

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA AVALIAÇÃO DE  
IMPUREZAS ORGÂNICAS DE TICAGRELOR**

LÍVIA MARONESI BUENO

Porto Alegre, 2016.



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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA AVALIAÇÃO DE  
IMPUREZAS ORGÂNICAS DE TICAGRELOR**

Dissertação apresentada por **Lívia Maronesi Bueno**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cássia Virginia Garcia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31 de março de 2016, pela Banca Examinadora, constituída por:

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leandro Tasso  
Universidade de Caxias do Sul

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

Maronesi Bueno, Livia  
Desenvolvimento de método analítico para avaliação  
de impurezas orgânicas de ticagrelor / Livia Maronesi  
Bueno. -- 2016.  
129 f.

Orientadora: Cássia Virginia Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2016.

1. controle de qualidade. 2. método analítico. 3.  
CLAE. 4. análise de impurezas. 5. ticagrelor. I.  
Garcia, Cássia Virginia, orient. II. Título.

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



*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”*

*Paulo Freire.*



A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço.

À professora Dra. Cássia Virginia Garcia pela oportunidade, pela confiança depositada em mim e pela orientação, sempre paciente e incentivadora, ao longo desses dois anos.

Aos professores Dr. Martin Steppe e Dra. Nádia Volpato pelos ensinamentos, e à professora Dra. Elfrides E. S. Schapoval pelo exemplo de ser humano e profissional.

Aos colegas do laboratório de Controle de Qualidade pelas trocas de conhecimentos e experiências e também pelos momentos de descontração.

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

À CAPES pelo apoio financeiro.

*“Happiness is only real when shared”*

Aos meus amigos, agradeço, dedico e compartilho este trabalho e a felicidade por ter chegado até aqui.

Às colegas e amigas Mariana, Letícia, Rafaela e Joanna pela relação construída para além do laboratório, pela parceria e também por estarem sempre dispostas a ajudar.

Às amigas “Bois”, por estarem comigo desde o começo, sendo a minha família na capital.

À Manu, Vanessa, Taíse e Marina, pelos 11 anos de amizade e por terem acompanhado toda minha trajetória até aqui.

Aos “migos Ciudadancers”, pela leveza e alegria legítima dos encontros, fundamentais nos momentos de cansaço e aflição.

Ao Léo, por todo apoio e ajuda com o trabalho e, principalmente, pela amizade e pelas tantas histórias compartilhadas.

À Bruna, por estar sempre por perto, apoiando e torcendo, e à Kamyla, que mesmo longe se fez presente e preencheu muitos dos meus dias.

À Carol, por ter caminhado ao meu lado, dividindo todas as angústias e incertezas, apoiando decisões, comemorando conquistas, sonhando futuros e vivendo presentes.

Aos meus pais, Sérgio e Lenir, e ao meu irmão Eduardo, por acreditarem no meu sonho e sempre terem apoiado minhas escolhas. Saibam que todas as minhas conquistas são de (e para) vocês.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Panorama da ativação e inibição das plaquetas através de mediadores endógenos e terapias antiplaquetárias.	35
Figura 2. Estrutura química do ticagrelor.	38
Figura 3. Mecanismo de ação do ticagrelor.	40
Figura 4. Rota de retrossíntese do ticagrelor.	41
Figura 5. Representação da rota de síntese do ticagrelor.	42
Figura 6. Estruturas de impurezas de síntese de ticagrelor.	56
Figura 7. Espectro na região do ultravioleta da solução de ticagrelor SQR.	57
Figura 8. Curva de aquecimento de ticagrelor SQR realizada por DSC.	58
Figura 9. Espectro de massas da SQR de ticagrelor com fragmentação do íon molecular.	60
Figura 10. Espectro de absorção na região do infravermelho da SQR de ticagrelor.	61
Figura 11. Espectro de absorção na região do infravermelho da SQR da Impureza 1.	62
Figura 12. Espectro de absorção na região do infravermelho da SQR da Impureza 2.	63
Figura 13. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da Impureza 1.	64
Figura 14. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da Impureza 2.	65
Figura 15. Espectros na região do ultravioleta das impurezas 1 e 2, respectivamente.	72
Figura 16. Cromatograma da mistura do fármaco e impurezas nas condições originais do método.	73
Figura 17. Cromatograma da mistura dos analitos utilizando coluna C8 de 150 mm.	74
Figura 18. Cromatograma da mistura dos analitos, mudando a proporção da fase móvel para 54:46 (acetonitrila:água v/v).	75
Figura 19. Cromatograma da mistura dos analitos utilizando fase móvel com pH ácido.	76

Figura 20. Cromatograma da mistura dos analitos com fase móvel composta por acetonitrila:acetato de amônio 50 mM (57:43 v/v), pH 8,2.	77
Figura 21. Cromatograma da solução placebo contendo os excipientes presentes nos comprimidos de ticagrelor.	84
Figura 22. Cromatograma correspondente a injeção do diluente utilizado no preparo das amostras (acetonitrila:água 57:43).	86
Figura 23. Representação gráfica da curva de calibração da impureza 1 obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.	88
Figura 24. Representação gráfica da distribuição residual de regressão linear da impureza 1.	88
Figura 25. Representação gráfica da curva de calibração da impureza 2 obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.	88
Figura 26. Representação gráfica da distribuição residual de regressão linear da impureza 2.	90
Figura 27. Representação gráfica da curva de calibração do ticagrelor obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.	90
Figura 28. Representação gráfica da distribuição residual de regressão linear do ticagrelor.	92
Figura 29. Cromatograma, em zoom, da análise de uma solução de comprimidos de ticagrelor a 750 µg/ml.	102
Figura 30. Cromatogramas dos testes de degradação forçada do ticagrelor.	111
Figura 31. Cromatograma da amostra degradada de ticagrelor após injeção em CLAE com injetor manual.	112
Figura 32. Espectro de massas do padrão de ticagrelor.	113
Figura 33. Espectro de massas do produto de degradação T8.	113
Figura 34. Espectro de massas do produto de degradação T10.	114
Figura 35. Proposta de degradação do ticagrelor com formação dos produtos T10 e T8.	115
Figura 36. Proposta de degradação do ticagrelor com formação direta do produto T8.	117

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites de notificação, identificação e qualificação de impurezas em substâncias ativas.	46
Tabela 2. Classificação dos solventes com base nos seus limites permitidos.	47
Tabela 3. Limites de notificação, identificação e qualificação para produtos de degradação.	49
Tabela 4. Atribuição das principais bandas do espectro de IV do ticagrelor.	61
Tabela 5. Atribuição das principais bandas do espectro de IV da impureza 1.	62
Tabela 6. Atribuição das principais bandas do espectro de IV da impureza 2.	63
Tabela 7. Atribuição dos picos obtidos no espectro de RMN <sup>1</sup> H da impureza 1.	65
Tabela 8. Atribuição dos picos obtidos no espectro de RMN <sup>1</sup> H da impureza 2.	65
Tabela 9. Condições cromatográficas pré-estabelecidas.	70
Tabela 10. Valores dos principais parâmetros analíticos avaliados durante o desenvolvimento do método.	77
Tabela 11. Condições cromatográficas definidas para a validação do método.	78
Tabela 12. Diluições da impureza 1 para avaliação da linearidade.	80
Tabela 13. Diluições da impureza 2 para avaliação da linearidade.	80
Tabela 14. Diluições do ticagrelor para avaliação da linearidade.	81
Tabela 15. Preparo das soluções para avaliação da exatidão.	82
Tabela 16. Alterações nas condições do método cromatográfico para avaliação da robustez.	83
Tabela 17. Estatística de regressão linear da impureza 1.	87
Tabela 18. Resíduos da regressão linear obtidos a partir dos resultados da linearidade da impureza 1.	87
Tabela 19. Estatística de regressão linear da impureza 2.	89
Tabela 20. Resíduos da regressão linear obtidos a partir dos resultados da	89

linearidade da impureza 2.	
Tabela 21. Estatística de regressão linear do ticagrelor.	91
Tabela 22. Resíduos de regressão linear obtidos a partir dos resultados da linearidade do ticagrelor.	91
Tabela 23. Resultados da precisão intra-dia e interdias da impureza 1.	93
Tabela 24. Resultados da precisão intra-dia e interdias da impureza 2.	93
Tabela 25. Resultados da precisão intra-dia e interdias do ticagrelor.	94
Tabela 26. Percentuais de recuperação obtidos nas diferentes concentrações para a impureza 1.	95
Tabela 27. Percentuais de recuperação obtidos nas diferentes concentrações para a impureza 2.	95
Tabela 28. Percentuais de recuperação obtidos nas diferentes concentrações para o ticagrelor.	95
Tabela 29. Resultados da avaliação da robustez do método na análise da impureza 1.	98
Tabela 30. Resultados da avaliação da robustez do método na análise da impureza 2.	99
Tabela 31. Resultados da avaliação da robustez do método na análise do ticagrelor.	100
Tabela 32. Condições cromatográficas para análise da amostra degradada de ticagrelor.	109

## RESUMO

O ticagrelor é um novo fármaco destinado para a prevenção de síndromes coronarianas agudas (SCA) caracterizadas pela formação de placas ateroscleróticas que se rompem no interior das artérias. Atua de forma diferenciada na inibição da ação plaquetária, inibindo de forma reversível e não competitiva o receptor P2Y<sub>12</sub>, o qual atua diretamente na agregação das plaquetas. Este medicamento está registrado no Brasil desde 2011, sob nome comercial de Brilinta®, na forma de comprimidos revestidos de 90 mg, e, até o presente momento, são poucos os estudos publicados a respeito do controle de impurezas e produtos de degradação do fármaco. No presente trabalho foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) adaptado para a análise de impurezas orgânicas do ticagrelor. O método por CLAE foi estabelecido utilizando equipamento Agilent 1200 Series, acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD) em 270 nm, com coluna cromatográfica Zorbax Plus C8 (150 x 4,6 mm, 5,0 µm), fluxo de 0,7 ml/min, volume de injeção de 20 µl e temperatura constante de 25°C. A fase móvel foi composta de acetonitrila: acetato de amônio 50 mM (57:43, v/v), pH 8,2. O método demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto, sendo adequado para a finalidade a que foi proposto. Além disso, foram elucidados os principais produtos de degradação originados quando as amostras dos comprimidos de ticagrelor em solução foram expostas à radiação UVC por duas horas, com base em um estudo preliminar de estabilidade do mesmo. Os mecanismos envolvidos na degradação fotolítica do ticagrelor também foram propostos.

**Palavras-chave:** ticagrelor, CLAE, validação, impurezas orgânicas, produtos de degradação.



## ABSTRACT

Ticagrelor is a new drug intended for the prevention of acute coronary syndromes (ACS) characterized by the formation of atherosclerotic plaques that rupture inside the arteries. Ticagrelor reversibly binds to P2Y<sub>12</sub> receptor, which acts directly on platelet aggregation. The drug was approved in Brazil in 2011, under the commercial name Brilinta® in the form of coated tablets of 90 mg, and until now has few published studies about the impurities control and degradation products. In this study, it was developed a method by high-performance liquid chromatography (HPLC) for the analysis of organic impurities of ticagrelor. The HPLC method was established using Agilent 1200 Series equipment coupled to photodiode array detector (PDA) at 270 nm with a Zorbax Plus C8 column (150 x 4.6 mm, 5.0 μm), flow rate of 0.7 ml/min, injection volume of 20 μL, and a constant temperature of 25°C. The mobile phase consisted of acetonitrile: ammonium acetate 50 mM (57:43 v/v), pH 8.2. The method demonstrated to be specific, linear, precise, accurate and robust, being suitable for the intended purpose. Besides, the major degradation products formed when samples of ticagrelor tablets in solution were exposed to UVC radiation for two hours were elucidated based on a preliminary stability study. The mechanisms involved in photolytic degradation of ticagrelor have also been proposed.

**Keywords:** ticagrelor, HPLC, validation, organic impurities, degradation products.



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>31</b>
3.1	Doenças cardiovasculares	33
3.2	Fármacos anti-trombóticos	36
3.3	Ticagrelor	37
3.3.1	Síntese	41
3.3.2	Análise quantitativa	42
3.3.3	Estudos de estabilidade	43
3.3.4	Análise de impurezas do ticagrelor	44
3.4	Análise e controle de impurezas em produtos farmacêuticos	44
3.4.1	Resíduos de solvente	46
3.4.2	Impurezas inorgânicas	47
3.4.3	Impurezas orgânicas	47
3.5	Metodologia analítica para análise de impurezas	49
3.6	Validação da metodologia analítica	51
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) DE TICAGRELOR E SUAS IMPUREZAS</b>	<b>53</b>
4.1	Introdução	55
4.2	Materiais	55
4.2.1	Substâncias químicas de referência (SQR) de ticagrelor e das impurezas	55
4.3	Metodologia	56
4.3.1	Espectrofotometria na região do UV	56
4.3.2	Calorimetria Exploratória Diferencial	57
4.3.3	Espectrometria de Massas	58
4.3.4	Espectroscopia no infravermelho	60
4.3.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	64
4.4	Conclusões	66
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO II. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS DE TICAGRELOR</b>	<b>67</b>
5.1	Introdução	69
5.2	Metodologia	69

5.2.1	Teste de solubilidade .....	70
5.2.2	Escolha do comprimento de onda para detecção .....	70
5.2.3	Testes de fase móvel e colunas cromatográficas.....	71
<b>5.3</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>71</b>
5.3.1	Teste de solubilidade .....	71
5.3.2	Escolha do comprimento de onda para detecção .....	71
5.3.3	Testes de fase móvel e colunas cromatográficas.....	72
<b>5.4</b>	<b>Validação do método analítico.....</b>	<b>78</b>
5.4.1	Teste de especificidade/seletividade .....	79
5.4.2	Limites de detecção e quantificação.....	79
5.4.3	Linearidade .....	79
5.4.4	Precisão (repetibilidade e precisão intermediária) .....	81
5.4.5	Exatidão.....	81
5.4.6	Robustez .....	82
<b>5.5</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>83</b>
5.5.1	Especificidade e seletividade.....	83
5.5.2	Limites de detecção e quantificação.....	85
5.5.3	Linearidade .....	86
5.5.4	Precisão.....	93
5.5.5	Exatidão.....	95
5.5.6	Robustez .....	97
<b>5.6</b>	<b>Aplicação do método desenvolvido na análise do produto farmacêutico.....</b>	<b>101</b>
5.6.1	Resultado e discussão .....	101
<b>5.7</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO III. ELUCIDAÇÃO DAS ESTRUTURAS DO PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO TICAGRELOR E PROPOSTA DE ROTA DE DEGRADAÇÃO.....</b>	<b>105</b>
6.1	Introdução .....	107
6.2	Materiais e métodos.....	108
6.2.1	Sistema cromatográfico e espectrômetro de massas .....	109
6.3	Resultados e discussão.....	110
6.4	Conclusão.....	118
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>123</b>

---

## 1 INTRODUÇÃO

---



As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte em mulheres e homens no Brasil, sendo responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos. Só no ano de 2009, estima-se que mais de 300.000 indivíduos vieram a óbito em decorrência dessas DCV, e dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia indicam que em 2015 os óbitos foram de 346.896 (MANSUR e FAVARATO, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, mais de 17 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares no ano de 2008 em todo o mundo, sendo que mais de 3 milhões dessas mortes ocorreram antes dos 60 anos de idade e poderiam ter sido amplamente prevenidas (WHO, 2011).

As DCV são caracterizadas por um conjunto de desordens do coração e vasos sanguíneos, geralmente ocasionadas por alguma falha na irrigação sanguínea de órgãos como coração, cérebro e membros inferiores e superiores como braços e pernas (WHO, 2011).

Dentro dessa definição está inserida a Síndrome Coronariana Aguda (SCA), termo utilizado para descrever uma série de doenças resultantes da redução do fluxo sanguíneo para o músculo cardíaco, entre elas o infarto agudo do miocárdio em progressão ou a ameaça iminente do infarto (angina instável) (TGA, 2011).

A ocorrência da SCA se dá pelo acúmulo de gordura e consequente formação de placas na parede interna das artérias, o que caracteriza a aterosclerose. Quando as placas ateroscleróticas se rompem, ocorre a ativação e agregação de plaquetas, levando à formação de trombos que causam a oclusão total ou parcial dos vasos, podendo culminar em infarto e AVC (TGA, 2011).

Nas últimas décadas, evidências crescentes demonstram que a adenosina difosfato inicia a agregação plaquetária pela ativação do receptor P2Y<sub>12</sub> acoplado à proteína G. Devido a sua função central na formação e estabilização de trombos, o receptor P2Y<sub>12</sub> é agora um alvo bem estabelecido de fármacos antitrombóticos, especialmente as tienopiridinas como o clopidogrel e o prasugrel, que são inibidores irreversíveis do P2Y<sub>12</sub> (ZHANG *et al.*, 2012). No entanto, estes fármacos apresentam algumas limitações, que incluem um início lento de ação, um efeito antiplaquetário modesto e variabilidade na resposta do fármaco ligada a comorbidades, polimorfismos nas enzimas envolvidas na sua conversão para o metabólito ativo e interações com outros medicamentos comumente utilizados, tais

como omeprazol, estatinas e bloqueadores de canais de cálcio (FRANCHINI & MANNUCCI, 2009; MICHELSON, 2010).

A fim de contornar estas deficiências, nos últimos anos foram desenvolvidas novas substâncias que agem no receptor P2Y<sub>12</sub>, dentre elas o ticagrelor (TGA, 2011).

O ticagrelor é o primeiro agente de uma nova classe de ciclopentiltriazolopirimidinas que se liga de forma seletiva e reversível ao receptor P2Y<sub>12</sub>, impedindo a transdução de sinal e, assim, diminuindo significativamente a agregação plaquetária (SCHNEIDER, 2011; STONE, 2010; WIDIMSKI *et al.*, 2012).

Dentre as vantagens deste novo fármaco sobre as tienopiridinas estão, por exemplo, o seu rápido início de ação, por não ser um pró-fármaco que necessita ser transformado no seu metabólito ativo; rápida suspensão da ação em caso de necessidade de cirurgia, uma vez que o ticagrelor faz uma ligação reversível com o receptor; menor variabilidade de resposta entre pacientes; e uma maior inibição da agregação plaquetária sem um aumento do risco de sangramento (TGA, 2011).

O ticagrelor é comercializado no Brasil sob o nome comercial de Brilinta® e teve seu registro concedido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2011. A forma farmacêutica em que se apresenta é de comprimidos revestidos de 90 mg, podendo ser administrado duas vezes ao dia.

O controle de qualidade de medicamentos tem papel de extrema importância no que se refere à segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos, atuando de forma incessante para que os fabricantes possam comprovar a qualidade de seus produtos, em todos os aspectos, junto aos órgãos reguladores.

Uma vez que o ticagrelor ainda é considerado um medicamento recente, são poucos os trabalhos que descrevem métodos para análise de impurezas do fármaco aplicáveis à forma farmacêutica comprimidos e à matéria-prima. Além disso, até o presente momento, não há monografia em farmacopeias, o que indica a necessidade de desenvolvimento de métodos para o controle de qualidade do medicamento.

As exigências relacionadas às análises que devem ser realizadas nos produtos farmacêuticos estão cada vez maiores e abrangentes, englobando desde os estudos de desenvolvimento e pré-formulação, passando pelos processos de produção e estabilidade, monitorando o medicamento até o fim do seu prazo de validade.

Um dos aspectos que, justamente, estão recebendo maior enfoque atualmente por parte das agências regulatórias da área são os estudos de estabilidade e controle de impurezas dos produtos farmacêuticos, seja matéria-prima ou produto acabado.

Sabe-se que os ativos farmacêuticos presentes em formulações podem não estar absolutamente puros. Não é incomum que estes apresentem quantidades variáveis de substâncias estranhas em sua composição. Dentro da definição de impurezas, estão incluídos desde os intermediários de síntese do ativo, resíduos de solventes utilizados na síntese ou até mesmo nos processos de produção do medicamento, até os produtos de degradação originados durante o armazenamento do produto acabado, por processos reativos entre fármaco e material de embalagem, fármaco e excipientes ou ação de fatores ambientais externos. (ICH Q3A(R2), 2006) (ICH Q3B(R2), 2006).

Tais substâncias, quando em níveis elevados, podem afetar não apenas os parâmetros de segurança do fármaco por produzir reações adversas e toxicidade, mas também alterar as características originais de solubilidade, interferindo diretamente na sua eficácia terapêutica.

Dessa forma, para garantir a qualidade dos medicamentos, as impurezas devem ser cuidadosamente monitoradas. É importante entender o que constitui uma impureza e identificar fontes potenciais de tais substâncias.

Por esta razão, a caracterização do perfil de impurezas representa um desafio analítico considerável, tendo em vista variabilidade de entidades químicas que podem permanecer como contaminantes residuais do processo de obtenção do ativo farmacêutico ou mesmo de processos de degradação ao longo do período de armazenamento.

Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos analíticos seletivos para a detecção e separação dessas impurezas nos produtos farmacêuticos se torna cada vez mais necessário dentro do controle de qualidade (AHUJA, 2007), bem como garantir a confiabilidade nos resultados de métodos com alta sensibilidade, por meio dos estudos de validação analítica.



---

## **2 OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo geral

- Desenvolver e validar método para detecção, identificação e quantificação de impurezas orgânicas de ticagrelor.

## 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as substâncias químicas de referência (SQR) de ticagrelor e de suas impurezas de síntese pelas técnicas analíticas de espectrofotometria na região de Infravermelho (IV) e no ultravioleta (UV), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).
- Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para detecção e quantificação de impurezas de síntese do ticagrelor.
- Verificar a estabilidade do fármaco frente à ação da luz UVC a fim de conhecer o seu perfil de degradação fotolítica e determinar as possíveis rotas de decomposição;
- Realizar a elucidação estrutural das impurezas orgânicas detectadas através da injeção direta dos produtos de degradação formados em espectrômetro de massas.



---

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

---



### 3.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade, morbidade e hospitalização no mundo desenvolvido (TGA, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2012, o que representa 31% de todas as mortes globais. Dessas mortes, avalia-se que 7,4 milhões foram devido a doença cardíaca coronariana e 6,7 milhões foram devido a acidente vascular cerebral (WHO, 2011).

Dados apresentados pela American Heart Association demonstram que mais de 80 milhões de americanos adultos (1 a cada 3) tem um ou mais tipos de doenças cardiovasculares, e cerca de 40.400.000 destes possuem mais de 60 anos de idade (ROGER *et al.*, 2011).

No Brasil, as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte em mulheres e homens, e são responsáveis por cerca de 20% de todas as mortes em indivíduos acima de 30 anos. Em um trabalho publicado por Mansur e Favarato (2012), onde foi realizada uma atualização dos dados de mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo entre os anos de 1990 até 2009, observou-se uma progressiva redução da morte por doenças isquêmicas do coração (DIC) e doenças cerebrovasculares (DCbV). No entanto, quando comparadas com os países que integram o estudo MONICA da Organização Mundial da Saúde, as mortalidades por DIC e DCbV na região metropolitana de São Paulo e no Brasil estão entre as mais altas do mundo (MANSUR e FAVARATO, 2012).

As doenças cardiovasculares são patologias complexas e multifatoriais, caracterizadas por diversos elementos como níveis elevados de colesterol e triglicerídeos séricos, aumento no fibrinogênio plasmático e fatores de coagulação, ativação plaquetária aumentada e alterações no metabolismo da glicose (WOOD, 2001).

Os fatores de risco que podem contribuir para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares são de origem tanto metabólicas, como dislipidemia, hipertensão, diabetes e sobrepeso/obesidade, quanto comportamentais (tabagismo e sedentarismo) e até mesmo sociais, como pobreza e baixa escolaridade. Existe

forte evidência científica que os fatores de risco comportamentais e metabólicos desempenham um papel fundamental na etiologia dessas doenças (WHO, 2011).

Os ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais são geralmente eventos agudos e são causados principalmente por um bloqueio que impede o fluxo de sangue para o coração ou cérebro. A razão mais comum para isso é o acúmulo de depósitos de gordura nas paredes internas dos vasos sanguíneos que irrigam estes órgãos, levando à formação das chamadas placas ateroscleróticas (WHO, 2011).

A aterosclerose é um processo inflamatório complexo que afeta os vasos sanguíneos de médio e grande porte de todo o sistema cardiovascular e que se desenvolve ao longo de muitos anos. Quando o revestimento (endotélio) destes vasos sanguíneos está exposto a níveis elevados de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (colesterol LDL) e algumas outras substâncias, tais como os radicais livres, estes passam a se depositar sobre a parede endotelial dos vasos. Estes depósitos, as placas ateroscleróticas, fazem com que a superfície interna dos vasos sanguíneos se torne irregular e o lúmen se estreite, tornando mais difícil para o sangue fluir. Além disso, os vasos sanguíneos também se tornam menos flexíveis (WHO, 2011).

A oclusão dos vasos sanguíneos é um processo longo que vai evoluindo durante toda a vida adulta dos indivíduos que possuem propensão a esta doença. Este quadro se agrava quando as placas ateroscleróticas se rompem, pois, a partir de então se inicia a ativação e a agregação das plaquetas, levando a formação de trombos que causam a oclusão total ou parcial dos vasos. A ocorrência deste evento nas artérias coronárias pode resultar na síndrome coronariana aguda (SCA), evoluindo para um ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral (TGA, 2011).

Os mecanismos envolvidos na formação das placas ateroscleróticas são bastante extensos e complexos, e compreendem inúmeras reações no interior dos vasos sanguíneos (Figura 1). Estudos já comprovaram que a adesão plaquetária e a trombose mural são onipresentes na iniciação e geração das lesões de aterosclerose em animais e humanos (ROSS, 1999).

As plaquetas possuem um importante papel na manutenção da integridade vascular na ausência de injúrias, protegendo o organismo contra hemorragias espontâneas. Porém, em locais onde existem lesões vasculares, as plaquetas entram em contato com substâncias subendoteliais expostas, como colágeno e

proteínas fibrosas presentes na parede do endotélio, e iniciam uma cascata de eventos envolvendo várias moléculas sinalizadoras que levam a formação de coágulos sanguíneos e trombos (NIESWANDT *et al.*, 2011).

Os mecanismos pelos quais as plaquetas formam os coágulos, incluindo a síntese de tromboxano A<sub>2</sub>, a sinalização mediada pelo ADP (adenosina difosfato) e a sinalização via glicoproteína IIb-IIIa, são importantes e bem estabelecidos alvos de fármacos utilizados no tratamento e prevenção do risco de eventos aterotrombóticos em pacientes com doenças cardiovasculares (HUBER *et al.*, 2011; WARDEN *et al.*, 2012).

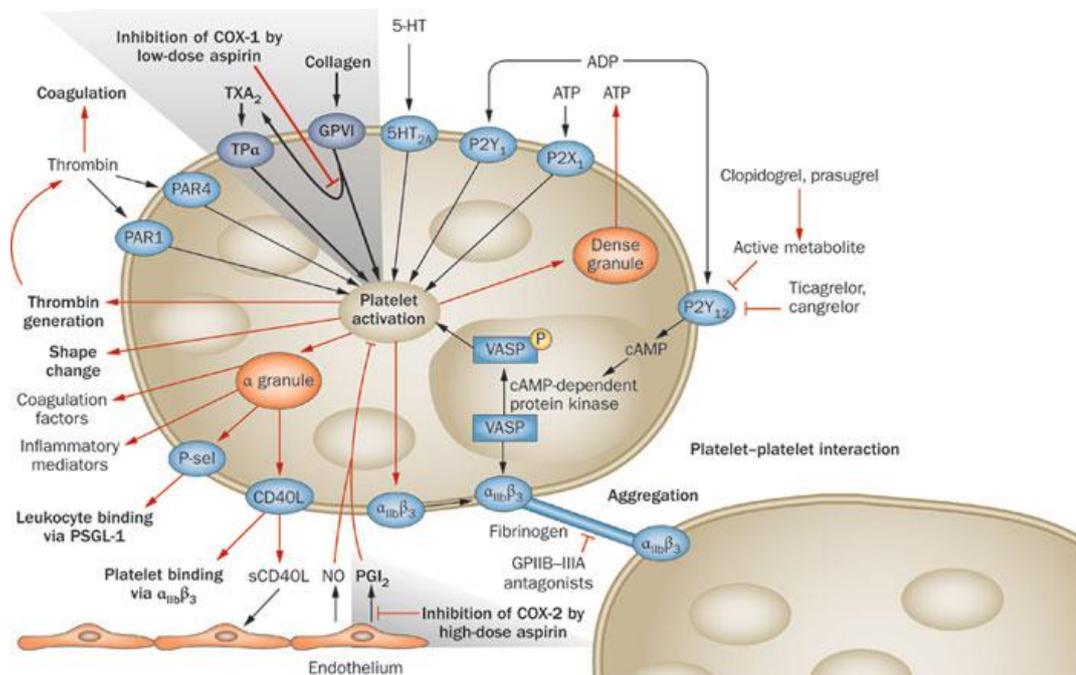


Figura 1. Panorama da ativação e inibição das plaquetas através de mediadores endógenos e terapias antiplaquetárias (WARDEN, 2012).

O ADP liberado das células endoteliais lesionadas e das plaquetas ativadas é um amplificador essencial na ativação plaquetária. As plaquetas expressam dois receptores de ADP, o P2Y1 e o P2Y12, os quais são acoplados as proteínas Gq e Gi2/3, respectivamente. O receptor P2Y1 é responsável pela mobilização de cálcio induzida por ADP necessária para a alteração no formato das plaquetas e sua agregação. Já o receptor P2Y12 inibe a formação de cAMP, permitindo assim a ativação plaquetária por outros agonistas, que de outra forma seriam impedidos.

Estudos realizados com pacientes que não apresentam o receptor P2Y12 mostraram que estes exibiam um “defeito seletivo” na agregação plaquetária induzida por ADP (DAVÌ & PATRONO, 2007). Já no trabalho de Dorsam e Kunapuli (2004), foi observado que camundongos que não possuem este receptor formam apenas pequenos e instáveis trombos, e apresentam uma proteção contra a oclusão arterial e o sangramento prolongado (DORSAM & KUNAPULI, 2004).

Assim, por possuir um importante papel na ativação da agregação plaquetária e consequente formação de trombos, o receptor P2Y12 se tornou um grande alvo de pesquisas, e é crescente o número de estudos desenvolvidos com fármacos antitrombóticos que atuem por esta via de sinalização para o tratamento e prevenção das doenças cardiovasculares, dentre os quais pode-se destacar o clopidogrel, o prasugrel, o cangrelor e o ticagrelor (FRANCHINI & MANNUCCI, 2009; ZHANG *et al.*, 2012).

### **3.2 Fármacos antitrombóticos**

O pioneiro e mais conhecido medicamento com eficácia comprovada utilizado na terapia antiplaquetária é o ácido acetilsalicílico, o AAS, que atua na inibição da síntese de tromboxano A<sub>2</sub>. A partir de 2003, a terapia antiplaquetária dupla foi padronizada, recomendando a utilização de AAS acompanhado de outro fármaco antiagregante, onde o principal tem sido o clopidogrel, um bloqueador irreversível do receptor P2Y12 da adenosina difosfato plaquetária (RABADAN, 2010; WIDIMSKI *et al.*, 2012).

Por ser um pró-fármaco, o clopidogrel requer metabolismo de duas etapas para conversão no seu metabólito ativo, o qual se liga irreversivelmente ao receptor P2Y12. Devido a essa ativação metabólica, o início do efeito do clopidogrel é relativamente lento, com a inibição de plaquetas em estado estacionário obtida 2 a 4 horas após uma dose inicial de 600 mg. Mesmo durante a dose de manutenção, há uma variação interindividual considerável nos níveis de inibição da agregação plaquetária, devido à conversão metabólica ser variável (JAMES *et al.*, 2009).

Além disso, outra desvantagem do clopidogrel é sua reduzida função antiplaquetária devido a uma “resistência” ao fármaco. Isto ocorre em 30 a 55% dos pacientes que apresentam um polimorfismo no gene que codifica o citocromo P450

2C19 (CYP2C19), o qual é responsável pela transformação hepática do clopidogrel no seu metabólito ativo (ZHANG *et al.*, 2012).

Assim como o clopidogrel, o prasugrel também é uma tienopiridina administrada por via oral que inibe a ativação e agregação plaquetária através da ligação irreversível de seu metabólito ativo ao receptor plaquetário P2Y12. O prasugrel é considerado um inibidor mais potente da agregação plaquetária induzida pelo ADP quando comparado com o clopidogrel, atuando de forma mais consistente e mais rápida, o que se pensa ser devido à sua absorção mais eficiente. Outra explicação para as vantagens do prasugrel sobre o clopidogrel seria por sua farmacocinética melhorada. Supõe-se que uma maior taxa de conversão do pró-fármaco para o metabólito ativo é responsável pela ação mais rápida do prasugrel. Além disso, uma menor variabilidade interindividual na sua eficácia e maior biodisponibilidade parecem ser responsáveis pela menor probabilidade de “resistência” ao tratamento (HUBER *et al.*, 2009).

No entanto, apesar das considerações positivas sobre esse pró-fármaco, o prasugrel também apresentou um aumento da taxa de sangramento em pacientes que estavam em maior risco de hemorragia, incluindo pacientes com um histórico de eventos cerebrovasculares, pacientes idosos e pacientes com baixo peso (HUBER *et al.*, 2011).

### 3.3 Ticagrelor

O ticagrelor é o primeiro agente de uma nova classe de ciclopentiltriazolopirimidinas e é uma molécula muito diferente do clopidogrel e do prasugrel (Figura 2). Assim como as tienopiridinas, o ticagrelor também interage com os receptores P2Y12 das plaquetas tornando-os incapazes de se ligar ao ADP, mas, neste caso, a droga não exige necessariamente uma conversão metabólica para interagir com o receptor (SCHNEIDER, 2011; STONE, 2010; WIDIMSKI *et al.*, 2012; WIJEYERATNE & HEPTINSTALL, 2011).

O ticagrelor foi aprovado pela *European Medicines Agency* (EMA) em 2010 e pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2011, sendo comercializado na forma de comprimidos orais revestidos, na dose de 90 mg, sob os nomes comerciais de Brilique® na Europa e Brilinta® na América, produzidos pelo laboratório AstraZeneca

(EMA, 2015; FDA, 2012). A administração do ticagrelor, também em conjunto com o AAS, é aprovada pela Comissão Europeia para a prevenção da aterotrombose em pacientes adultos com síndrome coronariana aguda.

No Brasil, o medicamento Brilinta® está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde 2011 e é indicado na prevenção de eventos trombóticos (morte cardiovascular, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral) em pacientes com síndrome coronariana aguda (ANVISA, 2012; ASTRAZENECA, 2012).

O ticagrelor é quimicamente designado como (1S,2S,3R,5S)-3-(7-((1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamina)-5-(propiltio)-3H-(1,2,3)triazolo(4,5-D)pirimidina-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol. Possui fórmula molecular  $C_{23}H_{28}F_2N_6O_4S$  e peso molecular de 522,57 g/mol. Apresenta-se sob a forma de pó branco e inodoro e é praticamente insolúvel em água independente do pH e pertence a Classe 4 do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (EMA, 2015; SCIFINDER, 2015).

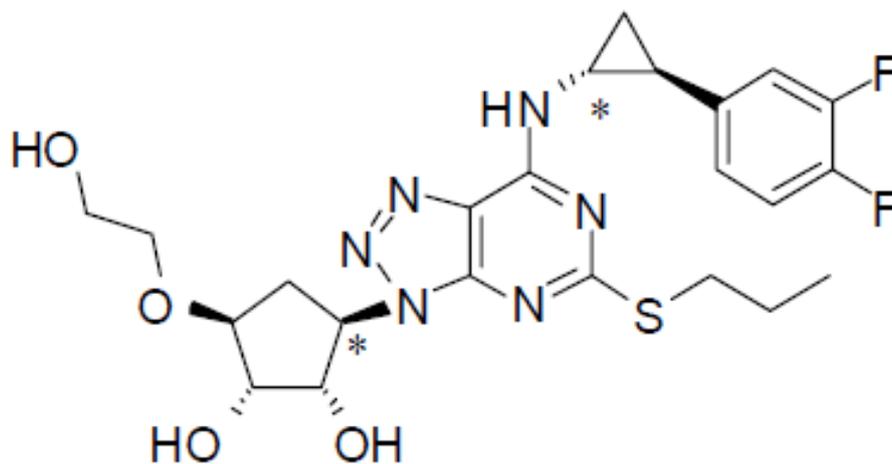


Figura 2. Estrutura química do ticagrelor.

O ticagrelor tem potencial para superar muitas das limitações da terapia com as tienopiridinas. No trabalho de revisão publicado por Husted e Van Giezen (2009), estão compiladas as características desse fármaco que o diferem dos seus predecessores clopidogrel e prasugrel, e que o tornam um medicamento com maior

segurança e eficácia na redução de eventos trombóticos em pacientes com síndrome coronariana aguda.

O ticagrelor não é um pró-fármaco, e, por conseguinte, não requer ativação metabólica para iniciar sua ação farmacológica. Sendo assim, possui um início de ação mais rápido e dependente da sua concentração, além de indicar uma menor variabilidade de resposta entre pacientes com possíveis polimorfismos genéticos. Ademais, por se ligar de forma reversível sobre o receptor P2Y12, oferece uma separação maior entre os efeitos antitrombóticos e tempo de hemorragia, promovendo uma maior e mais consistente inibição da agregação plaquetária sem aumento de sangramento, o que seria uma das principais vantagens desse fármaco em relação às tienopiridinas (HUSTED & VAN GIEZEN, 2009; JAMES *et al.*, 2009).

O mecanismo pelo qual o ticagrelor exerce sua ação antiplaquetária também difere das tienopiridinas. Apesar de ambas as classes serem inibidoras do receptor P2Y12, estudos demonstraram que a classe das ciclopentiltriazolopirimidinas não impede a ligação do ADP ao receptor, sugerindo que o ticagrelor se liga ao receptor P2Y12 num local distinto do local de ligação do ADP, inibindo a sinalização do receptor induzida por ADP de uma forma não competitiva (HUSTED & VAN GIEZEN, 2009).

Uma vez que o ticagrelor não impede a ligação do ADP, a hipótese é que ele age inibindo a mudança conformacional no receptor com ativação da proteína G induzida pelo ADP, consequentemente “travando” o receptor em um estado inativo e incapaz de iniciar uma sinalização induzida pelo ADP (Figura 3) (HUSTED & VAN GIEZEN, 2009).

Estas propriedades oferecem consideráveis benefícios clínicos para o ticagrelor, incluindo uma redução significativa na mortalidade por eventos cardiovasculares, infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral e um perfil de segurança favorável (STEINER *et al.*, 2013).

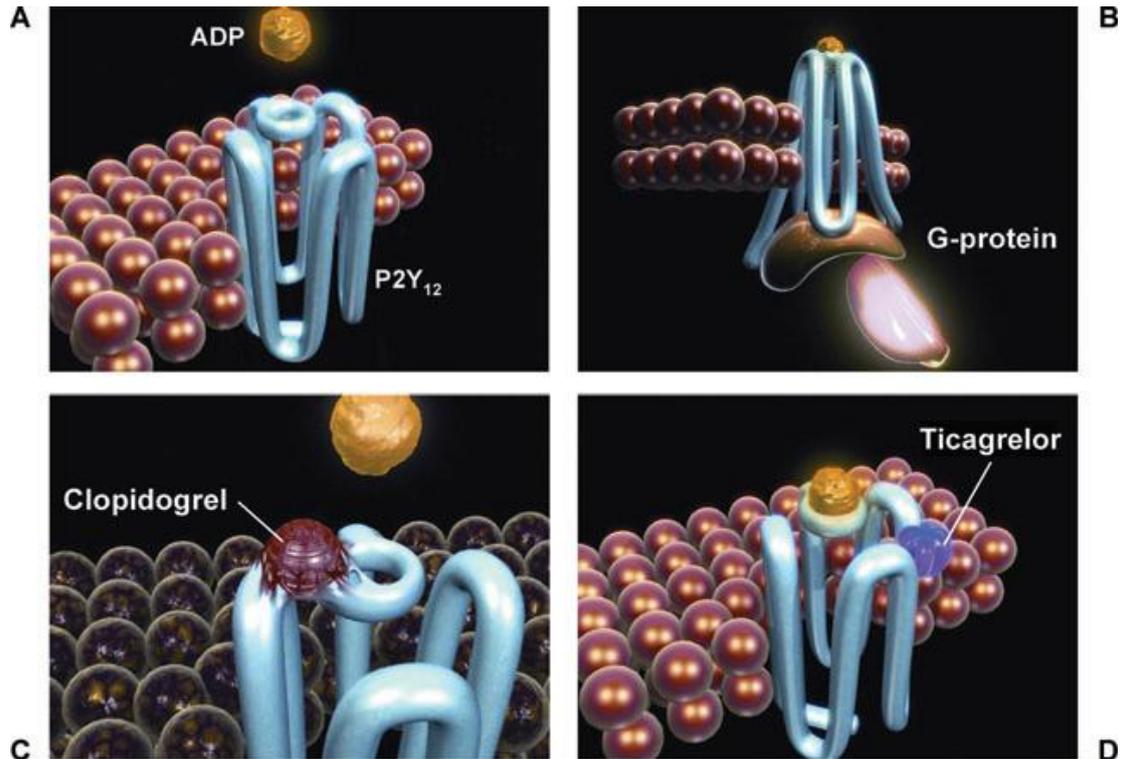


Figura 3. (A e B) ADP se liga ao receptor P2Y<sub>12</sub>, resultando em uma mudança conformacional e ativação da proteína G. (C) Ligação irreversível do metabólito ativo do clopidogrel ao receptor P2Y<sub>12</sub>. (D) Ligação reversível do Ticagrelor ao receptor P2Y<sub>12</sub> em um sítio distinto ao sítio de ligação do ADP, mudando a conformação do receptor e tornando-o inativo momentaneamente (HUSTED & VAN GIEZEN, 2009).

O ticagrelor é rapidamente absorvido após a administração oral. Ele é metabolizado principalmente através de enzimas do citocromo P450 3A e tem um metabólito ativo conhecido, o ARC124910XX, que está presente no sangue em cerca de um terço da concentração do fármaco. Embora este metabólito também exerça efeito na inibição do receptor P2Y<sub>12</sub> equivalente à do composto original, a ativação metabólica não é um requisito para a inibição da agregação plaquetária ocorrer. A farmacocinética do ticagrelor e do seu metabólito são previsíveis, com concentrações plasmáticas proporcionais à dose após dosagem inicial e estável no estado de equilíbrio (HUSTED & VAN GIEZEN, 2009).

Em humanos, o ticagrelor é rapidamente absorvido e extensivamente metabolizado, e a maior rota de excreção do fármaco é via fezes, com uma pequena fração sendo eliminada pela urina (TENG *et al.*, 2010; EMA, 2015).

### 3.3.1 Síntese

Pela análise retróssintética do ticagrelor demonstrada no trabalho de Zhang e colaboradores (2012) observam-se três principais estruturas químicas fazendo parte de sua molécula (Figura 4). Na rota de síntese do ticagrelor descrita pelo autor, a sua formação se dá pela “reação do dicloreto de pirimido (2) com o amino álcool (3), obtendo-se a amino pirimidina (5), a qual foi convertida para triazolopirimidina sob condições de diazotização. A reação da triazolopirimidina com (4) proporcionou a formação do ticagrelor”, conforme demonstrado na Figura 5. (ZHANG *et al.*, 2012).

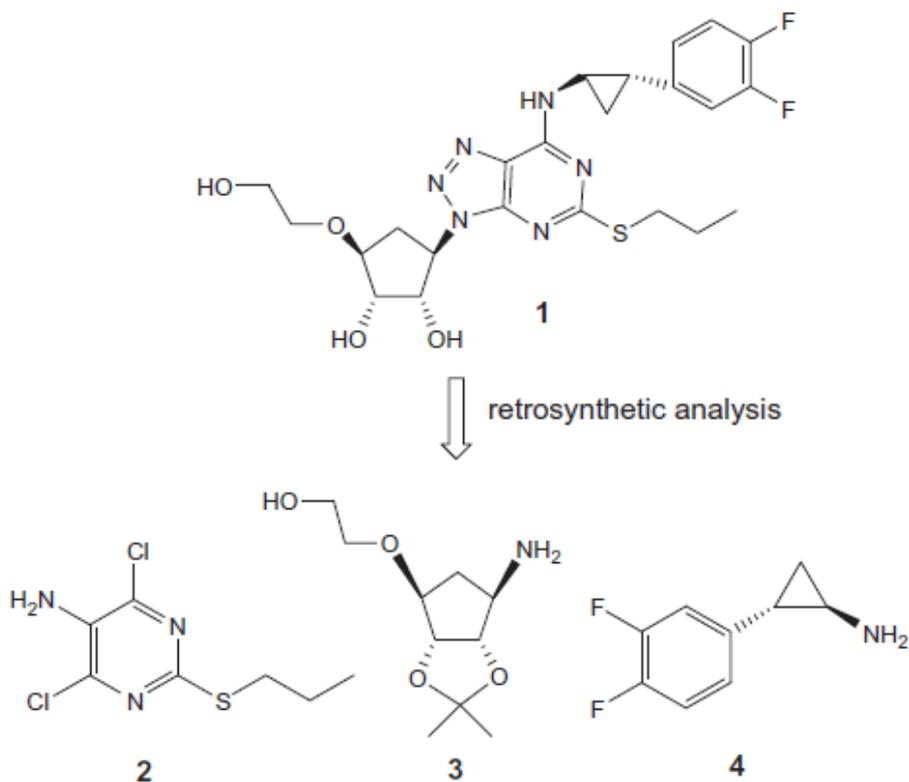


Figura 4. Rota de retróssíntese do ticagrelor (ZHANG *et al.*, 2012).

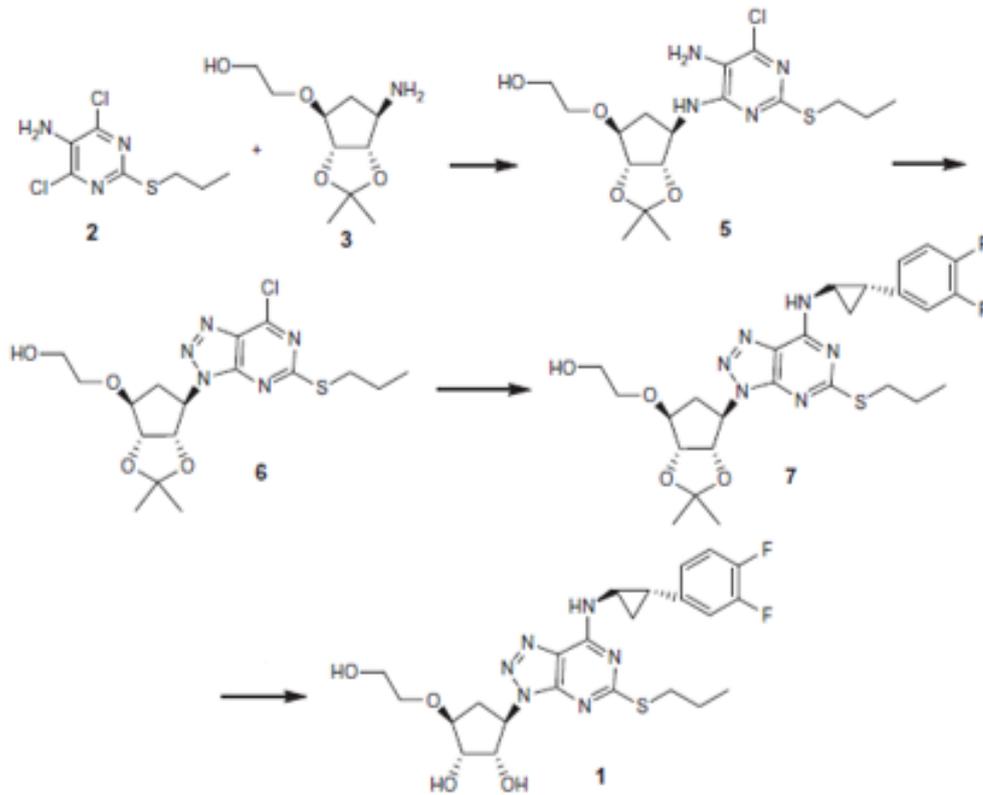


Figura 5. Representação da rota de síntese do ticagrelor (ZHANG *et al.*, 2012).

### 3.3.2 Análise quantitativa

Os trabalhos disponíveis na literatura a respeito da quantificação do ticagrelor na forma farmacêutica e matéria-prima por métodos cromatográficos foram desenvolvidos com detecção na região do ultravioleta (KALYANI & RAO, 2013) e detecção por arranjo de diodos (GOBETTI *et al.*, 2014). Também se encontram estudos de quantificação do ticagrelor e seus metabólitos em plasma humano, onde foram desenvolvidos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplados a espectrômetro de massas (SILLEN *et al.*, 2010; SILLEN *et al.*, 2011).

Um método de quantificação do ticagrelor e um de seus metabólitos simultaneamente, também em plasma humano, por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplado a espectrômetro de massas foi desenvolvido por Kale e colaboradores (2015).

### 3.3.3 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade do ticagrelor reportados até o momento na literatura são os previamente citados, desenvolvidos por Gobetti e colaboradores (2014) e Kalyani e Rao (2013). No primeiro, os autores avaliam o comportamento do produto farmacêutico frente a diferentes condições de degradação: em meio ácido e básico utilizando ácido clorídrico 0,1N e hidróxido de sódio 0,1N, respectivamente, e mantendo a amostra por 24 horas em temperatura ambiente; degradação fotolítica em câmara de luz UVC e UVA por duas horas; em presença de agente oxidante utilizando peróxido de hidrogênio 3%; e frente ao calor, onde a amostra foi mantida a uma temperatura de 60°C por duas horas. Como resultado desse estudo, foi observado que o fármaco é estável somente nas condições de radiação UVA e calor. Nas degradações em meio ácido e básico, ocorreu uma degradação considerável, restando apenas 36 e 38% da concentração inicial do fármaco, respectivamente. No entanto, o cromatograma demonstrou apenas um pequeno pico em tempo de retenção diferente do ticagrelor. Sob ação da radiação UVC, 23% de degradação foi observada, com a formação de três picos de produtos de degradação. Por fim, quando exposto a agente oxidante, o fármaco degradou completamente ao final das duas horas de exposição, demonstrando ser extremamente sensível a esta condição.

Já no trabalho desenvolvido por Kalyani e Rao (2013), os fatores de degradação estudados foram basicamente os mesmos, com algumas mudanças nas condições como a temperatura de 60°C durante exposição aos meios ácido (HCl 2N) e básico (NaOH 2N), bem como ao agente oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%). A degradação por via térmica foi executada a uma temperatura de 105°C por 6 horas, e para a degradação fotolítica a amostra foi colocada em câmara de luz UV por 7 dias. Além disso, também foi avaliado o comportamento do fármaco sob condições neutras, onde o ticagrelor foi mantido em refluxo na água por 6 horas a uma temperatura de 60°C.

Todas as condições avaliadas pelos autores apresentaram formação de produtos de degradação, porém em menor magnitude do que o relatado no trabalho citado anteriormente, sendo na condição oxidativa que o fármaco se mostrou mais instável, formando 9,56% de produto de degradação.

Cabe destacar que, em ambos os trabalhos citados, não foram identificados os produtos de degradação eventualmente formados.

### **3.3.4 Análise de impurezas do ticagrelor**

Até o presente momento, os trabalhos referentes ao estudo do perfil de impurezas do ticagrelor, com identificação das estruturas químicas e elucidação das suas respectivas rotas de formação foram publicados por Hassane e colaboradores (2015) e Kumar e colaboradores (2016).

No primeiro, o autor desenvolveu e validou um método analítico indicativo de estabilidade para a quantificação do ticagrelor e determinação do seu perfil de impurezas. O método validado foi por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta. A elucidação das estruturas dos produtos de degradação formados após exposição dos comprimidos do fármaco, em solução, a diferentes condições foi alcançada através da análise da fragmentação das amostras degradadas em espectrômetro de massas. Observou-se a formação de nove diferentes produtos de degradação ao final do estudo, todos com suas estruturas químicas determinadas e suas rotas e mecanismos de degradação elucidados. Os resultados dos estudos de cinética de degradação mostraram que o ticagrelor é extremamente instável frente a ação da luz e de agentes oxidantes.

Já no trabalho mais recente (KUMAR *et al.*, 2016), os autores identificaram, isolaram e caracterizaram cinco potenciais impurezas relacionadas ao processo de síntese do ticagrelor, sendo quatro delas ainda não reportadas na literatura. Tais substâncias foram detectadas por cromatografia líquida de alta eficiência e, posteriormente, identificadas através da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas.

## **3.4 Análise e controle de impurezas em produtos farmacêuticos**

Para que um produto farmacêutico esteja apto a ser utilizado é necessário garantir a sua qualidade. Dentre vários fatores, destaca-se a importância de o medicamento ser eficaz para a função pretendida, bem como ser seguro para o

paciente que dele fará uso, não causando nenhuma reação adversa inesperada ou qualquer tipo de toxicidade.

Cabe aos fabricantes de medicamentos assegurar que seus produtos sejam capazes de satisfazer todos os requisitos de qualidade durante todo o seu prazo de validade. Para tanto, realizam-se os testes de estabilidade nos produtos, a fim de prever o comportamento dos mesmos, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (BRASIL, 2010).

Além disso, as empresas estão cada vez mais atentas para o controle sobre o perfil de impurezas dos seus produtos, uma vez que a presença de substâncias estranhas na formulação pode alterar as características originais do medicamento, podendo afetar diretamente sua segurança e eficácia.

Com essa preocupação, vêm se tornando crescente as exigências frente à concessão e renovação de registro de novos produtos farmacêuticos pelas agências reguladoras, onde são cobrados dos fabricantes estudos completos a respeito do perfil de impurezas dos seus produtos.

A *International Conference of Harmonization* (ICH) dispõe de dois principais guias que tratam desse tema. O guia Q3A (R2), *Impurities in New Drug Substances*, orienta sobre os estudos do perfil de impurezas dos ingredientes farmacologicamente ativos, além de estabelecer os limites para notificação, identificação e qualificação dessas impurezas quando da solicitação/renovação de registro junto aos órgãos reguladores (Tabela 1). O guia aborda tais impurezas sob duas perspectivas: os aspectos químicos, que incluem, por exemplo, a classificação e identificação das impurezas e uma breve discussão sobre os procedimentos analíticos; e os aspectos de segurança, que fornecem orientações específicas para a qualificação das impurezas presentes na amostra em questão.

Em seu outro guia, Q3B (R2), *Impurities in New Drug Products*, o ICH complementa as instruções a respeito do controle de impurezas ao tratar dos produtos acabados. Neste guia são abordadas, especificamente, as impurezas classificadas como produtos de degradação. Dentro dessa categoria estão incluídos, além dos produtos de degradação derivados do fármaco, os produtos de reações do princípio ativo com os excipientes da formulação e/ou com os materiais de embalagem do produto (ICH Q3B (R2), 2006).

Tabela 1. Limites de notificação, identificação e qualificação de impurezas em substâncias ativas (ICH Q3A (R2), 2006).

<b>Dose Diária Máxima<sup>1</sup></b>	<b>Limite de notificação<sup>2:3</sup></b>	<b>Limite de identificação<sup>3</sup></b>	<b>Limite de qualificação<sup>3</sup></b>
≤ 2g/dia	0,05%	0,10% ou 1 mg da ingestão diária (o que for menor)	0,15% ou 1 mg da ingestão diária (o que for menor)
> 2g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

<sup>1</sup> Quantidade máxima da substância ativa administrada por dia;

<sup>2</sup> Limites de notificação maiores devem ser cientificamente justificados;

<sup>3</sup> Limites menores podem ser apropriados se a impureza for usualmente não tóxica.

De acordo com o ICH, as impurezas podem ser classificadas em três categorias principais: resíduos de solventes, impurezas inorgânicas e impurezas orgânicas (relacionadas ao próprio fármaco ou ao processo de produção) (ICH Q3A (R2), 2006). Neste contexto, inúmeras substâncias podem ser incluídas, dentre elas: reagentes de partida, isômeros, intermediários de síntese, reagentes, solventes, catalisadores e produtos de degradação (ROY, 2002).

### 3.4.1 Resíduos de solvente

Os solventes são líquidos orgânicos e inorgânicos usados como veículos para a preparação de soluções ou suspensões na síntese de uma nova substância farmacêutica ou na produção de um medicamento. Estes solventes podem não ser completamente eliminados e permanecer como resíduos no produto final na forma de impurezas. Muitos dos solventes utilizados industrialmente na síntese de novas moléculas e nos processos produtivos são conhecidamente tóxicos. Dependendo do seu possível risco à saúde humana, estes resíduos são divididos em três classes (Tabela 2).

### 3.4.2 Impurezas inorgânicas

As impurezas inorgânicas podem também ser derivadas de processos de síntese e produção de matérias-primas. Estas são normalmente conhecidas e identificadas, e incluem, principalmente: reagentes, reagentes ligantes, catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais e sais inorgânicos. As impurezas inorgânicas são normalmente detectadas e quantificadas utilizando procedimentos farmacopeicos já estabelecidos ou outros métodos apropriados (ICH Q3A(R2), 2006; PILANIYA *et al.*, 2010).

Tabela 2. Classificação dos solventes com base nos seus limites permitidos.

<b>Classes</b>	<b>Tipo de solventes</b>	<b>Limites</b>
Classe I	Agentes cancerígenos humanos conhecidos, agentes fortemente carcinogênicos para humanos e solventes nocivos ao meio ambiente.	Solventes a serem evitados.
Classe II	Agentes carcinogênicos não genotóxicos ou possíveis agentes causadores de outras toxicidades irreversíveis, como neurotoxicidade ou teratogenicidade. Solventes suspeitos de outras toxicidades significativas, porém reversíveis.	Solventes em níveis limitados.
Classe III	Solventes com baixo potencial tóxico para o homem; nenhum limite de exposição com base na saúde é necessário.	Solventes com baixo potencial tóxico.

Fonte: ICH Q3C: Guideline for Residual Solvents, 2006.

### 3.4.3 Impurezas orgânicas

As impurezas orgânicas são as impurezas mais comumente encontradas nos produtos farmacêuticos. Elas podem ser originadas durante a síntese do fármaco, do processo de produção ou da estocagem do produto. Mesmo que os produtos acabados sejam lavados com solventes, há sempre uma chance de algumas

substâncias dos materiais de partida que não reagiram permanecerem no produto final.

As impurezas de um fármaco ou de uma nova entidade química são originadas, principalmente, durante o processo de síntese a partir de matérias-primas, solventes, intermediários e subprodutos. As matérias-primas são geralmente fabricadas com requisitos de pureza inferiores aos do princípio ativo, e, portanto, podem conter um número de componentes que pode afetar a pureza do produto farmacêutico. Do mesmo modo, os solventes utilizados na síntese são suscetíveis de conter um certo número de impurezas que podem variar de níveis muito baixos até quantidades bastante significativas (AHUJA, 2007). Além disso, algumas impurezas dos medicamentos podem surgir de interações com os excipientes utilizados para formular um produto farmacêutico.

Outra potencial fonte de formação de impurezas orgânicas nos medicamentos é devido a processos de degradação. Durante a produção do medicamento, o fármaco é submetido a uma variedade de condições que podem levar a sua decomposição. Por exemplo, se o calor for usado para a secagem ou por outras razões, pode facilitar a degradação de fármacos termicamente lábeis. Soluções e suspensões são potencialmente propensas a degradação devido à hidrólise ou solvólise. Estas reações também podem ocorrer na forma farmacêutica sólida, tal como no caso de cápsulas e comprimidos, quando a água ou outro solvente for utilizado para a granulação (AHUJA, 2007). Neste contexto, a realização dos estudos de estabilidade do produto torna-se imprescindível para que se consiga prever o comportamento do fármaco frente aos diversos fatores de degradação, identificando e quantificando os eventuais produtos formados e avaliando sua possível toxicidade.

A Anvisa, em resolução publicada em dezembro de 2015 (RDC 53/2015), estabelece os “parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares”, onde também orienta sobre como conduzir os estudos de degradação forçada nos produtos (BRASIL, 2015). Os limites previstos nesta resolução são compatíveis com os preconizados pelo ICH em seu guia Q3B (R2), e estão demonstrados na tabela 3.

Uma vez que a estabilidade de um produto farmacêutico depende de vários fatores, desde as condições ambientais como temperatura, umidade e luz, e os

fatores relacionados ao produto, como as propriedades químicas e físicas do princípio ativo e dos excipientes, a forma farmacêutica e sua composição, o processo de produção e as propriedades dos materiais de embalagem, os estudos de estabilidade devem incluir a avaliação do comportamento do fármaco nas condições mais adversas. (KOPP, 2006).

Conduzir os estudos de estabilidade sob condições exageradas de temperatura, umidade e luz, por exemplo, pode ajudar a determinar quais potenciais impurezas podem ser geradas por reações de degradação, e auxiliar no controle de qualidade a fim de minimizar seu aparecimento durante os processos de produção e armazenagem dos medicamentos (AHUJA, 2007).

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

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

Dados: 1 - Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia  
2 - Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação.

### 3.5 Metodologia analítica para análise de impurezas

Uma ampla gama de métodos está disponível para monitorar as impurezas nos produtos farmacêuticos. O critério principal para a escolha do melhor método é a capacidade deste de diferenciar todos os compostos presentes em uma determinada

amostra. Este requisito reduz a escolha a métodos essencialmente espectroscópicos e de separação ou, ainda, uma combinação de ambos. Além disso, com relação a determinação de impurezas em produtos farmacêuticos, seja na matéria-prima ou no produto acabado, demanda-se por métodos analíticos sensíveis o suficiente, isto é, que sejam capazes de detectar com confiabilidade quantidades muito pequenas dessas substâncias nas amostras.

Os principais métodos espectroscópicos dos quais se pode fazer uso nesse tipo de análise são a espectrofotometria no ultravioleta (UV) e no infravermelho (IV), a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM). Em geral, IV, RMN e EM são excelentes técnicas de caracterização de impurezas que foram isoladas por qualquer uma das técnicas previamente citadas. Já a espectrofotometria na região do UV é mais utilizada para analisar amostras por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo esta combinação comumente empregada nas análises farmacêuticas.

Dentre os métodos de separação, os mais utilizados são a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia a gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (EC) e cromatografia de fluido supercrítico (CFS). Com exceção da eletroforese capilar, todas as demais são técnicas cromatográficas.

A eletroforese capilar é uma técnica que apresenta como principal vantagem o uso de quantidades reduzidas de amostra e de solventes. No entanto, a reprodutibilidade do método é difícil de ser alcançada.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica com muitas aplicações na área química e farmacêutica (SHAH *et al.*, 2012). É um método que oferece grandes benefícios em termos de conveniência, precisão, velocidade e capacidade de realizar separações difíceis. O fato de poder ser utilizada com diferentes tipos de detectores, como fluorescência, arranjo de diodos, espectrometria de massas, dentro outros, agrega mais uma vantagem ao seu uso.

O uso do CLAE como método de separação acoplado a alguma técnica de identificação, como espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear, tem se tornado uma escolha acertada para análise de impurezas e substâncias relacionadas em produtos farmacêuticos, e atualmente encontra-se bastante inserida na rotina dos laboratórios de controle de qualidade.

### 3.6 Validação da metodologia analítica

Para que se obtenha sucesso no desenvolvimento de novos medicamentos, bem como no monitoramento do produto lote a lote, levando em consideração o controle de qualidade durante esse processo, se faz necessário o uso de técnicas analíticas adequadas para a finalidade pretendida.

Além disso, garantir a confiabilidade de um resultado de determinada análise é tão importante quanto o resultado em si. Logo, é indispensável proceder com a validação do método, após o desenvolvimento do mesmo, de forma a comprovar que os resultados obtidos são confiáveis e que o método proposto é adequado para realizar as análises a que se destina.

De acordo com a RDC 17/2010, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados à análise (BRASIL, 2010).

Os métodos analíticos são divididos em quatro categorias, e, de acordo com a sua finalidade, são pré-definidos quais parâmetros devem ser avaliados durante a validação.

Os ensaios quantitativos para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas se enquadra na categoria II da RE 899/2003 para a qual se determina que o método seja validado nos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

Para proceder com a validação de uma metodologia analítica, é indispensável fazer uso de substâncias de referência oficializadas pela Farmacopeia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, admite-se o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados (BRASIL, 2003).



---

**4 CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) DE TICAGRELOR E SUAS IMPUREZAS**

---



## 4.1 Introdução

Estudos de desenvolvimento e validação de métodos analíticos exigem o uso de substâncias de referência com alto teor de pureza para que se obtenham resultados confiáveis. Para isso, devem ser utilizados materiais de referência com identidade e pureza documentadas e bem caracterizadas para o estudo de validação (ICH Q2B(R1), 2005). As substâncias de referência são classificadas em duas categorias: as compendiais, que são obtidas de fontes farmacopeicas e não necessitam de caracterização posterior, e as não compendiais, que são aquelas com elevado teor de pureza e que devem ser cuidadosamente caracterizadas para garantir sua identidade (SWARTZ & KRULL, 1998).

Para a construção do presente trabalho, serão utilizadas substâncias químicas de referência (SQR) de ticagrelor e de duas de suas impurezas de síntese. Uma vez que nenhuma destas substâncias é classificada como compendial, fez-se necessário realizar as suas caracterizações. Sendo assim, o presente capítulo tem como objetivo apresentar a caracterização da SQR de ticagrelor pelas técnicas analíticas de espectrofotometria na região de infravermelho (IV) e no ultravioleta (UV), espectrometria de massas (EM) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), e das SQR das impurezas por espectrofotometria na região de infravermelho (IV) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN).

## 4.2 Materiais

### 4.2.1 Substâncias químicas de referência (SQR) de ticagrelor e das impurezas

As substâncias químicas de referência utilizadas para o desenvolvimento do trabalho foram o ticagrelor, teor de 99,7%, adquirido por Sequoia Research Products (Reino Unido), e de duas impurezas de síntese do fármaco, do mesmo fornecedor.

A escolha das impurezas se deu a partir da análise da rota de síntese do fármaco, supondo que estas substâncias poderiam estar presentes no produto farmacêutico como contaminantes, por não terem reagido completamente durante a síntese, ou ainda, em decorrência de algum processo de degradação posterior no produto farmacêutico. As substâncias (1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropanamina

e 4,6-dicloro-2-(propiltio)pirimidina-5-amina, ambas ilustradas na figura 6 (ZHANG *et al.*, 2012) foram denominadas de Impureza 1 e Impureza 2, respectivamente, a fim de facilitar sua citação ao longo deste trabalho.

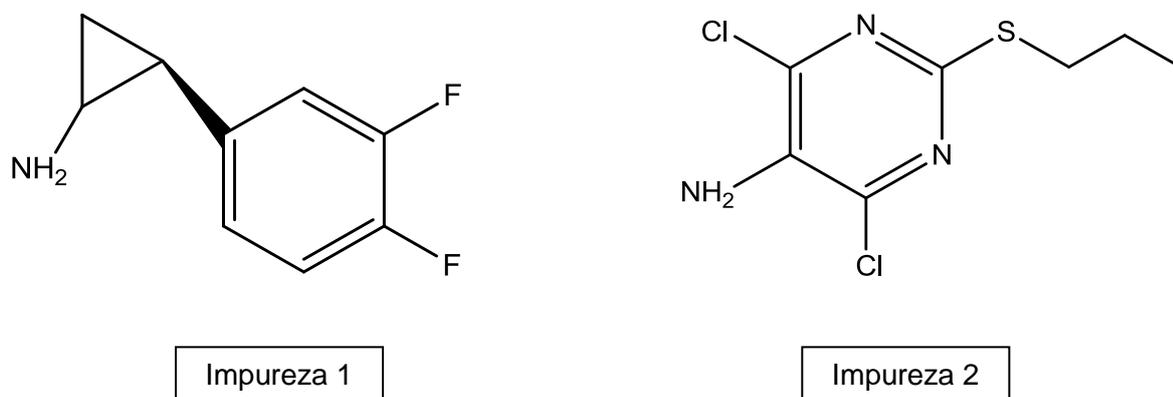


Figura 6. Estruturas das impurezas de síntese de ticagrelor.

### 4.3 Metodologia

#### 4.3.1 Espectrofotometria na região do UV

A espectrofotometria no ultravioleta é uma técnica analítica rápida, simples e de baixo custo que permite a identificação de compostos químicos e a quantificação de fármacos em preparações farmacêuticas. O princípio da técnica se baseia na absorção da energia eletromagnética por moléculas que depende tanto da concentração quanto da estrutura das mesmas, em uma faixa de comprimento de onda entre 190 a 380 nm. Na região do ultravioleta as transições são eletrônicas e ocorrem em porções da molécula chamadas de cromóforos (FB 5, 2010).

Para a caracterização da SQR de ticagrelor, foi preparada uma solução estoque de 50 µg/ml em metanol. Esta solução foi diluída a 20 µg/ml, no mesmo solvente e analisada no espectrofotômetro (Figura 7).

Os experimentos foram feitos em espectrofotômetro de UV Shimadzu modelo 1800 com cubetas de quartzo cujo caminho óptico é de 1 cm, para realização da varredura entre 200 e 300 nm.

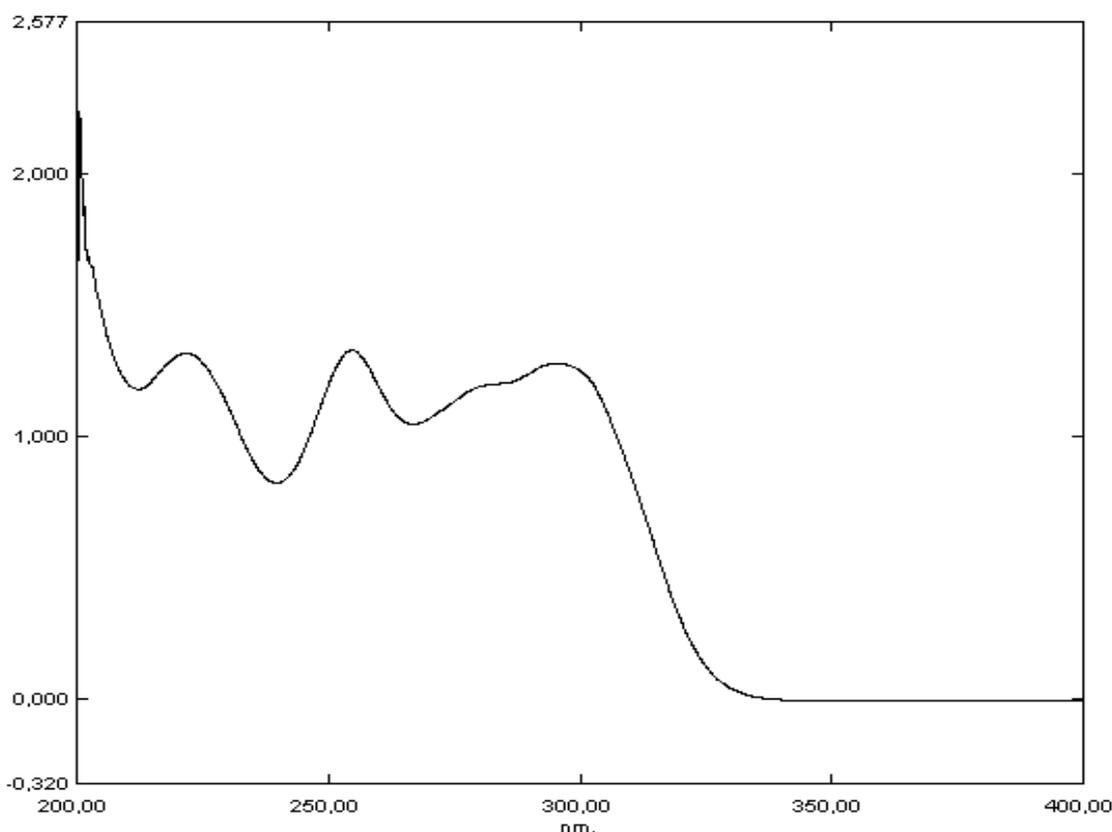


Figura 7. Espectro na região do ultravioleta da solução de ticagrelor SQR.

Através da análise do espectro da SQR do ticagrelor é possível observar que a sua molécula apresenta uma absorção considerável em uma ampla faixa de comprimento de onda, e isso se confirma pelos dados encontrados na literatura (AMBASANA, 2014).

#### 4.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica amplamente utilizada nas análises farmacêuticas e possui diversas finalidades, dentre elas a identificação e a determinação da pureza de compostos químicos. A DSC é um estudo termo analítico que permite a análise dos processos térmicos, endotérmicos ou exotérmicos, que são característicos do fármaco (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A análise da SQR por este método foi realizada pelo laboratório Prati-Donaduzzi, localizado em Toledo-PR, utilizando-se equipamento Mettler Toledo, modelo DSC 1 STARe System. O resultado da análise está demonstrado na figura 8.

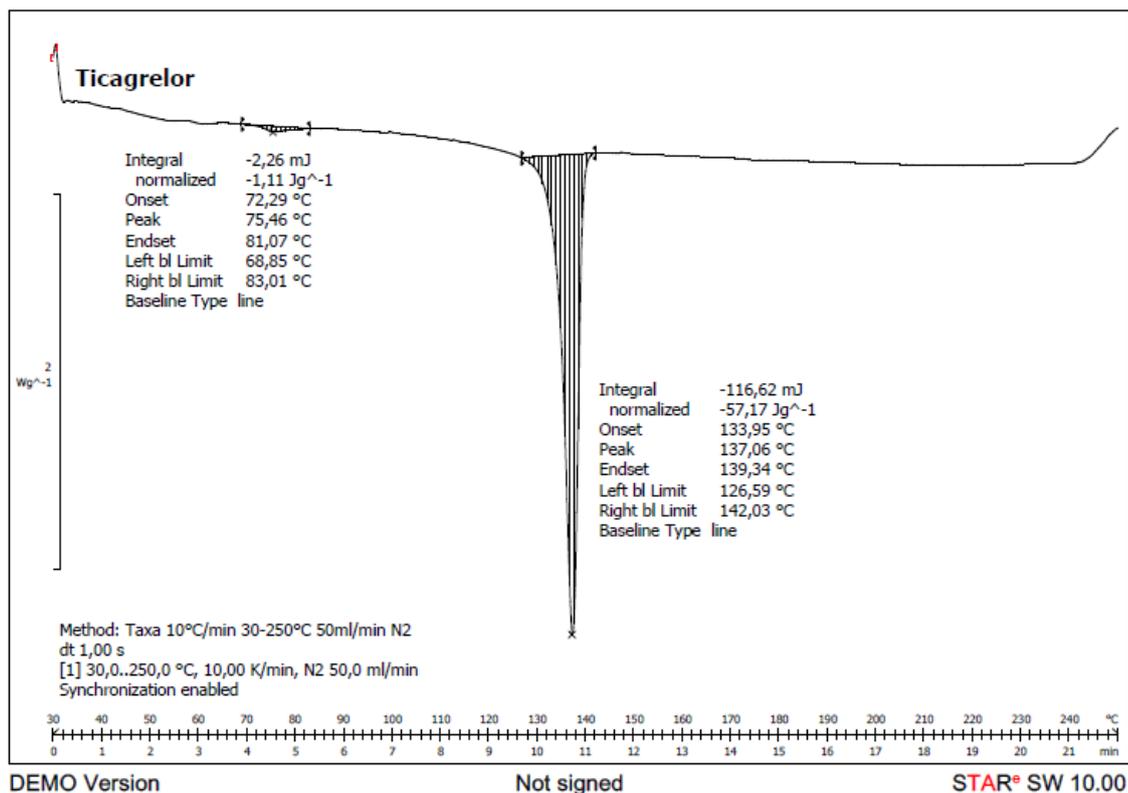


Figura 8. Curva de aquecimento de ticagrelor SQR realizada por DSC.

O fármaco apresentou uma faixa de fusão entre 133,95 °C e 139,34 °C, com o pico em 137,06 °C.

Até o presente momento, não consta descrição na literatura que demonstre o ponto de fusão do ticagrelor, no entanto o resultado obtido vai ao encontro do apresentado na patente US 2007/0293513, na qual são descritas as análises por DSC dos quatro polimorfos do ativo, e as temperaturas de fusão são correspondentes ao encontrado para o padrão do ticagrelor (BOHLIN *et al.*, 2007).

#### 4.3.3 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que pode fornecer informações tanto qualitativas quanto quantitativas dos analitos após a sua conversão para os íons moleculares. O princípio da técnica se baseia na introdução da amostra de interesse em uma fonte de ionização para adquirir cargas positivas ou negativas. Em seguida, os íons formados percorrem o instrumento e são separados

conforme sua proporção de massa/carga ( $m/z$ ). Após, esses íons chegam até o detector do equipamento e este gera um sinal gráfico relacionando a proporção  $m/z$  com sua intensidade. A partir do espectro de massas gerado para a substância em análise é possível confirmar a sua identidade através do sinal com  $m/z$  correspondente ao seu peso molecular (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

A determinação do íon molecular da SQR de ticagrelor foi realizada através da injeção direta de uma solução contendo 750  $\mu\text{g/ml}$  de padrão de ticagrelor em metanol em espectrômetro de massas marca AB Sciex Triple TOF 5600. O equipamento operou com modo de ionização por eletrospray positivo ( $\text{ESI}^+$ ), volume de injeção de 10  $\mu\text{l/min}$  e temperatura de 300°C. A análise foi realizada no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Porto Alegre/RS.

O espectro de massas obtido está representado na figura 9. Tratando-se de eletronebulização positiva, os picos apresentados nos espectros se referem ao peso molecular acrescido da massa de um íon hidrogênio ( $\text{H}^+$ ).

Como se pode observar, o principal pico demonstrado no gráfico possui  $m/z$  523,2646  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , correspondente com a massa molecular do fármaco (522,56 g/mol), comprovando sua identidade. Além disso, nota-se que a fragmentação do íon molecular originou os picos que correspondem com a literatura (495,2555; 453,1992; 363,1779; 335,1552; 321,1331; 293,1071; 153,0748; 127,0602), corroborando também para a comprovação da identidade do fármaco (TENG *et al.*, 2010).

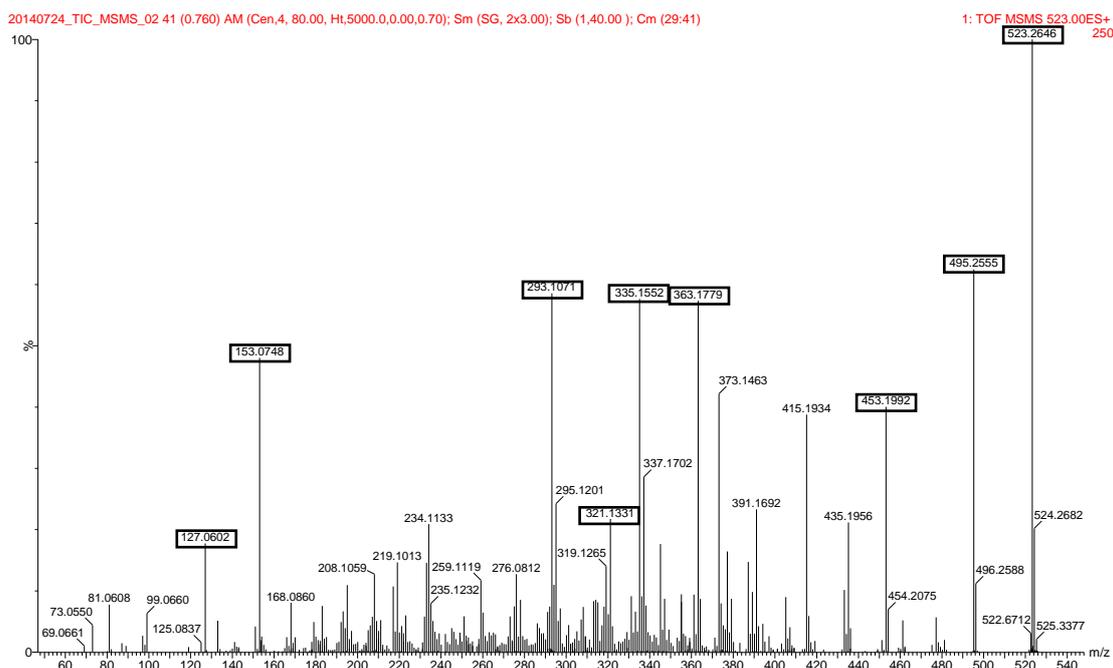


Figura 9. Espectro de massas da SQR de ticagrelor com fragmentação do íon molecular.

#### 4.3.4 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta valiosa para a determinação estrutural de compostos orgânicos e é muito utilizada na análise de fármacos, podendo ser aplicada a uma grande variedade de substâncias.

A identificação de estruturas químicas utilizando o espectro de infravermelho baseia-se nas bandas que certos grupos de átomos originam, mais ou menos na mesma frequência. É justamente a presença destas bandas características de grupos que permite ao analista a obtenção de informações úteis sobre a estrutura da substância em análise (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

O espectro da região do infravermelho da SQR de ticagrelor foi obtido através da pesagem de 2 mg de analito e a análise foi realizada em espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum BX, da Faculdade de Farmácia da UFRGS. O espectro resultante de análise está representado na figura 10. A tabela 4 apresenta as atribuições das principais bandas de absorção molécula de ticagrelor.

As impurezas 1 e 2 também foram analisadas por esta técnica, seguindo o mesmo procedimento adotado para o fármaco e utilizando o mesmo equipamento. Os espectros referentes às impurezas 1 e 2 estão apresentados nas figuras 11 e 12,

respectivamente. Nas tabelas 5 e 6 estão representadas as bandas de absorção no IV das Impurezas 1 e 2, respectivamente, com suas atribuições correspondentes.

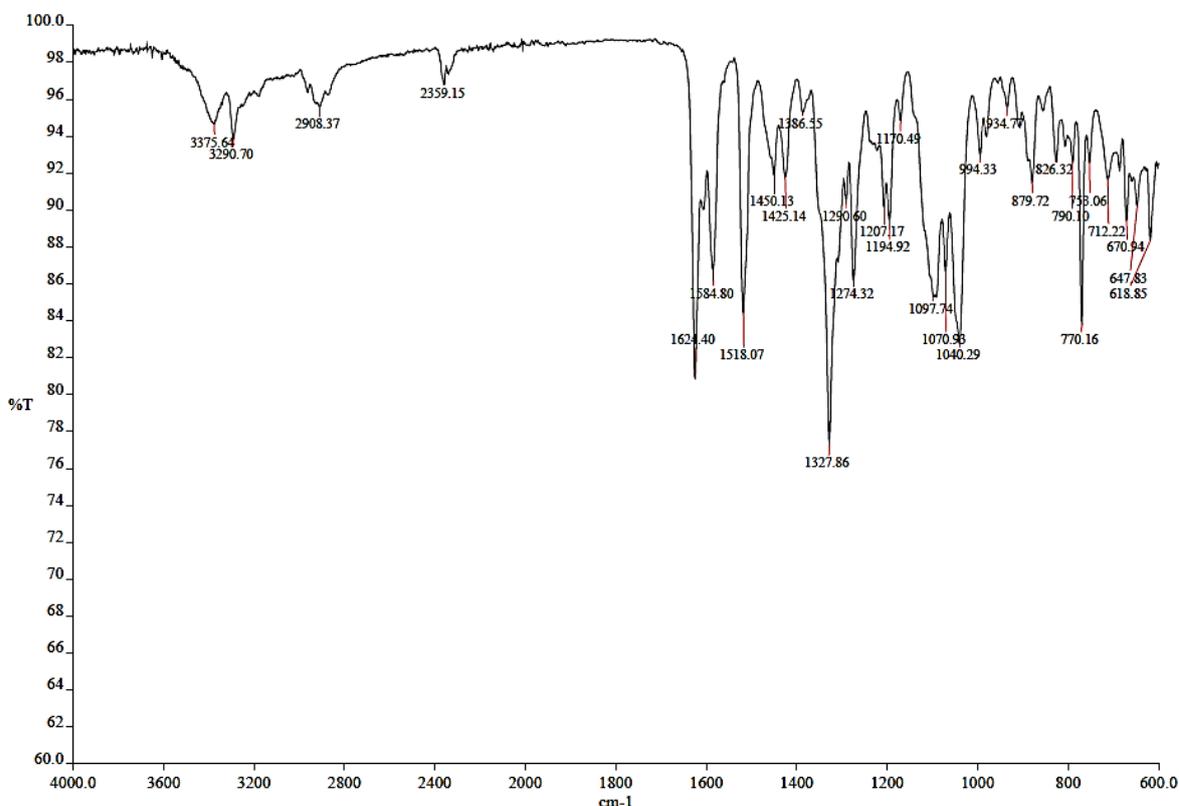


Figura 10. Espectro de absorção na região do infravermelho da SQR de ticagrelor.

Tabela 4. Atribuição das principais bandas do espectro de IV do ticagrelor (PAVIA *et al.*, 2001).

Frequência de absorção (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3375	Estiramento ligado a hidrogênio de OH
1624 e 1518	Estiramento C=C de aromático
1327	Estiramento de ligação C-N
1040	Estiramento C-O de álcool
770	Anel aromático di-orto substituído

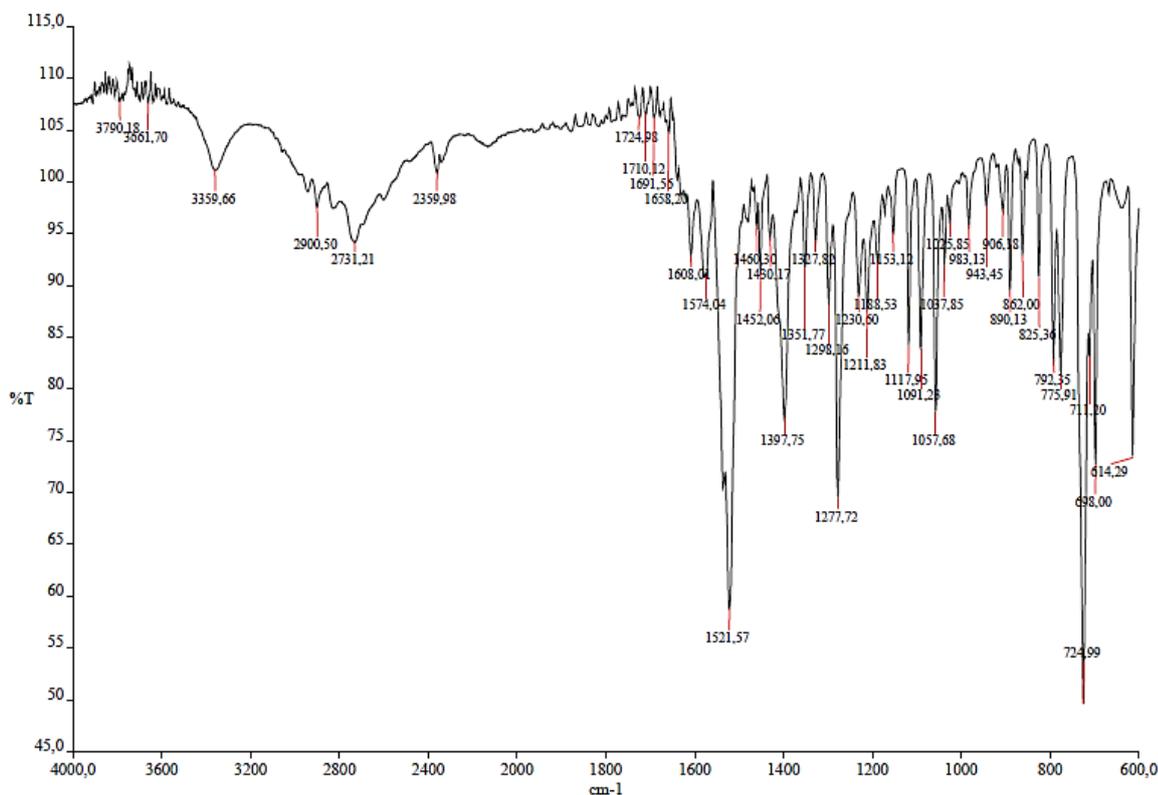


Figura 11. Espectro de absorção na região do infravermelho da SQR da Impureza 1.

Tabela 5. Atribuição das principais bandas do espectro de IV da Impureza 1 (PAVIA *et al.*, 2001).

Frequência de absorção (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3359	Deformação axial na ligação N-H
1521	Vibrações de núcleos de C=C aromáticos
724	Anel aromático orto-substituído

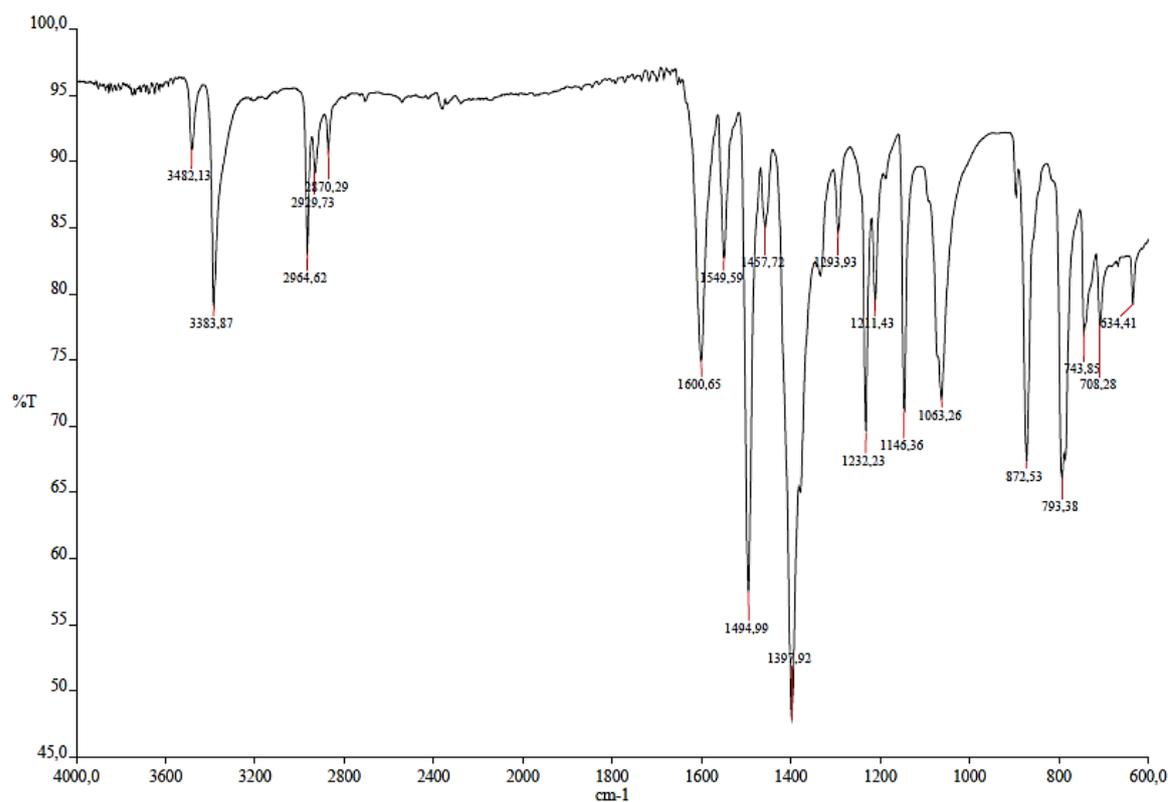


Figura 12. Espectro de absorção na região do infravermelho da SQR da Impureza 2.

Tabela 6. Atribuição das principais bandas do espectro de IV da Impureza 2 (PAVIA *et al.*, 2001).

Frequência de absorção (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3383	Deformação axial na ligação N-H <sub>2</sub>
2870, 2929, 2964	Deformação axial CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
1300-1500	C-N em anel aromático
793	Deformações axiais e angulares de C-Cl

A análise na região do infravermelho permitiu a identificação dos principais grupamentos presentes nas moléculas do ticagrelor e das suas impurezas, com suas bandas características, de acordo com a literatura (PAVIA *et al.*, 2001). Os

resultados encontrados estão de acordo com as estruturas dos compostos analisados, e confirmam a identidade das substâncias químicas de referência.

#### 4.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear também é uma técnica bastante eficaz para a identificação de compostos orgânicos. Através da análise de uma substância por RMN, é possível confirmar a sua identidade pela concordância entre sua estrutura química e os sinais gráficos gerados pela presença dos átomos de carbono e hidrogênio na molécula.

Os espectros de RMN de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) das Impurezas 1 e 2 foram obtidos em espectrômetro Varian, modelo VNMRS-300 de 300Hz, utilizando metanol deuterado como solvente, e estão representados nas figuras 13 e 14, respectivamente. As tabelas 7 e 8 apresentam as atribuições referentes aos picos do espectro de RMN  $^1\text{H}$  das impurezas 1 e 2.

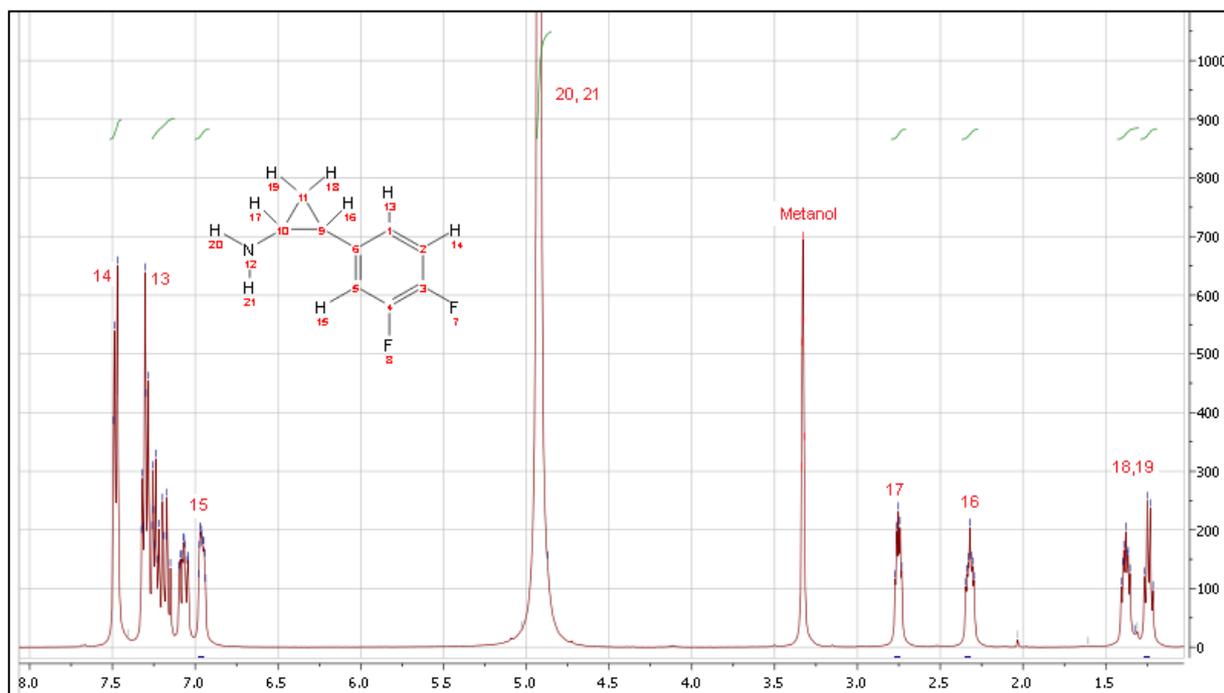
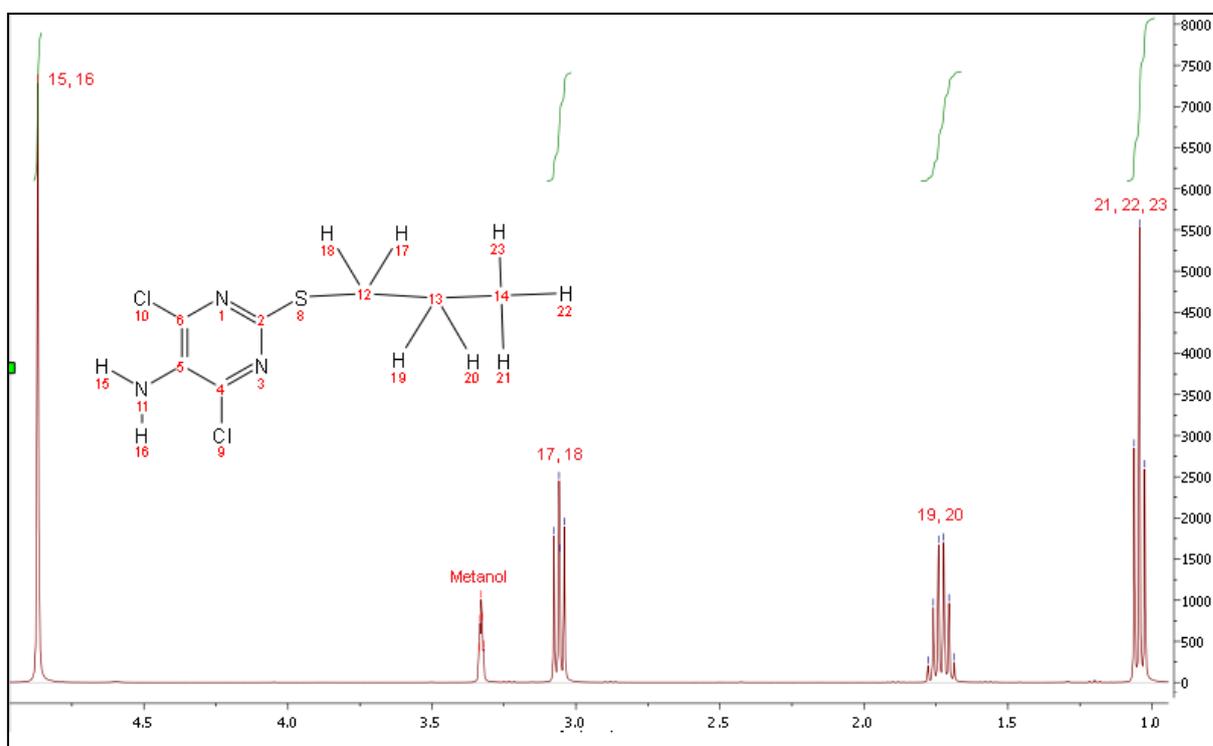


Figura 13. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Impureza 1.

Tabela 7. Atribuição dos picos obtidos no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Impureza 1.

Deslocamento (ppm)	Multiplicidade	Integral	Atribuição	Identificação
1,30	multiplete	2H	CH - CH	18,19
2,32	multiplete	1H	CH	16
2,75	multiplete	1H	CH	17
4,90	singleto	2H	NH <sub>2</sub>	20,21
7,01	multiplete	1H	CH	15
7,20	multiplete	1H	CH	13
7,45	multiplete	1H	CH	14

Figura 14. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Impureza 2.Tabela 8. Atribuição dos picos obtidos no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Impureza 2.

Deslocamento (ppm)	Multiplicidade	Integral	Atribuição	Identificação
1,04	triplete	3H	CH <sub>3</sub>	21,22,23
1,75	sexteto	2H	CH <sub>2</sub>	19,20
3,06	triplete	2H	CH <sub>2</sub>	17,18
4,87	singleto	2H	NH <sub>2</sub>	15,16

As atribuições dos hidrogênios das moléculas das Impurezas 1 e 2 foram estabelecidas com base em dados tabelados disponíveis na literatura específica (SILVERSTAIN, 2000; WEBSTER, 2000).

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  permitiu verificar os hidrogênios presentes nas moléculas das Impurezas 1 e 2, possibilitando confirmar a identidade das substâncias químicas de referência.

#### **4.4 Conclusões**

A partir das análises realizadas e dos resultados obtidos, foi possível reunir dados suficientes para comprovar a identidade da substância química de referência do ticagrelor. A comparação dos resultados de cada técnica analítica com aqueles já descritos na literatura auxiliou na confirmação de que a SQR adquirida da empresa britânica correspondia, efetivamente, ao ticagrelor. Com base nesses resultados, a SQR pôde ser utilizada de forma segura no desenvolvimento e validação do método analítico.

A avaliação da identidade das SQR das impurezas de síntese do ticagrelor, adquiridas do mesmo fornecedor, compreendeu um menor conjunto de resultados, onde se optou por priorizar análises de identificação que se relacionassem com a estrutura química das moléculas para que pudesse ser feita uma comparação efetiva com a amostra em análise. Os resultados observados após avaliação dos espectros de IR e RMN  $^1\text{H}$  possibilitaram confirmar a identidade de ambas as impurezas, assegurando seu uso no decorrer do trabalho.

---

**5 CAPÍTULO II. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS DE TICAGRELOR**

---



## 5.1 Introdução

Conforme previsto nos guias Q3A (R2) e Q3B (R2) do ICH, para que as indústrias farmacêuticas tenham seus pedidos de registro ou renovação de registro de novas substâncias e produtos farmacêuticos concedidos, é exigido que as mesmas apresentem estudos sobre o perfil de impurezas dos seus produtos. Estes estudos envolvem aspectos quantitativos e qualitativos, no intuito de fornecer todas as informações a respeito das substâncias relacionadas que podem estar presentes no produto.

Para isso, é imprescindível fazer uso de técnicas analíticas adequadas para detecção, identificação e quantificação dessas prováveis impurezas que possam vir a contaminar os produtos farmacêuticos.

Desenvolver e validar métodos capazes de detectar pequenas quantidades de analitos nos produtos farmacêuticos tem se tornado uma necessidade cada vez maior, especialmente quando o produto não se encontra descrito em nenhuma monografia farmacopeica, como é o caso do ticagrelor.

Os níveis de impurezas orgânicas podem ser medidos por uma variedade de técnicas, incluindo aquelas que comparam respostas analíticas para uma determinada impureza ao de um padrão de referência adequado ou com a resposta do próprio fármaco.

## 5.2 Metodologia

Para o desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência, foram utilizadas as substâncias químicas de referência do fármaco e de duas impurezas, todas caracterizadas como descrito previamente.

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent modelo LC 1200 series, equipado com uma bomba quaternária, um autoinjeter, compartimento com termostato e detector de arranjo de diodos. O sistema utilizado para aquisição de dados e análise de resultados foi o software ChemStation (Versão B03.02).

O desenvolvimento do método por CLAE para análise das impurezas do ticagrelor teve como ponto de partida as condições empregadas no trabalho

publicado por Gobetti e colaboradores (2014), no qual os autores apresentam um método para determinação de teor de ticagrelor em comprimidos revestidos (Tabela 9).

Tabela 9. Condições cromatográficas pré-estabelecidas (GOBETTI *et al.*, 2014).

Equipamento	CLAE Shimadzu
Fase móvel	Acetonitrila:água + 0,5% trietilamina (57:43)
pH	7,0
Fluxo da fase móvel	0,7 ml/min
Detecção	Detector DAD 255 nm
Coluna cromatográfica	Phenomenex C18 Luna (250 x 4,6 mm, 5,0 µm)
Temperatura da coluna	25°C
Volume de injeção	20 µl

### 5.2.1 Teste de solubilidade

A solubilidade das SQR do fármaco e das impurezas foi testada com o uso dos solventes água, metanol e uma mistura de acetonitrila e água na proporção de 57:43 (v/v), correspondente à fase móvel empregada no trabalho citado anteriormente, sem trietilamina. Para o teste, foram pesados 5 mg de cada substância e dissolvidos em 50 ml de solvente.

### 5.2.2 Escolha do comprimento de onda para detecção

Outro ponto avaliado no início do desenvolvimento do método foi o melhor comprimento de onda que possibilitasse analisar as três substâncias simultaneamente. Para isso, foram preparadas soluções de cada uma das SQR e estas submetidas a uma varredura no equipamento espectrofotômetro Shimadzu, modelo 1800.

### **5.2.3 Testes de fase móvel e colunas cromatográficas**

O teste para escolha da fase móvel mais apropriada para o método foi realizado a partir da condição inicial de acetonitrila e água nas proporções de 57:43 (v/v). Conforme apresentavam-se os resultados, diferentes proporções dos solventes, bem como a utilização de substâncias modificadoras na porção aquosa da fase móvel eram testados.

As colunas cromatográficas submetidas aos testes de desempenho da metodologia analítica foram:

- coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm x 5,0 µm), Phenomenex;
- coluna XBridge Fenil (250 x 4,6 mm x 5,0 µm), Waters;
- coluna Zorbax Eclipse Plus C8 (150 x 4,6 mm x 5,0 µm), Agilent.

## **5.3 Resultados e discussão**

### **5.3.1 Teste de solubilidade**

Após verificação da capacidade de solubilização dos pós nos diferentes solventes (metanol, água e acetonitrila: água), aqueles que apresentaram melhores resultados foram o metanol e a mistura de acetonitrila e água (57:43 v/v), onde ambos foram capazes de solubilizar todas as SQR com facilidade. No entanto, a escolha pela mistura de acetonitrila e água como sistema solvente se deu pelo fato de esta ser semelhante à composição inicial de fase móvel a ser utilizada no desenvolvimento do método.

### **5.3.2 Escolha do comprimento de onda para detecção**

A partir da análise de cada espectro (Figura 15), escolheu-se o comprimento de onda de 270 nm como o de melhor absorção para ambas as impurezas, bem como para o fármaco.

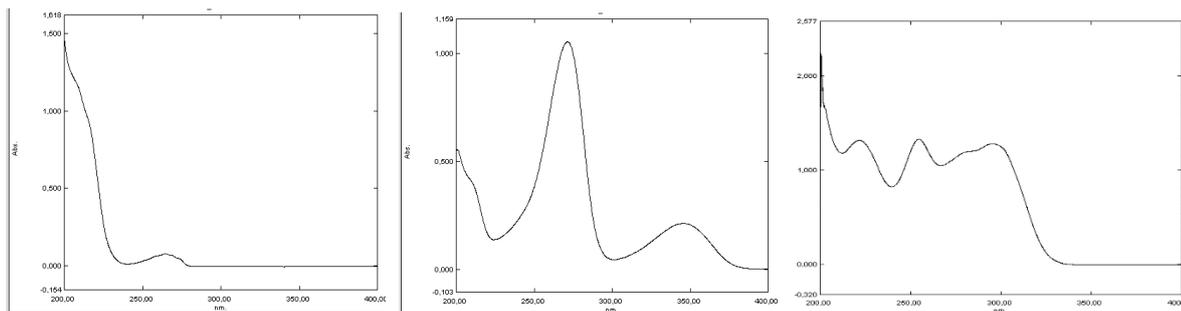


Figura 15. Espectros na região do ultravioleta das impurezas 1, 2 e do ticagrelor, respectivamente.

### 5.3.3 Testes de fase móvel e colunas cromatográficas

A primeira composição de fase móvel a ser testada no desenvolvimento deste método foi a mistura de acetonitrila e água na proporção de 57:43 (v/v), porém sem a trietilamina. A decisão por retirar a trietilamina se baseou no fato de esta substância interferir nas análises em espectrômetro de massas devido ao seu elevado grau de volatilidade. Considerando que, ao se tratar do controle de impurezas em produtos farmacêuticos, onde pode ser necessário realizar a identificação dessas substâncias, seria vantajoso fazer uso de um método hifenizado para separação e identificação desses compostos em uma mesma análise. Nesse sentido, havendo a possibilidade de transpor o método por CLAE com detecção por arranjo de diodos para detecção por espectrometria de massas, isto seria facilitado se as condições do método já forem compatíveis.

Após estes primeiros testes, iniciou-se a otimização do método, mantendo-se, inicialmente, as demais condições originais, como: coluna cromatográfica (Phenomenex Luna C18, 250 x 4,6 mm), pH neutro e fluxo da fase móvel (0,7 ml/min), temperatura da coluna (25 °C) e volume de injeção (20 µl) .

As soluções de trabalho foram obtidas a partir de uma solução estoque de cada uma das SQR individualmente pesando-se 5 mg dos pós e dissolvendo-os em balão volumétrico de 50 ml. A partir de cada solução estoque, transferiu-se 1 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se, assim, uma mistura dos padrões das impurezas e do fármaco, numa concentração de 10 µg/ml cada. Esta solução final foi filtrada em membrana de nylon de 45 µm de

diâmetro de poro, transferida para o vial e injetada no cromatógrafo. O resultado destas primeiras análises se apresenta na figura 16.

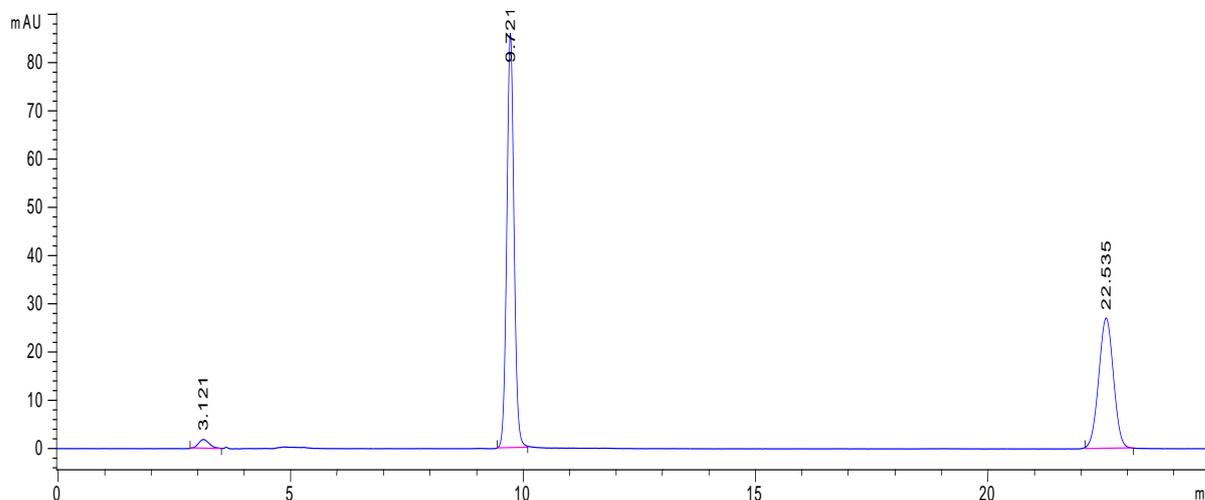


Figura 16. Cromatograma da mistura dos analitos utilizando coluna C18 de 250 nm e fase móvel composta por acetonitrila: água (57:43, v/v). O tempo de retenção de 3.121 minutos corresponde à impureza 1, o tempo de 9.121 minutos corresponde ao ticagrelor e o de 22.535 minutos corresponde à impureza 2.

O que se percebe a partir do cromatograma acima, é que a impureza 1 possui uma absorção reduzida quando comparada aos demais analitos, e, com relação a otimização do método, uma necessidade em limitar o tempo de corrida da análise devido à extensa retenção da impureza 2. Com esse objetivo definido, iniciaram-se diversas modificações nas condições do método a fim de aprimorá-lo o máximo possível.

A primeira alternativa foi a troca da coluna cromatográfica, uma vez que a coluna atual, uma C18 de 250mm, poderia estar contribuindo para o maior tempo de retenção da impureza 2. Nos casos onde o analito é muito retido na fase estacionária C18, as colunas C8 ou fenil são consideradas boas opções (LANÇAS, 2009). Dessa forma, optou-se, primeiramente, por uma coluna C8 de 150mm (Zorbax Eclipse Plus, 4,6 x 150mm, 5 $\mu$ m). O resultado encontra-se elucidado no cromatograma abaixo (Figura 17).

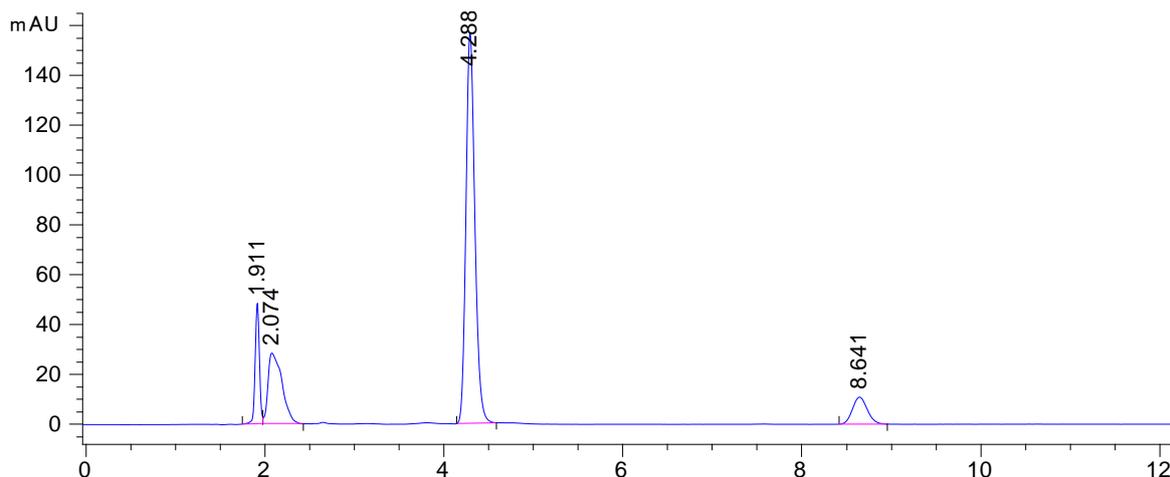


Figura 17. Cromatograma da mistura dos analitos utilizando coluna C8 de 150 mm. Fase móvel composta por acetonitrila: água (57:43, v/v).

Como esperado, ao reduzir o tamanho da coluna e a polaridade da fase móvel, diminuiriam-se também os tempos de retenção dos analitos, totalizando um tempo de análise bastante aceitável, em torno de 10 minutos. No entanto, a redução no tempo de retenção da impureza 1, passando de 3 para 2 minutos, não foi considerada adequada, uma vez que se aproximou muito do volume morto.

Na tentativa de melhorar a resolução entre a impureza 1 e o tempo do volume morto, optou-se por alterar as proporções da fase móvel, alterando a quantidade da fase aquosa de 43% para 46%.

Sabe-se que o princípio da retenção em fase reversa é a hidrofobia, ou seja, a separação no modo reverso se deve principalmente a interações entre a parte não polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa (CASS, 2001). Sendo assim, ao aumentar a proporção da fase aquosa espera-se, também, um aumento na interação do analito com a coluna, e, conseqüentemente, um aumento no seu tempo de retenção.

O que se obteve com essa alteração foi um aumento nos tempos de retenção do ticagrelor, que passou de 4,2 minutos para 4,9 minutos, e da impureza 2, que passou de 8,6 para 10,2 minutos. Esse aumento no tempo total da análise ainda seria considerado conveniente, no entanto, não foi proporcional para a impureza 1. O que se observou para esta substância foi um aumento insignificante no seu tempo de retenção, não sendo suficiente para afastá-la do volume morto com adequada resolução (Figura 18).

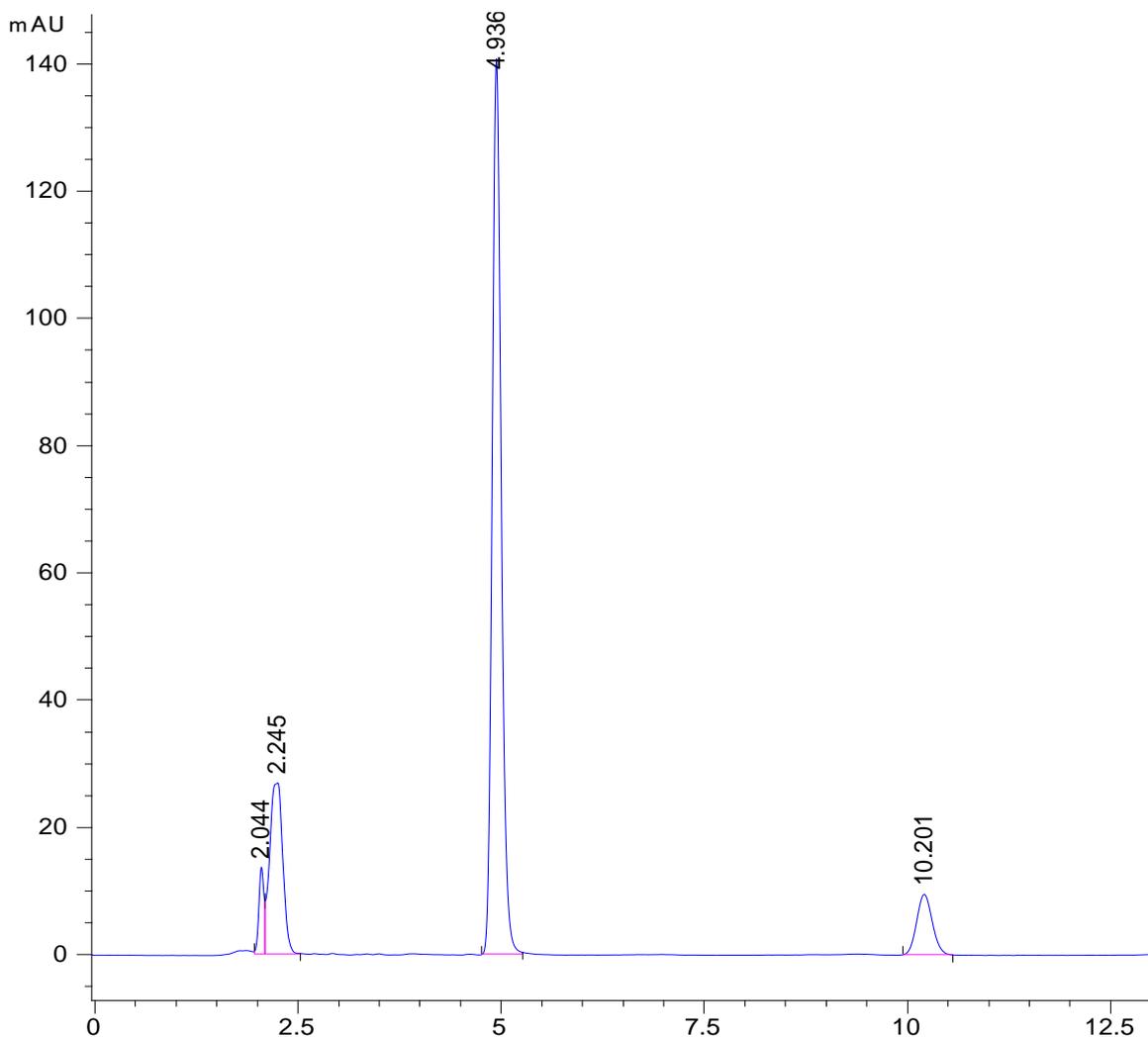


Figura 18. Cromatograma da mistura dos analitos, mudando a proporção da fase móvel para 54:46 (v/v) de acetonitrila e água, e mantendo a coluna C8 de 150 mm.

Outro fator que foi levado em consideração e que poderia estar influenciando nesses resultados é o pH da fase móvel, que até então se mantinha neutro. Sabe-se que nas separações por cromatografia em fase reversa, a retenção diminui para compostos mais hidrofílicos. Assim, quando um ácido ou uma base são ionizados, eles se tornam menos hidrofóbicos e, conseqüentemente, a retenção é reduzida (CASS, 2001). Desse modo, alterações no pH e na força iônica do solvente controlando a ionização podem apresentar resultados satisfatórios. Para isso, é preciso conhecer as características de dissociação da molécula a fim de encontrar a faixa de pH mais adequada para a análise da mesma.

Quando se entende que uma determinada substância possui característica ácida, pressupõe-se que ao diminuir o pH da fase móvel, a retenção irá aumentar. Enquanto que para compostos básicos, é a elevação do pH que aumenta a retenção.

Em vista disso, foi testado primeiramente o pH ácido, voltando às proporções iniciais de fase móvel para 57:43 (v/v) de acetonitrila e água. O ajuste do pH foi feito com ácido fosfórico a 10%, e o valor final ficou em 3,66 (Figura 19).

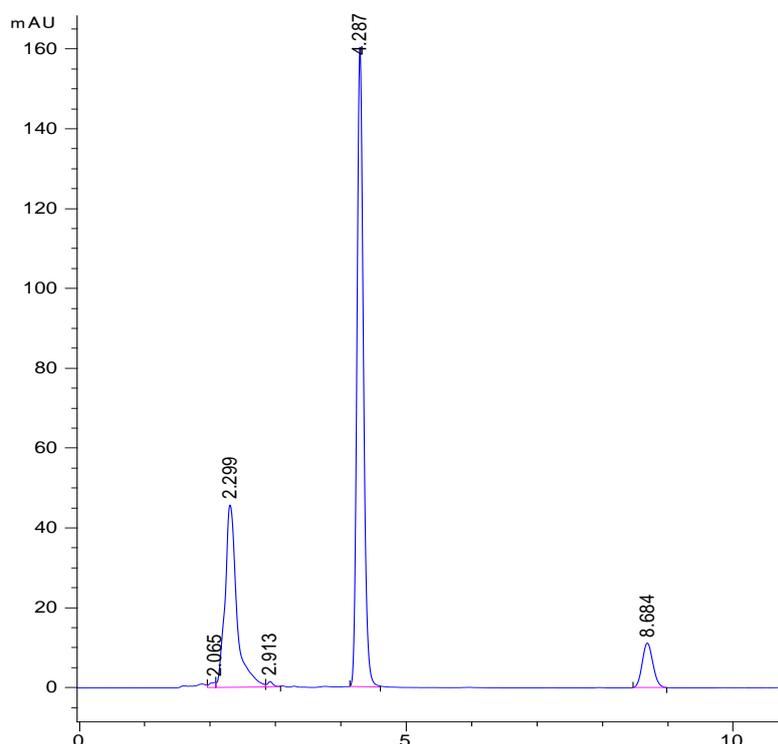


Figura 19. Cromatograma da mistura dos analitos utilizando fase móvel (acetonitrila:água 57:43, v/v) com pH ácido e coluna C8 de 150 mm.

Como se pode observar pelo cromatograma acima (Figura 19), em um pH ácido a impureza 1 não teve sua retenção aumentada, sugerindo que as suas moléculas se mantinham ionizadas, e, por consequência, interagindo menos com a fase estacionária.

A segunda alternativa foi testar a separação da mistura em um pH básico. Ao buscar um maior embasamento na literatura, verificou-se no trabalho de Hassane e colaboradores (2015) que os autores fizeram uso do acetato de amônio na porção aquosa da fase móvel para otimizar a separação dos produtos de degradação do ticagrelor.

É comum fazer uso desses modificadores em cromatografia líquida com o objetivo de alterar a ionização dos analitos através do ajuste do pH do meio, melhorando suas interações com a fase móvel e a fase estacionária (COLLINS, 2006). Deste modo, a escolha foi por alterar a composição da fase móvel para acetonitrila: acetato de amônio 50mM pH 8,2 ajustado com hidróxido de amônio 6M (57:43 v/v). A solução de acetato de amônio foi sempre filtrada em sistema de filtração a vácuo com membrana de nylon de 45µm de diâmetro de poro previamente ao seu uso no cromatógrafo. O resultado desse ensaio encontra-se exposto no cromatograma abaixo (Figura 20), seguido de alguns parâmetros de desempenho avaliados (Tabela 10).

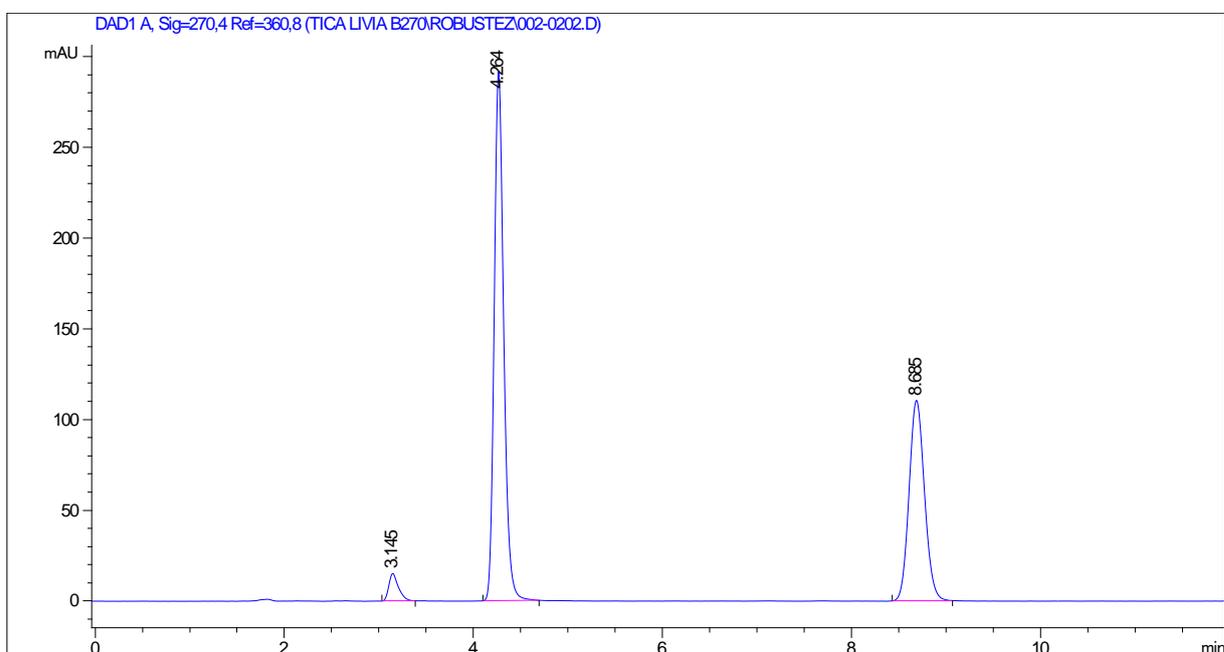


Figura 20. Cromatograma da mistura dos analitos com fase móvel composta por acetonitrila: acetato de amônio 50 mM (57:43 v/v), pH 8,2 e coluna C8 de 150 mm.

Tabela 10. Valores dos principais parâmetros cromatográficos avaliados durante o desenvolvimento do método analítico.

Tempo de retenção (min)	Área	Pratos teóricos	Resolução
3,145	107,95	4939	6,33
4,264	2043,45	9314	6,28
8,685	1255,35	13909	18,73

Nestas condições, o que se pôde notar foi que o pico correspondente à impureza 1 apresentou um aumento no seu tempo de retenção, passando para 3,145 minutos e afastando-se com resolução satisfatória do sinal referente ao volume morto. Além disso, os demais analitos mantiveram-se com boas eluições e o tempo total da análise não excedeu os 10 minutos.

A partir dos resultados deste último ensaio, considerou-se o método como definido, estando adequado para os objetivos a que foi proposto. Ficaram estabelecidas as condições a seguir para a execução da validação analítica (Tabela 11).

Tabela 11. Condições cromatográficas definidas para a validação do método.

<b>Condições finais.</b>	
Equipamento	CLAE Agilent 1200 series
Fase móvel	Acetonitrila: acetato de amônio 50mM (57:43 v/v)
pH	8,2
Fluxo da fase móvel	0,7 ml/min
Detecção	Detector DAD 270 nm
Coluna cromatográfica	Zorbax Eclipse Plus C8 (150 x 4,6 mm, 5,0 µm)
Temperatura da coluna	25°C
Volume de injeção	20 µl
Diluyente	Acetonitrila: água (57:43 v/v)

#### 5.4 Validação do método analítico

A validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência foi efetuada conforme previsto na legislação vigente através da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: especificidade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

#### **5.4.1 Teste de especificidade/seletividade**

Para avaliação da especificidade/seletividade do método, foi preparada uma solução placebo em uma concentração teórica de 45 µg/ml contendo todos os excipientes presentes na formulação. Esta solução foi filtrada em papel filtro duplo e, posteriormente, em membrana de 45 µm de diâmetro de poro.

Os excipientes utilizados no preparo da solução placebo são os descritos na bula do medicamento, nas quantidades indicadas pelo Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE; SHESKEY, 2006): manitol, amidoglicolato de sódio, fosfato de cálcio dibásico, hidroxipropilcelulose, estearato de magnésio, hipromelose, dióxido de titânio, talco, polietilenoglicol e óxido férrico amarelo.

#### **5.4.2 Limites de detecção e quantificação**

Os limites de detecção e quantificação das impurezas foram primeiramente calculados com base na relação sinal x ruído pelo software ChemStation do próprio equipamento. Posteriormente, tais limites foram obtidos experimentalmente através da injeção de diferentes concentrações das amostras, partindo-se de uma solução de 10 µg/ml de cada impureza. As amostras foram diluídas gradualmente e a cada análise, os valores da proporção sinal x ruído dos cromatogramas eram avaliados.

O limite de detecção foi determinado no momento em que a relação entre o sinal analítico do pico de cada impureza e o ruído da linha de base fosse de até 3 vezes. O limite de quantificação foi estabelecido com a determinação do ruído e do sinal analítico, onde o ponto definido foi de um sinal de, no mínimo, 10 vezes a altura do ruído da linha de base.

#### **5.4.3 Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada pela construção de três curvas padrão, em três diferentes dias, de cada uma das impurezas individualmente, e também do ticagrelor. Foram efetuadas três determinações de cada concentração.

Para as impurezas, a curva padrão foi elaborada com nove pontos, iniciando da concentração correspondente ao LQ até 120% do limite máximo especificado,

conforme consta na RE 899 (2013), enquanto que para o fármaco, a curva padrão foi construída com cinco pontos.

As diluições das amostras foram feitas a partir da solução estoque da SQR de cada analito na concentração de 100 µg/ml, e estão apresentadas nas tabelas 12, 13 e 14.

Tabela 12. Diluições da impureza 1 para avaliação da linearidade.

<b>Volume de solução estoque (100 µg/ml)</b>	<b>Volume final</b>	<b>Concentração</b>
100 µl	5 ml	2 µg/ml
250 µl	5 ml	5 µg/ml
500 µl	5 ml	10 µg/ml
750 µl	5 ml	15 µg/ml
1,0 ml	5 ml	20 µg/ml
1,5 ml	5 ml	30 µg/ml
2,0 ml	5 ml	40 µg/ml
2,5 ml	5 ml	50 µg/ml
3,0 ml	5 ml	60 µg/ml

Tabela 13. Diluições da impureza 2 para avaliação da linearidade.

<b>Volume de solução estoque (100 µg/ml)</b>	<b>Volume final</b>	<b>Concentração</b>
20 µl	10 ml	0,2 µg/ml
60 µl	10 ml	0,6 µg/ml
40 µl	5 ml	0,8 µg/ml
50 µl	5 ml	1,0 µg/ml
500 µl	5 ml	10 µg/ml
1,0 ml	5 ml	20 µg/ml
1,5 ml	5 ml	30 µg/ml
2,5 ml	5 ml	50 µg/ml
3,0 ml	5 ml	60 µg/ml

Tabela 14. Diluições do ticagrelor para avaliação da linearidade.

<b>Volume de solução estoque (100 µg/ml)</b>	<b>Volume final</b>	<b>Concentração</b>
1,5 ml	10 ml	15 µg/ml
3,0 ml	10 ml	30 µg/ml
4,5 ml	10 ml	45 µg/ml
6,0 ml	10 ml	60 µg/ml
7,5 ml	10 ml	75 µg/ml

#### **5.4.4 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)**

A precisão do método foi avaliada pela análise de uma solução contendo a mistura das duas impurezas com o fármaco. A cada dia eram preparadas as soluções estoque de cada substância separadamente, na concentração de 100 µg/ml. A partir dessas soluções, uma alíquota de 2 ml da impureza 1, 1 ml da impureza 2 e 4,5 ml do ticagrelor eram transferidas para um balão volumétrico de 10 ml e o volume deste completado com o diluente, resultando em uma mistura contendo a impureza 1 na concentração de 20 µg/ml, a impureza 2 na concentração de 10 µg/ml e o ticagrelor na concentração de 45 µg/ml. Esse procedimento repetiu-se em 6 balões, sendo cada um deles analisado em triplicata.

Para verificação da precisão intermediária, o procedimento foi o mesmo da repetibilidade, sendo executado em três dias distintos.

A precisão do método foi avaliada pela análise dos desvios padrão relativos (DPR) entre as análises da repetibilidade e também para a verificação da reprodutibilidade.

#### **5.4.5 Exatidão**

A análise da exatidão do método foi realizada através da adição de concentrações conhecidas dos padrões das impurezas à solução padrão do ticagrelor. Manteve-se a concentração do fármaco sempre constante, em 45 µg/ml, e modificou-se as concentrações das impurezas em três níveis dentro da faixa de

linearidade: concentração baixa, média e alta, conforme ilustrado na tabela 15. Além disso, foram realizadas análises isoladas do ticagrelor (45 µg/ml) e da mistura das impurezas 1 (20 µg/ml) e 2 (10 µg/ml), sendo denominadas de Soluções de Referência. Todas as amostras foram preparadas em triplicata, e cada uma analisada três vezes.

Tabela 15. Preparo das soluções para avaliação da exatidão.

<b>SQR Ticagrelor</b>	<b>SQR Impureza 1</b>	<b>SQR Impureza 2</b>
45 µg/ml	2 µg/ml	0,2 µg/ml
45 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml
45 µg/ml	60 µg/ml	30 µg/ml
45 µg/ml	-	-
-	20 µg/ml	10 µg/ml

Para o cálculo da exatidão foi utilizada a equação descrita abaixo, onde a concentração experimental foi obtida pela curva padrão de cada impureza.

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

#### 5.4.6 Robustez

A robustez do método desenvolvido para a análise de impurezas foi avaliada pela análise de uma amostra contendo a mistura dos padrões das impurezas com o fármaco, nas mesmas concentrações utilizadas no teste de precisão, frente a diferentes alterações no método a fim de verificar se este mantinha seus parâmetros adequados. Assim, foram avaliados os parâmetros de maior importância para um método de análise de impurezas, como: tempo de retenção, resolução entre os analitos, número de pratos teóricos e assimetria dos picos.

Para cada modificação efetuada, a amostra foi injetada três vezes, e a média dos resultados comparados com a condição normal. Na tabela 16 estão expostas as alterações definidas para a verificação da robustez do método.

Tabela 16. Alterações nas condições do método cromatográfico para avaliação da robustez.

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição normal</b>	<b>Alteração 1</b>	<b>Alteração 2</b>
Fluxo da fase móvel	0,7 ml/min	0,6 ml/min	0,8 ml/min
Proporções da fase móvel	57:43	55:45	59:41
pH da fase móvel	8,20	8,01	8,40

## **5.5 Resultados e discussão**

### **5.5.1 Especificidade e seletividade**

Ao se desenvolver um método para análise de impurezas em produtos farmacêuticos, o conceito de seletividade se faz ao garantir que o método seja capaz de separar, de forma confiável, os diferentes analitos de interesse (neste caso, as impurezas de síntese e o fármaco) sem interferência dos excipientes da formulação.

Para alcançar esta definição, optou-se por analisar a matriz que compõe os comprimidos de ticagrelor, pela injeção da solução placebo do mesmo, e comparar com uma amostra onde os analitos de interesse a este estudo estivessem presentes.

O que se espera é que na amostra do placebo não ocorra a formação de nenhum pico cromatográfico, especialmente nos tempos de retenção próximos aos dos analitos. Além disso, a confirmação da seletividade do método pode ser feita através do uso de detectores que indicam a pureza dos picos cromatográficos. O uso do detector de arranjo de diodos é bastante empregado para confirmar a pureza e a identidade do pico em análise.

Também foi avaliado se a composição utilizada como diluente durante o preparo das amostras poderia interferir na análise dos componentes da mistura das impurezas com o fármaco.

Abaixo pode-se ver os cromatogramas correspondentes à solução placebo e ao sistema diluente (Figuras 21 e 22, respectivamente).

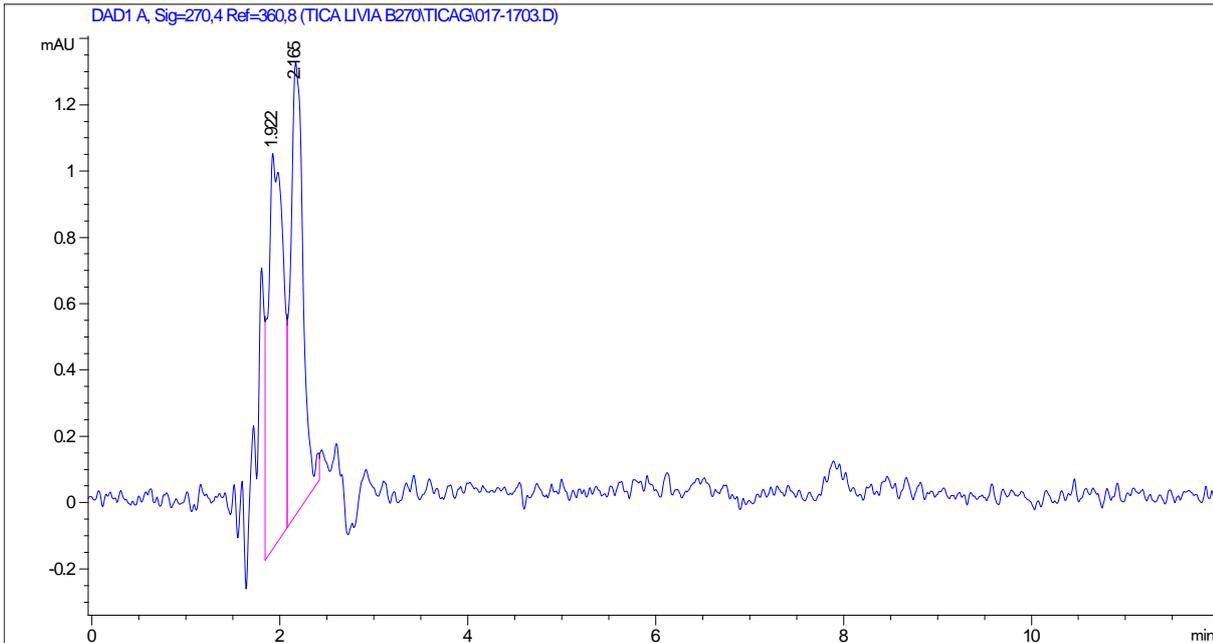


Figura 21. Cromatograma da solução placebo contendo os excipientes presentes nos comprimidos de ticagrelor.

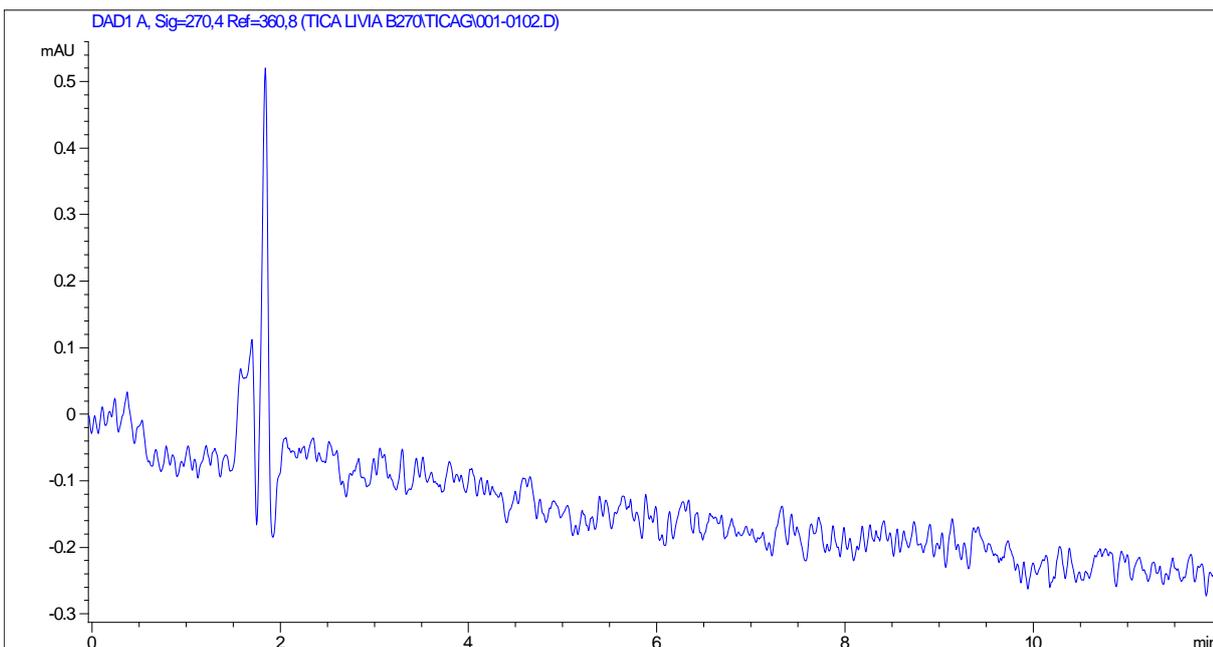


Figura 22. Cromatograma correspondente a injeção do diluente utilizado no preparo das amostras.

Como se pode observar nos cromatogramas, tanto a solução placebo quanto o diluente não interferem na análise do ativo, bem como de suas impurezas de síntese, comprovando que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada. Os dados de pureza dos picos dos analitos foram adquiridos pelo software do próprio equipamento, e confirmaram que não há interferência ou coeluição com outras substâncias.

### **5.5.2 Limites de detecção e quantificação**

Os limites de detecção e quantificação de um método cromatográfico podem ser obtidos de diferentes maneiras. Estes podem ser definidos diretamente pelo software do equipamento, ou, a partir dos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (l) obtidos pela curva padrão, ou, ainda, experimentalmente, através da análise de sucessivas diluições das amostras observando-se a relação sinal x ruído dos cromatogramas.

No presente trabalho, os limites do método foram definidos experimentalmente pela análise de diferentes concentrações de cada impureza, até se obter as relações sinal x ruído pré-estabelecidas.

Nos métodos desenvolvidos para o monitoramento de substâncias relacionadas em produtos farmacêuticos, como no caso de impurezas de síntese ou produtos de degradação, o limite de quantificação é um parâmetro muito importante a ser avaliado, uma vez que, nesse tipo de análise, espera-se encontrar quantidades muito pequenas dessas substâncias nas amostras. Além disso, é válido destacar que o ideal é que o limite de quantificação para as impurezas seja menor que o seu limite de notificação estabelecido pelas agências reguladoras para garantir que a metodologia desenvolvida seja capaz de cumprir com o seu propósito.

Sendo assim, os limites de quantificação das impurezas 1 e 2 foram de 2 µg/ml e 0,2 µg/ml, respectivamente. Tais valores vão ao encontro do que se verificou desde os testes preliminares ao desenvolvimento do método, onde a impureza 1 sempre se mostrou com uma menor sensibilidade de detecção quando comparada à impureza 2, sendo este fator capaz de afetar no limite de quantificação de um analito (CHAN *et al.*, 2004).

Para garantir a confiabilidade de tal resultado, foram preparadas três amostras das concentrações dos limites de quantificação de cada impureza e cada uma delas injetada em triplicata. Os DPRs das áreas foram calculados e os valores obtidos foram de 1,05% para a impureza 1 e 0,55% para a impureza 2, respectivamente.

Já os limites de detecção obtidos para cada uma das impurezas 1 e 2 foram de 0,5 e 0,07 µg/ml, nessa ordem.

### **5.5.3 Linearidade**

O primeiro critério de aceitação desse parâmetro se dá pelo exame visual do gráfico de calibração, sendo este o modo mais sensível de se detectar um possível desvio de linearidade. Em seguida, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para comprovação da linearidade do método.

A verificação da linearidade foi realizada pela análise da correlação entre as concentrações dos analitos e suas respectivas áreas, a partir dos gráficos de calibração. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi aplicado para confirmar a linearidade do método. Os resíduos padronizados também foram avaliados a fim de verificar possíveis amostras atípicas.

#### **5.5.3.1 Avaliação da linearidade do método para a impureza 1**

A figura 23 mostra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método, bem como a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

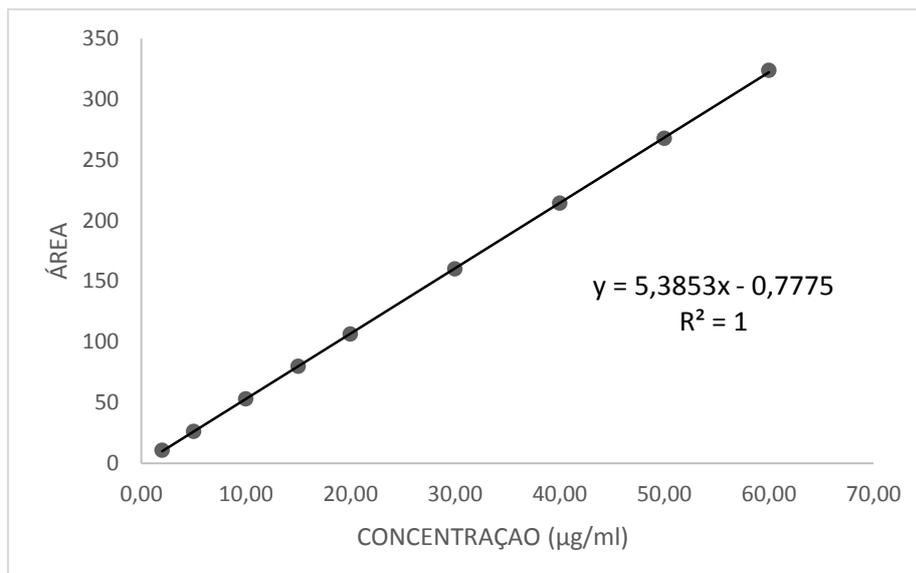


Figura 23. Representação gráfica da curva de calibração da impureza 1 obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

A tabela 17 apresenta os resultados correspondentes à análise de regressão linear ( $p \leq 0,05$ ) dos dados determinados a partir das curvas individuais da impureza 1.

Tabela 17. Estatística de regressão linear da impureza 1.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99997467
R-Quadrado	0,99994934
R-quadrado ajustado	0,999942103
Erro padrão	0,842069974
Observações	9

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	97973,92532	97973,92532	138170,1232	2,69313E-16
Resíduo	7	4,963572887	0,709081841		
Total	8	97978,88889			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	-0,806336868	0,467392433	-1,725181693	0,12814634	-1,91154435	0,298870613	-1,91154	0,298870613
Variável X 1	5,38903893	0,014497872	371,71242	2,69313E-16	5,354756912	5,423320949	5,354757	5,423320949

A tabela 18 apresenta os dados para o cálculo do resíduo padronizado de regressão linear, realizado sobre os resultados obtidos na linearidade.

Tabela 18. Resíduos da regressão linear obtidos a partir dos resultados da linearidade da impureza 1.

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	9,971740992	1,028259008	1,305420157
2	26,13885778	-0,138857783	-0,176286079
3	53,08405243	-0,084052434	-0,106708272
4	80,02924709	-0,029247085	-0,037130464
5	106,9744417	0,025558264	0,032447343
6	160,864831	-0,864831039	-1,097941143
7	214,7552203	-0,755220341	-0,958785529
8	268,6456096	-0,645609644	-0,819629914
9	322,5359989	1,464001054	1,858613901

A figura 24 representa os resíduos obtidos a partir da curva de regressão linear da impureza 1.

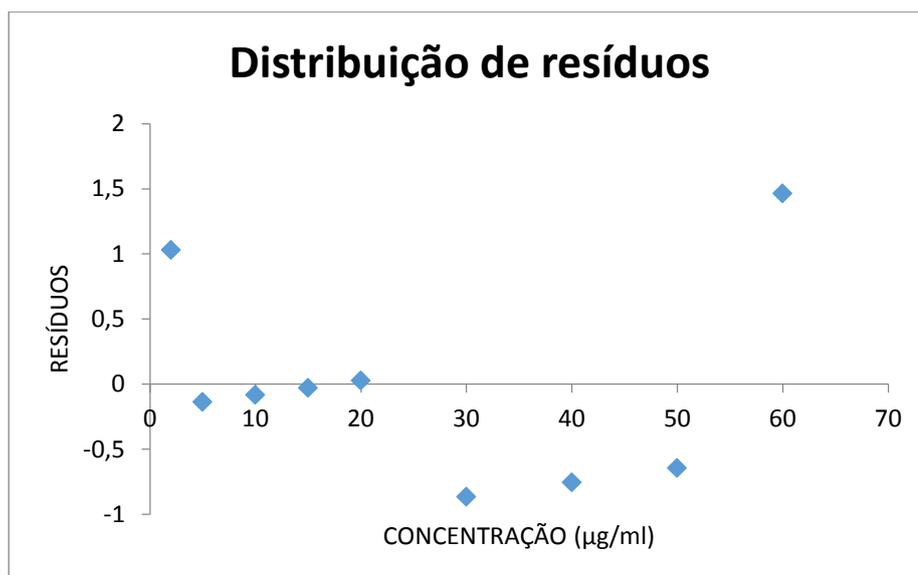


Figura 24. Representação gráfica da distribuição residual de regressão linear da impureza 1.

### 5.5.3.2 Avaliação da linearidade do método para a impureza 2

A figura 25 mostra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método, bem como a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

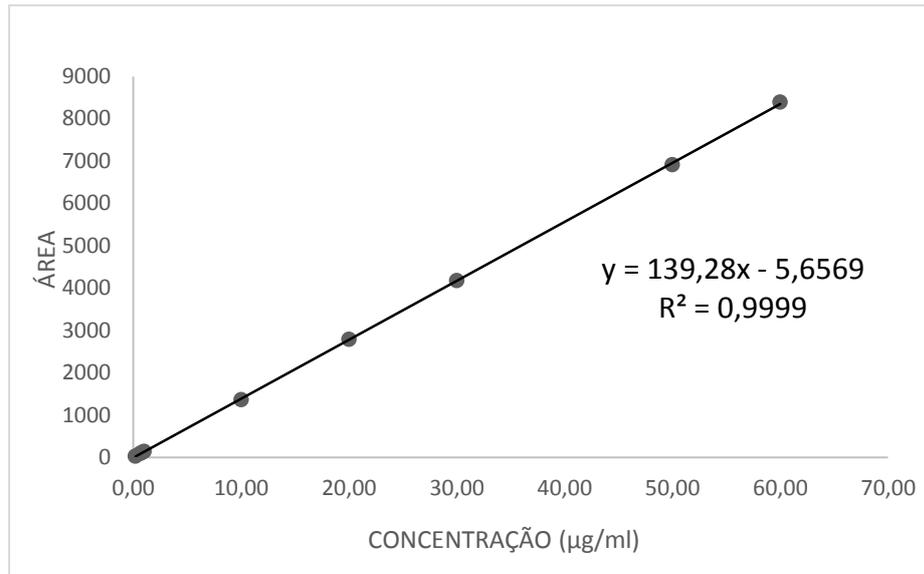


Figura 25. Representação gráfica da curva de calibração da impureza 2 obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

A tabela 19 apresenta os resultados correspondentes à análise de regressão linear ( $p \leq 0,05$ ) dos dados determinados a partir das curvas individuais da impureza 2.

Tabela 19. Estatística de regressão linear da impureza 2.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999971473
R-Quadrado	0,999942946
R-quadrado ajustado	0,999934796
Erro padrão	25,74475042
Observações	9

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	81314472,45	81314472,45	122684,7202	4,08255E-16
Resíduo	7	4639,54522	662,7921743		
Total	8	81319112			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	-5,666565591	11,48018229	-0,493595437	0,636700277	-32,81288305	21,47975187	-32,8129	21,47975187
Variável X 1	139,2757769	0,397631106	350,2637866	4,08255E-16	138,3355287	140,216025	138,3355	140,216025

A tabela 20 apresenta os dados para o cálculo do resíduo padronizado de regressão linear, realizado sobre os resultados obtidos na linearidade.

Tabela 20. Resíduos da regressão linear obtidos a partir dos resultados da linearidade da impureza 2.

Observação	Y previsto	Resíduos	Resíduos padrão
1	22,18858979	6,811410214	0,282842276
2	77,89890054	7,10109946	0,294871557
3	105,7540559	6,245944083	0,259361422
4	133,6092113	4,390788706	0,182326513
5	1387,091203	-26,09120326	-1,083431344
6	2779,848972	8,151027895	0,338469599
7	4172,606741	-0,606740954	-0,025194782
8	6958,122279	-46,12227865	-1,915217242
9	8350,880047	40,1199525	1,665971999

A figura 26 representa os resíduos obtidos a partir da curva de regressão linear da impureza 2.

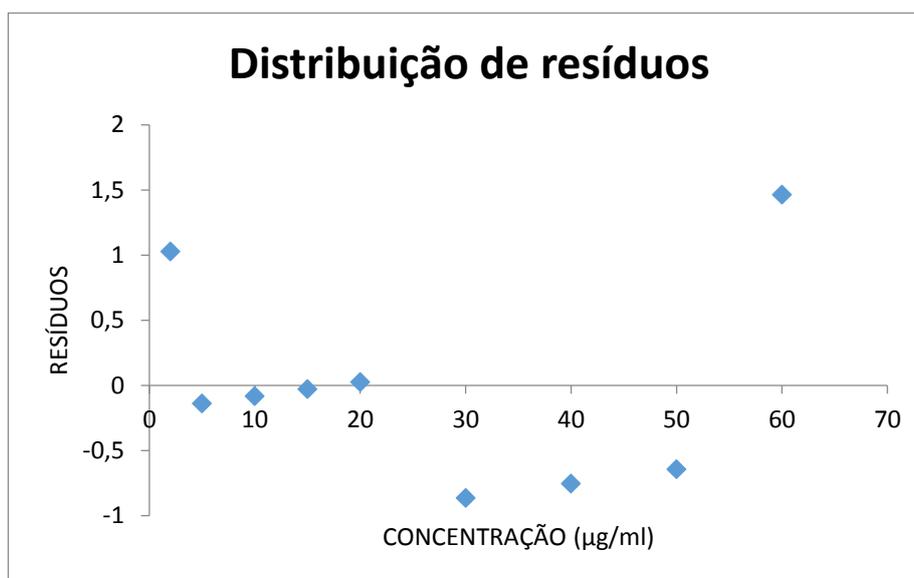


Figura 26. Representação gráfica da distribuição residual de regressão linear da impureza 2.

### 5.5.3.3 Avaliação da linearidade do método para o ticagrelor

A figura 27 mostra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método, bem como a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

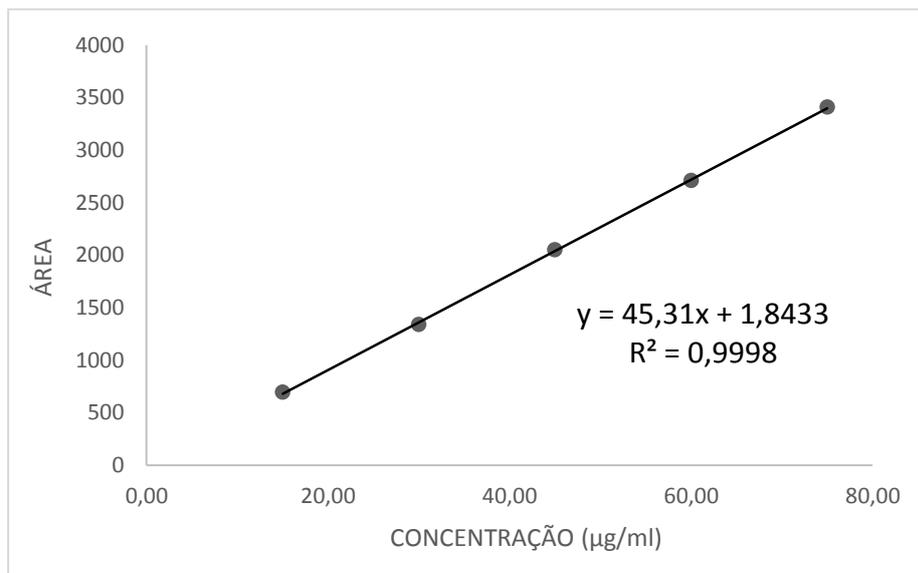


Figura 27. Representação gráfica da curva de calibração do ticagrelor obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

A tabela 21 apresenta os resultados correspondentes à análise de regressão linear ( $p \leq 0,05$ ) dos dados determinados a partir das curvas individuais do ticagrelor.

Tabela 21. Estatística de regressão linear do ticagrelor.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999899662
R-Quadrado	0,999799334
R-quadrado ajustado	0,999732446
Erro padrão	17,5755512
Observações	5

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	4617202,5	4617202,5	14947,24021	1,20649E-06
Resíduo	3	926,7	308,9		
Total	4	4618129,2			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2,1	18,43339361	0,113923678	0,91649471	-56,56328539	60,76328539	-56,5633	60,76328539
Variável X 1	45,3	0,370525153	122,2589065	1,20649E-06	44,1208236	46,4791764	44,12082	46,4791764

A tabela 22 apresenta os dados para o cálculo do resíduo padronizado de regressão linear, realizado sobre os resultados obtidos na linearidade.

Tabela 22. Resíduos da regressão linear obtidos a partir dos resultados da linearidade do ticagrelor.

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	681,6	13,4	0,880369955
2	1361,1	-21,1	-1,386254182
3	2040,6	10,4	0,683272204
4	2720,1	-11,1	-0,729261679
5	3399,6	8,4	0,551873703

A figura 28 representa os resíduos obtidos a partir da curva de regressão linear do ticagrelor.

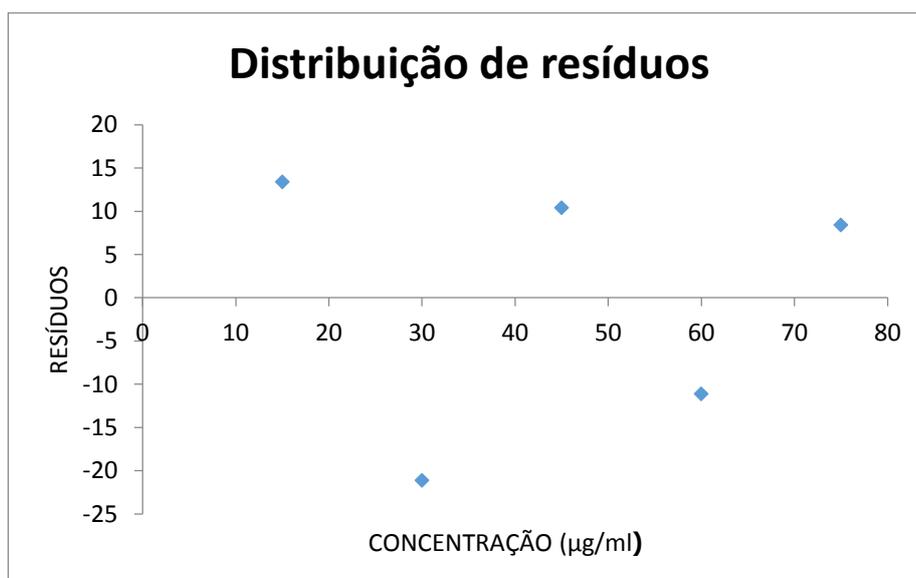


Figura 28. Representação gráfica da distribuição residual de regressão linear do ticagrelor.

Os resultados obtidos na análise da linearidade apresentaram-se satisfatórios para todos os compostos. Os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) obtidos para o ticagrelor e para as impurezas 1 e 2 foram de 0,9998, 1 e 0,9996, respectivamente, todos de acordo com o especificado. A análise estatística de regressão linear também apresentou valores adequados, comprovando que o método possui linearidade. Por fim, dos gráficos dos resíduos não apresentou indicadores de

variância não-constante, sendo os resíduos obtidos aleatoriamente distribuídos com ausência de amostras atípicas.

#### 5.5.4 Precisão

O estudo completo da precisão do método foi conduzido por três dias, sendo cada dia avaliado individualmente para verificação da repetibilidade. Ao final das três análises, as médias dos DPR foram relacionadas para compor o resultado da precisão intermediária.

As tabelas 23, 24 e 25 apresentam os resultados da análise de repetibilidade e reprodutibilidade da Impureza 1, Impureza 2 e do ticagrelor, nesta ordem.

Tabela 23. Resultados da precisão intra-dia e interdias da Impureza 1.

<b>REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA – IMPUREZA 1</b>			
	<b>DIA 1 (µg/ml)</b>	<b>DIA 2 (µg/ml)</b>	<b>DIA 3 (µg/ml)</b>
ANÁLISE 1	17,08	19,16	19,73
ANÁLISE 2	19,04	19,45	21,09
ANÁLISE 3	19,63	19,52	21,08
ANÁLISE 4	19,33	19,43	21,28
ANÁLISE 5	19,38	19,42	21,14
ANÁLISE 6	19,10	19,25	21,24
<b>MÉDIA</b>	<b>18,93</b>	<b>19,37</b>	<b>20,93</b>
<b>DP</b>	<b>0,93</b>	<b>0,14</b>	<b>0,59</b>
<b>DPR %</b>	<b>4,90</b>	<b>0,71</b>	<b>2,83</b>
<b>MÉDIA (n = 18)</b>	<b>19,74</b>		
<b>DESV PAD (n = 18)</b>	<b>1,07</b>		
<b>DPR % (n = 18)</b>	<b>5,41</b>		

Tabela 24. Resultados da precisão intra-dia e interdias da Impureza 2.

<b>REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA – IMPUREZA 2</b>			
	<b>DIA 1 (µg/ml)</b>	<b>DIA 2 (µg/ml)</b>	<b>DIA 3 (µg/ml)</b>
ANÁLISE 1	8,95	8,88	8,95
ANÁLISE 2	9,07	8,85	9,07
ANÁLISE 3	9,09	8,84	8,95
ANÁLISE 4	9,06	8,83	8,94
ANÁLISE 5	9,21	8,84	8,94
ANÁLISE 6	9,21	8,89	8,92
<b>MEDIA</b>	9,10	8,85	8,96
<b>DP</b>	0,10	0,02	0,06
<b>DPR %</b>	1,09	0,25	0,62
<b>MÉDIA (n = 18)</b>	<b>8,97</b>		
<b>DESV PAD (n = 18)</b>	<b>0,12</b>		
<b>DPR % (n = 18)</b>	<b>1,35</b>		

Tabela 25. Resultados da precisão intra-dia e interdias do ticagrelor.

<b>REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA – TICAGRELOR</b>			
	<b>DIA 1 (µg/ml)</b>	<b>DIA 2 (µg/ml)</b>	<b>DIA 3 (µg/ml)</b>
ANÁLISE 1	44,77	45,35	44,77
ANÁLISE 2	45,70	45,66	45,64
ANÁLISE 3	46,03	45,59	45,57
ANÁLISE 4	45,96	45,57	45,48
ANÁLISE 5	46,15	45,51	45,40
ANÁLISE 6	46,10	46,46	45,32
<b>MEDIA</b>	45,79	45,69	45,36
<b>DP</b>	0,52	0,39	0,31
<b>DPR %</b>	1,14	0,86	0,69
<b>MÉDIA (n = 18)</b>	<b>45,61</b>		
<b>DESV PAD (n = 18)</b>	<b>0,43</b>		
<b>DPR % (n = 18)</b>	<b>0,95</b>		

A partir dos valores de DPR obtidos entre as concentrações das amostras, pode-se afirmar que o método proposto apresentou adequada repetibilidade e reprodutibilidade tanto para a Impureza 1 quanto para a Impureza 2. O mesmo se observou nos resultados dos DPR do ticagrelor, que também apresentaram valores satisfatórios.

Cabe destacar que para métodos de análise de traços ou impurezas, os valores aceitáveis de DPR no teste de precisão podem ser diferentes dos usuais, sendo admitidos até 20% de DPR, dependendo do tipo de amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

### 5.5.5 Exatidão

As tabelas 26, 27 e 28 a seguir apresentam os valores de recuperação obtidos a partir das concentrações determinadas experimentalmente para as impurezas 1 e 2, e para o ticagrelor, respectivamente.

Tabela 26. Percentuais de recuperação obtidos nas diferentes concentrações para a impureza 1.

EXATIDÃO – IMPUREZA 1					
	CONC TEÓRICA ( $\mu\text{g/ml}$ )	CONC REAL ( $\mu\text{g/ml}$ )	ÁREA	CONC CURVA ( $\mu\text{g/ml}$ )	% RECUPERAÇÃO
PONTO BAIXO	2,0	2,08	10,47	2,09	100,38
PONTO MÉDIO	20,0	20,08	107,39	20,09	96,56
PONTO ALTO	60,0	61,2	336,10	62,56	102,21

Tabela 27. Percentuais de recuperação obtidos nas diferentes concentrações para a impureza 2.

EXATIDÃO – IMPUREZA 2					
	CONC TEÓRICA ( $\mu\text{g/ml}$ )	CONC REAL ( $\mu\text{g/ml}$ )	ÁREA	CONC CURVA ( $\mu\text{g/ml}$ )	% RECUPERAÇÃO
PONTO BAIXO	0,2	0,20	24	0,21	105,53
PONTO MÉDIO	10,0	10,16	1240	8,94	88,0
PONTO ALTO	30,0	30,48	4324	31,09	101,99

Tabela 28. Percentuais de recuperação obtidos nas diferentes concentrações para o ticagrelor.

EXATIDÃO – TICAGRELOR			
CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/ml}$ )	ÁREA	CONC CURVA ( $\mu\text{g/ml}$ )	% RECUPERAÇÃO
45,0	2027	44,70	99,33
45,0	2000	44,09	97,98
45,0	2022	44,59	99,09

A partir dos resultados obtidos no teste de exatidão, verificado pelo princípio da recuperação, o método não apresenta resultados satisfatórios para a Impureza 2 quando levado em consideração os critérios de aceitação usuais para análise de teor de fármacos, que são de 95 a 105% de recuperação. No entanto, para métodos de análise de impurezas esses limites podem ser discutidos e os valores de aceitação expandidos, uma vez que, nesses casos, as concentrações usuais dos analitos nas amostras podem ser bastante reduzidas, o que permite que se tenha uma maior variação nos percentuais de recuperação do método (RIBANI *et al.*, 2004).

Como se pode perceber, a avaliação da exatidão para a Impureza 1 apresentou valores de recuperação dentro dos critérios usuais de aceitação, ficando entre 96,56 e 102,21%. Já para a Impureza 2, nota-se que houve uma variação maior nos resultados, especialmente no ponto médio (10  $\mu\text{g/ml}$ ), onde a recuperação ficou em 88%. Ainda assim, tal valor se justificaria ao analisarmos que, quando a

amostra da Impureza 2 foi analisada isoladamente, na mesma concentração de 10 µg/ml, o valor da recuperação também foi inferior aos 95%.

Uma vez que as guias oficiais ainda não estabelecem de forma unânime quais os critérios ideais para a validação de métodos para análise de impurezas, os valores aqui expostos podem ser considerados aceitáveis.

#### **5.5.6 Robustez**

A análise da robustez de uma metodologia analítica é um dos parâmetros de grande importância na validação. Garantir que o método proposto resiste a pequenas variações em suas condições de análise propicia uma maior segurança para o laboratório que for utilizá-lo e atesta a confiança durante a rotina de trabalho.

Apesar de ser comumente o último parâmetro a ser verificado durante a validação analítica, muitos profissionais da área consideram que, devido a sua importância, o ideal é que a robustez seja avaliada logo no início da validação. Isso traria mais segurança ao longo da validação, pois se o método se mostrar pouco resistente a pequenas variações, ele provavelmente não será aprovado nos demais testes.

Os resultados estão apresentados nas tabelas 29, 30 e 31.

Tabela 29. Resultados da avaliação da robustez do método na análise da Impureza 1.

ROBUSTEZ – IMPUREZA 1										
	TEMPO RETENÇÃO	Diferença <sup>(b)</sup> %	ÁREA	Diferença %	RESOLUÇÃO	Diferença %	PRATOS TEÓRICOS	Diferença %	ASSIMETRIA	Diferença %
CONDIÇÕES NORMAIS <sup>(a)</sup>	3,148	-	107,97	-	6,26	-	4949,7	-	0,64	-
ALTERAÇÃO NO FLUXO FASE MÓVEL: 0,6 ml/min	3,679	16,86	125,73	16,44	6,26	0	4983,67	0,68	0,61	-4,68
ALTERAÇÃO NO FLUXO FASE MÓVEL: 0,8 ml/min	2,763	-12,22	94,80	-12,19	6,03	-3,67	4526,33	-8,55	0,66	3,12
ALTERAÇÃO NAS PROPORÇÕES FASE MÓVEL: 55:45	3,29	4,51	107,93	-0,03	7,68	22,68	5546,00	12,04	0,70	9,37
ALTERAÇÃO NAS PROPORÇÕES FASE MÓVEL: 59:41	3,044	-3,30	108,13	0,148	5,88	-6,07	6239,67	26,06	0,60	-6,25
ALTERAÇÃO pH FASE MÓVEL: 8,0	3,07	-2,47	109,37	1,29	6,95	11,02	5687,00	14,89	0,67	4,68
ALTERAÇÃO pH FASE MÓVEL: 8,4	3,15	0,063	110,43	2,27	6,54	4,47	5481,67	10,74	0,68	6,25

(a): Fase Móvel: acetonitrila/acetato de amônio 50 mM (57:43 v/v); fluxo 0,7 ml/min; pH 8,2.

(b): [alteração – condição normal]/condição normal x 100

Tabela 30. Resultados da avaliação da robustez do método na análise da Impureza 2.

ROBUSTEZ – IMPUREZA 2										
	TEMPO RETENÇÃO	Diferença <sup>(b)</sup> %	ÁREA	Diferença %	RESOLUÇÃO	Diferença %	PRATOS TEÓRICOS	Diferença %	ASSIMETRIA	Diferença %
CONDIÇÕES NORMAIS <sup>(a)</sup>	8,68	-	1256,3	-	18,73	-	13908	-	0,87	-
ALTERAÇÃO NO FLUXO FASE MÓVEL: 0,6 ml/min	10,11	16,47	1463,77	16,51	19,02	1,54	13861	-0,33	0,88	1,14
ALTERAÇÃO NO FLUXO FASE MÓVEL: 0,8 ml/min	7,58	-12,67	1096,80	-12,69	18,38	-1,86	13768	-1,00	0,87	0
ALTERAÇÃO NAS PROPORÇÕES FASE MÓVEL: 55:45	9,61	10,71	1247,57	-0,69	18,80	0,37	13610	-2,14	0,88	1,14
ALTERAÇÃO NAS PROPORÇÕES FASE MÓVEL: 59:41	7,79	-10,25	1252,50	-0,30	17,63	-5,87	13622	-2,05	0,86	-1,14
ALTERAÇÃO pH FASE MÓVEL: 8,0	8,52	-1,84	1244,40	-0,94	18,54	-1,01	14107	1,43	0,87	0
ALTERAÇÃO pH FASE MÓVEL: 8,4	8,56	-1,38	1241,93	-1,14	18,33	-2,13	13865	-0,30	0,87	0

(a): Fase móvel: acetonitrila/acetato de amônio 50 mM (57:43 v/v); fluxo 0,7 ml/min; pH 8,2.

(b): [alteração – condição normal]/condição normal x 100

Tabela 31. Resultados da avaliação da robustez do método na análise do ticagrelor,

**ROBUSTEZ – TICAGRELOR**

	TEMPO RETENÇÃO	Diferença <sup>(b)</sup> %	ÁREA	Diferença %	RESOLUÇÃO	Diferença %	PRATOS TEÓRICOS	Diferença %	ASSIMETRIA	Diferença %
CONDIÇÕES NORMAIS <sup>(a)</sup>	4,24	-	2042,30	-	6,26	-	9313	-	0,78	-
ALTERAÇÃO NO FLUXO FASE MÓVEL: 0,6 ml/min	4,95	16,74	2384,63	16,76	6,26	0	9990,3	7,27	0,77	-1,28
ALTERAÇÃO NO FLUXO FASE MÓVEL: 0,8 ml/min	3,74	-11,79	1788,73	-12,41	6,03	-3,67	8815,7	-5,33	0,79	1,28
ALTERAÇÃO NAS PROPORÇÕES FASE MÓVEL: 55:45	4,70	10,84	2035	-0,35	7,68	22,68	9634,7	3,45	0,79	1,28
ALTERAÇÃO NAS PROPORÇÕES FASE MÓVEL: 59:41	3,98	-6,13	2044,3	0,09	5,87	-6,23	9363,7	0,54	0,77	-1,28
ALTERAÇÃO pH FASE MÓVEL: 8,0	4,24	0	2021,1	-1,03	6,94	10,86	9552	2,56	0,79	1,28
ALTERAÇÃO pH FASE MÓVEL: 8,4	4,29	1,17	2020,83	-1,05	6,53	4,31	9671	3,84	0,79	1,28

(a): Fase móvel: acetonitrila/acetato de amônio 50 mM (57:43 v/v); fluxo 0,7 ml/min; pH 8,2.

(b): [alteração – condição normal]/condição normal x 100

Os resultados do teste de robustez foram adquiridos pelo cálculo da variação percentual (%) entre cada alteração do método com relação à condição normal. No entanto, como mais uma vez se carece de um acordo que defina o quanto de variação é aceitável, justifica-se aqui que o método se apresenta robusto por manter todos os parâmetros que comprometeriam sua performance dentro dos critérios estabelecidos.

Sobre o tempo de retenção das impurezas, percebe-se que houve variação em ambas, no entanto, não a ponto de comprometer a resolução da Impureza 1 com o tempo do volume morto e nem da Impureza 2 em prolongar o tempo total da corrida cromatográfica.

Em todos os outros parâmetros avaliados, nota-se que, para ambas as impurezas, as variações apresentadas também não impactaram de forma a comprometer a performance do método.

Da mesma forma, a análise do ativo também não foi prejudicada em nenhum aspecto quando feitas as alterações nas condições do método.

## **5.6 Aplicação do método desenvolvido na análise do produto farmacêutico**

Após proceder com a validação do método, o mesmo foi aplicado na análise de uma amostra de um lote de comprimidos de ticagrelor a fim de verificar uma eventual ocorrência das impurezas de síntese no produto acabado. Para isso, foram preparadas duas soluções, a partir de um mesmo pool de comprimidos, na concentração de 750 µg/ml. As soluções foram previamente filtradas em membrana de nylon de 45 µm e injetadas no cromatógrafo.

### **5.6.1 Resultado e discussão**

O cromatograma resultante da injeção da amostra do produto farmacêutico está demonstrado na figura 29. Foi aplicado zoom na linha de base para verificar se existe a presença de alguma das impurezas de síntese do ticagrelor. O que se observa, para o lote analisado, é que o produto acabado não apresenta nenhuma substância além do fármaco.

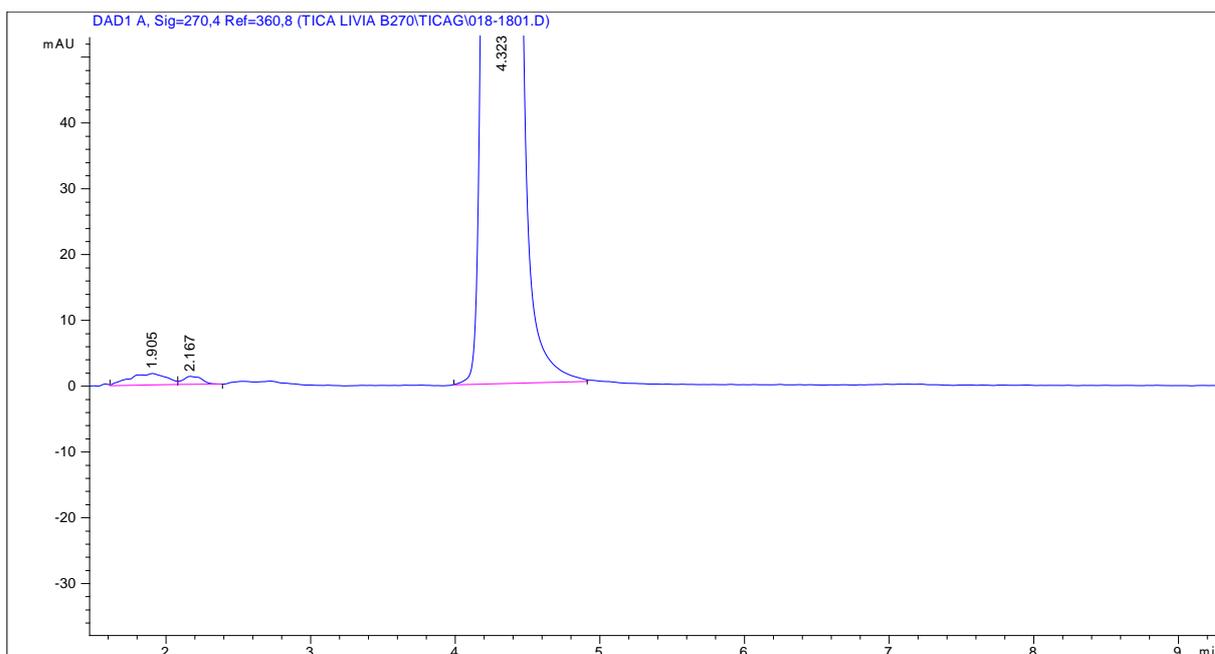


Figura 29. Cromatograma, aplicado zoom, da análise de uma solução de comprimidos de ticagrelor a 750 µg/ml.

## 5.7 Conclusão

Após a finalização dos ensaios e interpretação dos resultados de cada parâmetro avaliado, é possível afirmar que o método desenvolvido com o propósito de detectar, separar e quantificar as impurezas de síntese do ticagrelor atendeu aos requisitos necessários para garantir o seu uso de forma confiável.

A validação do método seguiu os preceitos definidos nos guias oficiais do ICH e da legislação vigente no Brasil, através da RE 899 (BRASIL, 2003; ICH Q2B (R1), 2005). No entanto, como já dito anteriormente, a validação dos métodos analíticos desenvolvidos para uso no controle de impurezas em fármacos e produtos acabados deve ser adaptada de forma responsável e coerente, a fim de garantir que o mesmo seja adequado ao seu uso e confiável nos resultados que apresenta.

Nesse contexto, pode-se julgar que o método de cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido nesse trabalho para análise de impurezas de ticagrelor mostrou-se adequado e atendeu aos requisitos estabelecidos, sendo considerado validado.

Além disso, sugere-se que o método aqui proposto poderia ser aplicado também no monitoramento das impurezas de síntese nos comprimidos de ticagrelor, uma vez atestada a não interferência da matriz na análise cromatográfica.



---

**6 CAPÍTULO III. ELUCIDAÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS  
PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO TICAGRELOR E  
PROPOSTA DE ROTAS DE DEGRADAÇÃO**

---



## 6.1 Introdução

Define-se impureza como qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem o(s) excipiente(s) (BRASIL, 2015).

Este conceito compreende inúmeras substâncias químicas, como, por exemplo, os reagentes de partida, intermediários de síntese, resíduos de solventes e os produtos de degradação. Estes últimos, devido a sua notável importância nos estudos de controle de qualidade de medicamentos, bem como seu impacto nos parâmetros de segurança e eficácia, são abordados de maneira bastante incisiva e abrangente dentro do controle de qualidade de impurezas. Sabe-se que, quando um produto farmacêutico sofre algum tipo de degradação, pode ocorrer a formação de novas entidades químicas que podem afetar diretamente a segurança do medicamento por algum fator de toxicidade, e/ou a sua eficácia, ao reduzir o teor do princípio ativo na formulação.

Frente a este cenário, torna-se relevante acompanhar o comportamento do produto acabado sob diferentes fatores de degradação para, a partir de então, elucidar os mecanismos pelos quais se formam os produtos de degradação, bem como identificar e qualificar tais substâncias.

Para isso, as empresas devem conduzir diferentes estudos de estabilidade nos medicamentos, conforme preconizado e definido nos guias oficiais, a fim de promover a sua degradação forçada e avaliar os produtos de degradação eventualmente formados.

O guia Q6A do ICH, no qual são estabelecidos os procedimentos de análise e os critérios de aceitação para novos fármacos e produtos farmacêuticos, prevê que as impurezas que foram estudadas e monitoradas em uma nova substância ativa não precisam ser controladas ou especificadas no produto acabado, a menos que elas também sejam produtos de degradação. Isto é, impurezas provenientes do processo de síntese da nova substância ativa são normalmente controladas durante os ensaios do fármaco, e, portanto, não estão incluídas no limite de impurezas totais. No entanto, quando uma impureza de síntese é também um produto de degradação, o seu nível deve ser monitorado e incluído no limite total de produtos de degradação (ICH Q6A, 1999).

Assim, a elaboração deste último capítulo se apoiou na ideia de complementar os estudos sobre o perfil de impurezas do ticagrelor, tendo como objetivo principal investigar a identidade dos seus principais produtos de degradação e, a partir disso, verificar uma eventual semelhança entre as impurezas de síntese e tais produtos.

## 6.2 Materiais e métodos

A condição escolhida para a identificação dos produtos de degradação foi a radiação, na qual o fármaco apresentou-se mais instável em relação aos outros fatores de degradação forçada.

As amostras submetidas ao teste de degradação foram os comprimidos revestidos de ticagrelor 90 mg, comercializados pelo nome Brilinta® e identificados pelo lote 34194, obtidos no comércio local.

O preparo da amostra seguiu o mesmo procedimento descrito no trabalho de Gobetti *et al* (2014). Vinte comprimidos de ticagrelor foram precisamente pesados e finamente pulverizados. Uma quantidade equivalente a 37,5 mg do fármaco foi pesada e transferida para balão volumétrico de 50 ml contendo metanol. Essa solução foi colocada em agitação no ultrassom por 30 minutos, e, em seguida, o volume completado com o mesmo solvente, resultando em uma solução estoque de 750 µg/ml, a qual foi filtrada em papel filtro. Uma alíquota de 2 ml dessa solução foi então transferida para uma cubeta descartável fechada com parafilm®, e esta, mantida por 2 horas em uma câmara espelhada sob radiação de luz UVC - 254 nm. Após esse período, transferiu-se 1 ml do conteúdo da cubeta para balão volumétrico de 5 ml e este completado com a fase móvel que seria utilizada na análise (acetonitrila: água 57:43 (v/v)). A amostra degradada em uma concentração final de 150 µg/ml foi filtrada em membrana de nylon de 45 µm e injetada no cromatógrafo.

### 6.2.1 Sistema cromatográfico e espectrômetro de massas

O equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado para analisar a amostra degradada e isolar os produtos de degradação foi da marca Shimadzu, modelo SCL-10 A, equipado com injetor manual e detector de lâmpada de deutério. As condições do método estão descritas abaixo (Tabela 31).

Tabela 32. Condições cromatográficas para análise da amostra degradada de ticagrelor.

Fase móvel	Acetonitrila: água (57:43 v/v)
pH da fase móvel	7,0
Fluxo da fase móvel	0,7 ml/min
Detecção	255 nm
Coluna cromatográfica	Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5,0 µm)
Temperatura da coluna	25°C
Volume de injeção	20 µl

Para proceder com a identificação dos produtos de degradação formados após exposição da amostra de ticagrelor à radiação UVC seria necessário dispor de algum tipo de detector adequado. Não havendo a possibilidade de fazer uso de uma técnica hifenizada, como a CLAE-EM, por exemplo, a alternativa mais cabível encontrada foi a de coletar cada um dos produtos de degradação separadamente e, em seguida, injetá-los no espectrômetro de massas. Desse modo, foi adaptado um coletor na saída do detector do cromatógrafo e, a cada injeção da amostra degradada, realizava-se a coleta dos analitos de interesse.

A análise dos produtos de degradação previamente isolados foi realizada no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Porto Alegre/RS, utilizando espectrômetro de massas da marca AB Sciex Triple TOF 5600. O equipamento operou com modo de ionização por eletrospray positivo (ESI<sup>+</sup>), volume de injeção de 10 µl/min e temperatura de 300 °C. As estruturas químicas das moléculas foram construídas com auxílio do programa ACD/ChemSketch.

### 6.3 Resultados e discussão

No estudo que serviu como ponto de partida para o desenvolvimento do presente trabalho, os autores submeteram amostras de ticagrelor a diversos fatores que poderiam promover a sua decomposição (GOBETTI *et al.*, 2014). Conforme previamente descrito no item **3.3.3**, as condições testadas pelos autores foram: meio ácido, meio básico, radiação UVA, radiação UVC, meio oxidativo e calor.

Os resultados das análises de estabilidade do ticagrelor nestas condições demonstraram que o fármaco resiste somente à ação da luz UVA, mantendo-se completamente íntegro. Em todas as outras condições, foi possível observar a ocorrência de degradações em diferentes magnitudes (Figura 30).

Ao se avaliar o cromatograma resultante da injeção da amostra degradada de ticagrelor, notava-se a formação de dois produtos de degradação majoritários. O primeiro produto apresentava um tempo de retenção em torno de 8 minutos, sendo então denominado de T8, e o segundo produto em torno de 10 minutos, T10, enquanto que o fármaco era retido por 9 minutos na coluna. (Figura 31).

Após coletar quantidade suficiente de cada um dos produtos, estes foram injetados diretamente no espectrômetro de massas para avaliação das suas fragmentações e conseqüente elucidação de suas estruturas químicas.

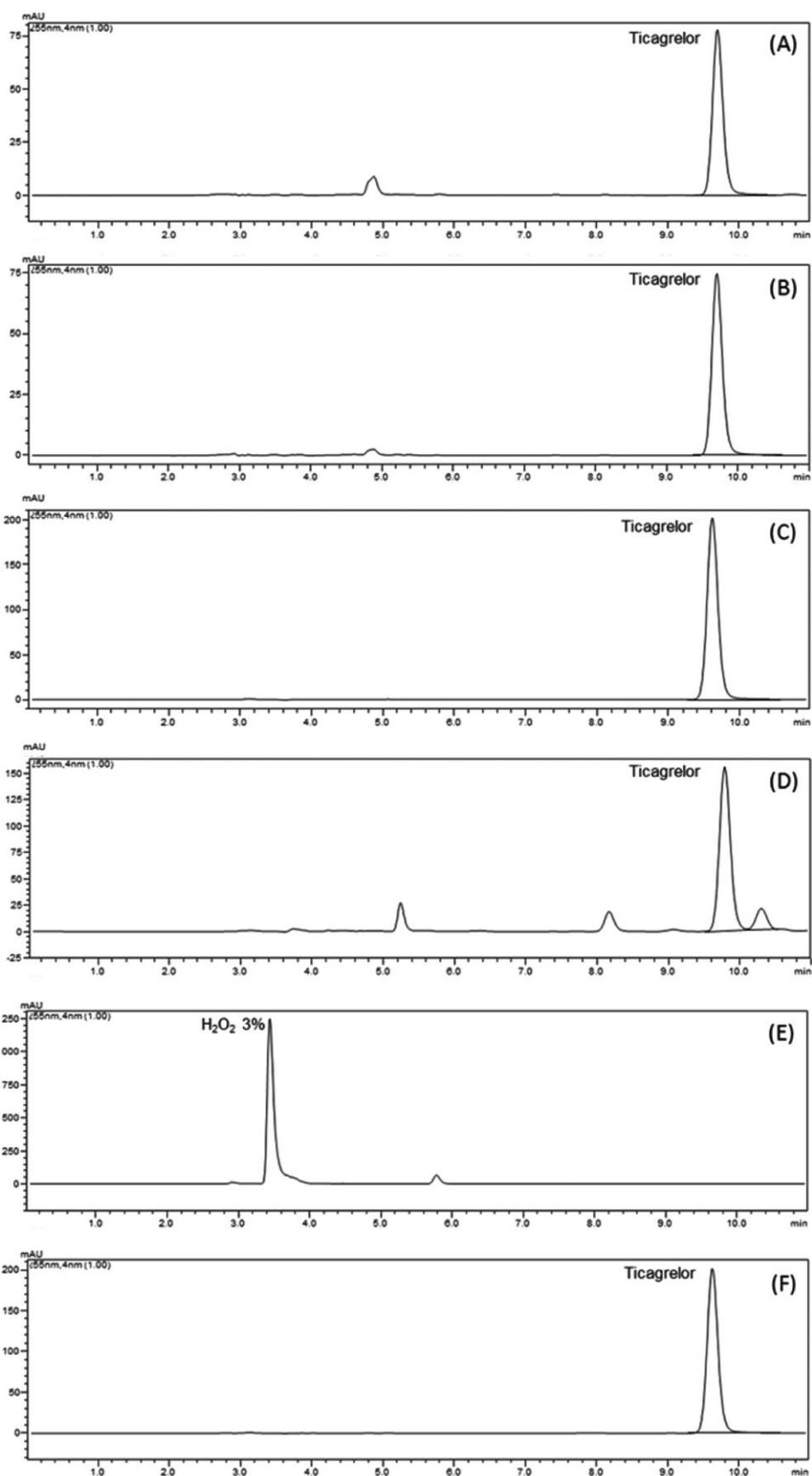


Figura 30. Cromatogramas dos testes de degradação forçada do ticagrelor: meio ácido (HCl 0,1N, 24h) (A); meio básico (NaOH 0,1 N, 24h) (B); radiação UVA (2h) (C); radiação UVC (2h) (D); meio oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, 2h) (E) e calor (60 °C, 2h) (F). (GOBETTI *et al.*, 2014).

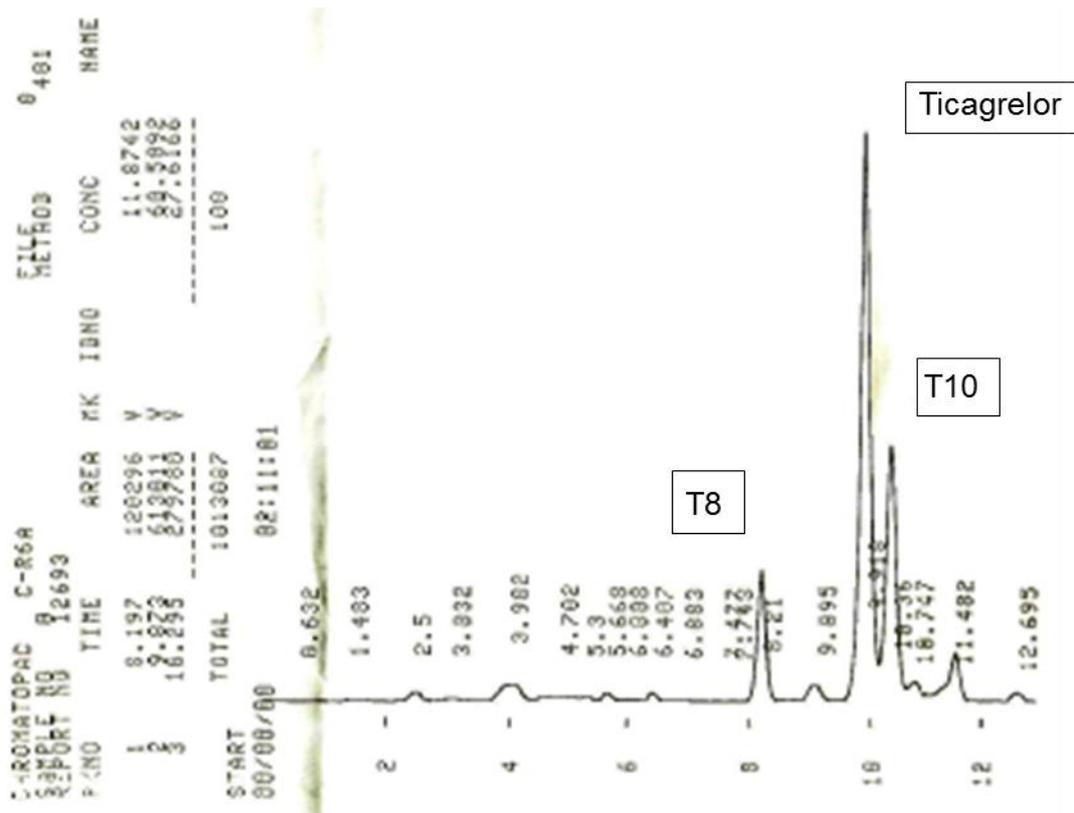


Figura 31. Cromatograma da amostra degradada de ticagrelor após injeção em CLAE com injetor manual.

Os resultados obtidos após injeção das amostras no espectrômetro de massas estão demonstrados a seguir.

Primeiramente foi analisada uma amostra do padrão (SQR) do ticagrelor para confirmar o íon precursor do fármaco. Conforme demonstrado no cromatograma (Figura 32), o íon de massa 523,19  $[M+H]^+$  corresponde ao peso molecular do ticagrelor (522,56 g/mol).

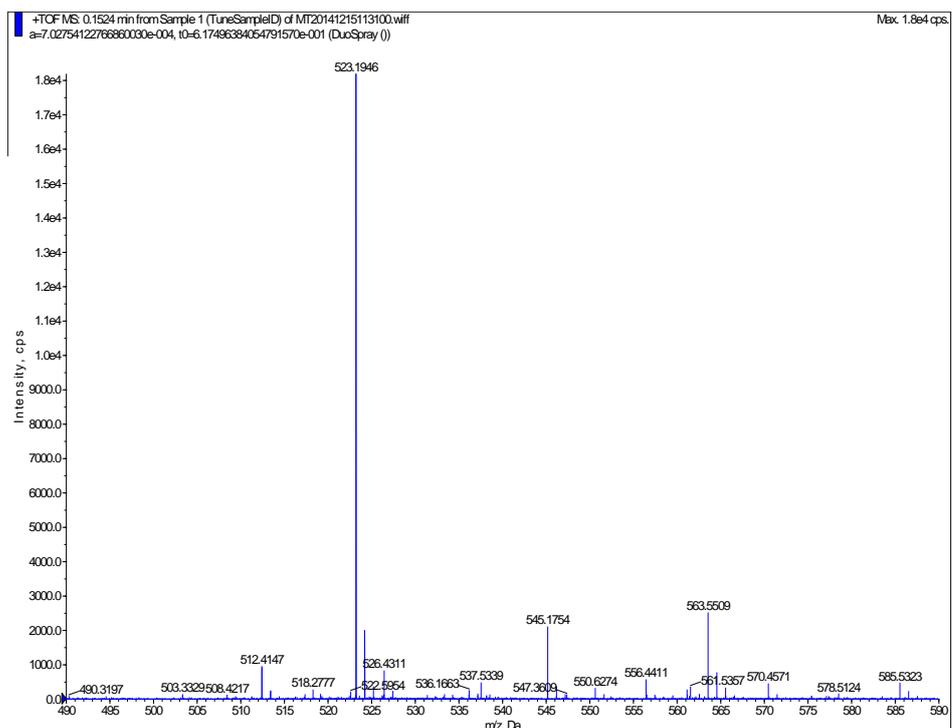


Figura 32. Espectro de massas do padrão de ticagrelor.

Em seguida, foram analisados os espectros dos produtos de degradação T8 e T10, respectivamente (Figuras 33 e 34).

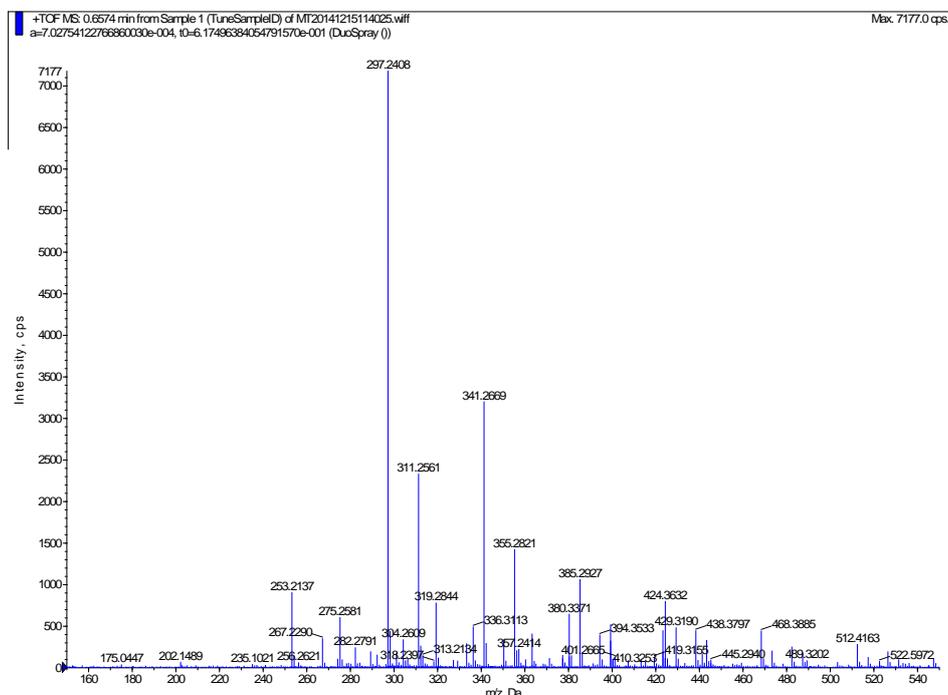


Figura 33. Espectro de massas do produto de degradação T8.

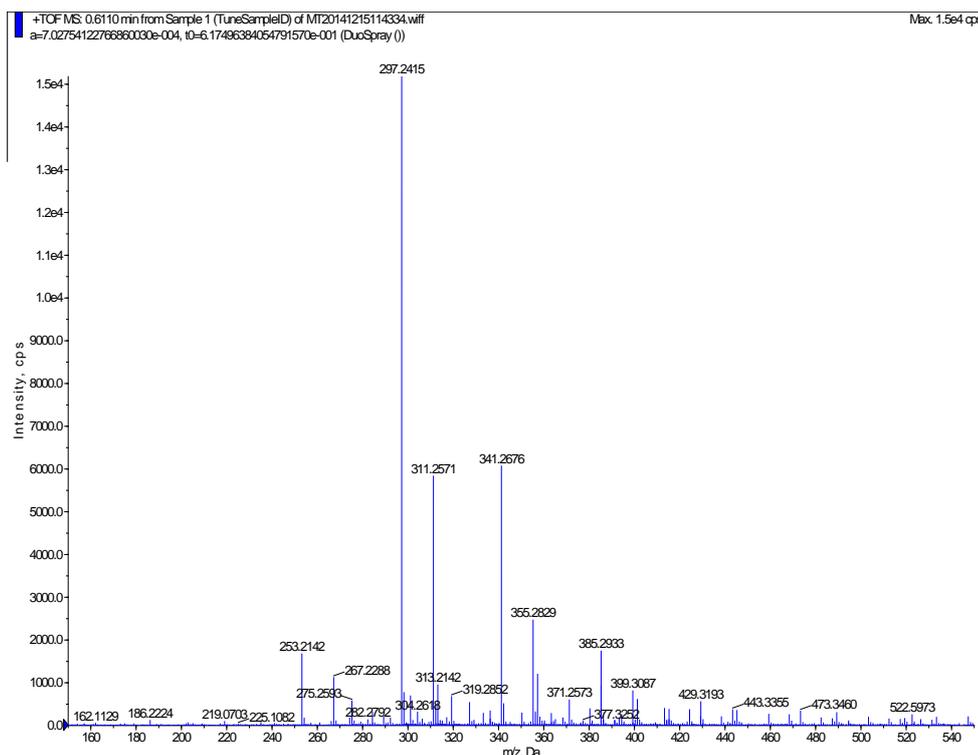


Figura 34. Espectro de massas do produto de degradação T10.

As estruturas dos produtos de degradação T8 e T10 foram propostas a partir de uma avaliação dos seus respectivos espectros de massas, juntamente com um levantamento de dados da literatura.

Partindo-se da massa molecular do ticagrelor,  $m/z$  523,19 pode-se sugerir que sua molécula sofre uma clivagem direta na ligação N-C do grupamento difluorofenilciclopropil ( $C_9H_8F_2^+$ ), perdendo uma massa de aproximadamente 153 g, formando uma molécula de  $m/z$  de 371,2573. Este produto de degradação já é bastante descrito na literatura, e corresponde a um dos principais metabólitos do ticagrelor, conhecido como AR-C133913XX (TENGE *et al.*, 2010; HASSANE, *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2016). Na figura 35 está ilustrada a quebra da molécula do fármaco, originando a estrutura do produto T10.

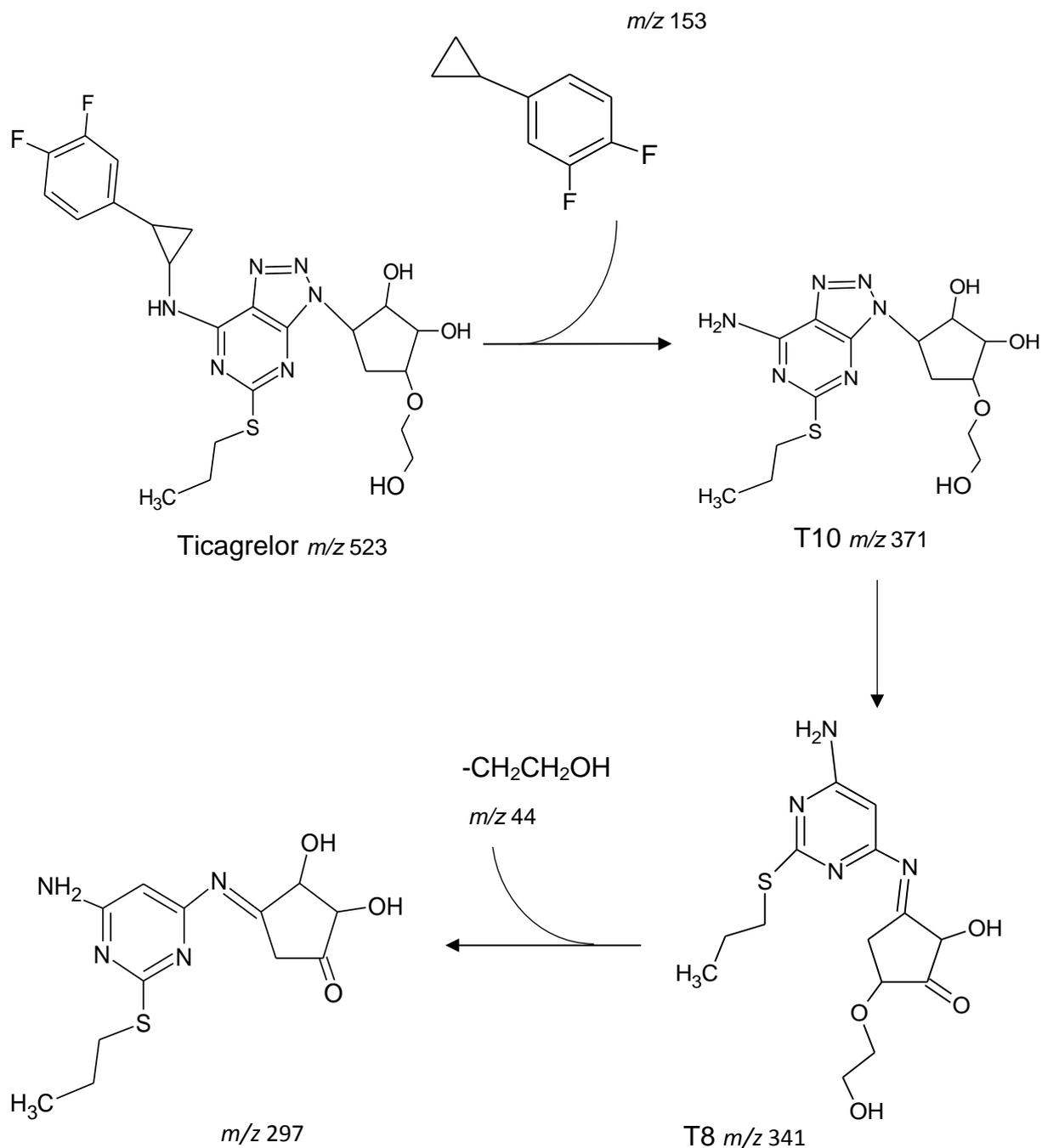


Figura 35. Proposta de degradação do ticagrelor com formação dos produtos T10 e T8.

O outro produto de degradação, T8, foi proposto sob duas perspectivas. Na primeira delas, sugere-se que a estrutura do composto T10 poderia sofrer uma clivagem no seu anel triazolopirimidino, com a perda de um grupamento  $\text{N}_2$ , somado a um processo de oxidação, resultando numa estrutura com  $m/z$  341,2676 ( $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^+$ ). Esta quebra do anel triazol também está em concordância com o

que descreve a literatura acerca das degradações fotolíticas (HASSANE, *et al.*, 2015; TONESSEN, 1996).

A segunda suposição para a formação do produto T8 seria diretamente a partir da molécula do ticagrelor, onde o fármaco teria sua estrutura modificada nos mesmos locais já descritos previamente originando a molécula do produto T8. Esta proposta justificaria o fato de que, no espectro de massas correspondente ao degradado T8 não se identifica o fragmento  $m/z$  371,2573. Na figura 36 está ilustrado esse mecanismo de degradação direto, bem como uma observação sobre os possíveis sítios onde poderiam ocorrer as oxidações da molécula, podendo esta manter-se em constante alternância entre as duas formas demonstradas.

Por fim, de acordo com outros trabalhos que estudam possíveis mecanismos de degradação do ticagrelor, acredita-se que a estrutura do composto T8 poderia sofrer uma degradação consecutiva onde perderia o grupamento etílico da sua molécula ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), resultando no fragmento de  $m/z$  297,2415, o qual apresentasse com significativa intensidade nos espectros de massas analisados (KUMAR, *et al.*, 2016).

Tendo como referência o trabalho de Hassane e colaboradores (2015), publicado em 2014, foi possível verificar a concordância entre alguns resultados, como no caso do produto de degradação T10, além de obter subsídios para o esclarecimento dos mecanismos que atuam na degradação do fármaco.

Por outro lado, este estudo contribui com informações adicionais a respeito do perfil de degradação fotolítica do ticagrelor, uma vez que foram sugeridas estruturas diferentes para o produto T8 e seu fragmento de  $m/z$  297 daquelas observadas em outros trabalhos. Cabe salientar que tais divergências nos resultados quando comparados com outros estudos se deve ao fato de que os mecanismos de fotodegradação de fármacos são bastante complexos e sofrem influência de inúmeros fatores, como por exemplo o efeito do oxigênio no produto, que pode ser responsável pela formação de produtos secundários, bem como as condições escolhidas para promover a degradação, como o tipo de fonte de radiação, o tempo de exposição, a concentração da amostra, dentre outros (TONESSEN, 1996).

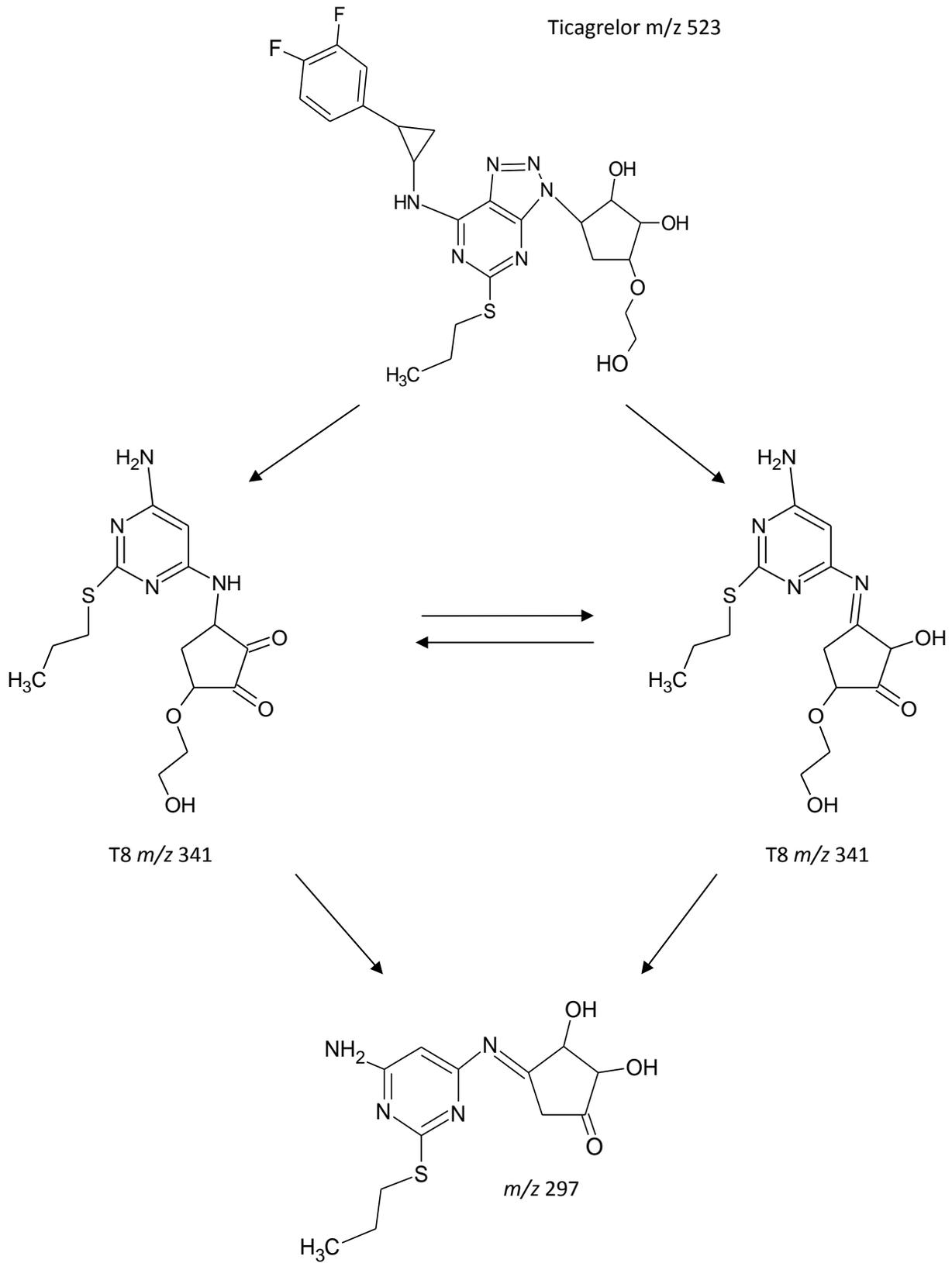


Figura 36. Proposta de degradação do ticagrelor com formação direta do produto T8.

#### 6.4 Conclusão

A avaliação dos espectros de massas dos produtos de degradação formados após exposição de uma solução de ticagrelor à radiação UVC por 2 horas permitiu identificar quais as principais substâncias originadas nesse processo, bem como pressupor os mecanismos químicos envolvidos.

Além disso, verificou-se que os produtos de degradação originados pela ação da luz, nas condições executadas neste trabalho, diferem das impurezas de síntese utilizadas no desenvolvimento do método analítico.

Conhecer a estabilidade de um fármaco frente à ação da luz, bem como prever quais substâncias podem ser originadas a partir dessa condição de degradação contribui para que se tenha um maior controle por parte dos fabricantes durante os processos de produção e armazenagem dos produtos, minimizando a sua ocorrência e garantindo os parâmetros de segurança e eficácia dos mesmos.

Sabe-se que a ação da luz sobre as substâncias químicas tem efeitos bastante pronunciados na sua estabilidade, o que torna ainda mais importante prever o comportamento do mesmo sob ação da radiação.

---

## **7 CONCLUSÕES**

---



- A caracterização da SQR do ticagrelor demonstrou-se satisfatória ao confirmar, por meio de diferentes técnicas, a identidade e pureza do fármaco, permitindo seu uso como padrão ao longo do desenvolvimento do trabalho;
- A caracterização das SQR das Impurezas 1 e 2 através das técnicas de espectroscopia na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear permitiu confirmar a identidade das substâncias;
- O método desenvolvido para análise de impurezas orgânicas de ticagrelor por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou desempenho satisfatório, comprovado pelo estudo de validação analítica, sendo adequado para o uso pretendido;
- A análise da amostra degradada do ticagrelor em espectrômetro de massas permitiu elucidar as estruturas químicas dos produtos de degradação majoritários formados após exposição do fármaco à radiação UVC;
- Os mecanismos envolvidos na fotodegradação do ticagrelor foram propostos e estão de acordo com os dados encontrados na literatura a respeito da estabilidade do fármaco a esta condição de estresse.



---

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



AHUJA, S. S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 1, p. 3-11, 2007.

AMBASANA, M. A., KAPURIYA N. P., FALDU, N. J., LADVA, D. K. Development and validation of a UV spectrophotometric method for the determination of ticagrelor in bulk form. **Scholars Research Library**, v. 6, n. 4, p. 237-240, 2014.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br/datavisa/consulta\\_produto](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto) Acessado em 17/05/2014.

ASTRAZENECA – Brilinta. Disponível em: [www.astrazeneca.com.br](http://www.astrazeneca.com.br) Acessado em: 17/05/2014.

BOHLIN, M.; COSGROVE, S.; LASSEN, B. Crystalline and amorphous form of a triazolo (4, 5-D) pyridimine compound. **U.S. Patent** No 7,265,124, 2007.

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

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 899, de 29 de maio de 2003, Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos estratégias e validação**, São Carlos: EdUFSCar, 2001.

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

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

DAVÌ, G., & PATRONO, C. Platelet activation and atherothrombosis. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 24, p. 2482-2494, 2007.

DORSAM, R. T., & KUNAPULI, S. P. Central role of the P2Y 12 receptor in platelet activation. **The Journal of clinical investigation**, v. 113 n. 3, p. 340-345, 2004.

EMA - European Medicines Agency. European Public Assessment Report, 2010. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu> Acessado em: 18/05/2015.

FB 5 - FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª Ed. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, DF, 2010.

FDA – Food and Drug Administration. Disponível em: [www.fda.gov](http://www.fda.gov) Acessado em 18/05/2014.

FRANCHINI, M., MANNUCCI, P. New antiplatelet agents: why they are needed. **European Journal of Internal Medicine**, v. 20, p. 733-738, 2009.

GOBETTI, C., LAZZARETTI PEREIRA, R., SEBASTIAN LOUREIRO MENDEZ, A., & VIRGINIA GARCIA, C. Determination of the New Antiplatelet Agent Ticagrelor in Tablets by Stability-Indicating HPLC Method. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 279-283, 2014.

HASSANE, S. Y., SECRÉTAN, P. H., HENRIET, T., BERNARD, M., AMRANI, F., AKROUT, W., TILLEUL, P.; YAGOUBI, N. & DO, B. Identification of the major degradation pathways of ticagrelor. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 105, p. 74-83, 2015.

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

HUBER, K., YASOTHAN, U., HAMAD, B., & KIRKPATRICK, P. Prasugrel. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 6, p. 449-450, 2009.

HUSTED, S., & VAN GIEZEN, J. J. J. Ticagrelor: the first reversibly binding oral P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist. **Cardiovascular therapeutics**, v. 27, n. 4, p. 259-274, 2009.

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

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

ICH. **International Conference on Harmonisation**. Guideline for Residual Solvents. Q3C, 2006.

ICH. **International Conference on Harmonisation**. Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. Q6A, 1999.

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

JAMES, S., ÅKERBLM, A., CANNON, C. P., EMANUELSSON, H., HUSTED, S., KATUS, H., ... & BECKER, R. Comparison of ticagrelor, the first reversible oral P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist, with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: rationale, design, and baseline characteristics of the PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial. **American heart journal**, v. 157, n. 4, p. 599-605, 2009.

KALE, P., AGRAWALA, Y., SONIB, G., & PATELB, P. Simultaneous quantification of ticagrelor and its metabolite des hydroxyethoxy ticagrelor in human plasma by ultra-

performance liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 37-45, 2015.

KALYANI, L., & RAO, A. L. A Validated Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Ticagrelor in Bulk and its Formulations. **International Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 3, p. 634-642, 2013.

KOPP, S. Stability testing of pharmaceutical products in a global environment. *Regulatory Affairs Journal*, v. 16, n. 5, p. 291-294, 2006.

KUMAR, N., DEVINENI, S. R., GAJJALA, P. R., GUPTA, D. K., BHAT, S., KUMAR, R., ... & KUMAR, P. Four process-related potential new impurities in ticagrelor: Identification, isolation, characterization using HPLC, LC/ESI-MS n, NMR and their synthesis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 120, p. 248-260, 2016.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Átomo, 2009.

MANSUR, A. D. P.; FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.99, n. 2, p. 755-761, 2012.

MICHELSON, A. D. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 9, p. 154–169, 2010.

NIESWANDT, B., PLEINES, I., & BENDER, M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9 n. (s1), p. 92-104, 2011.

OLIVEIRA, M. A. D., YOSHIDA, M. I., & LIMA GOMES, E. C. D. Thermal analysis applied to drugs and pharmaceutical formulations in pharmaceutical industry. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

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

PILANIYA, K., CHANDRAWANSHI, H. K., PILANIYA, U., MANCHANDANI, P., JAIN, P., & SINGH, N. Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 1, n. 3, p. 302, 2010.

RABADAN, I. R. Nuevos antiagregantes en el síndrome coronario agudo. El futuro es hoy. **Revista Española de Cardiología Suplemento**, v. 10, p. 12D-22D, 2010.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., & MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROGER, V. L., GO, A. S., LLOYD-JONES, D. M., ADAMS, R. J., BERRY, J. D., BROWN, T. M., ... & FOX, C. S. Heart disease and stroke statistics—2011 update a report from the American Heart Association. **Circulation**, v.123, n. 4, p. e18-e209, 2011.

ROSS, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. **New England journal of medicine**, v. 340 n.2, p. 115-126, 1999.

ROWE, RC; SHESKEY, PJ. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 5a. ed. [S.l.: s.n.], 2006. p. 945. Disponível em: <<http://datastandards.co.uk/casepdf/case5.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

ROY, J., Pharmaceutical impurities – A mini-review. **AAPS PharmSciTech**, v. 3(2), p. 1-8, 2002.

SCHNEIDER, D. Mechanisms potentially contributing to the reduction in mortality associated to ticagrelor therapy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, n. 6, p. 685-687, 2011.

SCIFINDER - Chemical Abstracts Service: Columbus, OH, RN 274693-27-5  
Disponível em: [www.scifinder.com](http://www.scifinder.com) Acessado em 13/05/2015.

SHAH, S. R., PATEL, M. A., NAIK, M. V., PRADHAN, P. K., & UPADHYAY, U. M. Recent Approches of Impurity Profiling in Pharmaceutical Analysis: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 10, p. 3603, 2012.

SILLEN, H., COOK, M., DAVIS, P. Determination of ticagrelor and two metabolites in plasma samples by liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2299-2306, 2010.

SILLEN, H., COOK, M., DAVIS, P. Determination of unbond ticagrelor and its active metabolite (AR-C124910XX) in human plasma by equilibrium dialysis and LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2315-2322, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

STEINER, J. B., WU, Z., & REN, J. Ticagrelor: positive, negative and misunderstood properties as a new antiplatelet agent. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, n. 7, p. 398-403, 2013.

STONE, G. W. Ticagrelor in ACS: redefining a new standard of care? **The Lancet**, v. 325, p. 263-265, 2010.

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

TENG, R., OLIVER, S., HAYES, M. A., & BUTLER, K. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ticagrelor in healthy subjects. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 9, p. 1514-1521, 2010.

TGA - Therapeutic Good Administration. Australian Public Assessment Report for Ticagrelor, 2011. Disponível em: <http://www.tga.gov.au> Acessado em: 17/08/2015.

TONESSEN, H.H. **Photostability of drugs and drug formulations**. London: Taylor and Frances, 1996.

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

WHO – World Health Organization. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control, 2011.

WIDIMSKI, P., JUKEMA, J. W., MEIER, B., TRENK, D., COLLET, J. P., FRICK, M., ROFF, M. Evolving strategies in the management of acute coronary syndromes with oral antiplatelet agents. **Cor at vasa**, v. 54, p. e32-e38, 2012.

WIJEYERATNE, Y. D., & HEPTINSTALL, S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists. **British journal of clinical pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 647-657, 2011.  
WOOD, D. Established and emerging cardiovascular risk factors. **American heart journal**, v. 141, n.2, p.S49-S57, 2001.

ZHANG, H., LIU, J., ZHANG, L., KONG, L., YAO, H., & SUN, H. Synthesis and biological evaluation of ticagrelor derivatives as novel antiplatelet agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22 n. 11, p. 3598-3602, 2012.