2015).

-
- JARDIM, I.F., COLLINS, C.H., GUIMARÃES, L.F.L. IN.: Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos da cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP; cap. IX, p. 273-398, 2006.
- KAILASA, S.K.; KANG, S.H. Microchip-based capillary electrophoresis for DNA analysis in modern biotechnology: A review. **Separation and Purification Review**, v. 38, p. 242-288, 2009.
- KAMATA, K., KAWAMOTO, H., HONMA, T., IWAMA, T., KIM, S.H. Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**; v 95, p. 6630-6635, 1998.
- KREUTZ, R. Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, n. 26, p. 27-32, 2012.
- KUBITZA, D., BECKA, M., VOITH, B., ZUEHLSDORF, M., WENSING, G. Safety, pharmacodynamics and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, na oral direct factor Xa inhibitor. **Clinical Pharmacology Therapy**; v. 78, p. 412-421, 2005.
- LACHMAN, L. LIEBERUAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouse Gulben Kian, 2001. p. 1517.
- LANDERS, J.P. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3rd ed. Boca Ratom, FL: CRC Press, 2008
- LEE, H. Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28,p. 1161-1202, 2008.
- LANG, D.; FREUDENBERGER, C., WEINZ, C. In vitro metabolism of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in liver microsomes and hepatocytes of rats, dogs and humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 5, p. 1046-1055, 2009.
- MAGIERA, S. Fast, simultaneous quantification of three novel cardiac drugs in human urine by MEPS-UHPLC-MS/MS for therapeutic drug monitoring. **Journal of Chromatography B**, vol. 938, p. 86-95, 2013.
- MALDANER, L.; JARDIN, IC. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, 2009.
-

MANZ, A.; HARRISON, D.J.; VERPOORTE, E.M.; FETTINGER, J.C.; PAULUS, A.; LUDI, H.; WIDMER, H.M. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: capillary electrophoresis on a chip. **Journal of Chromatography**, n. 593, p. 253 – 258, 1992.

MARSH, A., BRODERICK, M., ALTRIA, K., POWER, J., DONEGAN, S., CLARCK, B. **Capillary electrophoresis for pharmaceutical analysis**. In: Capillary electrophoresis: methods and protocols, edited by P. Schmitt-Kopplin, Muchen, Germany: Humana press, p. 2005-245, 2008.

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

MARTINEZ-HIDALGO, M.P.V. Alternativas a La experimentacion animal em toxicologia: situación actual. **Acta Bioethica**, v. 13, p. 41-52, 2007).

MARCOS, M. **Determinação de medicamentos antiepilépticos e anticonvulsivantes por UPLC-MS/MS**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química Forense) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011

McBRIDE, B.F. A preliminary assessment of clinical differences between novel oral anticoagulants currently in development. **The Journal of Clinical Pharmacology**; v. 45, p. 1004-1017, 2005.

MEHTA, S.; SHAH, R.P.; SINGH, S. Strategy for identification and characterization of small quantities of drug degradation products using LC and LC–MS: application to valsartan, a model drug. **Drug Testing and Analysis**, v. 2, p. 82-90, 2010.

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

NORDMAN, N.; SIKANEN, T.; MOILANEN, M.A.; AURA, S.; KOTIAHO, T.; FRANSSIL, S.; KOSTIAINEN, R. Rapid and sensitive drug metabolism studies by SU-8 microchip capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 739-745, 2011.

NARAYANAM, M.; HANDA, T.; SHARMA, P.; JHAJRA, S.; MUTHE, P.K.; DAPPILI, P.K.; SHAH, R.P.; SINGH, S. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 191-217, 2014.

NUDELMAN, N.E.S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.

OHLA, S.; BEYREISS, R.; SCRIBA, G.K.E.; FRAN, Y.; BELDER, D. An integrated on-chip system. **Electrophoresis**, v. 31, p. 3263-3267, 2010.

OHLA, S.; BELDER, D. Chip-based separation devices coupled to mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, 16, 453-459, 2012

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

PAN, C.; JIANG, Y.; WEN, H.; MOTTO, M. Identification of a drug degradation product found in a stressed dosage form using LC/MSn, LC/TOF MS and on-line H/D exchange MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 57, p. 99-103, 2012.

PYELL, U. Capillary electromigration separation techniques – current trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 20-22. 2003.

RAMISETTI, N.R.; KUNTAMUKKALA, R. Development and validation of a stability indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process related and stress degradation products of rivaroxaban. **Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 23155-23167, 2014.

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

REYES, D.R.; LOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.; MANZ, A. A micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2623-2636, 2002.

ROEHRIG, S., STRAUB, A., POHLMANN, J., LAMPE, T., PERNERSTORTER, P., SCHLEMMER, K.K. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-

oxo-3-[4-(3-oxazolidin-5-yl)methyl]thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939: An oral, direct factor Xa inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, p. 5900, 2005.

ROHDE, G. Determination of rivaroxaban – a novel. oral, direct factor Xa inhibitor – in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Chromatography B**, v. 872, p. 43-50, 2008

SCHAPPLER, J.; VEUTHEY, J.-I.; RUDAZ, S. **Coupling CE and microchip-based devices with mass spectrometry**. In: Capillary Electrophoresis Methods of Pharmaceutical Analysis, Editado por AHUJA, S.; JIMIDAR, M.I. Elsevir Inc.: Londres, UK. Vol. 9, 481, 2008.

SETTLER, F.A. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. Ed. Prentice Hall, NY, 1997.

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

SINGH, S; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology On-line**, April, p. 1-14, 2000.

SONG, Z.; XU, Y.; CHEN, Z.; YANG, J.; LI, X.; ZHANG, Z. Quantification of lactate in synovia by microchip with contactless conductivity detection. **Analytical Biochemistry**, v. 434, p. 73-77, 2013.

STUART, B. Modern infrared spectroscopy. University of Greenwich, 1996. John Wiley & Sons, England, UK.

SÜSLÜ, I.; ÇELEBIER, M.; ALTINÖZ, S. Electrochemical behaviour investigation and square-wave voltammetric determination of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. **Analytical Methods**, v. 6, p. 9397-9403, 2014.

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

TAKÁCS-NOVÁK, K.; SZÖKE, V.; VÖGYI, G.; HORVÁTH, P.; AMBRUS, R.; SZABÓ-RÉVÉSZ. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. n. 83, p. 279-285, 2013.

-
- TAN, W.; FAN, Z.H.; QIU, C.X.; RICCO, A.J.; GIBBONS, L. Miniaturized capillary isoelectric focusing in plastic microfluidic devices. **Electrophoresis**, 23, 3638, 2002.
- UMEMOTO, Y.; KATAOKA, M.; YATSUSHIRO, S.; WATANABE, M.; KIDO, J.; KAKUHATA, R.; YAMAMOTO, T.; SHINOHARA, Y.; BABA, Y. Sequential analysis of RNA synthesis by microchip electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 388, p. 161-163, 2009.
- VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments. **Analytical Chemistry** 76, 3373-3385, 2004.
- VILLIERS. A., Evaluation of Ultra Performance Liquid Chromatography Part I. Possibilities and Limitations. **Journal of Liquid Chromatography**. v. 1127, p. 60-69, 2006.
- 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.
- WEINER, D. Modeling, simulation, and the critical path. **Drug Discovery and Development**, v. 12, p. 54-64, 2006
- WEINZ, C.; SCHWARZ, T.; KUBITZA, D.; MUEK, W.; LANG, D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n.5, p. 1056-1064, 2009.
- WISSMANN, P.J.; GROVER, M.A.A. A new approach to batch process optimization using experimental design. **American Institute of chemical Engineers Journal**, v. 55, n. 2, p. 342-353, 2009.