

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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA INDICATIVA DE ESTABILIDADE  
PARA COMPRIMIDOS DE AMBRISENTANA**

**RODOLFO ORTIGARA**

**PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2015**

---



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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA INDICATIVA DE ESTABILIDADE PARA  
COMPRIMIDOS DE AMBRISSENTANA**

Dissertação apresentada por Rodolfo  
Ortigara para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Cássia Virginia Garcia

Coorientador: Prof. Dr. Martin Steppe

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2015

---

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em Nível de mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 20 de março de 2015 pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dra. Andréa Inês Horn Adams  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Prof. Dra. Aline Rigon Zimmer  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

#### CIP - Catalogação na Publicação

Ortigara, Rodolfo

Desenvolvimento de metodologia indicativa de estabilidade para comprimidos de ambrisentana / Rodolfo Ortigara. -- 2015.

131 f.

Orientadora: Cassia Virginia Garcia.

Coorientador: Martin Steppe.

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

1. Ambisentana. 2. Produtos de degradação. 3. Estabilidade. 4. UPLC-UV. 5. UPLC-MSMS. I. Garcia, Cassia Virginia, orient. II. Steppe, Martin, coorient. III. Título.

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

Este trabalho foi realizado no laboratório de pesquisa e desenvolvimento analítico da empresa produtora de medicamentos Prati, Donaduzzi e Cia LTDA, localizada em Toledo, Paraná.

---



Dedico este trabalho a minha família.







## **AGRADECIMENTOS**

A professora Cassia Garcia, e professor Martin Steppe pela orientação nos estudos e pela confiança em mim depositada.

Aos colegas do laboratório de Controle de Qualidade da UFRGS pelos momentos de estudo e discussão técnica, que muito contribuiu para a execução desta dissertação.

Aos professores do programa de Pós-Graduação que sempre se mostraram solícitos para sanar dúvidas e compartilhar o conhecimento.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar o mestrado e pela excelente qualidade do curso.

Aos colegas de trabalho da Prati, Donaduzzi, em especial a Lislaine Deconto, Marcelo Kamei e Lincoln Coutinho, pelo grande auxílio nas atividades laborais.

A colega Marcia Mitsui pela oportunidade concedida e pelo seu exemplo de determinação e conduta.

À Prati Donaduzzi pela disponibilização de equipamentos e estrutura física para realização dos ensaios.

A PH Científica e Waters pelo fornecimento da substância química de referência

A Professora Elfrides Eva Scherman Schapoval, pelo exemplo de profissional farmacêutico.

Aos que não foram citados, mas que de alguma maneira contribuíram para a execução desta dissertação.

---



## RESUMO

A ambrisentana é um novo fármaco utilizado para o combate aos sintomas da hipertensão arterial pulmonar e comercializado na forma de comprimidos revestidos. Em 2010, sua comercialização foi aprovada pela ANVISA, sob nome comercial de Volibris®. O controle de qualidade de medicamentos é parte fundamental para o desenvolvimento e liberação de fármacos para o consumo, no entanto, há poucos estudos relacionados à proposição de métodos analíticos e estudo da estabilidade deste fármaco. Assim, foi proposto o desenvolvimento e validação de método de doseamento e análise de produtos de degradação, juntamente com a identificação da molécula proveniente da degradação do insumo ativo em condição de estresse térmico. Um método cromatográfico, com utilização de equipamento de cromatografia UPLC®, acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (PDA), foi desenvolvido. Testes com diferentes solventes e diferentes colunas cromatográficas foram executados, alcançando-se a uma condição ideal, com excelente qualidade cromatográfica (pratos teóricos, sensibilidade e resolução entre picos) e um reduzido tempo de análise (6 minutos). Este método foi validado de acordo com os guias de validação internacionais e após a finalização dos ensaios e interpretação dos resultados, verificou-se que o método apresenta especificidade adequada, tanto para análise de doseamento da substância ativa como para identificação e quantificação de produtos de degradação. Também apresentou exatidão e precisão dentro do esperado para utilização em controle da qualidade de produtos farmacêuticos, tendo também limites de quantificação e detecção em magnitude adequada para se avaliar a possível degradação do fármaco. O método se apresentou linear no intervalo pretendido e com robustez satisfatória. Com o estresse da molécula estabelecido no desenvolvimento e validação da metodologia analítica, o principal produto de degradação foi identificado por detecção em espectrometria de massas após separação cromatográfica em sistema composto de UPLC® - EM/EM. A molécula proveniente da degradação do fármaco foi identificada, e teve o seu mecanismo de degradação proposto, concluindo-se que a presença da ambrisentana em ambientes ácidos pode desencadear a degradação da molécula, facilitada ainda por temperatura.

---

**Palavras Chave:** Ambrisentana, Estudo de estresse, validação, produtos de degradação, UPLC.

---

## ABSTRACT

The ambrisentana is a new drug used to combat the symptoms of pulmonary arterial hypertension and marketed in the form of coated tablets. In 2010, its commercialization was approved by ANVISA, under trade name Volibris®. The quality control of medicines is a fundamental part for the development and release of drugs for consumption, however, there are few studies related to the proposition of analytical methods and study the stability of the drug. Thus, we propose the development and validation of appropriate method to assay the drug and degradation products, and the identification of degradation product obtained in stress conditions. A chromatographic method using UPLC® chromatography equipment coupled to photodiode array detector (PDA) have been developed. Tests with different solvents and different chromatographic columns were performed, reaching up to an optimal chromatographic condition (theoretical plates, sensitivity, and resolution between peaks) and reduced chromatographic run time (6 minutes). This method was validated in accordance with international guidelines and validation after the completion of the tests and interpret the results, it was found that the method has adequate specificity for both analysis, assay of the active principle for identification and quantification of degradation products. Also presented accuracy and precision as expected for use in quality control of pharmaceuticals, and limits of quantification and detection at adequate levels to assess the possible degradation of the drug. The method was linear in the target range and with satisfactory robustness. With the stress of established molecule in the development and validation of analytical methodology, was identified the main degradation product by mass spectrometry detection after chromatographic separation of compound UPLC® system. The molecule from the drug degradation was identified, and had its proposed degradation mechanism, concluding that the presence of ambrisentana in acidic can trigger the degradation of the molecule, also facilitated by temperature.

Keywords: Ambrisentana, stress study, validation, degradation products, UPLC.

---



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aprovação de medicamentos para tratamento da HAP pelo FDA(VENTETUOLO; KLINGER, 2012).....	43
Figura 2 - Estrutura química da ambrisentana .....	44
Figura 3 – Produtos de degradações propostos por Ramiseti e Kuntamukkala (2014) .....	47
Figura 4 - íon ambrisentana e seus principais fragmentos observados em espectro de massas.....	53
Figura 5 - Espectro de massas de ambrisentana – íon precursor (ES+).....	53
Figura 6 - Espectro de massas de Ambrisentana - íon produto (ES+) .....	54
Figura 7 - Espectro de RMN - <sup>1</sup> H Ambrisentana (300MHz).....	55
Figura 8 - Espectro de RMN - <sup>13</sup> C Ambrisentana .....	57
Figura 9 - Espetro de infravermelho da ambrisentana .....	59
Figura 10 - Termograma de DSC - ambrisentana .....	60
Figura 11 - Espectro de absorção no ultravioleta do pico de Ambrisentana .....	75
Figura 12 - Cromatogramas das Injeções de 3 e 5 microlitros da amostra e com diluentes Metanol 100% e Metanol : água 1:1 .....	76
Figura 13 - Função de Van Deemter (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).....	77
Figura 14 - Diferentes tipos de empacotamentos de colunas cromatográficas .....	78
Figura 15 - Cromatograma da amostra em estresse térmico a 60°C por 10 dias com coluna fluorofenil e fase móvel com acetonitrila e solução ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v) .....	79
Figura 16 - Cromatograma da amostra em estresse térmico a 60°C por 10 dias com coluna fenil e fase móvel com Metanol e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v).....	80
Figura 17 - Cromatograma da amostra em estresse térmico a 60°C por 10 dias com coluna C18 e fase móvel com acetonitrila e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v) .....	81
Figura 18 - Cromatograma da amostra em estresse térmico a 60°C por 10 dias com coluna C18 e fase móvel com metanol e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v).....	82

---

Figura 19 - Cromatograma da solução padrão de ambrisentana, tempo zero.....	86
Figura 20 - Cromatograma da solução amostra, após 3 dias de armazenamento no auto injetor do equipamento .....	86
Figura 21 – Cromatograma da solução placebo dos comprimidos de ambrisentana	86
Figura 22 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse em meio básico (NaOH 0,1M) por 10 dias.....	87
Figura 23 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse em meio ácido (HCl 0,1M) por 5 dias.....	87
Figura 24 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse em meio oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%) por 5 dias .....	87
Figura 25 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse térmico (60°C) por 6 horas.....	88
Figura 26 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse fotólítico (Câmara com potência de 1,2 milhões de lux/hora) por 3 dias.....	88
Figura 27 - Regressão para linearidade do método por UPLC no intervalo de doseamento .....	90
Figura 28 - Gráfico de Resíduos da linearidade do método por UPLC no intervalo de doseamento .....	91
Figura 29 - Regressão para linearidade do método por UPLC no intervalo de produtos de degradação .....	93
Figura 30 - Gráfico de Resíduos da linearidade do método por UPLC no intervalo de produtos de degradação .....	94
Figura 31 - Cromatograma LQ/LD 0,025 µg/mL .....	96
Figura 32 - Cromatograma LQ/LD 0,075 µg/mL .....	96
Figura 33 - Cromatograma LQ/LD 0,10 µg/mL .....	96
Figura 34 - Cromatograma LQ/LD 0,125 µg/mL .....	97
Figura 35 - Diferentes avaliações da precisão.....	99
Figura 36 - Comparação de desvios padrão entre precisões .....	101
Figura 37 - Comparações das médias das precisões.....	101
Figura 38 - Cromatograma de íons totais do padrão de ambrisentana.....	112
Figura 39 - Cromatograma de íons totais – Amostra de ambrisentana sob condição de estresse térmico .....	112
Figura 40 - Íon precursor Ambrisentana .....	113

---



Figura 41 – Espectro de massas - íon precursor ambrisentana Padrão .....	113
Figura 42 - Espectro de massas - íon precursor ambrisentana Amostra estressada .....	113
Figura 43 - Espectro de massas - íon precursor Degradação - Amostra estressada .....	114
Figura 44 - Molécula proposta do produto de degradação .....	114
Figura 45 - Espectro de massas - íon produto do Produto de Degradação - Amostra estressada.....	115
Figura 46 - Fragmentos de massas do produto de degradação de ambrisentana ..	115
Figura 47 - Proposta da rota de degradação de ambrisentana em condições ácidas (RAMISETTI; KUNTAMUKKALA, 2014).....	116

---



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da Hipertensão Pulmonar (SIMONNEAU; ROBBINS, 2009)	41
Tabela 2 - Classificação da HAP (SIMONNEAU; ROBBINS, 2009)	42
Tabela 3 - Condições do espectrômetro de massas – teste de identificação da SQR	52
Tabela 4 - Atribuição dos picos obtidos no espectro de RMN - <sup>1</sup> H de Ambrisentana.	56
Tabela 5 - Atribuição dos picos obtidos no espectro de RMN - <sup>13</sup> C de Ambrisentana	57
Tabela 6 - Frequência de absorção das principais bandas no infravermelho da ambrisentana e suas respectivas atribuições.	59
Tabela 7 - Preparo das soluções de ambrisentana para estudo preliminar de degradação forçada.	67
Tabela 8 - Preparo das soluções em condições de estresse	69
Tabela 9 - Diluições para preparo das soluções de ambrisentana para avaliação da linearidade – Doseamento	70
Tabela 10 - Diluições para preparo das soluções de ambrisentana para avaliação da linearidade – produtos de degradação	71
Tabela 11 - Preparo das soluções para avaliação da exatidão – Intervalo de Doseamento	72
Tabela 12 - Preparo das soluções para avaliação da exatidão – Intervalo de produtos de degradação	72
Tabela 13 - Alterações no sistema cromatográfico para avaliação da robustez do método por UPLC para análise de ambrisentana.	73
Tabela 14 - Gradiente usado com coluna fluorofenil e fase móvel com Acetonitrila e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v)	78
Tabela 15 - Gradiente usado com coluna fenil e fase móvel com Metanol e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v)	79
Tabela 16 - Gradiente usado com coluna C18 e fase móvel com acetonitrila e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v)	80

---

Tabela 17 - Gradiente usado com coluna C18 e fase móvel com Metanol e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v) .....	81
Tabela 18 – Informações dos picos cromatográficos dos cromatogramas nas diferentes condições testadas .....	83
Tabela 19 – Programação de eluição da fase móvel do sistema cromatográfico gradiente.....	85
Tabela 20 - Teor de ambrisentana nas amostras submetidas às diferentes condições de estresse .....	89
Tabela 21 - Resíduos linearidade – intervalo entre 350 e 650 µg/mL.....	92
Tabela 22 - Resíduos linearidade do método por UPLC no intervalo para avaliação de Produtos de degradação.....	95
Tabela 23 - Resultados do teste de recuperação de ambrisentana na faixa de doseamento .....	98
Tabela 24 - Resultados do teste de recuperação de ambrisentana na faixa de Produtos de Degradação .....	98
Tabela 25 – Resultados da precisão no 1º dia .....	99
Tabela 26 – Resultados da precisão intermediária 1 .....	100
Tabela 27 - Resultados da precisão intermediária 2.....	100
Tabela 28 - Resultados da avaliação do parâmetro Robustez para o método por UPLC de ambrisentana.....	103
Tabela 29 – Principais tipos de estudos de estabilidade realizados em medicamentos e seus objetivos. ....	108
Tabela 30 - Limites de notificação, identificação e qualificação para produtos de degradação.....	108
Tabela 31 – Equipamento e condições cromatográficas para análise instrumental – identificação do PD.....	110
Tabela 32 - Equipamento e condições do espectrômetro de massas .....	110
Tabela 33 - Íons observados no método por UPLC-EM/EM e suas condições de detecção .....	111

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

SQR - substância química de referência

RMN <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética nuclear de Hidrogênio

RMN <sup>13</sup>C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

FDA - Food and Drug Administration (agência regulatória dos Estados Unidos da América)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ICH - International Conference on Harmonisation

F.M. – Fase Móvel

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta eficiência

---



## **APRESENTAÇÃO**

De acordo com as normas vigentes no Regimento de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o presente trabalho de dissertação foi redigido em capítulos, para melhor compreensão e discussão dos resultados. Assim, este documento se divide da seguinte maneira:

- Introdução
  
  - Objetivos
  
  - Revisão Bibliográfica
  
  - Capítulo 1 – Caracterização da SQR
  
  - Capítulo 2 – Desenvolvimento e validação da metodologia analítica
  
  - Capítulo 3 – Proposta da rota de degradação da ambrisentana
  
  - Conclusão
  
  - Referências Bibliográficas
  
  - Anexos
-





## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
	2.1. Objetivo geral .....	37
	2.2. Objetivos específicos.....	37
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>39</b>
	3.1. Aspectos gerais .....	41
	3.2. Ambrisentana .....	44
	3.2.1. Descrição química.....	44
	3.2.2. Mecanismo de ação .....	44
	3.2.3. Aspectos farmacológicos .....	45
	3.2.4. Polimorfismo .....	45
	3.2.5. Química Analítica aplicada na determinação de Ambrisentana .....	45
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA SQR.....</b>	<b>49</b>
	4.1. Introdução .....	51
	4.2. Substância química de referência (SQR) .....	52
	4.2.1. Espectrometria de massas.....	52
	4.2.1.1. Resultados e discussão.....	53
	4.2.2. Espectroscopia de RMN – $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	54
	4.2.2.1. Resultados e discussão.....	55
	4.2.3. Espectrofotometria de infravermelho .....	58
	4.2.3.1. Resultados e discussão.....	58
	4.2.4. Calorimetria exploratória diferencial – DSC .....	60
	4.2.4.1. Resultados e discussão.....	60
	4.3. Conclusões.....	61

---

<b>5. CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA .....</b>	<b>63</b>
5.1. Introdução.....	65
5.2. Materiais e métodos.....	66
5.2.1. Teste de solubilidade.....	67
5.2.2. Estudo de estresse preliminar .....	67
5.2.3. Testes de volume de injeção, diluentes das amostras e vazão da fase móvel	67
5.2.4. Teste de colunas cromatográficas .....	68
5.2.5. Teste de fase móvel .....	68
5.3. Considerações iniciais da validação analítica .....	68
5.3.1. Especificidade .....	69
5.3.2. Linearidade.....	70
5.3.3. Limite de quantificação e de detecção.....	71
5.3.4. Exatidão.....	71
5.3.5. Precisão.....	73
5.3.6. Robustez .....	73
5.4. Resultados e discussão .....	74
5.4.1. Solubilidade .....	74
5.4.2. Espectro de ultravioleta – Escolha do comprimento de onda .....	74
5.4.3. Testes de volume de injeção, diluentes da amostra e vazão da fase móvel	75
5.4.4. Testes de fase móvel e coluna cromatográfica .....	77
5.4.5. Metodologia Analítica desenvolvida .....	83
5.4.5.1. Soluções .....	84
5.4.5.2. Sistema Cromatográfico .....	84
5.4.5.3. Cálculos Analíticos.....	85
5.4.6. Especificidade .....	86

---

5.4.7.	Linearidade .....	90
5.4.8.	Limite de Quantificação e Limite de Detecção .....	95
5.4.9.	Exatidão .....	97
5.4.10.	Precisão .....	98
5.4.11.	Robustez .....	102
5.5.	Conclusão .....	104
<b>6.</b>	<b>CAPÍTULO 3 – PROPOSTA DE ROTA DE DEGRADAÇÃO DA AMBRISENTANA .....</b>	<b>105</b>
6.1.	Introdução .....	107
6.2.	Materiais e métodos .....	109
6.3.	Resultados e discussão.....	111
6.4.	Conclusões.....	116
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>119</b>
	BIBLIOGRAFIA.....	123
<b>8.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>127</b>

---



---

## 1. INTRODUÇÃO

---



A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é caracterizada pela elevação da pressão arterial e da resistência vascular dentro da circulação pulmonar. Esta patologia pode se desenvolver devido à insuficiência ventricular esquerda, embolia pulmonar crônica, dentre outras causas. A caracterização da HAP é dada em situação onde a pressão média pulmonar é maior do que 25 mmHg em repouso ou de 30 mmHg em exercício (BARST *et al.*, 2004).

Acredita-se que a HAP seja resultado de anormalidade na função endotelial, com redução da síntese de substâncias vasodilatadoras, como a prostaciclina e ácido nítrico e aumentada produção de substâncias vasoconstritoras, como a endotelina (RUFINO *et al.*, 2013).

Esta patologia é rara (em torno de 15 a 70 casos por 1 milhão de habitantes), porém, é uma situação clínica de elevada gravidade que pode levar à insuficiência ventricular direita progressiva e finalmente ao óbito (ROMANO, 2010).

Os tratamentos disponíveis para a HAP são escassos, mas têm ajudado na qualidade de vida dos pacientes que fazem uso destes, embora algumas ressalvas sejam dadas a cada tratamento (FINE *et al.*, 2009).

Terapias à base de exercício moderado e treino respiratório, com intuito de melhorar a capacidade respiratória e realização de exercícios foram capazes de aumentar a capacidade de atividades físicas e da qualidade de vida de pacientes com HAP crônica (ROSENKRANZ, 2007).

Medicamentos à base de anticoagulantes são indicados para o tratamento, devido ao fato de diminuir o risco de embolia pulmonar. Em contrapartida, apresenta um subsequente aumento da gravidade da HAP. Da mesma maneira, o tratamento com diuréticos pode ser uma alternativa, visto que resultados satisfatórios têm sido observados em alguns pacientes (ROSENKRANZ, 2007).

Tratamentos específicos para a HAP são fundamentados nos medicamentos à base de produtos bloqueadores do canal de cálcio, como o nifedipino, o diltiazem e o anlodipino. Esses medicamentos são utilizados em indivíduos que respondem ao tratamento, o que infelizmente inclui um número de 10 a 15 % dos pacientes, e destes apenas a metade respondem caso uma dose elevada seja necessária. Fármacos a base de prostaglandinas (treprostinil e beraprost) são também utilizados, porém apresentam baixa estabilidade e por isso possuem restrições de

uso em vários países. Os inibidores da fosfodiesterase tipo 5, como o sildenafil também demonstraram aumento da capacidade de realização de exercícios (ROSENKRANZ, 2007).

Os medicamentos contendo substâncias antagonistas aos receptores de endotelina (ET) como a bosentana e a ambrisentana são também utilizados para a HAP (FINE *et al.*, 2009), sendo a ambrisentana um bloqueador seletivo de receptores de endotelina, mais precisamente o ET-A, encontrados nas células endoteliais e células musculares lisas vasculares (RUFINO *et al.*, 2013). A ambrisentana é comercializada sob nome comercial Volibris® e teve registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicado em 07 de dezembro de 2010 e está disponível nas concentrações de 5 e 10 mg, sendo um medicamento registrado pela empresa GLAXOSMITHKLINE BRASIL LTDA.

Para registro e comercialização de novos medicamentos, que podem compreender novas entidades químicas e novos genéricos, ou ainda, alterações de formulação ou processos produtivos, as empresas devem atender alguns padrões de qualidade que garantam a segurança e eficácia do produto em questão, como ensaios de perfil de dissolução, equivalência farmacêutica, bioequivalência farmacêutica, ensaios clínicos, estudos de estabilidade etc (BRASIL, 2014a).

Junto a isso, a resolução RDC 58 de 20 de dezembro de 2013, 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 (BRASIL, 2013). Esta resolução, que entrará em vigor em dezembro de 2015, orienta sobre os estudos de degradação forçada, que são parte do desenvolvimento de um medicamento. Segundo a ANVISA, eles têm a finalidade de acelerar a degradação do fármaco em um medicamento, para que se possa avaliar tanto a susceptibilidade deste a situações de estresse, elucidar os mecanismos envolvidos, as reações cinéticas, as estruturas dos produtos de degradação, bem como verificar a adequabilidade do método analítico para aplicação em um estudo de estabilidade. Os estudos de degradação forçada também podem auxiliar na seleção adequada do material de embalagem primária e excipientes mais compatíveis com o fármaco (BRASIL, 2014b).



Desta maneira, o desenvolvimento de novos produtos, a partir da data de vigência desta legislação, devem apresentar os dados do estudo de investigação de produtos de degradação, que tem por objetivo garantir a segurança e a eficácia terapêutica aos usuários dos medicamentos submetidos a registro e renovação de registro a ANVISA.

Nos casos de os medicamentos possuírem monografias específicas em compêndios oficiais, reconhecidos pelas agências regulatórias, como a Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Americana, Farmacopeia Britânica, Farmacopeia Europeia, dentre outras, podem-se usar estas metodologias e seus limites para o controle das impurezas e produtos de degradação. Caso não existam monografias nos compêndios reconhecidos pela ANVISA, um novo método deve ser desenvolvido e validado para que se possa avaliar a qualidade e a estabilidade dos medicamentos.

No caso da ambrisentana comprimidos, nenhuma monografia oficial está disponibilizada em farmacopeias, criando a necessidade de desenvolvimento de um método de análises para este controle de qualidade.

O desenvolvimento de nova metodologia analítica para controle de qualidade e para estudo de estabilidade de ambrisentana comprimidos é o objetivo principal desta dissertação.

Face à importância de assegurar a qualidade de preparações farmacêuticas contendo o fármaco ambrisentana e ao reduzido número de publicações referentes ao desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade o presente trabalho visa desenvolver novo método analítico, que seja capaz de identificar com segurança as possíveis degradações que possam surgir durante a produção e/ou o armazenamento do produto (estudos de estabilidade) e para utilização no controle de qualidade do medicamento.



---

## **2. OBJETIVOS**

---



## **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver e validar método analítico para a caracterização e determinação quantitativa de ambrisentana e seus produtos de degradação em comprimidos, e identificar os principais produtos de degradação formados.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar a identidade e pureza da substância química de referência (SQR) de ambrisentana pelas técnicas analíticas de espectrofotometria na região de Infravermelho (IV), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).
- Desenvolver método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector ultravioleta para análise qualitativa e quantitativa de ambrisentana em comprimidos;
- Validar metodologia para análise qualitativa e quantitativa de ambrisentana em comprimidos;
- Desenvolver método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de espectrometria de massas para analisar as soluções degradadas sob condições de estresse e elucidar a estrutura química dos produtos de degradação eventualmente formados nestas condições.



---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---





### 3.1. Aspectos gerais

A hipertensão pulmonar é uma enfermidade que apresenta-se dividida em 5 grupos clínicos, de acordo com uma recente atualização na classificação realizada em 2009 (SIMONNEAU; ROBBINS, 2009). De forma resumida, os grupos estão apresentados na Tabela 1 abaixo. A ambrisentana, fármaco objeto desta dissertação, é um fármaco que tem sua aplicação focada no grupo 1, que clinicamente apresenta hipertensão nas artérias pulmonares, classificando-se como hipertensão arterial pulmonar (HAP).

Tabela 1 - Classificação da Hipertensão Pulmonar (SIMONNEAU; ROBBINS, 2009)

<b>Grupo</b>	<b>Classificação da Hipertensão Pulmonar</b>
Grupo 1	Hipertensão arterial pulmonar
Grupo 2	Hipertensão pulmonar devido à doença do coração esquerdo
Grupo 3	Hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e / ou hipóxia
Grupo 4	Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica
Grupo 5	Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais pouco claros

A HAP, por sua vez, também apresenta subgrupos, os quais foram estabelecidos para melhor entender a prevalência da enfermidade, as suas causas principais e os riscos envolvidos. A Tabela 2 apresenta estes principais subgrupos.

Tabela 2 - Classificação da HAP (SIMONNEAU; ROBBINS, 2009)

<b>Grupo</b>	<b>Classificação da Hipertensão Pulmonar</b>
1.1	HAP idiopática
1.2	Hereditária
1.3	Induzida por toxinas ou drogas
1.4	Associada com:
1.4.1	Doenças do tecido conjuntivo
1.4.2	Infecção por HIV
1.4.3	Hipertensão portal
1.4.4	Cardiopatias congênitas
1.4.5	esquistossomose
1.4.6	Anemia hemolítica crônica
1.5	Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido
1'	Doença pulmonar veno-oclusiva

De forma geral a HAP é uma enfermidade que causa uma grande perda na qualidade de vida do paciente, visto que este pode apresentar grande dificuldade em praticar exercícios físicos, e geralmente evolui para uma dificuldade em realizar atividades que exijam pequenos esforços. Os sintomas principais são cansaço, fadiga, dispneia, limitação para atividades diárias, tonturas, dor precordial e torácica, além de outros, e que quando avaliados quanto a sua intensidade, ajudam a classificar o grau da doença.

Como a adequada circulação sanguínea no pulmão é essencial para uma eficiente oxigenação do sangue, a dificuldade de circulação nos capilares pulmonares estimula um maior esforço cardíaco para compensar a deficiência na circulação, elevando a pressão sanguínea neste tecido. Mesmo assim este aumento no débito cardíaco pode não ser suficiente, levando o paciente a sentir os sintomas anteriormente citados (AHMED; PALEVSKY, 2014).

Alguns fatores influenciam na ocorrência da HAP, podendo-se citar a presença de insuficiência cardíaca congestiva, histórico de coagulo de sangue no pulmão, infecção por HIV, doença pulmonar ou de válvula cardíaca, distúrbios autoimunes que lesam os pulmões, como a esclerodermia e artrite reumatoide, e qualquer outra condição que cause níveis baixos de oxigênio no sangue (TAICHMAN; MANDEL, 2013).

Frente a tudo isso, e a grande chance de pacientes acometidos pela HAP terem uma qualidade de vida seriamente prejudicada pelos sintomas, fármacos

foram descobertos e o seu uso ocasionou melhora na condição clínica destes pacientes.

A primeira alternativa aos pacientes foi em 1995, com a aprovação pelo FDA do epoprostenol, uma prostacilina bloqueadora dos canais de cálcio, com ação vasodilatadora sistêmica. Como a sua ação é sistêmica, nem todos os pacientes respondiam bem ao tratamento, mas como se tratava da único fármaco disponível, os efeitos adversos observados eram frequentes (VENTETUOLO; KLINGER, 2012).

Outros fármacos, a partir de 2001, foram aprovadas pelo FDA, destacando-se os antagonistas dos receptores de endotelina como a bosentana e ambrisentana. A Figura 1, a seguir, adaptada de Ventetuolo e Klinger mostram a cronologia de aprovação pelo FDA dos fármacos atualmente usados na HAP (VENTETUOLO; KLINGER, 2012).

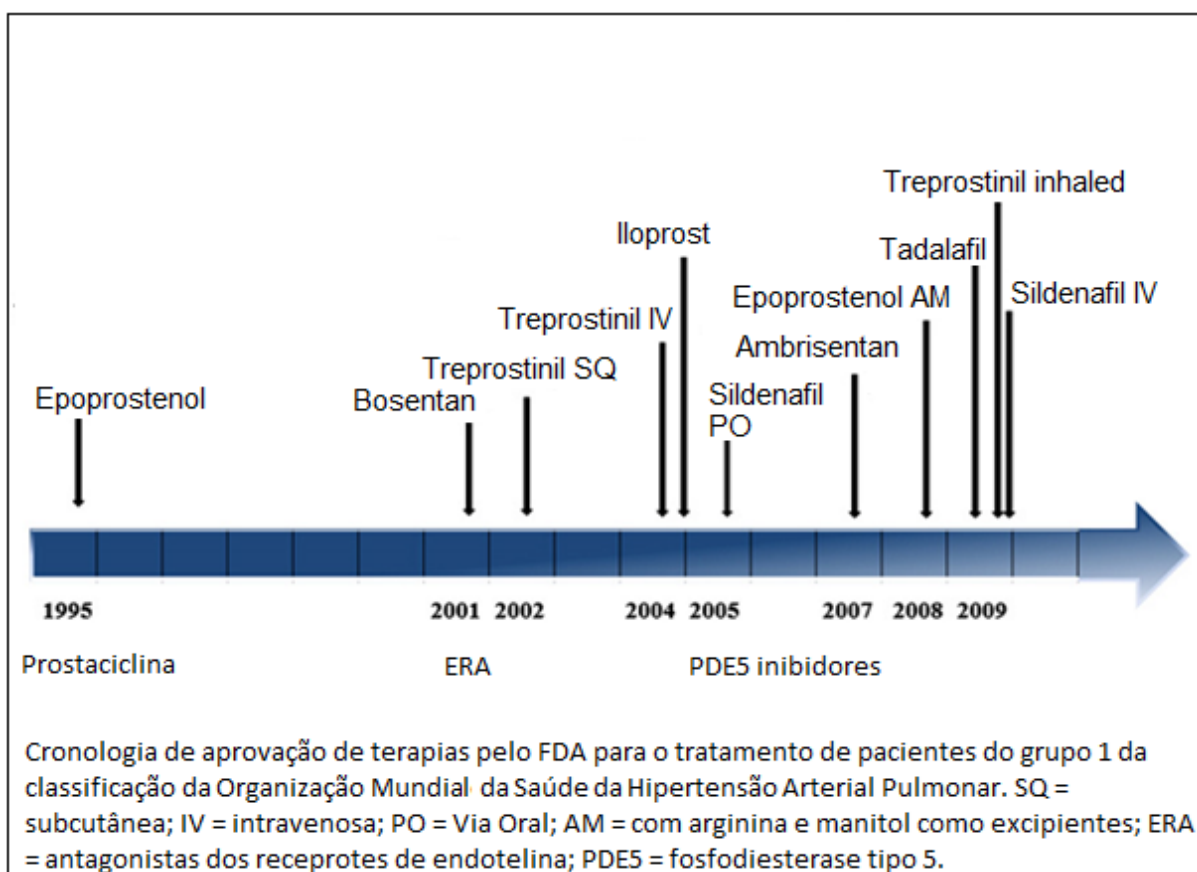


Figura 1 - Aprovação de medicamentos para tratamento da HAP pelo FDA (VENTETUOLO; KLINGER, 2012)

## 3.2. Ambrisentana

### 3.2.1. Descrição química

A ambrisentana, com nome químico (+)-2(S)-(4,6-dimetilpirimidina-2-iloxi)-3-metoxi-3,3-ácido difenilpropionico ( DCB 00630; número CAS 177036-94-1), possui massa molecular de 378,4 gramas/Mol. É um fármaco com aparência de pó branco a quase branco e ponto de fusão entre 172 a 178 °C (KOMPELLA *et al.*, 2013). A estrutura química da ambrisentana está demonstrada na Figura 2.

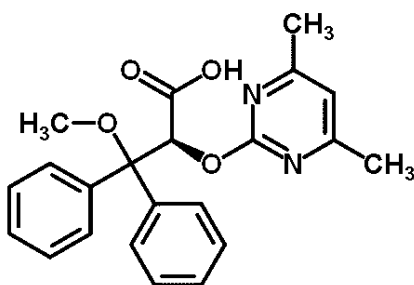


Figura 2 - Estrutura química da ambrisentana

### 3.2.2. Mecanismo de ação

A ambrisentana, como já mencionado, é um fármaco que possui grande afinidade pelos receptores de endotelina, agindo como bloqueadores destes receptores. Estes são classificados em 1, 2 e 3, porém os receptores de endotelina Tipo 1 são os mais importantes em situações de distúrbios clínicos a eles associados. Este receptor tipo 1 pode-se subdividir em outras duas classes, os receptores de endotelina tipo 1A e tipo 1B. A estimulação dos receptores tipo 1A provocam efeito mais prolongado, mesmo após o desligamento do sítio ativo, ao contrário do efeito do tipo 1B, que tem ação transitória (CHENG, 2008).

Neste contexto, a ambrisentana tem uma afinidade de 4 mil vezes maior pelos receptores tipo 1A, do que pelos receptores 1B, o que torna o medicamento mais seletivo que outras substâncias de uso similar, como a bosentana, que

apresenta 100 vezes mais afinidade pelos receptores tipo 1A do que pelos receptores 1B (CHENG, 2008).

### **3.2.3. Aspectos farmacológicos**

A ambrisentana, quando administrada em formas farmacêuticas de uso oral, é bem absorvida, e alcançada concentração plasmática máxima entre 1,7 e 3,3 horas após administração, independente se for um portador de HAP ou em um indivíduo saudável. A ambrisentana apresenta ligação às proteínas plasmáticas na fração de 99%. O fármaco é eliminado principalmente por vias não renais (77%). Dados *in vitro* indicam que o metabolismo da ambrisentana é afetado pelo citocromo P450 e por inibidores da glicoproteína P. A depuração renal média de ambrisentana em indivíduos saudáveis e portadores de HAP é relatada entre 38 e 19 mL/min, respectivamente. A meia vida de eliminação da ambrisentana após administração repetida demonstrou variação entre 13,6 a 16,5 horas (CHENG, 2008).

### **3.2.4. Polimorfismo**

Segundo informações de patentes, a ambrisentana pode ser produzida em pelo menos uma forma cristalina e na forma amorfa, mas as diferenças entre as possíveis formas morfológicas quanto a propriedades físico-químicas não são relatadas (RIMKUS *et al.*, 2012), (KOMPELLA *et al.*, 2013).

### **3.2.5. Química Analítica aplicada na determinação de Ambrisentana**

Como a ambrisentana é um fármaco recente, poucos estudos apresentam metodologias analíticas para identificação, quantificação, determinação de diferentes formas estruturais (quiralidade), e análises de impurezas potenciais como produtos de degradação.

Pode-se citar estudo de quantificação de ambrisentana em plasma, onde foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada à espectroscopia de massas com objetivo de desenvolver a técnica analítica que fosse

aplicada à quantificação deste fármaco em estudos farmacocinéticos em ratos (NIROGI *et al.*, 2012).

Outro estudo publicado em 2013, também mostra a aplicação da técnica de CLAE acoplada a espectroscopia de massas. Este estudo mostrou a aplicação da técnica na quantificação de ambrisentana em plasma humano, para avaliação da farmacocinética em estudo de bioequivalência farmacêutica (LUKRAM; SHARMA, 2014).

A técnica de cromatografia permite determinação simultânea de vários analitos devido a sua elevada capacidade de separação. Quando se associam técnicas de detecção mais seletivas, com espectroscopia de massas, pode-se otimizar muito a qualidade e velocidade de obtenção de resultados analíticos. Desta forma, pesquisadores utilizaram a técnica hifenizada para avaliar os efeitos do uso combinado de vários fármacos como ambrisentana, bosetana, sildenafil e tadalafila, que agiam em diferentes vias de desencadeamento da HAP em crianças (YOKOYAMA *et al.*, 2014).

Também usando cromatografia, pesquisadores dispoñdo de coluna cromatográfica com fase estacionária com base de celulose desenvolveram método analítico capaz de separar os enantiômeros de ambrisentana, podendo-se assim avaliar o efeito de diferentes rotas sintéticas na obtenção dos enantiômeros de ambrisentana (DOUŠA; GIBALA, 2012).

Em 2013, pesquisadores desenvolveram metodologia analítica que permitisse a separação dos produtos oriundos da degradação forçada de ambrisentana. Este estudo conseguiu realizar a degradação da ambrisentana e separar os quatro principais produtos de degradações, usando CLAE com detector de ultravioleta e fase móvel composta de ácido fosfórico, água, metanol e acetonitrila, com coluna de empacotamento C18, e eluindo os compostos de interesse em análise cromatográfica de 30 minutos (NARAYANA; CHANDRASEKHAR; RAO, 2013).

Pode-se ressaltar outra publicação, de março de 2014, da Royal Society of Chemistry, que mostrou uma completa investigação de produtos de degradação em ambrisentana, partindo de amostras submetidas a condições de estresse ácido, básico, hidrolítico, oxidativo, térmico e fotolítico. A metodologia analítica desenvolvida para a separação dos compostos de interesse (Ambrisentana e suas

degradações), era configurada com coluna C18 (dimensões de 150 x 4,6mm e fase estacionaria com partículas de 5 micrômetros), fase móvel composta de tampão acetato de amônia 10mM e acetonitrila eluindo num fluxo de 1,0 mL por minuto. A análise cromatográfica otimizada demonstrou duração de 45 minutos aproximadamente. Neste mesmo estudo, os pesquisadores elucidaram as estruturas químicas das impurezas, através da espectrometria de massas. Os produtos de degradação propostos pelos autores estão ilustradas na Figura 3 (RAMISETTI; KUNTAMUKKALA, 2014).

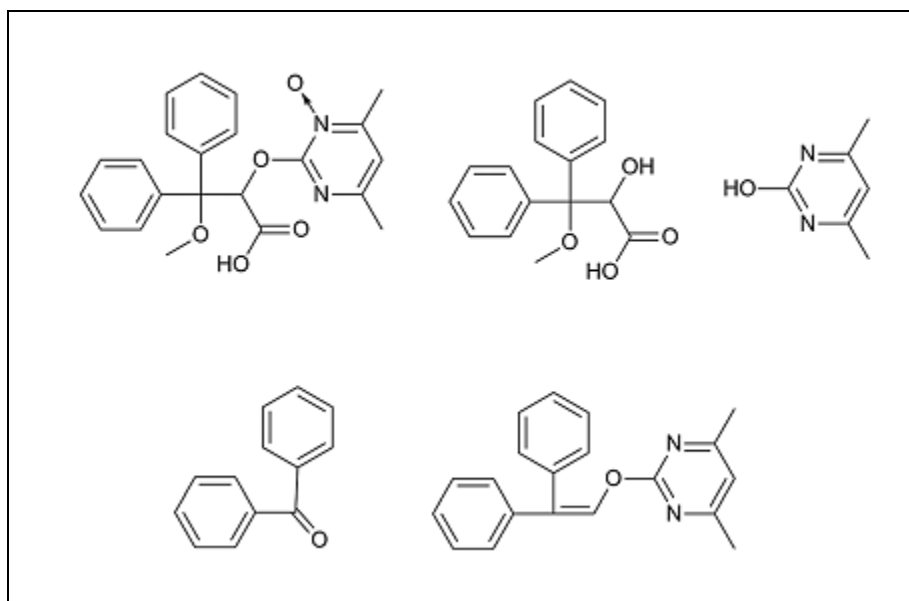


Figura 3 – Produtos de degradações propostos por Ramisetti e Kuntamukkala (2014)





---

## **4. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA SQR**

---



#### 4.1. Introdução

As farmacopeias descrevem as suas monografias e nelas estão indicados os padrões que devem ser utilizados para a execução das análises. Em especial, a Farmacopeia Brasileira traz em suas monografias as situações onde os padrões são necessários. Caso a própria Farmacopeia Brasileira não possua o padrão para fornecer aos usuários, pode-se fazer uso de padrões fornecidos por outras entidades oficiais, as farmacopeias estrangeiras. A Resolução Nº 37, de 6 de julho de 2009, trata da admissibilidade das farmacopeias estrangeiras e regulamenta quais são os compêndios internacionais que podem ser utilizados no caso de ausência de monografia na Farmacopeia Brasileira. Da mesma maneira, esta resolução também regulamenta a possibilidade de uso das substâncias químicas de referência farmacopéica na ausência destas no órgão oficial do Brasil. Estas substâncias, reconhecidas pela sua grande pureza e padronização, são conhecidas como substâncias químicas de referência farmacopeica (SQRF).

A ambrisentana, como é um fármaco relativamente novo, ainda não dispõe de monografia em compêndios oficiais, conseqüentemente, também não existe substância química de referência farmacopeica.

Desta maneira a resolução RDC Nº 17, de 16 de abril de 2010, que Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, descreve no artigo 188 que um padrão de referência não adquirido de uma farmacopeia reconhecida deve ser do mais elevado grau de pureza possível de ser obtido e cuidadosamente caracterizado a fim de garantir sua identidade, teor, qualidade, pureza e potência para que uma análise possa ser conduzida utilizando-se este material como substância química de referência (padrão de trabalho) (NIROGI *et al.*, 2012).

Assim sendo, para a caracterização do material de referência para a ambrisentana, foram utilizadas as técnicas de espectrometria de massas, infravermelho, Ressonância magnética nuclear de Carbono e de Hidrogênio e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

## 4.2. Substância química de referência (SQR)

O insumo utilizado foi Ambrisentana fornecida pela empresa BOC Sciences, identificada com o Lote B13L1115 e declarada com 99,5% de ambrisentana no material. Desta maneira, este material foi avaliado para ser utilizado como Substância Química de Referência (SQR).

### 4.2.1. Espectrometria de massas

A análise de identificação da ambrisentana em espectroscopia de massas foi realizada no laboratório instrumental de estudos Biofarmacêuticos da empresa Biocinese, localizada em Toledo, Paraná, que teve gentilmente cedeu sua estrutura para a realização dos ensaios.

O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massas MS/MS modelo Quattro Micro API® fabricado pela Waters®, e as condições analíticas estão descritas na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 - Condições do espectrômetro de massas – teste de identificação da SQR

Parâmetro	Ajuste
Tipo de ionização	Electrospray Positivo (ES+)
Modo de operação	MS Scan e Daughter Scan
Fluxo do gás do cone	100 L/hr de nitrogênio
Pressão do gás de colisão	$4,0 \times 10^{-3}$ bar de argônio
Fluxo do gás de dessolvatação	400 L/hr de nitrogênio
Temperatura de dessolvatação	400 °C
Temperatura do íon block	110 °C

Analisou-se a ambrisentana por infusão direta da solução efetuando escaneamentos de massa em modo MSScan (íon precursor) e DaughterScan (íon produto).

A solução infundida diretamente no espectrômetro de massas foi preparada na concentração de 0,1 mg/mL em metanol, e posteriormente diluída a 3000 ng/mL em solução de ácido fórmico 0,05%:acetonitrila (1:1 v/v), a qual foi utilizada para infusão.

Monitoraram-se as massas que representam a molécula da ambrisentana e seus principais fragmentos, de acordo com literatura específica (Figura 4) (NIROGI *et al.*, 2012).

#### 4.2.1.1. Resultados e discussão

O íon precursor pode ser observado no espectro de massas (Figura 5) com  $M+H = 379,3$  e seus principais fragmentos ( $347,2$  e  $303,3$ ) Figura 6.

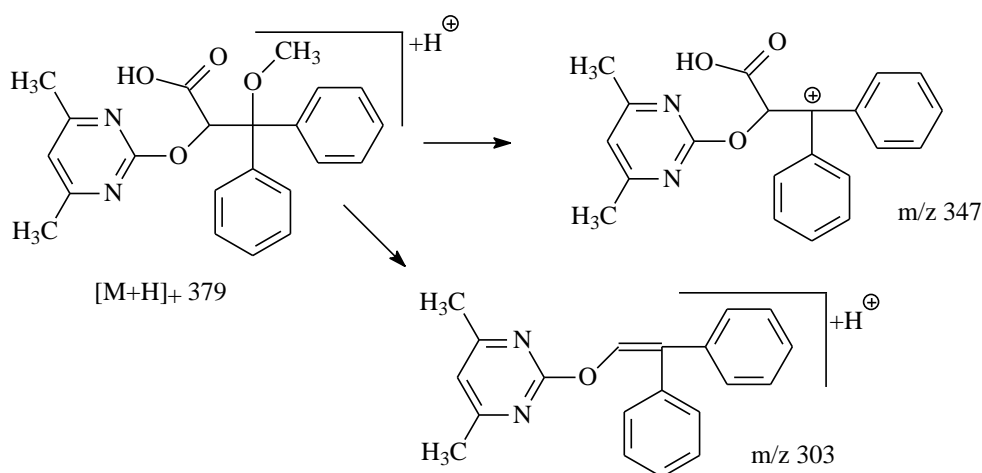


Figura 4 - íon ambrisentana e seus principais fragmentos observados em espectro de massas

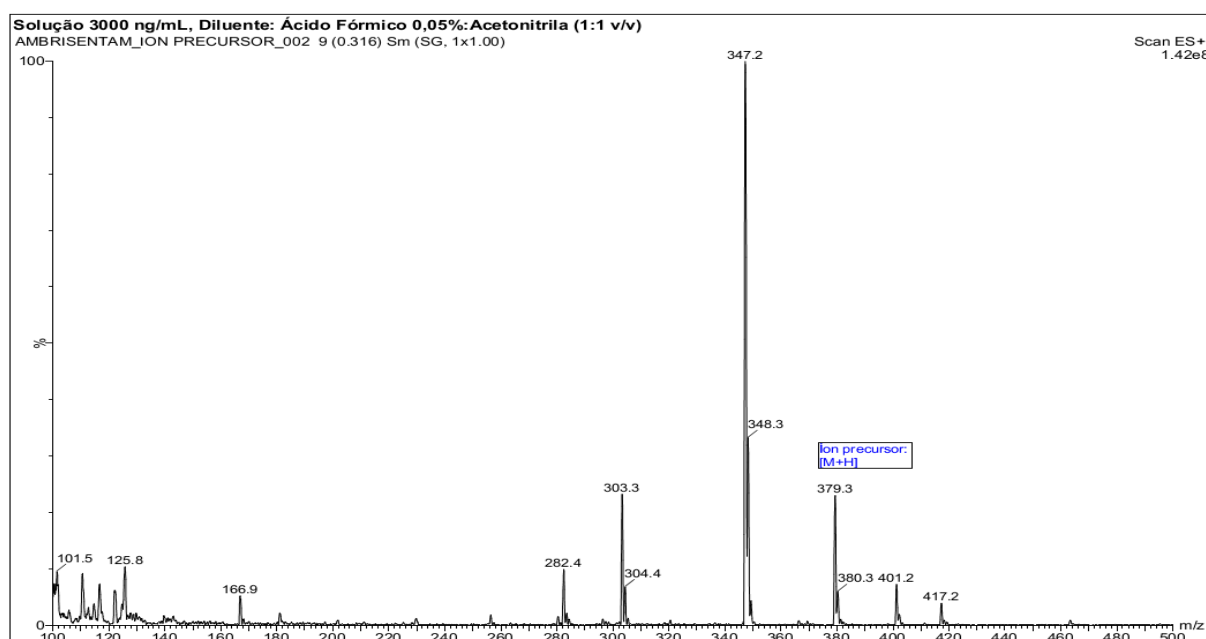


Figura 5 - Espectro de massas de ambrisentana – íon precursor (ES+)

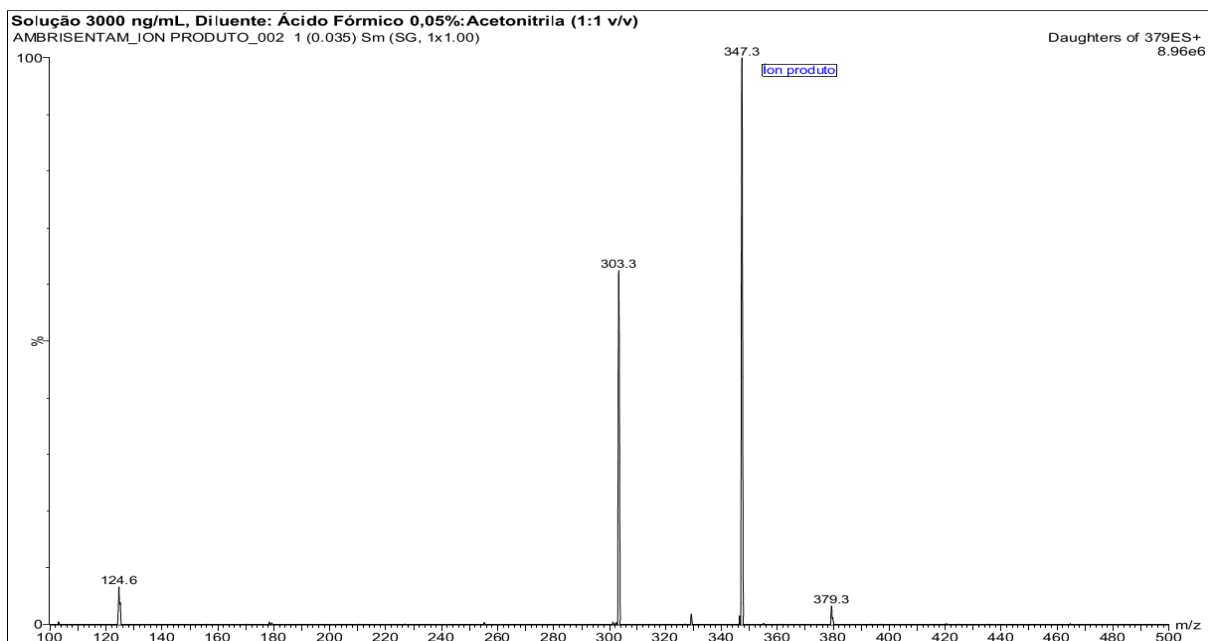


Figura 6 - Espectro de massas de Ambrisentana - íon produto (ES+)

Como pode ser observado, a amostra analisada apresentou as massas esperadas, com destaque para o íon precursor (M+H) de 379,3 e os principais fragmentos, com massas de 347,3 e 303,3. Estes resultados estão de acordo com esperado para esta molécula, como já relatado em outros estudos de fragmentação de massas (NIROGI *et al.*, 2012).

#### 4.2.2. Espectroscopia de RMN – $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

A espectroscopia de RMN é uma técnica amplamente utilizada na identificação de compostos orgânicos devido ao detalhamento das informações fornecidas e a possibilidade de se chegar bem próximo ou efetivamente elucidar a estrutura química (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

A técnica RMN pode trazer informações acerca dos átomos de hidrogênio presentes (RMN  $^1\text{H}$ ), como o número de átomos deste elemento na molécula e através dos deslocamentos químicos dos mesmos, pode-se estimar quais grupamentos estão próximos a eles. Também a presença de carbono 13 (átomo com momento magnético não nulo) na molécula fornece informações sobre a quantidade de carbonos na molécula e, também, através do deslocamento químico,

pode-se estimar os principais grupamentos vizinhos de cada carbono analisado (sinal no espectro de RMN) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

As amostras de ambrisentana (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) foram analisadas no laboratório de ressonância magnética nuclear do Instituto de Química da UFRGS – Campus do Vale. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram registados em Espectrômetro de 300 MHz, modelo Inova 300, fabricados pela empresa Varian. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm a calibração de ponto mínimo realizado com padrão de TMS e espectros adquiridos utilizando-se solvente metanol deuterado. As constantes de acoplamento foram relatadas em Hz.

#### 4.2.2.1. Resultados e discussão

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e sua estrutura química estão apresentados na Figura 7.

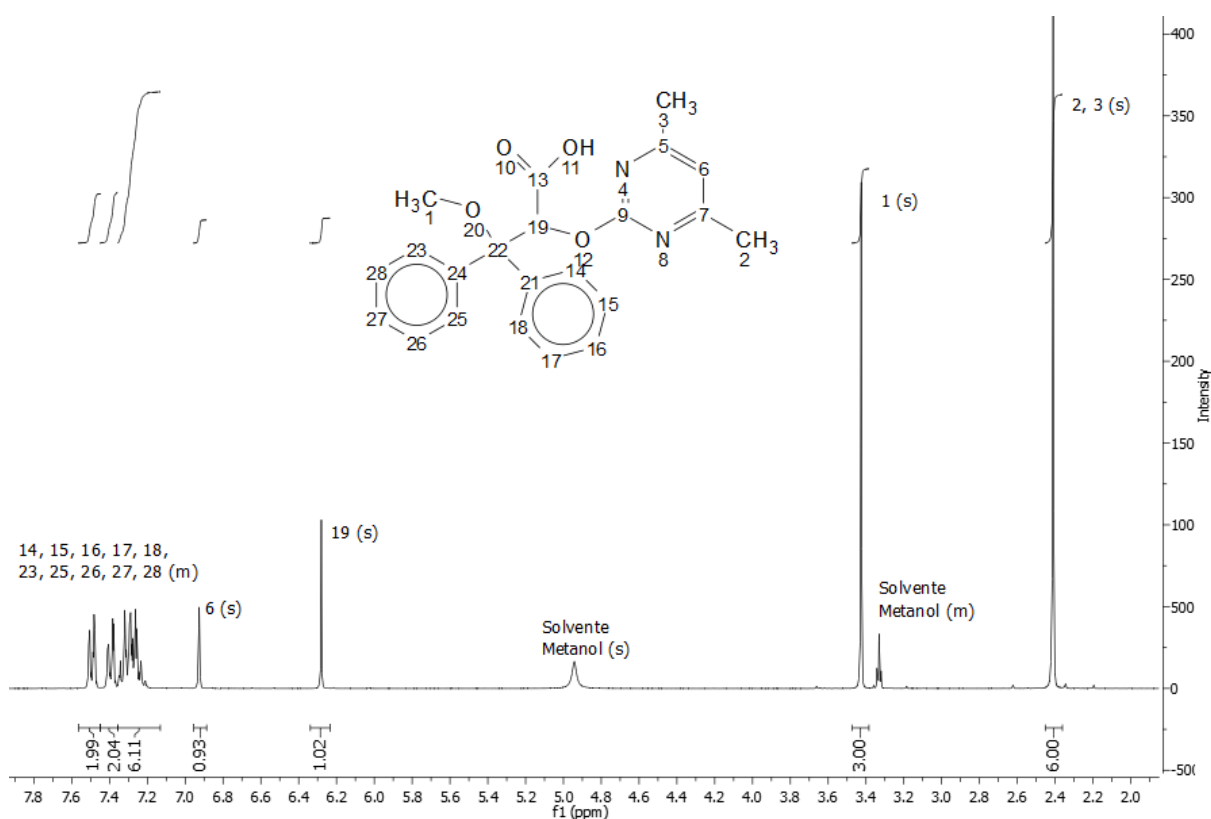


Figura 7 - Espectro de RMN - <sup>1</sup>H Ambrisentana (300MHz)

Na Tabela 4, podemos observar as que as atribuições e os picos observados no espectro de RMN <sup>1</sup>H estão de acordo com os citados na literatura especializada

(PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009). A contagem de hidrogênios pelas integrais mostrou 21 átomos de um total de 22 da molécula, sendo o hidrogênio da Hidroxila (identificado como número 11, Figura 7, que não apresentou sinal, o que é possível de acontecer, visto que em alguns casos são por questões estruturais (grandes diferenças de eletronegatividade) associado ao solvente utilizado.

Tabela 4 - Atribuição dos picos obtidos no espectro de RMN -  $^1\text{H}$  de Ambrisentana.

Deslocamento	Multiplicidade	Integral	Atribuição	Identificação
2.41	m	6.00	2 (CH <sub>3</sub> )	2, 3
3.43	m	3.00	CH <sub>3</sub>	1
6.28	s	1.01	CH	19
6.93	s	0.96	CH	6
7.29	m	6.12	CH	14, 15, 16, 17, 18, 23, 25, 26, 27, 28.
7.39	m	2.03	CH	
7.49	m	1.99	CH	

O espectro de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) apresentado na Figura 8, mostra os sinais de frequência de absorção dos átomos da molécula de ambrisentana. A confirmação da estrutura pode ser dada pela verificação da posição dos sinais, de acordo com os deslocamentos químicos citados na literatura especializada (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009).



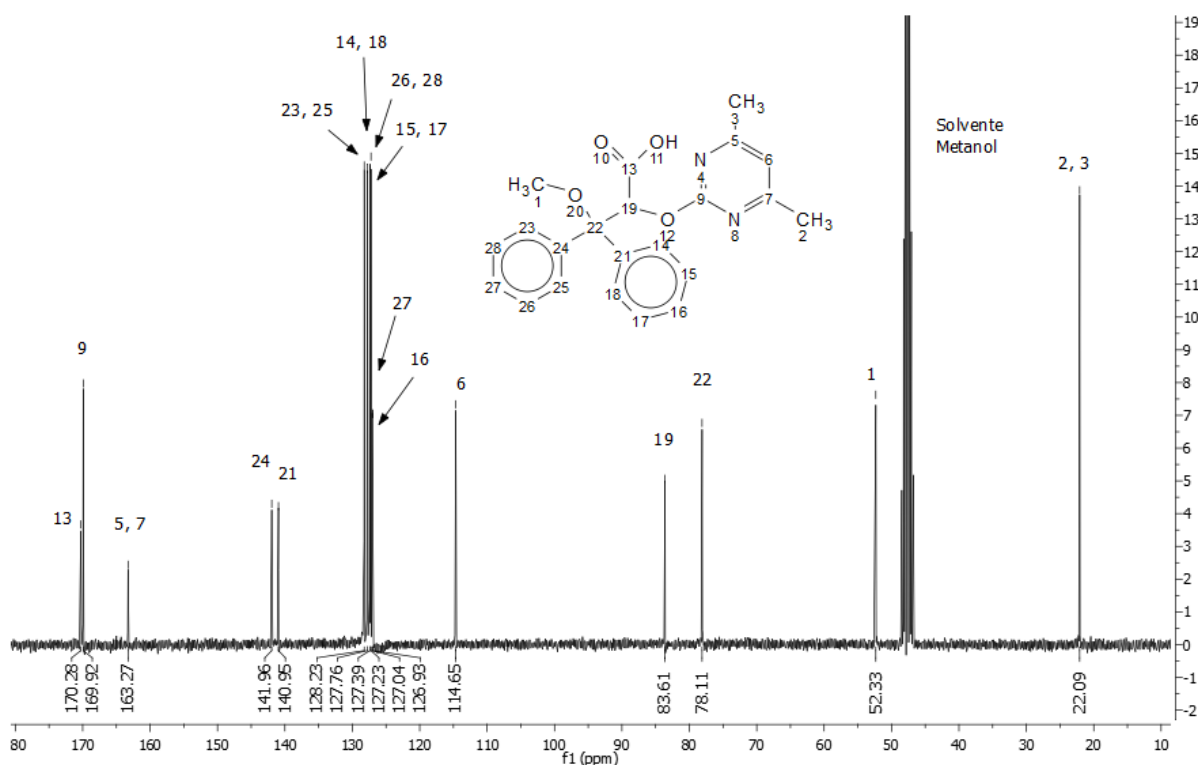


Figura 8 - Espectro de RMN -  $^{13}\text{C}$  Ambrisentana

A Tabela 5 mostra as atribuições dos sinais encontrados.

Tabela 5 - Atribuição dos picos obtidos no espectro de RMN -  $^{13}\text{C}$  de Ambrisentana

Deslocamento (ppm)	Atribuição	Identificação
170,28	COOH – carbono de ácido carboxílico	13
169,92	OCNN – carbono em anel pirimidina e ligado a oxigênio	9
163,27	C substituído em anel pirimidina	5, 7
141,96	C substituído de anel monosubstituído	24
140,95	C substituído de anel monosubstituído	21
126,93 a 128,23	C de anel monosubstituído	14, 15, 16, 17, 18, 23, 25, 26, 27, 28
114,65	C em anel pirimidina	6
83,61	OC(COOH) – carbono vizinho a ácido carboxílico e ligado a oxigênio	19
78,11	(Fenil)2COC	22
52,33	OCH3 – metila ligada a oxigênio	1
22,09	CH3 de substituição em anel pirimidina	2, 3

Também pode-se concluir que a amostra apresentou espectro puro, com presença única dos sinais provenientes da molécula em análise e do solvente utilizado, sem interferências ou sinais sem atribuição. Este dado pode confirmar a alta pureza do material testado.

#### **4.2.3. Espectrofotometria de infravermelho**

A espectrofotometria no infravermelho mostra absorções específicas para determinados tipos de ligações químicas entre átomos. Desta maneira, uma substância, contendo várias ligações, gera um espectro de absorção que se torna característico para a substância. Se esta substância já foi estudada, e tem um espectro de IV já interpretado e devidamente reportado à molécula, a comparação dele é uma ótima evidência para confirmação da identidade química (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Para a verificação das características de absorção da SQR, foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho modelo Spectrum 400 da marca Perkin Elmer, instalado no laboratório de controle de qualidade da empresa Prati Donaduzzi e Cia LTDA.

A leitura da amostra pode ser feita diretamente, sem necessidade de pré-tratamento do material.

##### **4.2.3.1. Resultados e discussão**

Conforme mostrado no espectro de infravermelho, ilustrado na Figura 9, pode-se ver as principais bandas de absorção, que caracterizam alguns grupamentos específicos da molécula em estudo. Estas bandas estão apresentadas na Tabela 6, juntamente com as respectivas atribuições (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009).

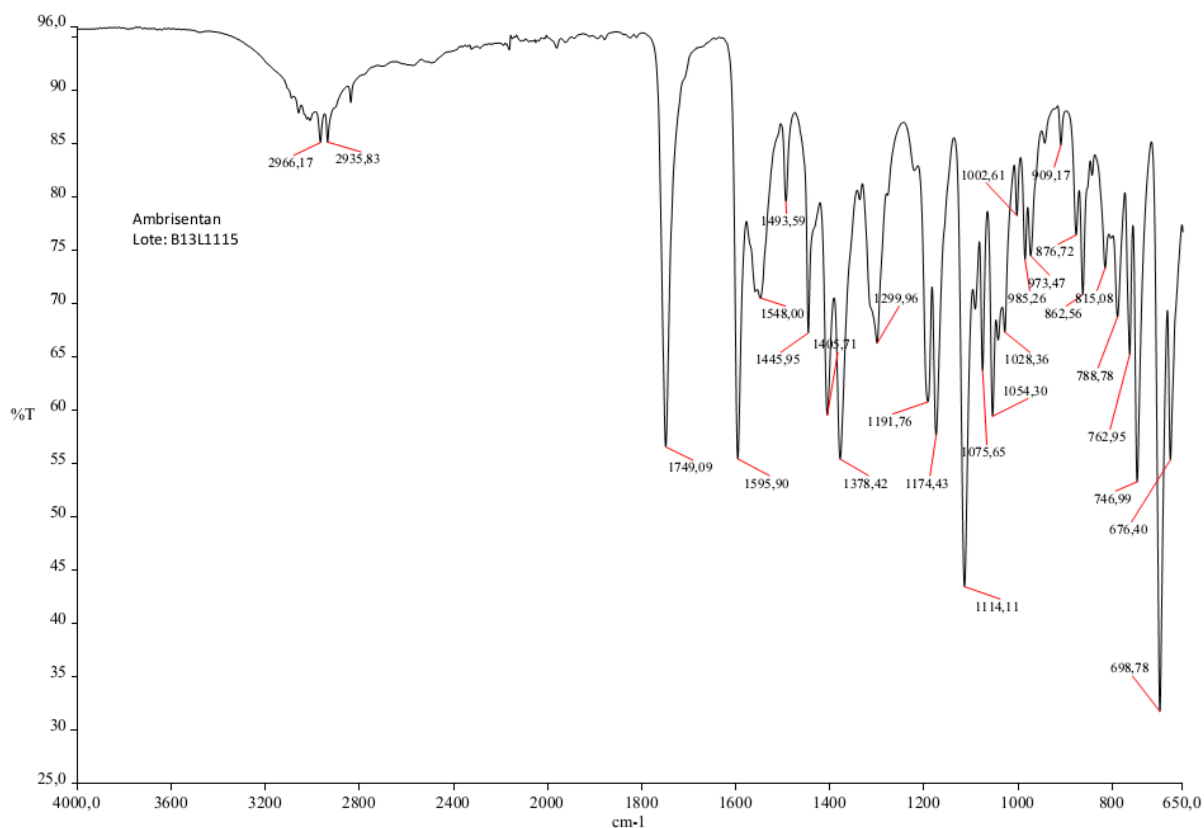


Figura 9 - Espectro de infravermelho da ambrisentana

Tabela 6 - Frequência de absorção das principais bandas no infravermelho da ambrisentana e suas respectivas atribuições.

Frequência	Atribuição
2935	C-OH Ácido Carboxílico - Estiramento
1749	C=O Ácido carboxílico – Estiramento
1595	C=C Aromático - Estiramento
1300	C-O-C Estiramento
1114	C-O-C Éter dialquílico - Estiramento assimétrico
698	Deformação Angular fora do plano de CH Aromático

A identificação do espectro da molécula pode também ser confirmada quando se compara com o espectro demonstrado no Anexo 1, que é o espectro de infravermelho reportado em uma patente depositada para produção de ambrisentana com alta pureza (KOMPELLA *et al.*, 2013). Este espectro de infravermelho demonstrado na patente apresenta os mesmos sinais e intensidades em relação ao espectro do material testado, confirmando assim a sua identidade.

#### 4.2.4. Calorimetria exploratória diferencial – DSC

As análises de DSC foram conduzidas em equipamento Metler Toledo configurado para operar em uma rampa de aquecimento de 10° C por minuto e com um fluxo de nitrogênio de 50 mililitros por minuto.

##### 4.2.4.1. Resultados e discussão

O material utilizado neste estudo apresentou mesmo perfil térmico que o produzido com o processo patenteado para produção de ambrisentana de alta pureza (KOMPELLA *et al.*, 2013). Este termograma pode ser observado no Anexo 2.

Conforme demonstrado na Figura 10, a SQR analisada apresentou temperatura de fusão iniciando em 173,62°C ( $T_{onset}$ ) e terminando a fusão em 183,53°C. De acordo com informações do laudo do fornecedor do fármaco, a faixa de fusão é de 174,9 a 176,1°C. As referências observadas confirmam a temperatura de fusão observada neste experimento.

O termograma de DSC pode informar também a pureza aproximada do material, neste, pode-se verificar que está em torno de 97,23%.

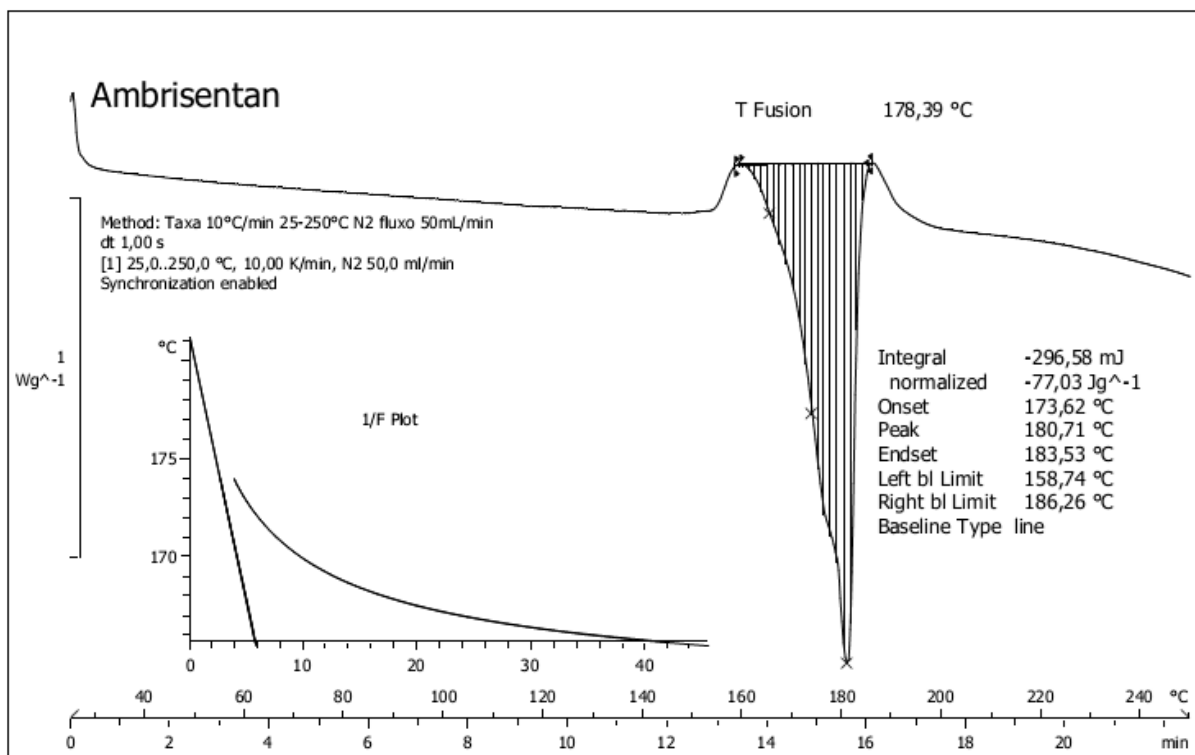


Figura 10 - Termograma de DSC - ambrisentana

### **4.3. Conclusões**

Com base nas análises realizadas e nos resultados encontrados, pode-se concluir que a amostra utilizada para caracterização, Lote B13L1115, fornecida pela empresa BOC Sciences, é a ambrisentana, com identidade confirmada pelas técnicas de Espectroscopia de Massas, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , Infravermelho e DSC, e sua pureza pode ser confirmada também pelas análises de RMN e DSC.

As técnicas analíticas utilizadas para a avaliação da identidade e pureza do material mostraram-se eficientes e seus resultados são de grande confiabilidade.

Com base nos testes de pureza e caracterização da SQR, foi possível confirmar a pureza do padrão utilizado para as análises subsequentes.

Após estes ensaios, considera-se a ambrisentana devidamente caracterizada para uso como SQR.



---

**5. CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA  
ANALÍTICA**

---





## 5.1. Introdução

Métodos indicativos de estabilidade são métodos capazes de identificar com segurança o decaimento do teor de substância ativa nos medicamentos. Para tanto, é necessário que interferências que possam surgir durante o estudo de estabilidade do medicamento, como os produtos de degradação, sejam devidamente eliminadas (ICH, 1997).

Neste contexto, as agências regulatórias criaram guias e legislações que regulamentam as características de uma metodologia adequada e os limites para estas degradações.

O ICH (International Conference on Harmonisation), em seu guia sobre impurezas em novos produtos farmacêuticos, orienta testar as metodologias quanto à capacidade de identificar separadamente as impurezas provenientes do processo de síntese da molécula, das impurezas que se formam a partir da degradação da substância ativa, sejam elas devido ao processo produtivo, ao contato com excipientes, embalagem ou a condições adversas no seu armazenamento. Estes testes devem avaliar a metodologia analítica utilizando amostras submetidas a condições de estresse, como calor, luz, umidade, hidrólise ácida e básica e ambiente oxidativo (ICH, 1997).

A ANVISA, em uma recente resolução, estabeleceu parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos, bem como forneceu informações acerca da condução dos estudos de degradação forçada, e das documentação que deve ser apresentada na concessão de registro e renovação do registro dos produtos. Estas informações são as decisões e racionais técnicos do desenvolvimento da metodologia analítica que possa assegurar a qualidade dos resultados da investigação de produtos de degradação em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2013).

Com estas exigências regulatórias, esta metodologia analítica indicativa de estabilidade para aplicação em comprimidos contendo ambrisentana, deve ser capaz de separar eficientemente as possíveis degradações do fármaco, bem como realizar a identificação e quantificação do fármaco de maneira satisfatória.

Da mesma maneira, os procedimentos analíticos usados em todos os desenvolvimentos de fármacos e medicamentos fornecem informações e resultados para as decisões de liberação de lotes, determinação de prazos de validade através de estudos de estabilidade, investigação de desvios produtivos, determinação de impurezas. Todos estes são embasados em dados oriundos de técnicas analíticas. Assim, para se tomar decisões acertadas e evitar trabalho adicional, uma performance adequada dos procedimentos analíticos é essencial (ERMER, JOACHIM, 2001).

Com esta importância, um procedimento de validação da metodologia analítica deve ser adotado, com o objetivo de demonstrar que o método analítico é adequado para o propósito ao qual se destina (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

## **5.2. Materiais e métodos**

O equipamento de cromatografia utilizado foi um UPLC® Waters, modelo ACQUITY UPLC H-Class Core System, detector equipado com arranjo de fotodiodos e forno para colunas. O *software* para aquisição de dados e tratamento dos resultados foi o Empower Interprise.

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento da metodologia foram de grau cromatográfico e as colunas também foram da marca Waters.

A substância química de referência utilizada foi a padronizada neste estudo (pureza de 99,5% de ambrisentana na SQR), e os comprimidos revestidos de ambrisentana de 5mg (Volibris®) adquiridos em farmácia comercial.

O desenvolvimento da metodologia analítica iniciou com testes de solubilidade do fármaco e de investigação de solventes capazes de desintegrar o comprimido de ambrisentana e garantir a extração do fármaco da forma farmacêutica.

Foi também preparada solução concentrada de SQR de ambrisentana em metanol com objetivo de, a partir dela, preparar amostras para submeter às condições de degradação forçada.

A escolha da fase móvel foi determinada a partir da preparação de diferentes composições de solventes, com objetivo de selecionar àquela que apresentaria a melhor seletividade e rapidez na análise cromatográfica.

### 5.2.1. Teste de solubilidade

A solubilidade do fármaco e dos comprimidos foi testada com o uso dos solventes água, metanol e mistura destes dois solventes na proporção de 1:1 (v:v).

### 5.2.2. Estudo de estresse preliminar

O estudo preliminar de estresse das amostras foi conduzido de acordo com o descrito a seguir, detalhando preparo das amostras, conforme Tabela 7. O tempo de estresse foi de 10 dias para todas as condições testadas.

Tabela 7 - Preparo das soluções de ambrisentana para estudo preliminar de degradação forçada.

	Solução Estoque AMB: 2,00 mg/mL em Metanol		
	Balão Volumétrico (mL)	Volume Sol. Estoque	Volume Agente estressante
Controle	10	2,5	N/A
Estresse térmico (60°C)	10	2,5	N/A
Estresse Fotolítico (UV-VIS)	10	2,5	N/A
Estresse HCl (0,1M)	10	2,5	2,5
Estresse NaOH (0,1M)	10	2,5	2,5
Estresse H2O2 (3%)	10	2,5	2,5
Volumes completados com solução de água e metanol (1:1)			

N/A = Agente estressante não adicionado

### 5.2.3. Testes de volume de injeção, diluentes das amostras e vazão da fase móvel

Foram testados os volumes de injeção de 5 microlitros e de 3 microlitros, para a combinação de solventes metanol, e mistura de metanol:água (50:50 v:v), como detalhado abaixo:

- Diluente Metanol – Volume de injeção de 3 µL
- Diluente Metanol – Volume de injeção de 5 µL
- Diluente Metanol:Água (50:50 v:v) – Volume de injeção de 3 µL
- Diluente Metanol:Água (50:50 v:v) – Volume de injeção de 5 µL

A vazão da fase móvel foi testado para que se obtivesse o máximo de eficiência, desde que suportado pelo equipamento.

#### **5.2.4. Teste de colunas cromatográficas**

As colunas cromatográficas submetidas aos testes de desempenho da metodologia analítica foram as colunas C18, fluorofenil e fenil, todas com tamanho de 2,1 mm x 50mm, e tamanho de partículas de 1,7 micrômetros.

#### **5.2.5. Teste de fase móvel**

O teste para escolha da fase móvel mais apropriada para o método foi realizado utilizando-se as combinações de solvente orgânico e solução A. Todo o desenvolvimento foi realizado com variações das proporções dos solventes, com diferentes rampas de eluição (eluição com gradiente de fase móvel) e com alterações do solvente orgânico, onde utilizou-se metanol e acetonitrila para os testes de desenvolvimento. A solução aquosa usada (Solução A) foi uma mistura de ácido fórmico, trietilamina e água (1:1:998).

### **5.3. Considerações iniciais da validação analítica**

A validação desta metodologia analítica foi realizada avaliando-se todos os parâmetros preconizados pelo guia do ICH. Os ensaios foram conduzidos de modo que se tenha resultados de validação analítica para quantificação da substância ambrisentana (determinação de teor) e para a quantificação das possíveis impurezas formadas em estudos de estabilidade (determinação de produtos de degradação).

### 5.3.1. Especificidade

A especificidade da metodologia foi testada de modo que a possível interferência nos resultados por outros compostos presentes na amostra ou mesmo a interferência do próprio sistema cromatográfico pudesse ser esclarecida.

Inicialmente amostras foram preparadas para se submeter a condições de estresse. Este preparo seguiu de acordo com a Tabela 8 abaixo.

Tabela 8 - Preparo das soluções em condições de estresse

Solução Estoque AMB	Balão Volumétrico (mL)	Volume Sol. Estoque	Volume Agente estressante	4,0 mg/mL em Metanol Tempo de estresse
Controle	20	5,0	N/A	0 dias
Estresse térmico (60 °C)	20	5,0	N/A	6 horas
Estresse Fotolítico*	20	5,0	N/A	10 dias
Estresse HCl (0,1M)	20	5,0	5,0	5 dias
Estresse NaOH (0,1M)	20	5,0	5,0	10 dias
Estresse H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)	20	5,0	5,0	5 dias

Volumes completados com solução de água e metanol (1:1)

\* Câmara de fotoestabilidade com exposição a luz ultravioleta (espectro entre 320 e 400nm) e potência de 1,2 milhões de lux/hora.

Após o período de estresse, as amostras foram diluídas para concentração de 0,5 mg/mL, sendo que as submetidas aos estresses ácido e básico foram neutralizadas (utilizando-se NaOH ou HCl) ao final do tempo de exposição.

Estas amostras foram então filtradas em membrana de 0,20 µm e injetadas no sistema cromatográfico proposto.

Foram preparadas também amostras de comprimidos, conforme proposto para a metodologia de doseamento e amostras de placebo.

O placebo foi produzido de acordo com os ingredientes indicados na bula do medicamento Volibris®, nas quantidades recomendadas pelo Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE; SHESKEY, 2006).

Os ingredientes utilizados e descritos na bula do medicamento referência são: lactose monoidratada, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato

de magnésio, opadry (álcool polivinílico, talco, dióxido de titânio, macrogol, lecitina, vermelho FD&C/ vermelho Allura).

### 5.3.2. Linearidade

A linearidade foi testada de acordo com a finalidade das metodologias. Desta maneira, para doseamento do ativo nos comprimidos de ambrisentana, o intervalo estudado foi de 70 a 130% da concentração de 0,5 mg/mL e para produtos de degradação foi testado o intervalo de 0,025% a 1% da concentração de 0,5 mg/mL.

As amostras foram preparadas, seguindo-se as diluições apresentadas na Tabela 9, a partir de solução estoque preparada a 1,0 mg/mL. Todas as amostras foram diluídas com a solução diluente metanol:água (1:1).

Tabela 9 - Diluições para preparo das soluções de ambrisentana para avaliação da linearidade – Doseamento

<b>%</b>	<b>Volume solução estoque (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>
70	3,5	10	0,350
80	4,0	10	0,400
90	4,5	10	0,450
100	5,0	10	0,500
110	5,5	10	0,550
120	6,0	10	0,600
130	6,5	10	0,650

Como as impurezas da ambrisentana isoladas não estavam disponíveis, o próprio SQR de ambrisentana foi usado como padrão para a linearidade da metodologia nas concentrações em que se espera ter que quantificar as impurezas e os produtos de degradação.

Tabela 10 - Diluições para preparo das soluções de ambrisentana para avaliação da linearidade – produtos de degradação

<b>%</b>	<b>Volume solução estoque (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
0,025	0,5	20	0,125
0,050	1,0	20	0,250
0,075	1,5	20	0,375
0,100	1,0	10	0,500
0,150	1,5	10	0,750
0,200	2,0	10	1,000
0,250	2,5	10	1,250
0,500	5,0	10	2,500
0,750	7,5	10	3,750
1,000	10,0	10	5,000

As amostras foram preparadas seguindo-se as diluições apresentadas na Tabela 10, a partir de solução estoque preparada a 5,0 µg/mL. Todas as amostras foram diluídas com a solução diluente metanol:água (1:1).

### **5.3.3. Limite de quantificação e de detecção**

Para avaliação dos limites de quantificação e de detecção, foram analisadas amostras da linearidade, diluindo-se as mesmas no solvente metanol:água (1:1) e injetando no sistema cromatográfico. O limite de quantificação foi determinado no momento em que a relação entre sinal analítico do pico de ambrisentana e o ruído da linha de base fosse de até 10 vezes. O limite de detecção foi estabelecido com a determinação do ruído e do sinal analítico, onde o ponto definido como detectável foi de um sinal de 3 vezes a altura do ruído da linha de base.

### **5.3.4. Exatidão**

Da mesma forma que a linearidade, a exatidão foi testada separadamente para o ensaio de doseamento e ensaio de produtos de degradação. A quantidade de placebo utilizado e de SQR seguiu o racional de que as quantidades máximas de excipientes podem interferir na quantificação do ativo e/ou das degradações que podem estar presentes.

O preparo das soluções para o teste da exatidão no ensaio de doseamento seguiu as condições descritas na Tabela 11, onde são apresentadas as diluições e a quantidade de placebo utilizado. A solução estoque de SQR foi preparada a 1,0 mg/mL e a solução estoque de placebo foi preparado em uma quantidade 4 vezes maior do que a quantidade teórica de uma solução amostra para teste de doseamento.

Tabela 11 - Preparo das soluções para avaliação da exatidão – Intervalo de Doseamento

%	Volume sol. estoque SQR (mL)	Volume sol. estoque Placebo (mL)	Volume final (mL)	Concentração (mg/mL)
70	3,5	2,5	10	0,350
100	5,0	2,5	10	0,500
130	6,5	2,5	10	0,650

Para avaliar a exatidão no intervalo da concentração de ocorrência de produtos de degradação foram preparadas diluições das amostras nas concentrações como mostrado na Tabela 12. As diluições foram realizadas a partir de uma solução na concentração de 20 µg/mL. A solução estoque de placebo foi preparada em uma concentração que continha quantidade 4 vezes maior do que a quantidade teórica de uma solução amostra para teste de doseamento.

Tabela 12 - Preparo das soluções para avaliação da exatidão – Intervalo de produtos de degradação

	%	Conc. µg/mL	Volume solução estoque SQR	Volume solução estoque placebo	Volume final
<b>Padrão Exatidão</b>	0,20	1,000	1,0	5,0	20
Exatidão 0,125	0,03	0,125	0,125	5,0	20
Exatidão 0,250	0,05	0,250	0,25	5,0	20
Exatidão 0,500	0,10	0,500	0,5	5,0	20
Exatidão 1,000	0,20	1,000	1,0	5,0	20
Exatidão 10,00	2,00	10,000	5,0	2,5	10



### 5.3.5. Precisão

A precisão foi preparada conforme amostra para doseamento, de acordo com o descrito no item 5.4.5.1, no preparo da *Solução Amostra para doseamento*. Este procedimento foi realizado para se obter n=6.

A precisão intermediária foi executada da mesma maneira que a precisão, também em sextuplicata, diferindo pelo fato de ser executada em três dias distintos. No segundo dia amostras (n=6) foram preparadas pelo mesmo analista, e no terceiro dia, a análise foi feita por um analista diferente, para verificar se o processo de preparo da amostra pode ser analista-dependente.

### 5.3.6. Robustez

A robustez é avaliada para verificar se alguma mudança pequena nas configurações da metodologia analítica podem impactar na performance da mesma, comparando-se os parâmetros de qualidade dos cromatogramas e os resultados obtidos com o método original frente ao método sob condições cromatográficas alteradas.

Para avaliação da robustez, três amostras foram preparadas conforme metodologia de doseamento e outra submetida a condições de estresse térmico a 60°C por 6 horas e analisadas no método sem alterações. As mesmas foram reanalisadas, em sistema com as alterações descritas na Tabela 13 a seguir.

Tabela 13 - Alterações no sistema cromatográfico para avaliação da robustez do método por UPLC para análise de ambrisentana

<b>Parâmetro</b>	<b>Método sem alteração</b>	<b>Alteração 1</b>	<b>Alteração 2</b>
Conc. inicial da F.M. (v:v)	50:50	48:52	52:48
Vazão da fase móvel	0,4 mL/minuto	0,35 mL/minuto	0,45 mL/minuto
Temp. forno de colunas	40 °C	35 °C	45 °C
Diferente lote de coluna	Lote A	Lote B	n/a
pH da fase móvel	3,2	3,0	3,4

## **5.4. Resultados e discussão**

### **5.4.1. Solubilidade**

A ambrisentana mostrou-se praticamente insolúvel em água, visto que 10mg de material não solubilizaram em 20mL deste solvente, nem mesmo molhar o pó foi possível. Já o metanol mostrou-se bastante adequado, uma vez que este dissolveu facilmente o produto.

Como o comprimido de ambrisentana tem excipientes hidrossolúveis, e o fármaco é dificilmente solubilizado pela água, a associação de solventes demonstrou melhores resultados, onde uma adição inicial de 5mL de água promoveu uma completa desintegração de um comprimido, e em seguida uma adição de mais 5 mL de metanol aparentemente foi capaz de solubilizar o ativo (extração confirmada na etapa posterior, da validação analítica).

### **5.4.2. Espectro de ultravioleta – Escolha do comprimento de onda**

Solução de ambrisentana, foi analisada quanto a sua absorção na faixa do ultravioleta afim de determinar o melhor comprimento de onda para a análise. A Figura 11 mostra o espectro de absorção no ultravioleta da molécula da ambrisentana.

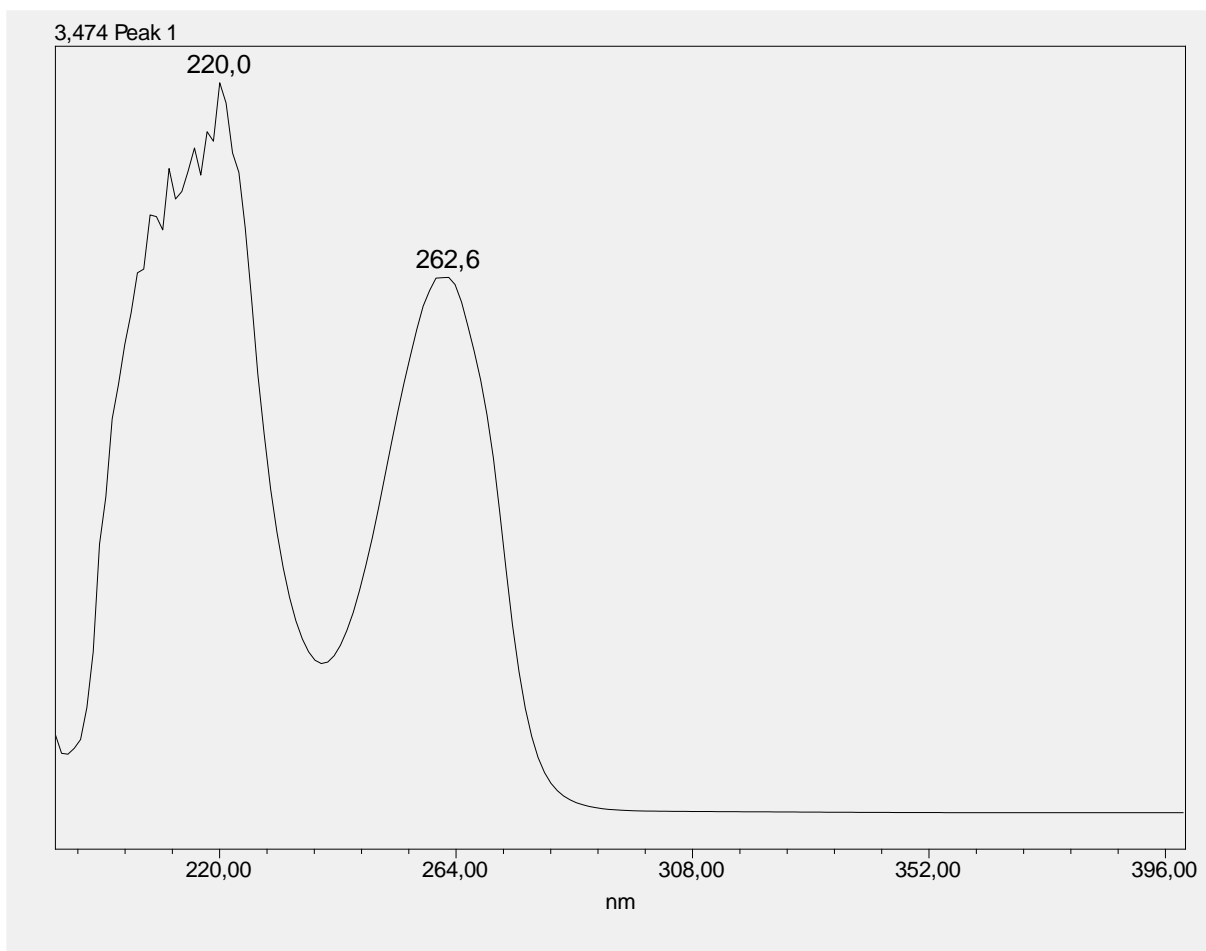


Figura 11 - Espectro de absorção no ultravioleta do pico de Ambrisentana

Desta forma pode-se perceber que existe um pico de absorção em torno de 260 nm e que pode ser uma boa escolha para comprimento de onda para a metodologia analítica.

#### **5.4.3. Testes de volume de injeção, diluentes da amostra e vazão da fase móvel**

Tendo-se em vista que a coluna que seria utilizada teria as dimensões de 50 milímetros de comprimento e de 2,1 milímetros de diâmetro interno, e tendo partículas de fase estacionária com diâmetro na ordem de 1,7 micrômetros, seria necessário escolher um volume de injeção ideal para verificar a carga de amostra adequada para a coluna que seria utilizada.

Sabendo-se que o diluente usado nas amostras interfere diretamente na eluição dos analitos, principalmente em cromatografia com volume reduzido

(cromatografia de ultraperformance), foram testados também dois diferentes solventes, o metanol 100% e mistura de metanol e água (1:1).

Desta forma, a amostra da solução controle na concentração de 0,5 mg/mL foi analisada. O pico cromatográfico (Figura 12) foi avaliado, e a condição que apresentou melhor simetria e maior número de pratos teóricos foi escolhida.

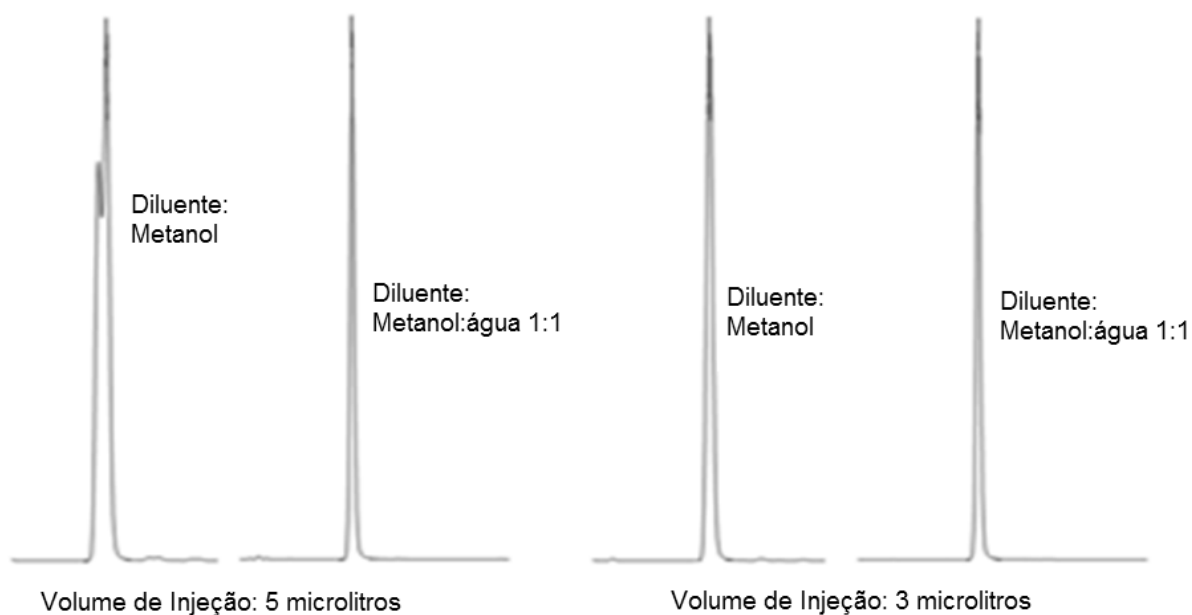


Figura 12 - Cromatogramas das Injeções de 3 e 5 microlitros da amostra e com diluentes Metanol 100% e Metanol : água 1:1

Como se observou, a injeção de amostra usando metanol como diluente ocasiona uma quebra de pico cromatográfico, devido à eluição do analito pelo próprio diluente da amostra. Em cromatografia de fase reversa, os analitos tendem a ter maior afinidade pelos solventes orgânicos, o que propicia uma eluição mais rápida dos mesmos. Assim, com o volume da injeção maior, o próprio diluente arrasta parte da amostra, ocasionando uma “quebra” do pico cromatográfico quando se injetam 5 microlitros de uma amostra diluída em solvente orgânico puro. Fato este não ocorre quando o diluente é uma mistura de solventes orgânico e aquoso (metanol:água, 1:1).

Avaliando-se estes resultados, e tendo-se intenção de se obter um limite de quantificação reduzido, para que se possa quantificar produtos de degradação em quantidades mínimas, optou-se por um volume de injeção de 5 microlitros e o diluente metanol:água, (1:1).

Outro parâmetro cromatográfico importante definido foi a vazão da fase móvel a ser utilizada. De acordo com a teoria estabelecida por Van Deemter (Figura 13), quanto menor for o tamanho da partícula da fase estacionária menor é a perda de eficiência da coluna em vazões maiores (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). Com isto, a maior vazão possível foi adotada, para que se tenha a maior eficiência em um menor tempo de análise. O fluxo que mostrou-se mais adequado foi de 0,4 mL/minuto, onde a pressão da fase móvel ficou situada em torno de 650 Kgf por centímetro quadrado, sendo o limite do equipamento de 1200 Kgf.

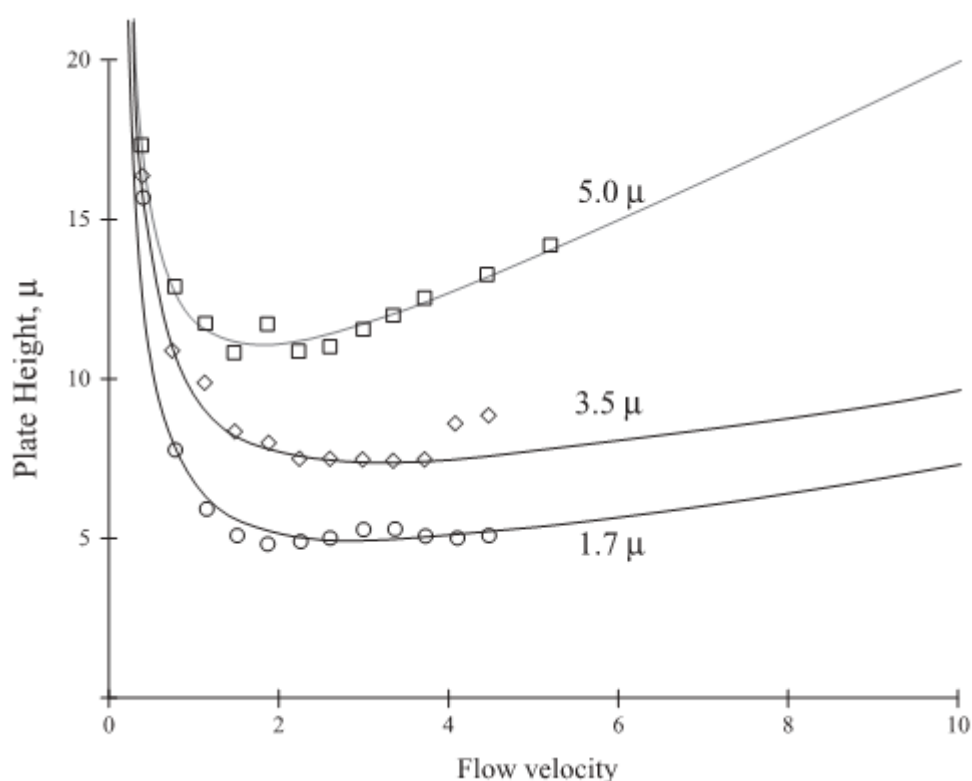


Figura 13 - Função de Van Deemter (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007)

#### 5.4.4. Testes de fase móvel e coluna cromatográfica

As amostras submetidas a condições de estresse foram testadas para que a melhor combinação de fase móvel e coluna cromatográfica pudesse ser estabelecida. Várias amostras submetidas às condições de estresse apresentaram picos secundários, no entanto a amostra submetida à condição de temperatura de 60 °C por 10 dias demonstrou maior instabilidade, evidenciada pela formação de

vários picos secundários. Por isso esta amostra foi utilizada para testar os parâmetros cromatográficos de fase móvel e fase estacionária.

As colunas testadas foram as compostas por fases estacionárias C18, fluorofenil e fenil (Figura 14). Estas apresentam seletividades diferentes que por sua vez auxiliam na separação cromatográfica de compostos com estrutura química semelhantes.

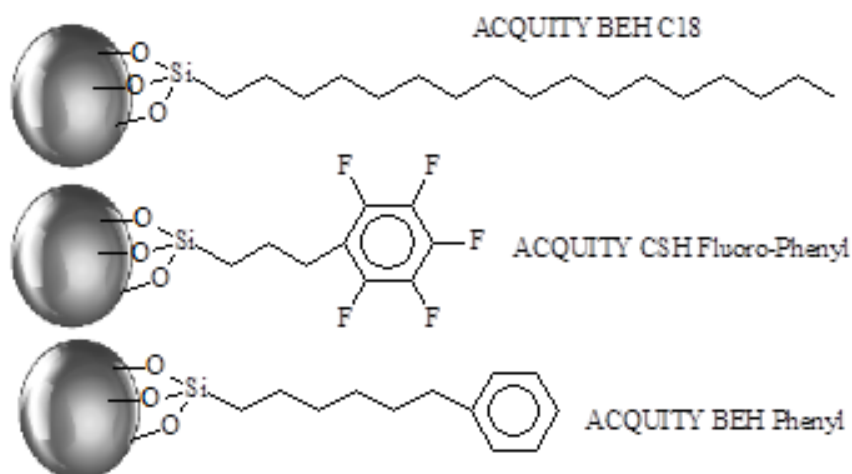


Figura 14 - Diferentes tipos de empacotamentos de colunas cromatográficas

Alguns testes foram realizados com a coluna cromatográfica Fluorofenil, e a melhor condição para esta fase estacionária, foi utilizando-se fase móvel composta por acetonitrila como solvente orgânico e solução de ácido fórmico e trietilamina (água: ácido fórmico: trietilamina – 998:1:1 – v:v:v) eluindo em gradiente, conforme Tabela 14.

Tabela 14 - Gradiente usado com coluna fluorofenil e fase móvel com Acetonitrila e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v)

Tempo (minutos)	% Solução A	% Acetonitrila
0	80	20
0,5	80	20
0,5 → 3,5	80 → 30	20 → 70
3,5	30	70
4,2	30	70
4,2 → 4,5	30 → 80	70 → 20
4,5	80	20
6	80	20

O cromatograma apresentou-se adequado, mostrando boa resolução entre os picos com eluição em um tempo relativamente curto, com pode-se verificar na Figura 15. O número de pratos teóricos para o pico do ativo foi de 83.802.

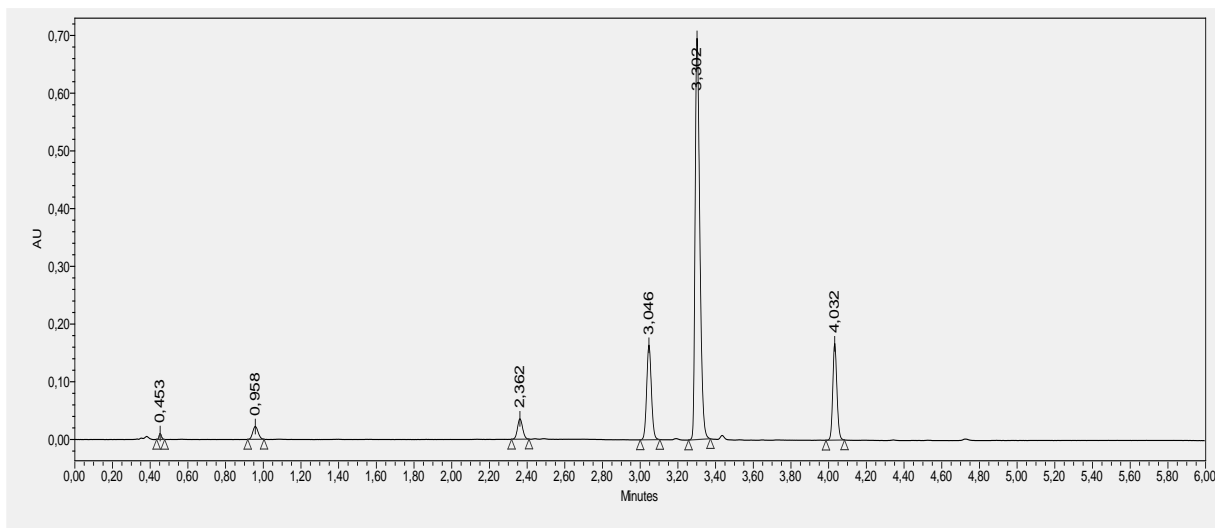


Figura 15 - Cromatograma da amostra em estresse térmico a 60°C por 10 dias com coluna fluorofenil e fase móvel com acetonitrila e solução ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v)

Outra coluna testada foi a empacotada com ligantes fenil, que teve um gradiente ajustado (Tabela 15) para que os picos oriundos da degradação fossem bem separados entre si (Figura 16).

Tabela 15 - Gradiente usado com coluna fenil e fase móvel com Metanol e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v)

Tempo (minutos)	% Solução A	% Metanol
0	40	60
0,5	40	60
0,5 → 4,2	40 → 10	60 → 90
4,2	10	90
5,0	10	90
5,0 → 5,5	10 → 40	90 → 60
5,5	40	60
6	40	60

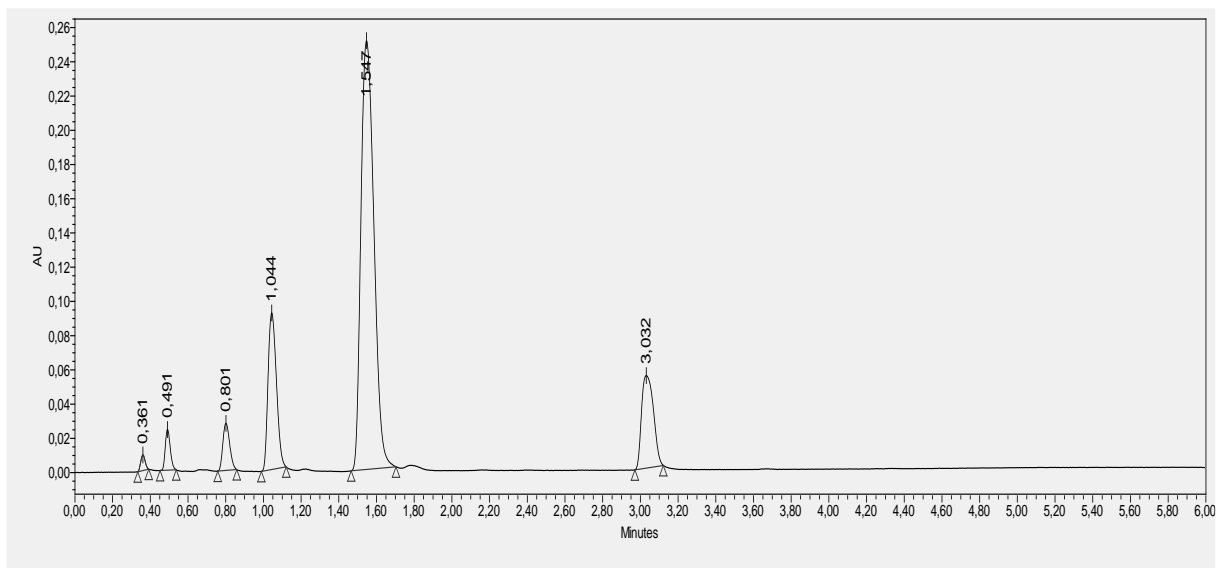


Figura 16 - Cromatograma da amostra em estresse térmico a 60°C por 10 dias com coluna fenil e fase móvel com Metanol e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v)

No cromatograma da Figura 16 é possível verificar a eluição de todos os picos com adequada resolução, porém com menor eficiência (pratos teóricos = 2421 para o pico da ambrisentana), quando comparada a coluna fluorofenil.

Uma terceira coluna, mais usual em cromatografia em fase reversa, a octadecilsilano (C18) também foi testada, e esta apresentou resultados muito reprodutíveis, com boa separação. Além disso, é uma coluna de fácil aquisição, o que fornece também uma maior reprodutibilidade de lote a lote.

Esta coluna foi inicialmente testada com fase móvel composta por solução A - água, ácido fórmico e trietilamina (998:1:1) e acetonitrila, eluindo em gradiente, conforme demonstrado na Tabela 16.

Tabela 16 - Gradiente usado com coluna C18 e fase móvel com acetonitrila e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v)

Tempo (minutos)	% Solução A	% Acetonitrila
0	50	50
0,5	50	50
0,5 → 4,2	50 → 30	50 → 70
4,2	30	70
5,0	30	70
5,0 → 5,5	30 → 50	70 → 50
5,5	50	50
6	50	50



O cromatograma demonstrou-se adequado, aparentando boas separações dos picos (Figura 17), porém alguns eluíram próximo ao volume morto do sistema, desta maneira, novo teste foi feito, usando-se metanol ao invés de acetonitrila na fase móvel. O objetivo deste teste foi verificar se uma melhor seletividade ocorreria com este novo eluente orgânico. Como pode-se ver na Tabela 17 o gradiente iniciou com 50% de solvente orgânico.

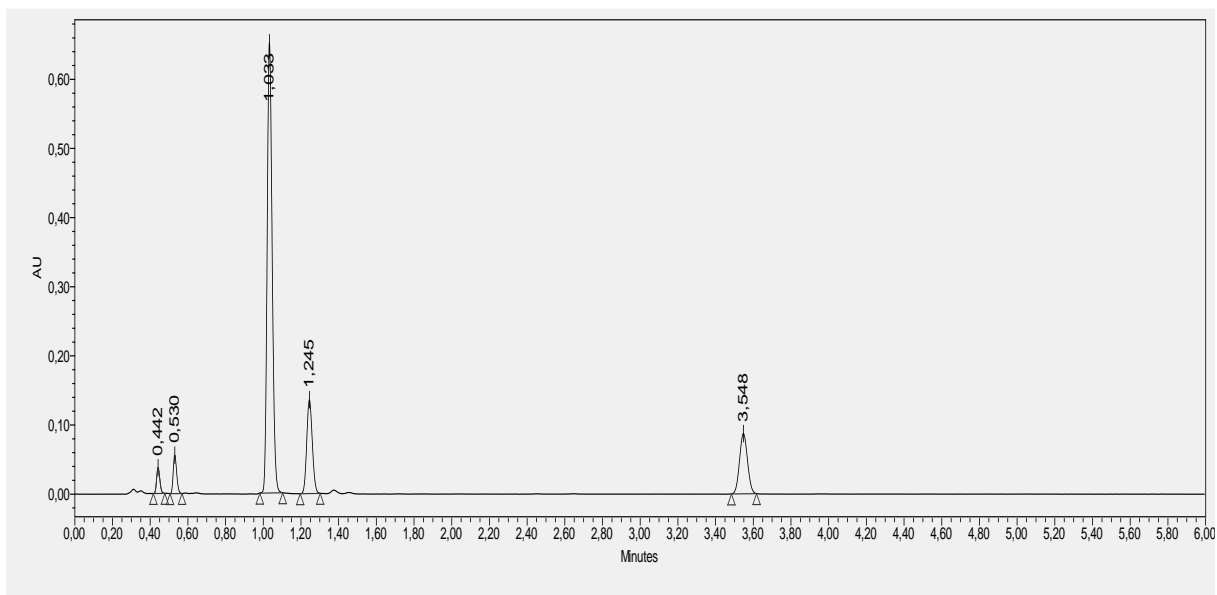


Figura 17 - Cromatograma da amostra em estresse térmico a 60°C por 10 dias com coluna C18 e fase móvel com acetonitrila e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v)

Tabela 17 - Gradiente usado com coluna C18 e fase móvel com Metanol e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v:v)

Tempo (minutos)	% Solução A	% Metanol
0	50	50
1,5	50	50
1,5 → 4,0	50 → 10	50 → 90
4	10	90
5	10	90
5 → 5,5	10 → 50	90 → 50
5,5	50	50
6	50	50

A Figura 18 demonstra como a separação dos picos de interesse aconteceu, apresentando boa resolução entre eles e um bom número de pratos teóricos (81.871 pratos teóricos para o pico da ambrisentana), conforme mostrado Tabela 18.

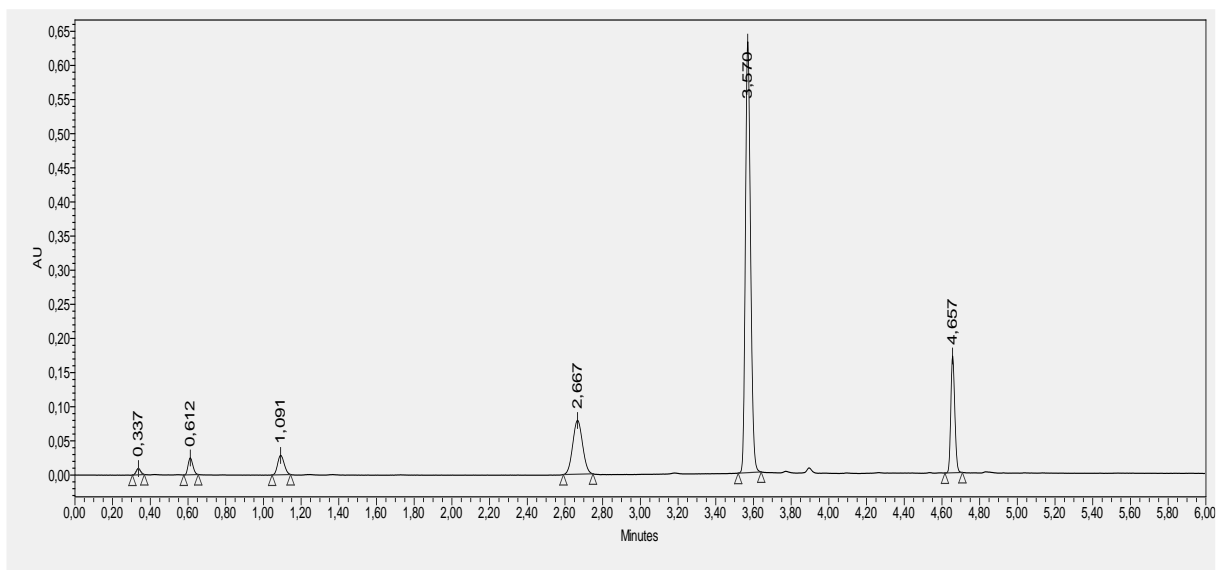


Figura 18 - Cromatograma da amostra em estresse térmico a 60°C por 10 dias com coluna C18 e fase móvel com metanol e Solução A - ácido fórmico: trietilamina:água (1:1:998 v:v)

A Tabela 18 demonstra os dados de adequabilidade do sistema cromatográfico, via dados observados nos cromatogramas do desenvolvimento da metodologia. Pode-se observar o tempo de retenção e as resoluções do pico em questão com o imediatamente anterior, pratos teóricos, assimetria e relação sinal/ruído. Estes dados de *system suitability*, foram calculados com auxílio do *software* Empower da Waters de acordo com a Farmacopeia Americana (USP 38).

Tabela 18 – Informações dos picos cromatográficos dos cromatogramas nas diferentes condições testadas

Condição testada	Pico	Tempo de retenção	Resolução	Pratos teóricos	Assimetria	Sinal/Ruído
Coluna Fluorofenil	1	0,453		6180	1,22	98
	2	0,958	13,05	5145	1,1	211
	3	2,362	26,77	35663	1,07	336
	4	3,046	14,02	70795	1,08	1559
	<b>5</b>	<b>3,302</b>	<b>5,49</b>	<b>83802</b>	<b>1,38</b>	<b>6616</b>
	6	4,032	16,72	162077	1,13	1594
Coluna fenil	1	0,361		1027	1,07	99
	2	0,491	2,78	1653	1,21	259
	3	0,801	5,25	2278	1,19	300
	4	1,044	3,21	2586	1,23	1000
	<b>5</b>	<b>1,547</b>	<b>4,84</b>	<b>2421</b>	<b>1,28</b>	<b>2739</b>
	6	3,032	12,57	11733	1,29	590
Coluna C18 e Acetonitrila na Fase Móvel	1	0,442		3086	1,16	337
	2	0,530	2,65	3847	1,22	503
	3	<b>1,033</b>	<b>11,96</b>	<b>7266</b>	<b>1,17</b>	<b>5892</b>
	4	1,245	4,05	8303	1,10	1226
	5	3,548	34,18	32798	1,05	787
Coluna C18 e Metanol na Fase Móvel	1	0,337		937	1,05	92
	2	0,612	5,92	2605	1,16	248
	3	1,091	8,4	4470	1,13	285
	4	2,667	19,23	12143	1,04	794
	<b>5</b>	<b>3,57</b>	<b>12,14</b>	<b>81871</b>	<b>1,18</b>	<b>6368</b>
	6	4,657	24,09	229092	1,15	1725

Pico da ambrisentana destacado em negrito

#### 5.4.5. Metodologia Analítica desenvolvida

Com o desenvolvimento da metodologia finalizado, foram encontradas as melhores condições de preparo da amostra e de sistema cromatográfico, ficando definido os parâmetros a seguir para a execução da validação analítica.

#### 5.4.5.1. Soluções

Solução diluente: mistura de metanol e água, mas proporções de 1:1.

*Solução A:* mistura de ácido fórmico, trietilamina e água, nas proporções de 1:1:998.

*Solução Padrão:* Foram dissolvidos 10mg de padrão SQR de Ambrisentana para balão volumétrico de 20mL e diluídos com solução diluente. O ultrassom foi utilizado para completa solubilização do material (aproximadamente 15 minutos). A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro de 0,20 micrometros de diâmetro de poro.

*Solução Amostra para doseamento:* Foram triturados a pó fino os comprimidos de ambrisentana, e pesado massa equivalente a 5mg de ambrisentana para balão volumétrico de 10mL. Adicionou-se diluente e levou-se a ultrassom por 20 minutos. Completou-se o volume do balão volumétrico, homogeneizou-se a solução e filtrou-se com filtro de 0,20 micrometros de diâmetro de poro.

*Solução amostra para uniformidade de conteúdo:* Foi utilizado para o ensaio um comprimido em um balão volumétrico de 10mL onde adicionou-se 5mL de água. Agitou-se o balão até completa desintegração do comprimido, após isso, foi adicionado metanol completando o volume do balão volumétrico. O uso do ultrassom sem aquecimento do banho foi realizado por 20 minutos. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro de 0,20 micrometros de diâmetro de poro.

#### 5.4.5.2. Sistema Cromatográfico

*Vazão da fase móvel:* 0,4 mL por minuto

*Comprimento de onda:* 260 nanômetros (Aquisição em PDA)

*Coluna Cromatográfica:* Waters Acquity BEH C18 - 2,1 x 50mm 1,7µm

*Temperatura da coluna:* 40 °C.

Sistema de eluição gradiente (Tabela 19).

Tabela 19 – Programação de eluição da fase móvel do sistema cromatográfico gradiente

Tempo (minutos)	% Solução A	% Metanol
0	50	50
1,5	50	50
1,5 → 4,0	50 → 10	50 → 90
4	10	90
5	10	90
5 → 5,5	10 → 50	90 → 50
5,5	50	50
6	50	50

#### 5.4.5.3. Cálculos Analíticos

Para cálculo do teor das amostras analisadas, usou-se a equação abaixo:

$$Teor (\%) = \frac{Aa \times Cp \times Tp}{Ap \times Ca}$$

Onde,  $Aa$  é a área do pico da ambrisentana no cromatograma obtido com a injeção da solução amostra,  $Cp$  é a concentração em mg/mL de ambrisentana na solução padrão,  $Tp$  é o teor do padrão de ambrisentana (dado em %),  $Ap$  é a área do pico da ambrisentana no cromatograma obtido com a injeção da solução padrão e  $Ca$  é a concentração teórica de ambrisentana presente na solução amostra (em mg/mL).

Para cálculo da porcentagem dos picos secundários (produtos de degradação), usou-se a equação abaixo:

$$Teor impureza individual (\%) = \frac{Aimp \times 100}{Atotal}$$

Onde,  $Aimp$  é a área da impureza que foi quantificada e  $Atotal$  é a área total do cromatograma da solução amostra, desconsiderando picos referente a placebo e ao branco.

### 5.4.6. Especificidade

A avaliação da especificidade da metodologia analítica realizada nos ensaios demonstrou que as separações dos picos de interesse aconteceram de maneira eficiente. Abaixo são apresentados os cromatogramas das amostras submetidas à condições de estresse (Figura 19 a Figura 26).

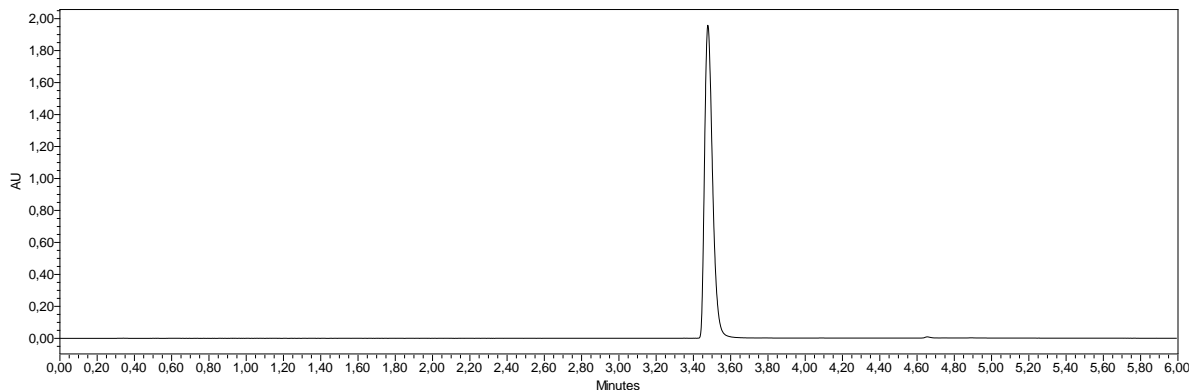


Figura 19 - Cromatograma da solução padrão de ambrisentana, tempo zero

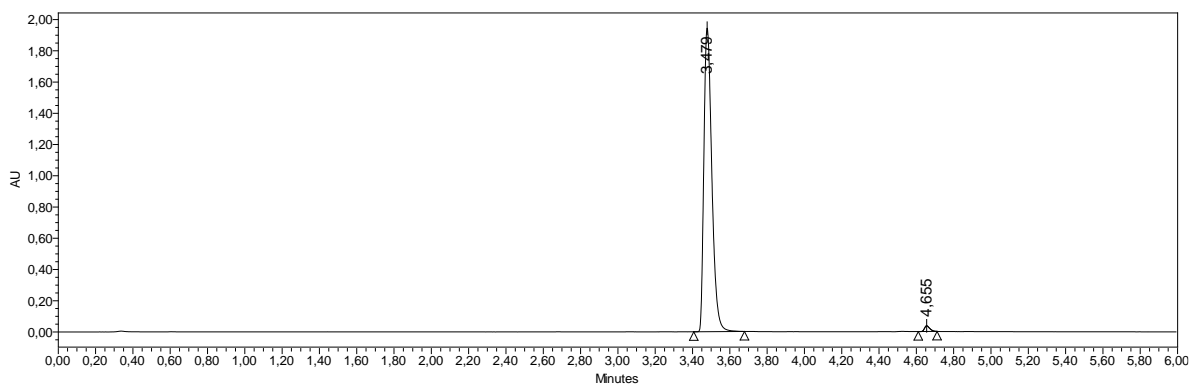


Figura 20 - Cromatograma da solução amostra, após 3 dias de armazenamento no auto injetor do equipamento

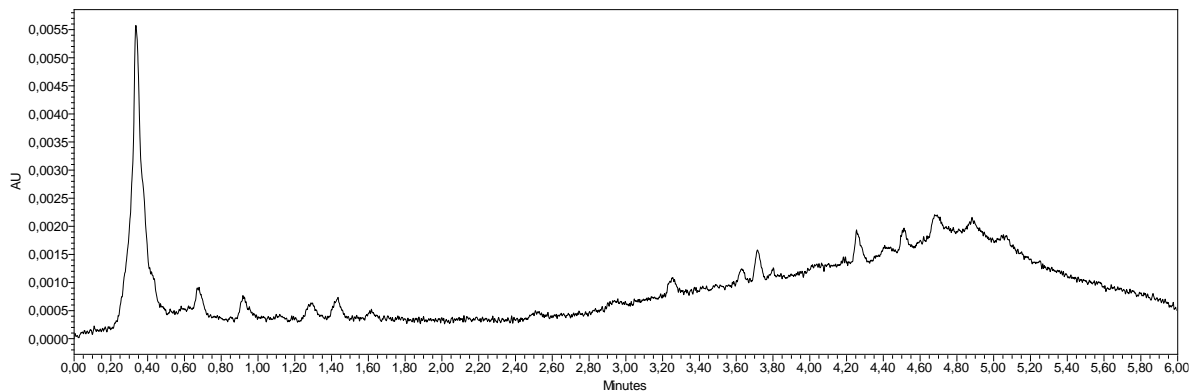


Figura 21 – Cromatograma da solução placebo dos comprimidos de ambrisentana

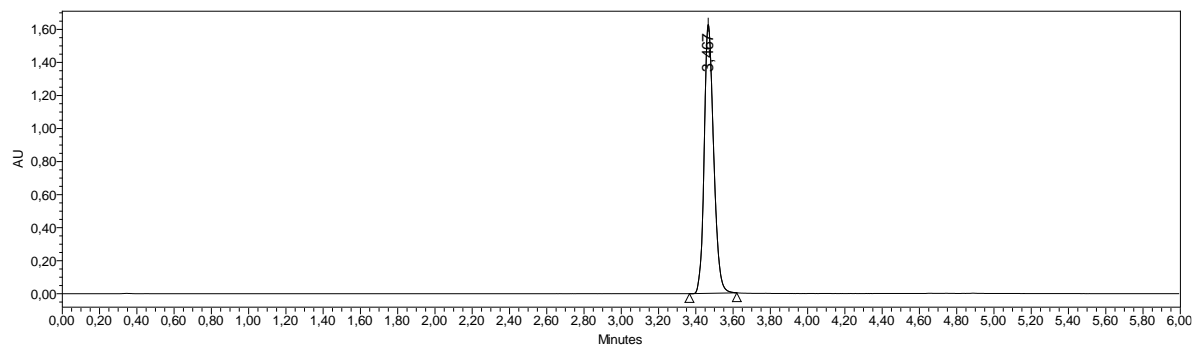


Figura 22 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse em meio básico (NaOH 0,1M) por 10 dias

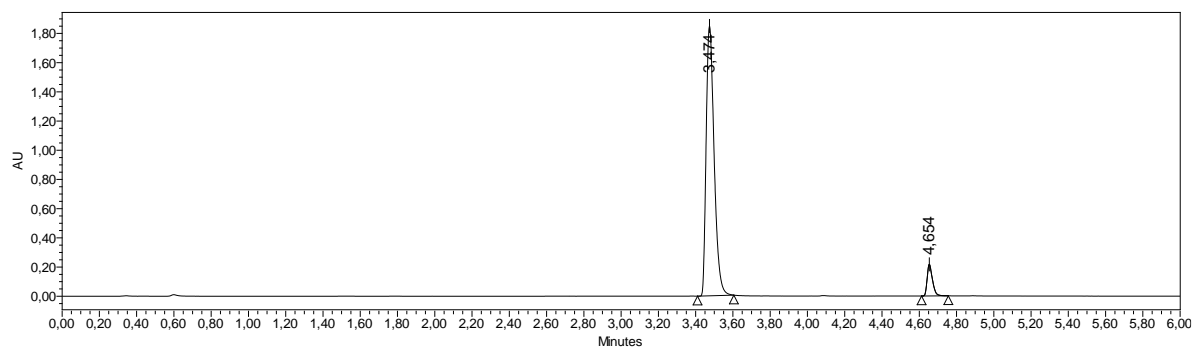


Figura 23 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse em meio ácido (HCl 0,1M) por 5 dias.

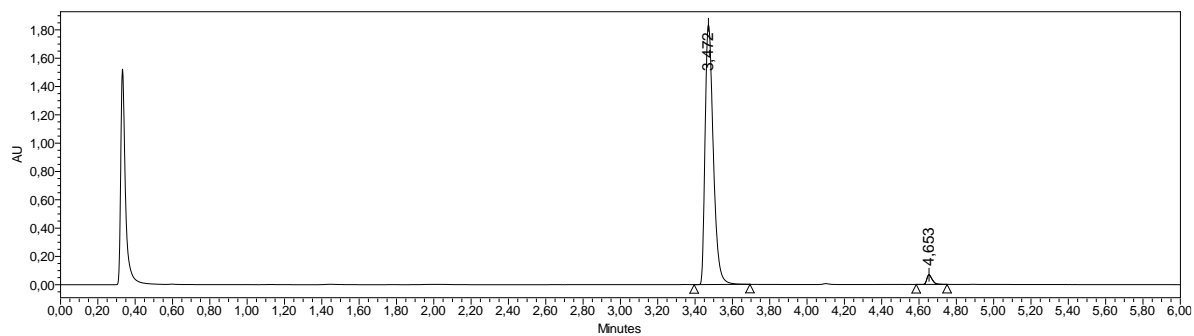


Figura 24 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse em meio oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) por 5 dias

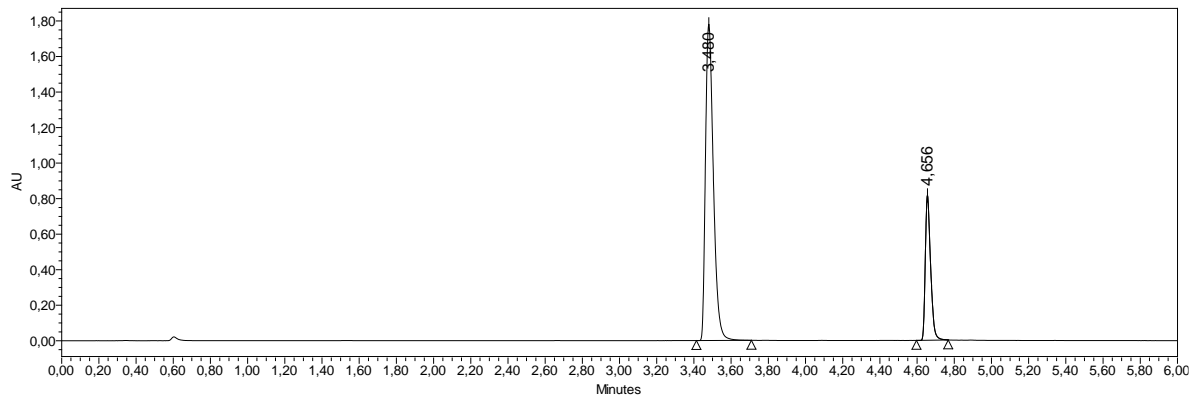


Figura 25 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse térmico (60°C) por 6 horas.

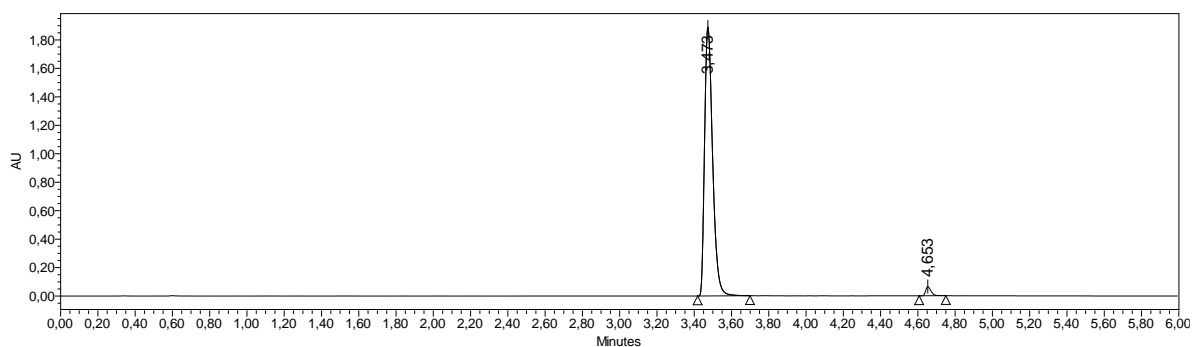


Figura 26 - Cromatograma da amostra de ambrisentana em estresse fotolítico (Câmara com potência de 1,2 milhões de lux/hora) por 3 dias.

Como se percebe nos cromatogramas apresentados, as separações foram adequadas, e a presença do placebo não teve impacto na avaliação do ativo e dos possíveis produtos de degradação encontrados na amostra, visto que o placebo não apresenta picos com intensidade significativa que possam interferir na quantificação dos picos de interesse.

A avaliação das amostras degradadas objetivou garantir uma degradação suficiente da substância ativa, que propiciasse a avaliação da separação. De acordo com literatura especializada em estudos de estresse, uma degradação leve na molécula indica quais poderão ser os principais produtos de degradação primários. Caso a molécula seja degradada extensivamente é possível a ocorrência de novas derivações dos produtos de degradação, conhecidas como degradações secundárias (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005). O objetivo deste estudo foi promover uma degradação leve na molécula, com intuito de identificar e separar uma degradação primária da substância ativa ambrisentana. Os resultados do estudo de estresse estão apresentados na Tabela 20 a seguir.



Tabela 20 - Teor de ambrisentana nas amostras submetidas às diferentes condições de estresse

	%	% (decaimento)	% de degradação (área normalizada)
<b>Amostra 0 dias</b>	100,00%	0,0%	0,0%
<b>Amostra 3 dias</b>	99,06%	0,9%	1,2%
<b>Amostra HCl 5 dias</b>	94,28%	5,7%	7,2%
<b>Amostra NaOH 10 dias</b>	98,65%	1,4%	0,0%
<b>Amostra UV 10 dias</b>	97,24%	2,8%	2,2%
<b>Amostra Peróxido 3 dias</b>	95,99%	4,0%	2,4%
<b>Amostra 60°C 6 horas</b>	90,16%	9,8%	23,6%

A Tabela 20, mostra o teor do ativo das amostras após o período de estresse frente ao padrão, e a porcentagem decaída do ativo. Também mostra a porcentagem encontrada da degradação, calculando-se de acordo com área normalizada (relação de área do ativo e área da degradação).

Como pode-se verificar, a amostra em estresse básico não apresentou aparecimento de pico que possa indicar degradação, enquanto em todas as outras condições, pode-se ver que picos secundários surgiram, sugerindo que a degradação ocorreu, inclusive nas amostras sem condição estressante, apenas injetada 3 dias após o seu preparo, o que sugere que o próprio diluente utilizado para preparo da amostra pode causar a degradação da mesma, provavelmente por via hidrolítica, devido à presença de água no mesmo.

Outros estudos realizados com o produto ambrisentana, mostraram que a ambrisentana degradou em condições de estresse ácido (0,5N HCl, 60°C) em 3 horas, com surgimento de 5 picos secundários e em temperatura (com ambrisentana em estado sólido) não se evidenciou degradação (RAMISETTI; KUNTAMUKKALA, 2014). Pelo exposto pelos autores e pelos resultados dos ensaios realizados, pode-se notar que a ambrisentana sofre degradação em estresse a térmico 60°C apenas se estiver em solução com características neutras ou ácidas, pois assim, a temperatura pode agir como catalizador da reação de hidrólise da molécula. Caso o material sólido esteja sob temperatura de 60 °C, não se evidencia degradação após 10 dias.(RAMISETTI; KUNTAMUKKALA, 2014).

A amostra injetada logo após ser preparada não evidenciou presença de degradação, desta forma pode-se usar este diluente para preparo das amostras,

porém cuidados de não armazenar ela para posterior injeção em cromatógrafo devem ser tomados, visto que na amostra injetada após 3 dias do seu preparo foi possível identificar um pico de degradação.

### 5.4.7. Linearidade

Após a injeção das amostras, as áreas foram registradas e tabeladas, e a relação entre a concentração e a área obtida foi avaliada com auxílio do software minitab®, os resultados da regressão estão apresentados a seguir (Figura 27).

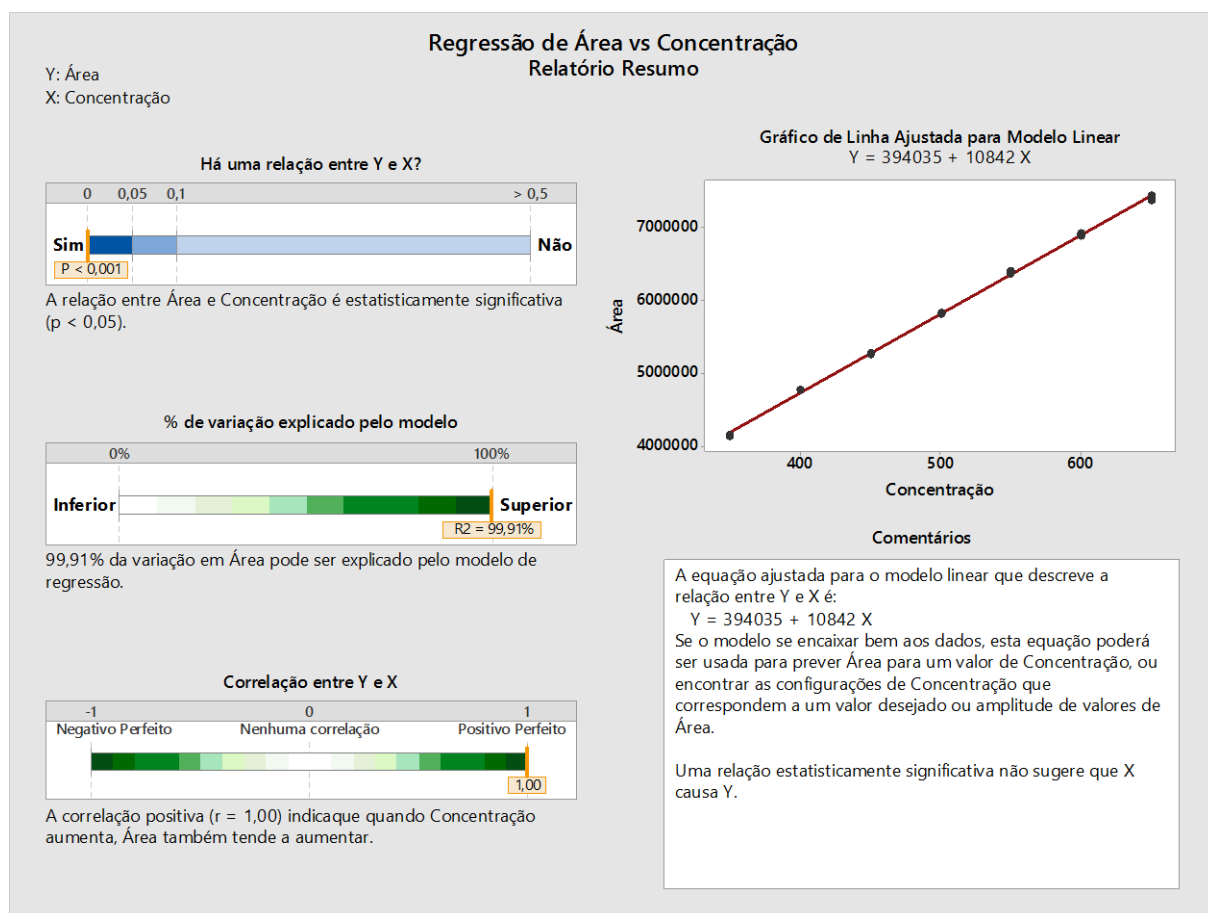


Figura 27 - Regressão para linearidade do método por UPLC no intervalo de doseamento

Os dados da Figura 27 indicam que existe uma forte relação entre a concentração do analito e a resposta na área do pico cromatográfico. Pode-se perceber que o coeficiente de correlação é de pelo menos 0,999, ou seja 99,91% da variação da área pode ser explicada pelo modelo apresentado.

A avaliação dos resíduos da linearidade também foi feita com uso do software Minitab®, e os resultados estão apresentados na Figura 28.

Os resíduos apresentaram distribuição uniforme em torno da linha de resíduo zero, não apresentando tendências de distribuição.

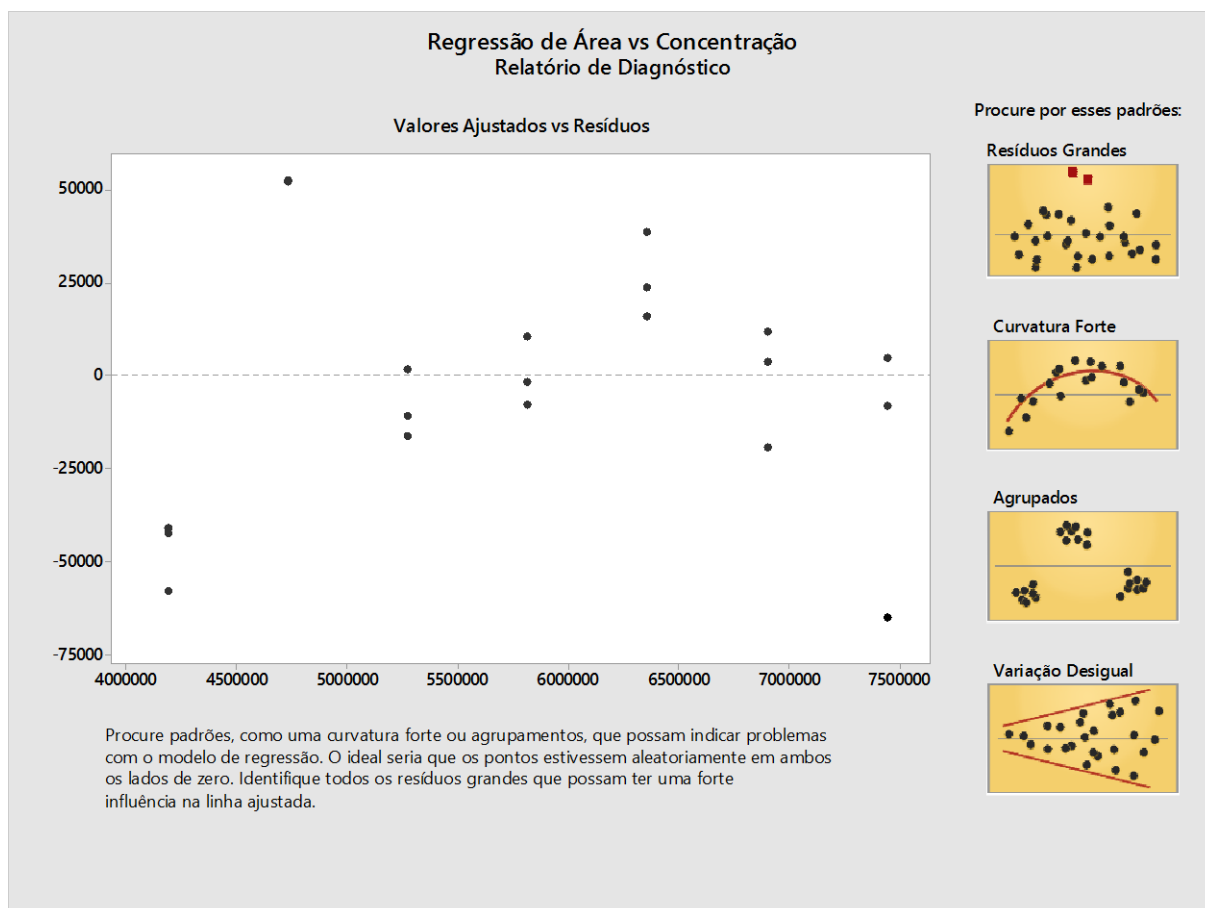


Figura 28 - Gráfico de Resíduos da linearidade do método por UPLC no intervalo de doseamento

De acordo com o software Minitab®, os resíduos padronizados são úteis para se detectar outliers. O resíduo padronizado é igual ao valor do resíduo, dividido por uma estimativa de seu desvio padrão. Resíduos padronizados maiores do que 2 e menores do que -2 são globalmente considerados grandes.

A Tabela 21, apresenta os resultados dos resíduos e os resíduos padrão.

Pode-se observar que os resíduos não apresentam variações excessivamente grandes em torno da linha central (resíduo zero) que possam ser estatisticamente diferentes dos demais, visto que a variação nos resíduos padronizados não ultrapassou  $\pm 2,0$ .

Tabela 21 - Resíduos linearidade – intervalo entre 350 e 650 µg/mL.

<i>Observação</i>	<i>Concentração (µg/mL)</i>	<i>Área</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	350	4146405	4188734	-42329	-1,25
2	350	4130654	4188734	-58080	-1,715
3	350	4147795	4188734	-40939	-1,209
4	400	4783302	4730834	52468	1,5496
5	400	4783590	4730834	52756	1,5581
6	400	4783501	4730834	52667	1,5554
7	450	5274836	5272933	1903	0,0562
8	450	5262278	5272933	-10655	-0,315
9	450	5256602	5272933	-16331	-0,482
10	500	5825755	5815033	10722	0,3166
11	500	5807436	5815033	-7597	-0,224
12	500	5813407	5815033	-1626	-0,048
13	550	6373234	6357133	16101	0,4755
14	550	6396024	6357133	38891	1,1486
15	550	6381080	6357133	23947	0,7072
16	600	6911334	6899233	12101	0,3574
17	600	6879841	6899233	-19392	-0,573
18	600	6903109	6899233	3876	0,1145
19	650	7376155	7441333	-65178	-1,925
20	650	7446151	7441333	4818	0,1423
21	650	7433209	7441333	-8124	-0,24

A possibilidade do método não se apresentar linear para grandes intervalos de concentração também foi testado, onde a faixa de concentração para determinação de produtos de degradação foi avaliada. A Figura 29 demonstra a interpretação estatística dos dados para este intervalo de 0,125 a 5µg/mL.

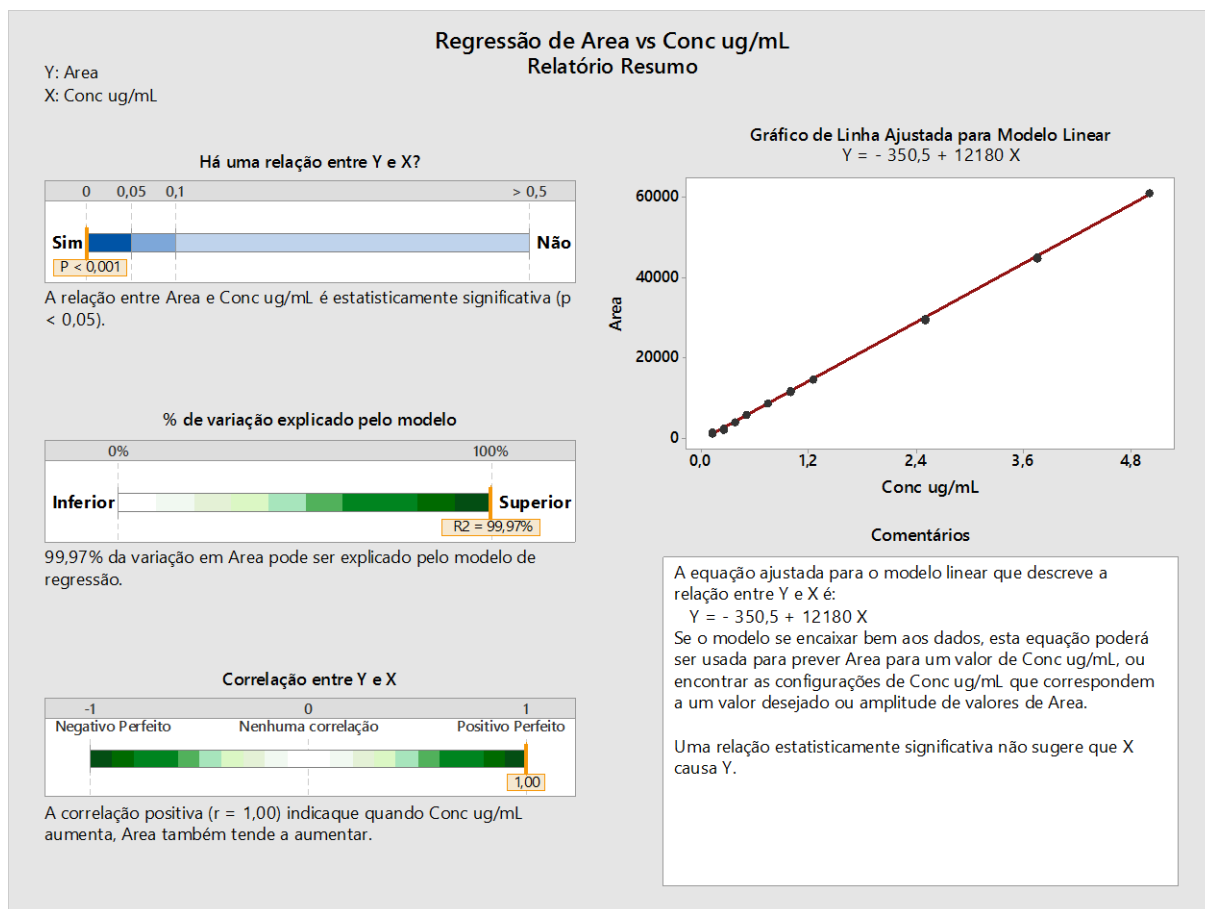


Figura 29 - Regressão para linearidade do método por UPLC no intervalo de produtos de degradação

Como se percebe, a correlação entre a concentração da amostra e a resposta na área do cromatograma para o intervalo especificado para a análises de produtos de degradação se mostrou muito boa, com  $R^2$  de 0,999, o que demonstra uma grande correlação dos dados.

A Figura 30 e a Tabela 22 mostram os resultados do tratamento estatístico para a análise de resíduos deste intervalo linear. Pode-se perceber que a distribuição dos resíduos está adequada, mostrando-se uniformemente distribuídos.

Um valor em especial apresenta-se maior que +2,0 que pode indicar ser um outlier, mas também sinaliza o quanto de variação dos dados observados está sendo considerado por este modelo linear estabelecido. Como se trata de uma análise complexa pela técnica utilizada, onde o intervalo está estabelecido próximo aos limites de detecção e de quantificação do equipamento, justificam-se desvios maiores, e uma maior variação dos resíduos também pode ser aceita.

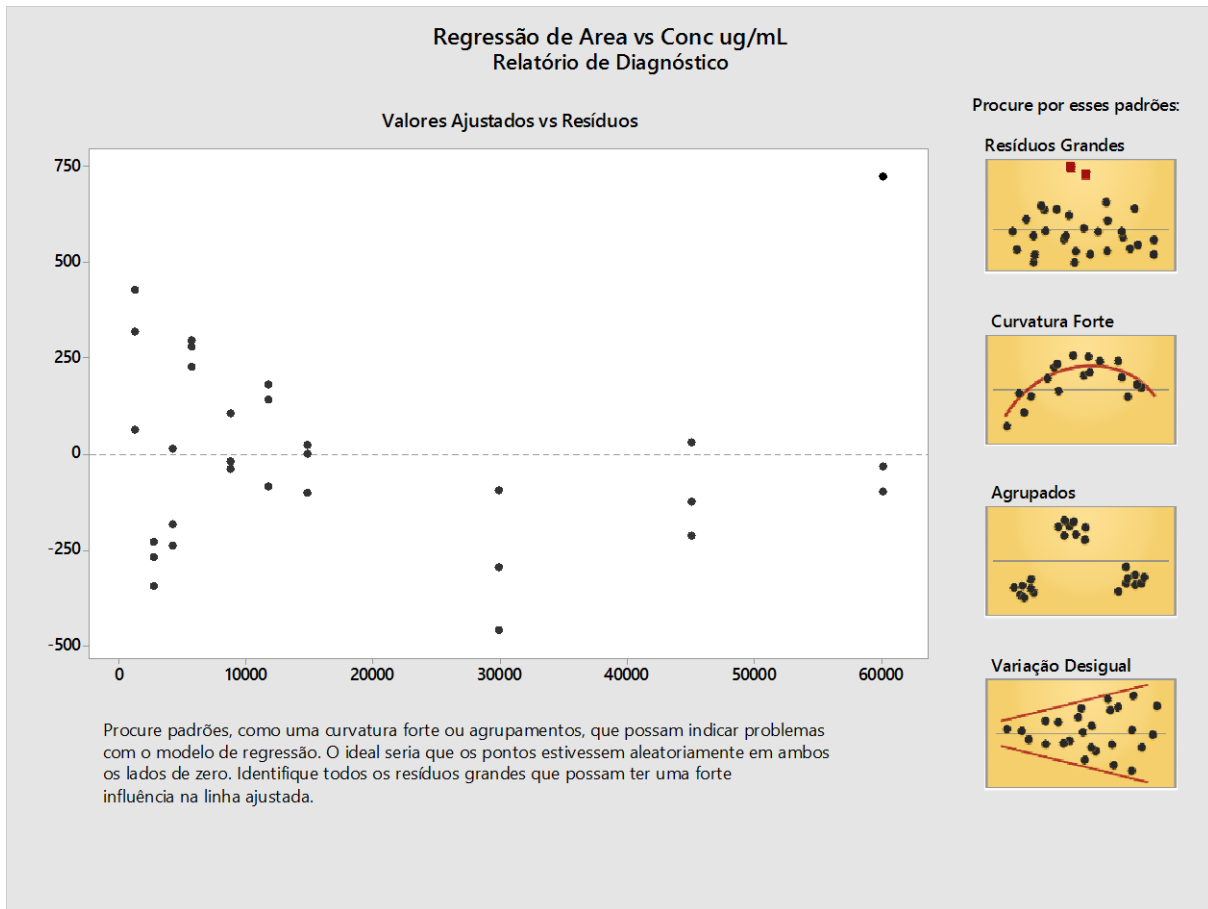


Figura 30 - Gráfico de Resíduos da linearidade do método por UPLC no intervalo de produtos de degradação

Tabela 22 - Resíduos linearidade do método por UPLC no intervalo para avaliação de Produtos de degradação

Observação	Conc ug/mL	Area	Y previsto	Resíduos	Resíduos padrão
1	0,125	1665	1237	428	1,6975
2	0,125	1557	1237	320	1,269
3	0,125	1300	1237	63	0,2494
4	0,25	2517	2748	-231	-0,917
5	0,25	2478	2748	-270	-1,072
6	0,25	2403	2748	-345	-1,369
7	0,375	4020	4259	-239	-0,949
8	0,375	4272	4259	13	0,051
9	0,375	4074	4259	-185	-0,735
10	0,5	5997	5770	227	0,9
11	0,5	6068	5770	298	1,1817
12	0,5	6051	5770	281	1,1142
13	0,75	8772	8792	-20	-0,08
14	0,75	8754	8792	-38	-0,151
15	0,75	8898	8792	106	0,4199
16	1	11728	11814	-86	-0,342
17	1	11957	11814	143	0,5666
18	1	11997	11814	183	0,7253
19	1,25	14859	14836	23	0,0905
20	1,25	14736	14836	-100	-0,398
21	1,25	14836	14836	0	0
22	2,5	29650	29946	-296	-1,175
23	2,5	29484	29946	-462	-1,834
24	2,5	29850	29946	-96	-0,382
25	3,75	44842	45056	-214	-0,85
26	3,75	44932	45056	-124	-0,493
27	3,75	45087	45056	31	0,1219
28	5	60893	60166	727	2,883
29	5	60134	60166	-32	-0,128
30	5	60067	60166	-99	-0,394

#### 5.4.8. Limite de Quantificação e Limite de Detecção

Os limites de detecção e de quantificação devem estar situados em concentrações adequadas para que a quantificação e detecção do analito possam ser feitos com segurança.

Desta maneira, as amostras analisadas em diluições sucessivas foram avaliadas, observando-se a relação sinal x ruído.

As figuras a seguir (Figura 31 a Figura 34) apresentam os cromatogramas e as relações entre o sinal analítico e o ruído instrumental.

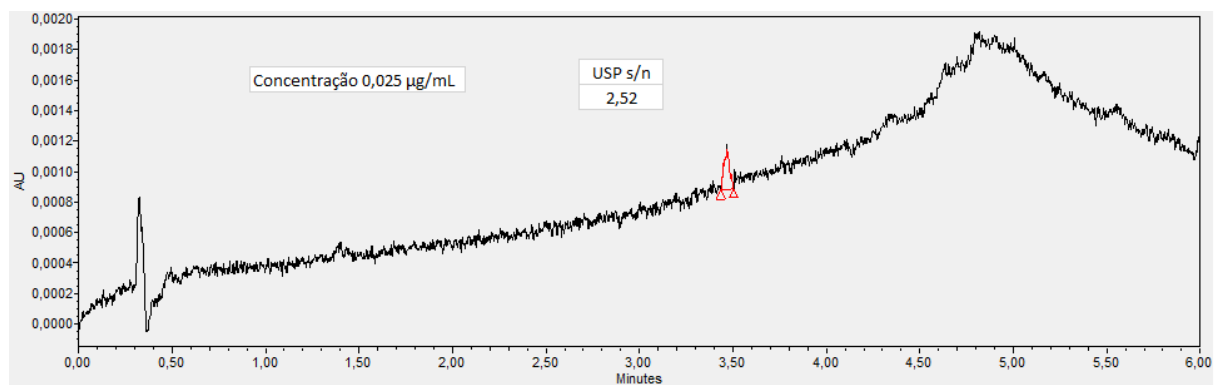


Figura 31 - Cromatograma LQ/LD 0,025 µg/mL

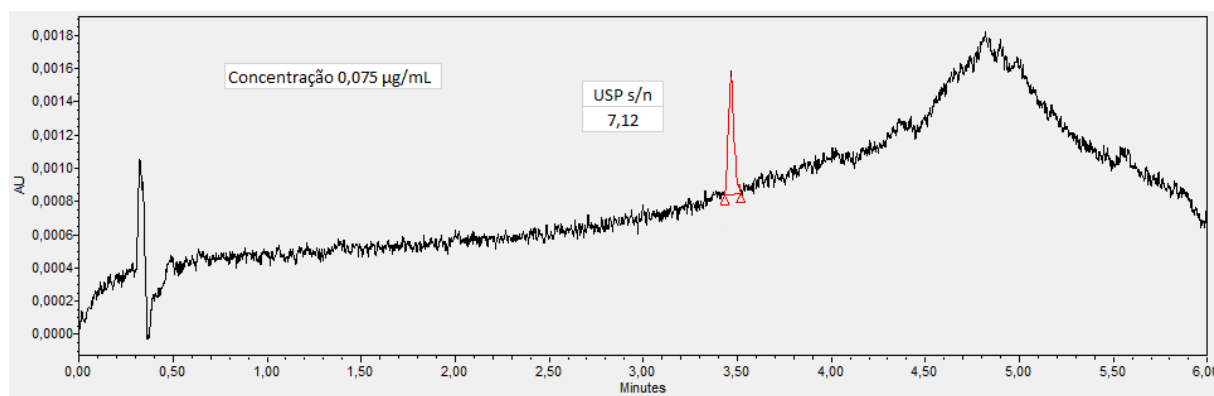


Figura 32 - Cromatograma LQ/LD 0,075 µg/mL

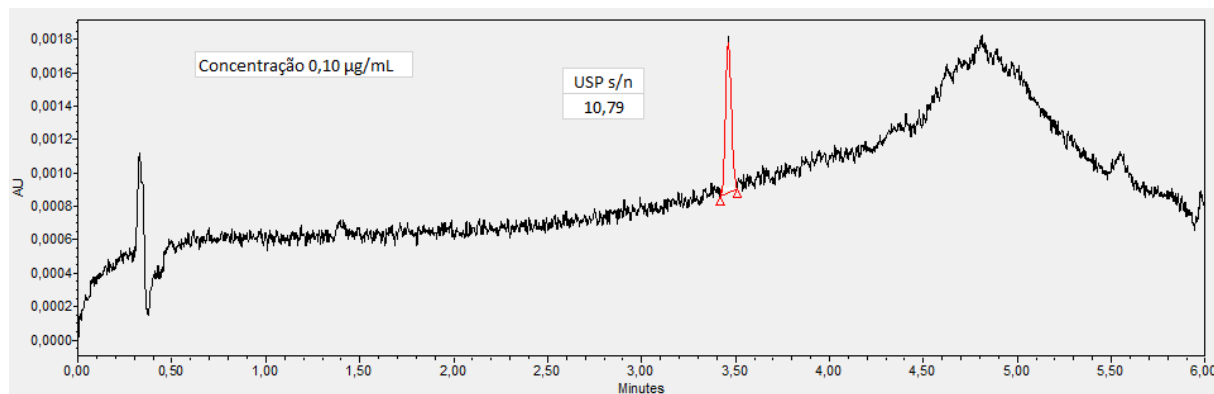


Figura 33 - Cromatograma LQ/LD 0,10 µg/mL



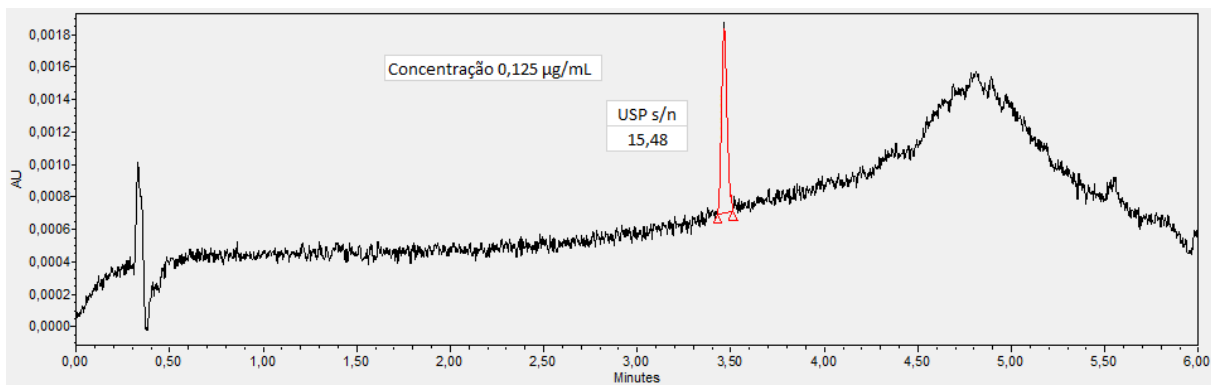


Figura 34 - Cromatograma LQ/LD 0,125 µg/mL

Como se observa, o limite de detecção foi de 0,075µg/mL, que apresentou uma relação de sinal/ruído de 7,12 (Figura 32). Uma concentração menor que essa também foi testada (0,025 µg/mL), porém a relação de sinal/ruído mostrou resultado menor que 3, que é o limite para a detecção (Figura 31). O limite de quantificação ficou em 0,10 µg/mL, apresentando relação sinal/ruído de 10,79, estando acima do ponto de corte (relação sinal/ruído de 10), como se observa na Figura 33. O intervalo adotado para quantificação dos produtos de degradação e proposto nesta validação foi de 0,125 a 0,5 µg/mL, e como se pode ver na Figura 34, a relação sinal/ruído foi de 15,48, estando adequada para a configuração do sistema proposta.

#### 5.4.9. Exatidão

A exatidão foi realizada pelo método do placebo contaminado e a *Tabela 23* apresenta os resultados do intervalo estabelecido para o teste de doseamento.

Como se percebe, a recuperação das amostras foi satisfatória, obtendo-se valores próximos ao real, comprovando que o método apresenta recuperação adequada ao propósito sugerido.

Tabela 23 - Resultados do teste de recuperação de ambrisentana na faixa de doseamento

	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área média	Recuperação (%)
<b>Padrão Exatidão</b>	500	5821138	
Exatidão nível 1	350	4250879	104,32
Exatidão nível 2	500	5967889	102,52
Exatidão nível 3	650	7566075	99,98

A exatidão para o intervalo de concentração proposta para análise de produtos de degradação foi testado entre na faixa de 0,125 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados aprestados na Tabela 24 mostram a adequada recuperação do padrão adicionado às amostras.

Tabela 24 - Resultados do teste de recuperação de ambrisentana na faixa de Produtos de Degradação

	concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área média	Recuperação (%)
<b>Padrão Exatidão</b>	1	12086	
Exatidão nível 1	0,125	1488	98,47%
Exatidão nível 2	0,250	3021	99,97%
Exatidão nível 3	0,500	6124	101,33%
Exatidão nível 4	1,000	12381	102,44%
Exatidão nível 5	10,000	120677	99,85%

#### 5.4.10. Precisão

De acordo com literatura, as medições de precisão definem quanto os resultados apresentados podem estar dispersos, quanto são reprodutíveis e dão a confiança aos dados que são obtidos. Geralmente, seis resultados obtidos de preparações replicadas a partir da mesma amostra fornece uma ideia adequada da precisão do método (ICH, 2005).

O método analítico proposto mostrou resultados precisos para a finalidade pretendida, apresentando desvio padrão relativo de 0,96 a partir de 6 réplicas preparadas a partir de uma amostra homogênea (Tabela 25).

Tabela 25 – Resultados da precisão no 1º dia

	Massa pesada (mg)	Conc. Teórica (mg/mL)	Área	Teor	DPR	Teor Médio
<b>Padrão Precisão</b>	<b>6,53</b>	<b>0,6530</b>	<b>7597671 7593824</b>	<b>99,50%</b>	0,04%	
Precisão 1	71,259	0,4828	5631901	99,77%		
Precisão 2	72,000	0,4879	5724181	100,37%		
Precisão 3	74,513	0,5049	5986213	101,42%	0,96%	100,28%
Precisão 4	78,723	0,5334	6166857	98,89%		
Precisão 5	70,575	0,4782	5663070	101,30%		
Precisão 6	76,631	0,5192	6064236	99,90%		

Como ilustrado na Figura 35 a precisão pode ser testada em vários níveis, sendo usualmente testada como precisão, a precisão do sistema (injeções da mesma preparação da amostra) geralmente realizada anteriormente a cada análise, como *System suitability*, também a repetibilidade e precisão intermediária (avaliada em validações analíticas) e reprodutibilidade (realizadas em estudos colaborativos e transferência de tecnologia) (ERMER, J; MILLER, 2006).

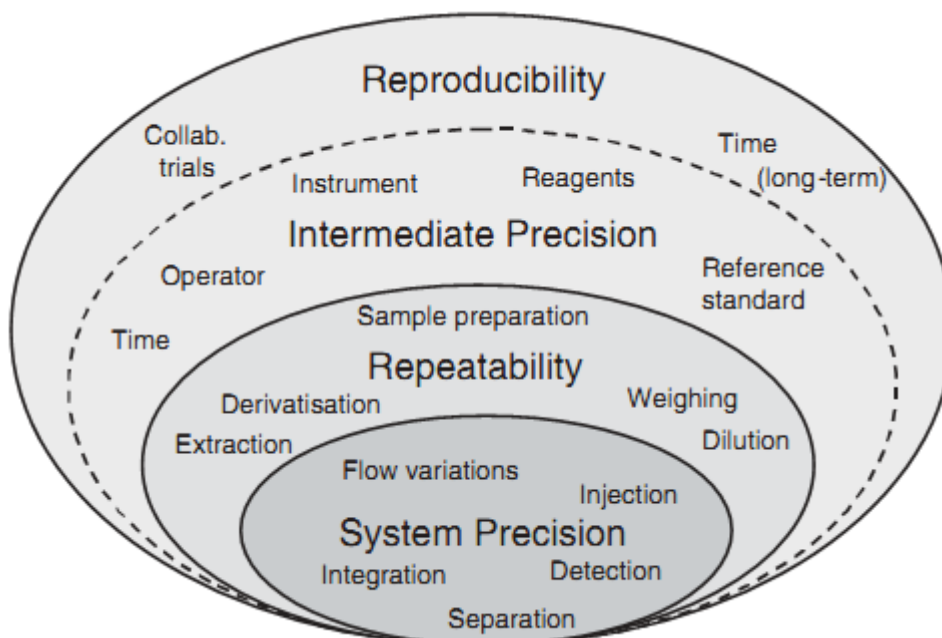


Figura 35 - Diferentes avaliações da precisão

As precisões preparadas por analistas diferentes e analisadas em equipamentos diferentes apresentaram um desvio padrão relativo baixo, de 0,87% e 0,54% respectivamente (Tabela 26 e Tabela 27), estando em conformidade com a precisão. Pode-se entender que diferentes dias e diferentes analistas não comprometem a precisão do método, visto que todas as avaliações apresentaram um DPR menor que 1,0%.

Tabela 26 – Resultados da precisão intermediária 1

	Massa pesada	Conc. teórica	Área	Teor	DPR	Teor Médio
<b>Padrão Precisão</b>	<b>25,85</b>	<b>0,5170</b>	<b>5665904</b>	<b>99,50%</b>	<b>0,08%</b>	
<b>Padrão Precisão</b>			<b>5672102</b>			
Precisão 1	74,32	0,5052	5545523	99,60%		
Precisão 2	74,17	0,5042	5546706	99,82%		
Precisão 3	73,28	0,4982	5454149	99,35%	0,87%	99,15%
Precisão 4	74,62	0,5073	5551080	99,30%		
Precisão 5	72,15	0,4905	5371956	99,38%		
Precisão 6	78,65	0,5347	5740326	97,42%		

Tabela 27 - Resultados da precisão intermediária 2

	Massa pesada	Conc. teórica	Área	Teor	DPR	Teor Médio
<b>Padrão Precisão</b>	<b>6,53</b>	<b>0,6530</b>	<b>7733678</b>	<b>99,50%</b>	<b>0,75%</b>	
<b>Padrão Precisão</b>			<b>7651726</b>			
Precisão 1	73,03	0,4948	5782364	98,70%		
Precisão 2	73,04	0,4949	5821447	99,35%		
Precisão 3	73,8	0,5001	5821097	98,32%	0,54%	99,05%
Precisão 4	73,07	0,4951	5851366	99,82%		
Precisão 5	73,17	0,4958	5829420	99,31%		
Precisão 6	73,44	0,4976	5822411	98,82%		

Foi realizado também a análise estatística com teste ANOVA, para verificar se os desvios padrão (Figura 36) e as médias (Figura 37) poderiam diferir entre si. Os relatórios foram extraídos do software Minitab®.

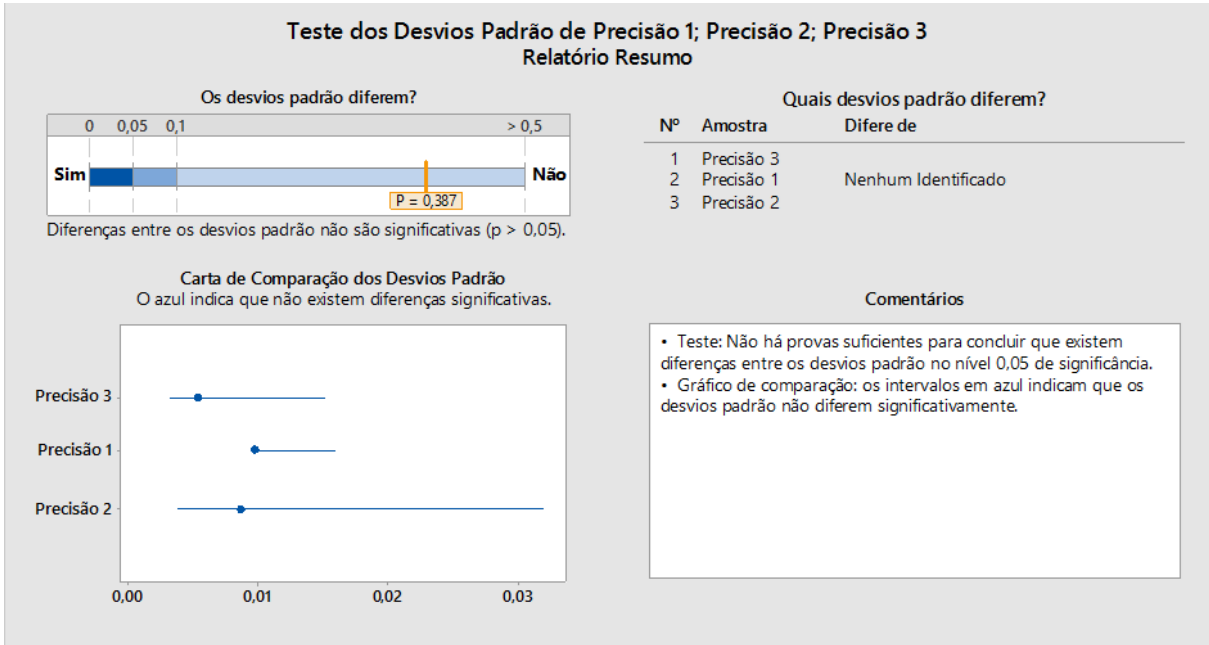


Figura 36 - Comparação de desvios padrão entre precisões

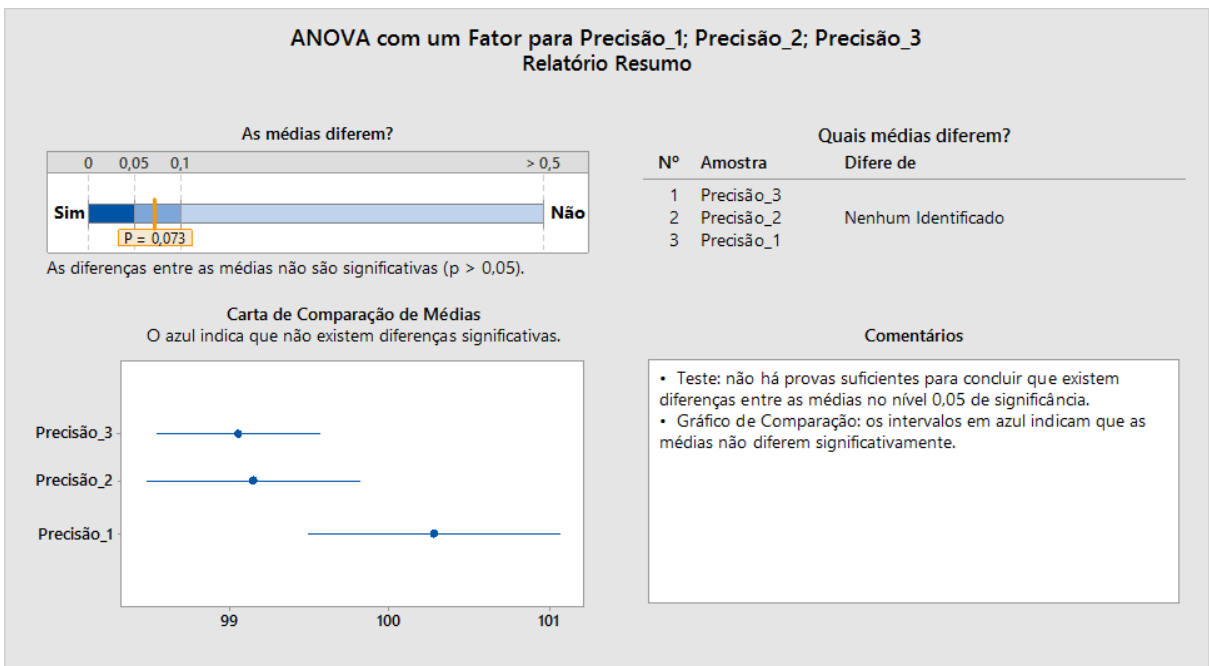


Figura 37 - Comparações das médias das precisões

Como se interpretou, as médias das precisões não apresentaram diferenças significativas entre si, e também os desvios padrão das precisões foram semelhantes.

#### **5.4.11. Robustez**

O teste de robustez consiste em realizar testes para avaliar a capacidade de um método de ser executado eficazmente em um ambiente de laboratório típico e com variações aceitáveis (ERMER, J; MILLER, 2006).

A avaliação da robustez da metodologia analítica foi realizada com amostras da precisão, e a avaliação compreendeu a reprodutibilidade dos resultados de teor da amostra e também com a amostra estressada, que possibilitou a avaliação da resolução entre o pico de degradação e do ativo nas diferentes condições testadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Resultados da avaliação do parâmetro Robustez para o método por UPLC de ambrisentana

		Teor	Resolução	Pratos Teóricos	Assimetria
Método sem alteração	Amostra Estressada	n/a	23,72	37920	1,19
	Amostra	100,65%	n/a	37784	1,19
Método com alteração concentração da F.M. 48:52 (Metanol:Solução A)	Amostra Estressada	n/a	23,75	47709	1,14
	Amostra	100,51%	n/a	46897	1,16
Método com alteração concentração da F.M. 52:48 (Metanol: Solução A)	Amostra Estressada	n/a	24,04	31572	1,2
	Amostra	99,57%	n/a	31327	1,21
Método com alteração do Vazão 0,35 mL/min	Amostra Estressada	n/a	23,8	40357	1,29
	Amostra	100,23%	n/a	38412	1,33
Método com alteração do Vazão 0,45 mL/min	Amostra Estressada	n/a	23,02	31886	1,12
	Amostra	98,59%	n/a	32673	1,12
Método com alteração da temperatura 35 °C	Amostra Estressada	n/a	22,66	37678	1,14
	Amostra	99,14%	n/a	36655	1,13
Método com alteração da temperatura 45 °C	Amostra Estressada	n/a	25,51	40334	1,23
	Amostra	100,42%	n/a	39429	1,23
Método com alteração de lote de coluna	Amostra Estressada	n/a	18,4	20745	1,72
	Amostra	99,62%	n/a	20090	1,72
Método com alteração no pH - 3,0	Amostra Estressada	n/a	18,81	21013	1,74
	Amostra	99,91%	n/a	20307	1,75
Método com alteração no pH - 3,4	Amostra Estressada	n/a	19,89	20400	1,75
	Amostra	101,78%	n/a	19381	1,80

Como se observam, os resultados de doseamento da amostra foram satisfatórios, não apresentando diferenças significativas entre o resultado do método sem alteração e das condições testadas.

Quanto à avaliação da resolução entre os picos na amostra estressada, pode-se ver algumas diferenças, mas a capacidade do método de separar os picos em nenhum momento foi comprometida, tendo como menor valor de resolução de 18,4, que é muito acima de 2,0, valor este em que a separação já acontece a nível de linha de base.

Assim sendo, pode-se concluir que o método é robusto nas condições testadas.

## **5.5. Conclusão**

Após a finalização dos ensaios e interpretação dos resultados da validação analítica, verificou-se que o método apresenta especificidade adequada, tanto para análise de doseamento da substância ativa como para identificação e quantificação de produtos de degradação. Também apresentou exatidão e precisão dentro do esperado para utilização em controle da qualidade de produtos farmacêuticos, tendo também limites de quantificação e detecção em magnitude adequada para se avaliar a possível degradação do fármaco. O método se apresentou linear no intervalo pretendido e suficientemente robusto para determinação analítica de ambrisentana.

Assim pode-se concluir que o método proposto é adequado para a identificação, e quantificação de ambrisentana e seus produtos de degradação em comprimidos, seja para liberação de lotes em controle de qualidade como também em amostras submetidas a estudo de estabilidade.



---

**6. CAPÍTULO 3 – PROPOSTA DE ROTA DE DEGRADAÇÃO DA  
AMBRISSENTANA**

---



## 6.1. Introdução

O estudo da estabilidade de produtos farmacêuticos é um dos pontos mais importantes a ser avaliado no desenvolvimento de novas drogas ou de novas formulações. Também é um importante ponto a ser monitorado, principalmente em situações onde alterações nos produtos ou processos são realizadas. Estas mudanças podem ser na matéria-prima utilizada, como alterações de rota sintética do fármaco, alterações nas embalagens ou condições de armazenagem ou então alterações na origem (alterações de fornecedores) propriamente dita do mesmo. Além desses, alterações que possam estar mais ligadas a formulação devem ser monitoradas, como alteração de excipientes utilizados, seja de forma quantitativa ou qualitativa, e alterações no processo produtivo (HUYNH-BA, 2009).

Os atributos de qualidade, tais como identidade, concentração e pureza devem ser estabelecidos durante o desenvolvimento dos medicamentos. Caso as propriedades físico-químicas ou de performance (como perfil de dissolução) do medicamento se alterem para além dos limites aceitos no estudo de estabilidade, então os dados de segurança e eficácia estabelecidas podem não ser mais aplicáveis. As alterações na estabilidade podem oferecer riscos à segurança do paciente, uma vez que a dose administrada ao paciente pode ser mais baixa do que esperada, além de poder levar à formação de produtos de degradação potencialmente tóxicos (HUYNH-BA, 2009).

Neste contexto, vários são os estudos de estabilidade para medicamentos que são preconizados pelas agências regulatórias, os quais estão descritos de maneira resumida na Tabela 29 (WHO, 1997).

Estes estudos de estabilidade norteiam para a garantia da qualidade dos medicamentos consumidos para que o seu período de validade seja adequado para a formulação comercializada. A degradação da formulação deve ser acompanhada, pois alterações podem acontecer, e testes para avaliação dos subprodutos que podem eventualmente se formar durante este período devem ser devidamente executados.

Tabela 29 – Principais tipos de estudos de estabilidade realizados em medicamentos e seus objetivos.

<b>Tipo de Estudo</b>	<b>Uso</b>	<b>Objetivo</b>
Acelerado	Desenvolvimento do produto	Selecionar formulação e embalagens adequadas
Acelerado e longa duração	Desenvolvimento do produto e dossiê para registro	Determinar o prazo de validade do produto
Longa duração	Dossiê para registro	Validar o prazo de validade solicitado
Acelerado e longa duração	Garantia da qualidade do produto, incluindo controle de qualidade	Verificar que não estão acontecendo mudanças capazes de afetar a estabilidade do produto

Os produtos de degradação podem ser danosos se consumidos, por isso seu monitoramento deve ser realizado (ICH, 1997). Os limites sugeridos para os produtos de degradação foram publicados em 2013 pela ANVISA (BRASIL, 2013), sendo compatíveis aos preconizados pelo ICH. A Tabela 30 mostra estes limites (BRASIL, 2013).

Tabela 30 - Limites de notificação, identificação e qualificação para produtos de degradação.

	<b>Dose máxima diária</b> <sup>1</sup>	<b>Limites</b> <sup>2</sup>
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
Limites de qualificação	> 10g	0,10%
	< 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.

No caso da ambrisentana, onde a dose máxima diária recomendada na bula é de 10mg, os limites para notificação, identificação e qualificação ficam pré-estabelecidos em 0,1%, 0,2% e 0,5% respectivamente, ou seja, impurezas

encontradas na concentração de até 0,1% não precisam ser reportadas, e acima disso precisam ser apresentadas durante os estudos de estabilidade. Impurezas com teor maior que 0,2% precisam ter sua identidade revelada, e impurezas em quantidade maior que 0,5% em relação ao ativo, devem ter sua toxicidade conhecida, e caso necessário, novo limite deve ser avaliado.

Em todos estes casos, uma metodologia analítica deve dar o suporte para estas determinações e, caso impurezas estejam com seus limites acima do limite de identificação, a determinação da identidade do produto se faz necessária. Para tanto, pode-se optar por identificação via cromatografia com uso de padrões externos (caso se tenha sugestão de degradação e disponibilidade do padrão) ou então técnicas analíticas capazes de identificação dos compostos.

No caso da ambrisentana, não se tem disponibilidade de padrões conhecidos que possam ser os seus produtos de degradação, por isso após o estudo de estresse, e com uso de espectroscopia de massas, foram realizados ensaios com objetivo de se obter uma massa possível de se prever a rota de degradação da molécula e se estabelecer a estrutura química da degradação do fármaco.

## **6.2. Materiais e métodos**

A condição escolhida para a identificação da degradação foi a amostra submetida ao estresse térmico, a qual apresentou uma degradação intensa e que teve maior instabilidade frente às outras condições de degradação forçada. Esta amostra foi preparada utilizando-se o diluente validado (Metanol:água, 1:1, v:v) e foi submetida à temperatura de 60 °C por 6 horas. Também foi preparado um padrão de ambrisentana no momento da análise.

A análise de espectroscopia de massas foi realizada no laboratório instrumental de estudos Biofarmacêuticos da empresa Biocinese, localizada em Toledo, Paraná, cuja estrutura gentilmente foi cedida para a realização dos ensaios.

A técnica analítica consistiu em realizar uma separação dos analitos presentes na amostra (ambrisentana e sua principal degradação) via cromatografia

de ultra performance e posterior detecção em espectrômetro de massas (UPLC-MS/MS).

A Tabela 31 detalha as condições básicas utilizadas para o ensaio instrumental, e a Tabela 32 o equipamento e as configurações do espectrômetro de massas.

Tabela 31 – Equipamento e condições cromatográficas para análise instrumental – identificação do PD

Equipamento – Modelo – Fabricante	UPLC – Acquity – Waters
Detecção	Espectrometria de Massas
Fase móvel: componentes: proporção	Metanol:Formiato de Amônio 5 mM pH 3 ajustado com ácido fórmico (65:35 v/v)
Vazão da fase móvel	0,400 mL/min
Temperatura do Auto Injetor	6 ° C
Temperatura da Coluna	40 ° C
Volume de Injeção	1 µL
Coluna Cromatográfica	Waters BEH C18 50x2,1mm 1,7 µm
T.R. Ambrisentana	Aprox. 1,2 minuto(s)
T.R. Produto de Degradação	Aprox. 4,5 minuto(s)
Tempo total de análise	6,0 minuto(s)

Tabela 32 - Equipamento e condições do espectrômetro de massas

Sistema - Modelo - Fabricante	MS/MS – Quattro Premier XE - Waters
Tipo de ionização	Electrospray Positivo (ES+)
Modo de operação	MS Scan e Daughter Scan
Fluxo do gás do cone	100 L/hr de nitrogênio
Pressão do gás de colisão	4,0x10 <sup>-3</sup> bar de argônio
Vazão do gás de dessolvatação	650 L/hr de nitrogênio
Temperatura de dessolvatação	350 °C
Temperatura do íon block	120 °C

Como já mencionado, as análises foram realizadas por UPLC-EM/EM, separando as amostras via cromatografia, os escaneamentos de massa foram feitos

em modo MSScan (íon precursor) e DaughterScan (íon produto) com varreduras entre 100-800 m/z a cada 2 segundos.

A configuração do espectrômetro de massas para a verificação dos íons e proporcionar as suas fragmentações estão descritas na Tabela 33.

Tabela 33 - Íons observados no método por UPLC-EM/EM e suas condições de detecção

Analito	Íon (m/z)		Cone (V)	Energia de Colisão (V)	Capilar (kV)
	precursor	produto			
Ambrisentana	379	347	15	8	3,0
Ambrisentana Degradação 1	303	125	15	16	3,0

### 6.3. Resultados e discussão

Os ensaios realizados apresentaram os cromatogramas a seguir (Figura 39 e Figura 38), onde se pode destacar a presença do sinal com tempo de eluição sendo detectado com 1,16 minutos, correspondente a molécula de ambrisentana, como confirmado pelo único sinal no cromatograma da solução padrão.

A detecção de outro pico com tempo de retenção de 4,57 evidencia a eluição da principal degradação do ativo (não observada no cromatograma do padrão).

Estes cromatogramas mostram o somatório (total) da intensidade de sinais de íons em cada um dos espectros de massas de uma série adquirida em função do tempo de retenção cromatográfico.

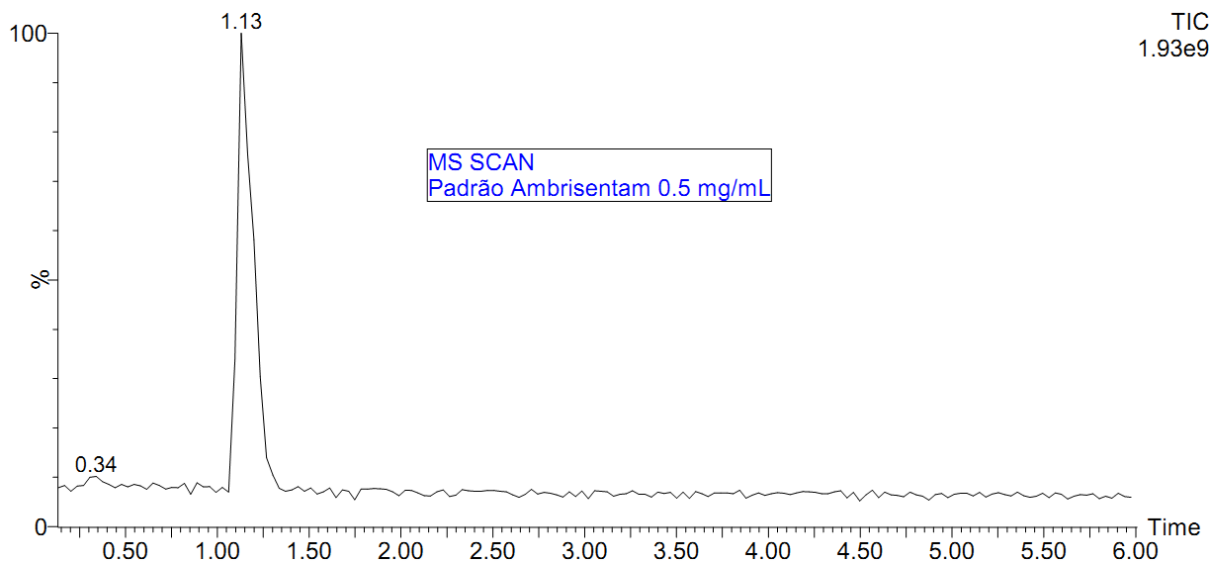


Figura 38 - Cromatograma de íons totais do padrão de ambrisentan

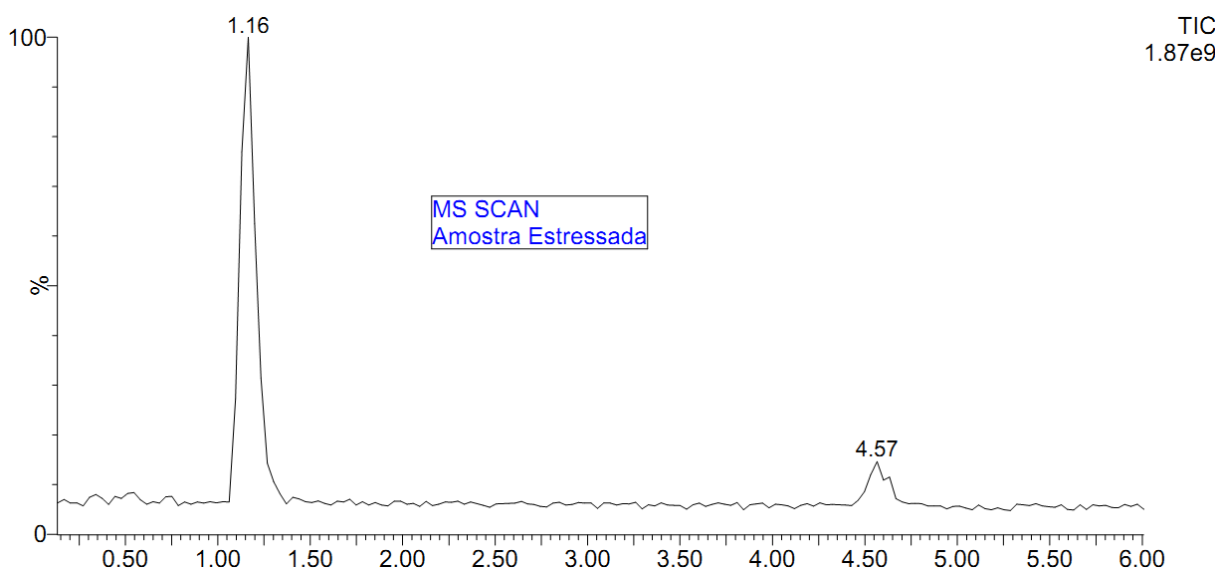


Figura 39 - Cromatograma de íons totais – Amostra de ambrisentan sob condição de estresse térmico

A partir destas análises, uma avaliação mais detalhada de cada sinal cromatográfico foi realizada. Primeiramente a confirmação da massa do íon precursor de ambrisentan foi confirmada no sinal obtido em 1,165 minutos (Figura 41), onde se destaca sinais do íon precursor de ambrisentan com massa de 379 (M+H) (Figura 40). Esta mesma massa, foi detectada no mesmo tempo de retenção na amostra estressada (Figura 42).



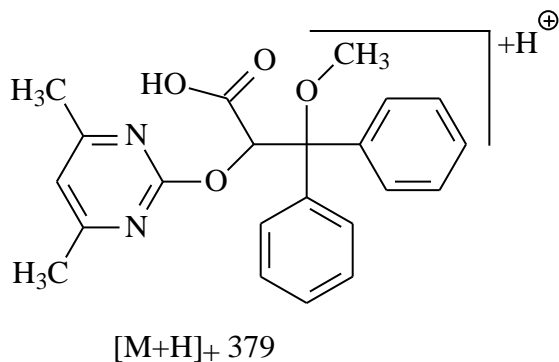


Figura 40 - Íon precursor Ambrisentana

Esta massa, é compatível com o peso molecular da ambrisentana (378 gramas/Mol), e também está de acordo com bibliografia consultada (NIROGI *et al.*, 2012).

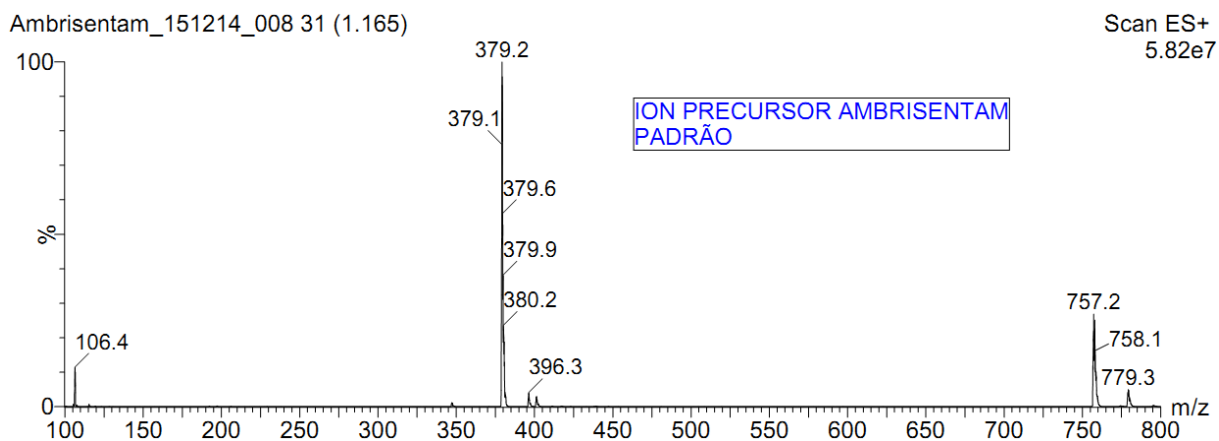


Figura 41 – Espectro de massas - íon precursor ambrisentana Padrão

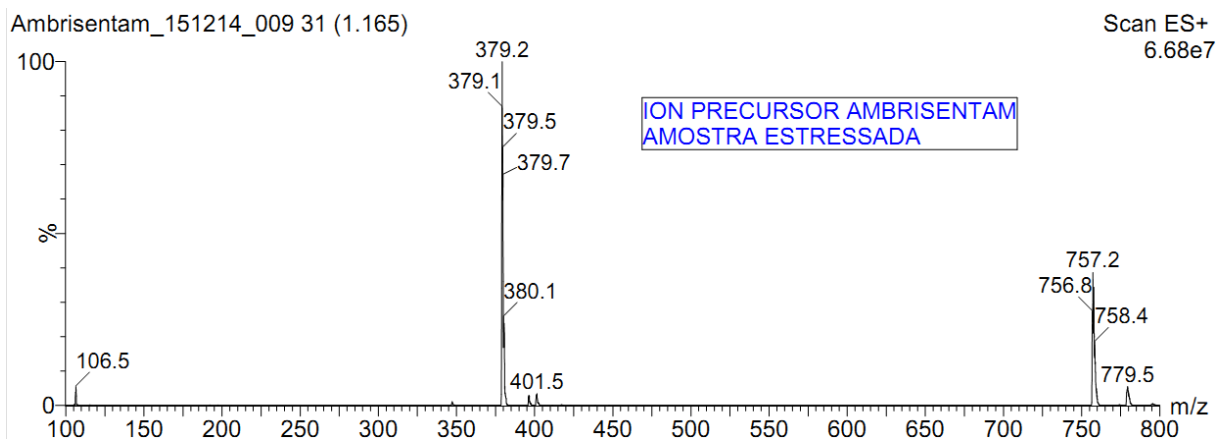


Figura 42 - Espectro de massas - íon precursor ambrisentana Amostra estressada

Com a confirmação do sinal referente a ambrisentana no tempo de retenção de 1,165 minutos, pode-se supor que o segundo sinal observado no cromatograma de íons totais (tempo de retenção de 4,56 minutos) é oriundo da degradação do fármaco ambrisentana.

Para tanto, a verificação da massa foi realizada com escaneamento de massas presentes neste tempo de retenção, e os resultados são verificados no espectro de massas ilustrado na Figura 43.

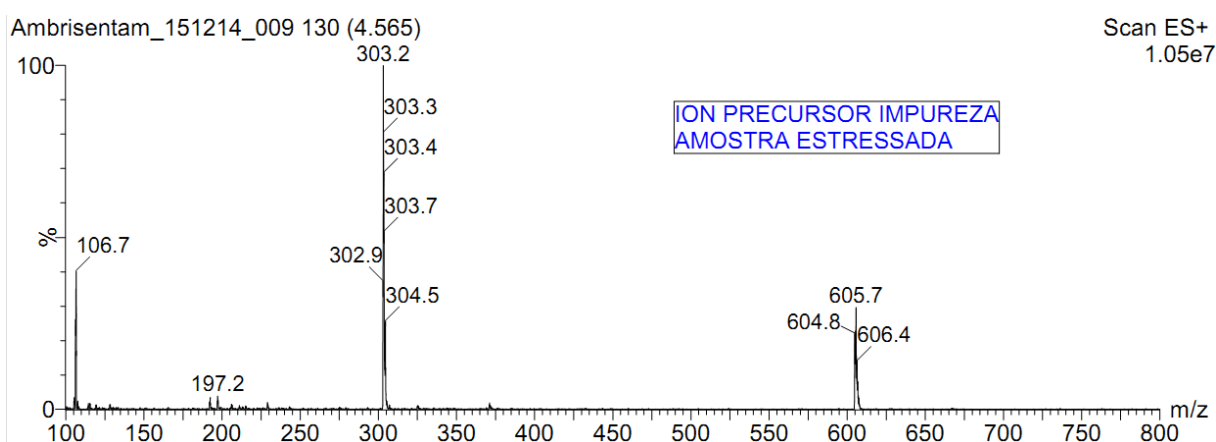


Figura 43 - Espectro de massas - íon precursor Degradação - Amostra estressada

Observa-se que a principal massa encontrada no espectro é de 303 gramas/mol, que sugere que o produto de degradação da molécula de ambrisentana possui uma massa molecular aproximado de 302 gramas/Mol ( $M+H = 303$  gramas/Mol) (Figura 44). Esta molécula proposta é também citada no trabalho de pesquisadores indianos (RAMISETTI; KUNTAMUKKALA, 2014), que da mesma maneira que o presente estudo, tiveram a identificação desta massa molecular em espectroscopia de massas em avaliação de amostras submetidas à degradação forçada em meio térmico.

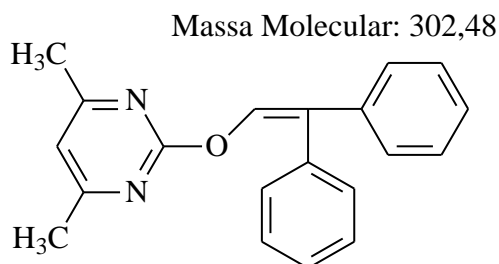


Figura 44 - Molécula proposta do produto de degradação

A fim de obter maiores informações acerca da estrutura a ser identificada, uma fragmentação deste material foi realizada, e as massas encontradas estão ilustradas na Figura 45, com destaque às massas de 179 e 125 (m/z).

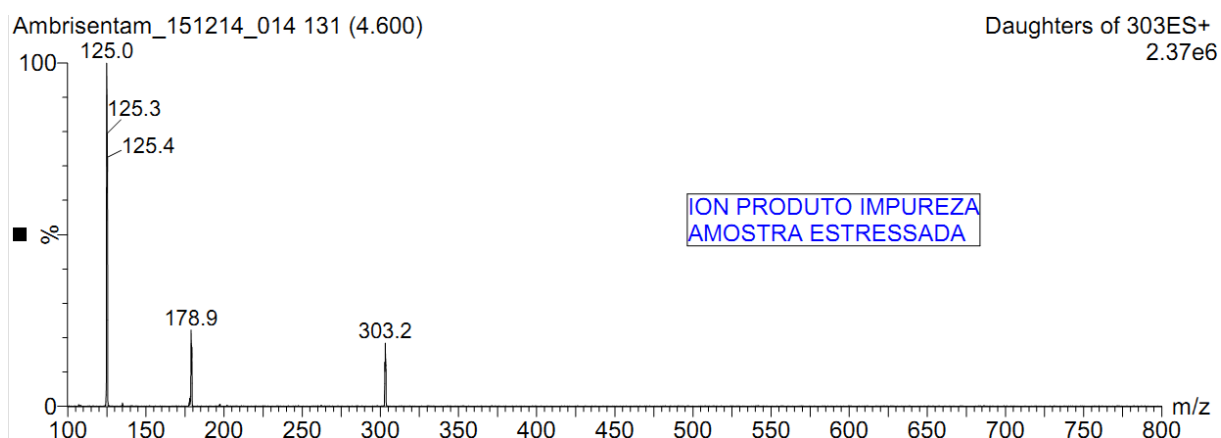


Figura 45 - Espectro de massas - íon produto do Produto de Degradação - Amostra estressada

Os fragmentos encontrados estão de acordo com a literatura especializada, onde se pode observar as estruturas dos fragmentos citados (Figura 46) (RAMISETTI; KUNTAMUKKALA, 2014).

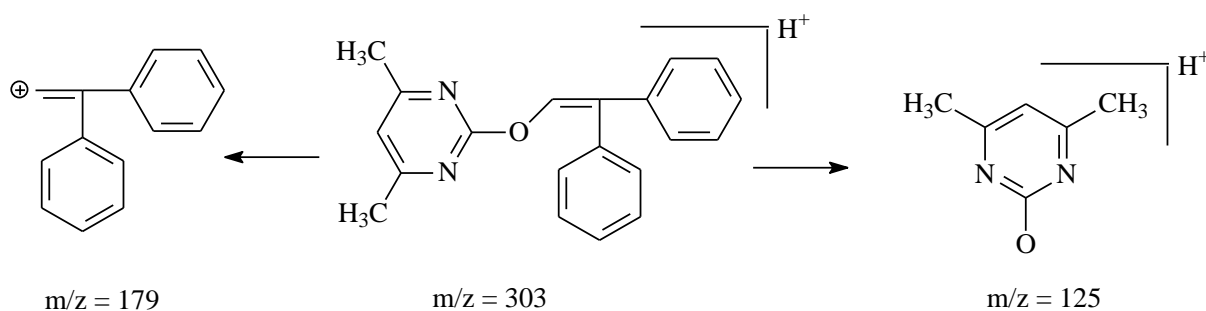


Figura 46 - Fragmentos de massas do produto de degradação de ambrisentana

A reação química que proporciona o surgimento do produto de degradação identificado também é citada em literatura atualizada, como descrito na Figura 47 (RAMISETTI; KUNTAMUKKALA, 2014).

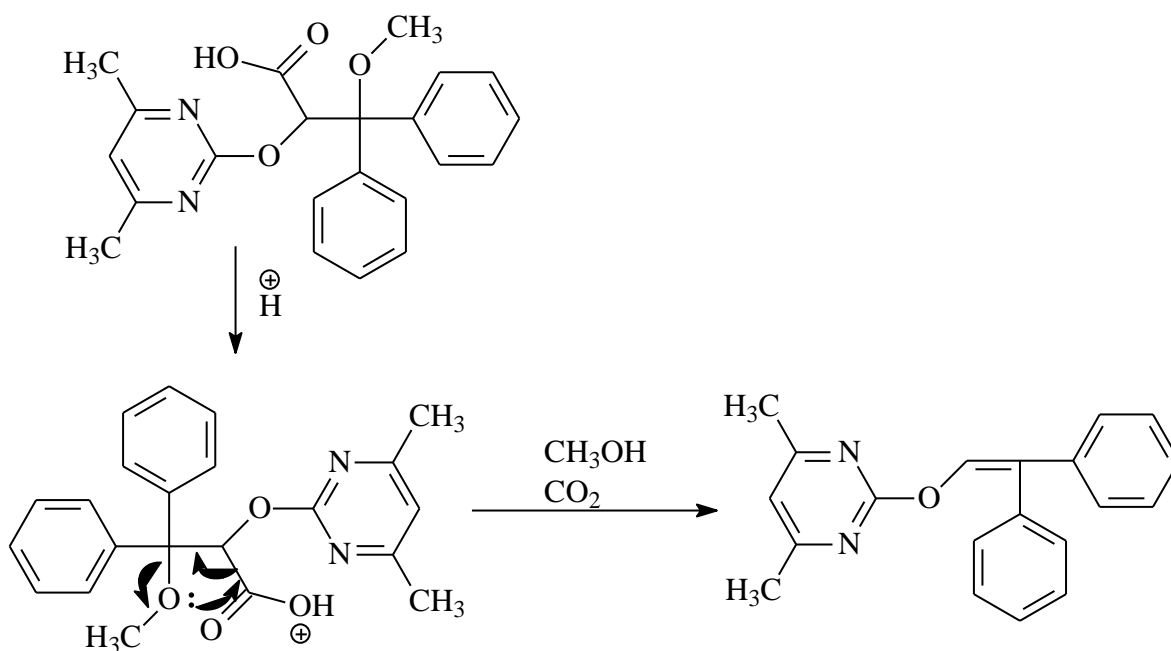


Figura 47 - Proposta da rota de degradação de ambrisentana em condições ácidas (RAMISETTI; KUNTAMUKKALA, 2014)

A rota de degradação proposta pelos autores (RAMISETTI; KUNTAMUKKALA, 2014) envolve basicamente um ambiente com características ácidas (HCl 0,5N), e que no presente estudo, foi propiciado por uma solução hidrometanólica, com aceleração da degradação tendo a temperatura como catalizador.

#### 6.4. Conclusões

A investigação da estrutura química do principal produto de degradação proveniente de degradação catalisada por temperatura a 60°C em meio hidrometanólico (metanol:água – 50:50 – v:v) foi conduzida utilizando-se a cromatografia acoplada a espectroscopia de massas, e os resultados encontrados demonstraram que uma reação química catalisada por pH ácido é o que ocasiona o surgimento da degradação, reação esta acelerada em temperaturas elevadas.

Após a condução do estudo de degradação forçada da ambrisentana, o principal produto de degradação foi identificado e sua rota de degradação foi apresentada.

Desta maneira considera-se que o objetivo de elucidação estrutural proposto para o presente trabalho foi atingido de maneira satisfatória.



---

## **7. CONCLUSÕES**

---

---





Este trabalho de pesquisa obteve os pontos a seguir destacados como principais conclusões:

- A SQR do fármaco ambrisentana demonstrou ser adequada ao estudo, tendo identidade e pureza satisfatórias para ser utilizado como padrão analítico (SQR);
- O estudo preliminar de estabilidade do fármaco ambrisentana demonstrou que a molécula é sensível a condições de estresse como ambientes ácidos, temperatura elevada, passível de sofrer oxidação e fotodegradação;
- O método desenvolvido para avaliação da qualidade de comprimidos de ambrisentana teve desempenho satisfatório para utilização em análises de doseamento e avaliação quantitativa de produtos de degradação, como comprovado na validação analítica conduzida;
- A estrutura química do principal subproduto da ambrisentana, obtido por degradação térmica foi elucidada.



## BIBLIOGRAFIA

AHMED, S.; PALEVSKY, H. I. Pulmonary Arterial Hypertension Related to Connective Tissue Disease: A Review. *Rheumatic Disease Clinics of NA*, v. 40, n. 1, p. 103–124, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rdc.2013.10.001>>.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. [S.l.]: Taylor & Francis Boca Raton, 2005.

BARST, R. J. *et al.* Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 43, n. 12s1, p. S40–S47, 2004.

BRASIL. nº 58 de 20 de Dezembro de 2013, *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*. (D. O. da União, Org.). [S.l.: s.n.], 2013

BRASIL. nº 60, de 10 de outubro de 2014, *Dispõe sobre os critérios para a concessão renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências*. *Diário Oficial da União*, 2014a.

BRASIL. nº 68 de 29 de Agosto de 2014 - *Proposta de guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação*. *Diário Oficial da União*. [S.l.: s.n.], 2014b

BRASIL. nº 899, de 29 de maio de 2003, *Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. *Diário Oficial União*. [S.l.: s.n.], 2003

CHENG, J. W. M. Ambrisentan for the management of pulmonary arterial hypertension. *Clinical Therapeutics*, v. 30, n. 5, p. 825–833, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149291808001756>>.

DOUŠA, M.; GIBALA, P. Rapid determination of ambrisentan enantiomers by enantioselective liquid chromatography using cellulose-based chiral stationary phase in reverse phase mode. *Journal of separation science*, v. 35, n. 7, p. 798–803, 2012.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis . Part I : An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 755–767, 2001.

ERMER, J.; MILLER, J. H. M. B. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. [S.l.]: Wiley, 2006. Disponível em: <[http://books.google.com.br/books?id=RcqRD\\_\\_qgScC](http://books.google.com.br/books?id=RcqRD__qgScC)>.

FINE, N. *et al.* Endothelin receptor antagonist therapy in congenital heart disease with shunt-associated pulmonary arterial hypertension: A qualitative systematic

review. *Canadian Journal of Cardiology*, v. 25, n. 3, p. e63–e68, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0828282X09700418>>.

HUYNH-BA, K. *Handbook of stability testing in pharmaceutical development: regulations, methodologies, and best practices*. [S.l.]: Springer, 2009.

ICH. Impurities in new drug products - Q3B (R2). *Q3B (R2), Current Step*, v. 4, 1997.

ICH. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY - Q2(R1). v. 1994, n. November 1996, 2005.

KAZAKEVICH, Y. V.; LOBRUTTO, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. [S.l.]: Wiley, 2007. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=csAk-MpeTocC>>.

KOMPELLA, A. *et al. Process for the preparation of highly pure ambrisentan*. . [S.l.]: Google Patents. Disponível em: <<https://www.google.com.br/patents/US20130060031>>. , 2013

LUKRAM, O. K.; SHARMA, R. High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantification of endothelin receptor antagonist drug, ambrisentan, in human plasma and its application in a pharmacokinetic study. *Biomedical chromatography : BMC*, v. 28, n. 8, p. 1147–55, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616031>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

NARAYANA, M. B. V.; CHANDRASEKHAR, K. B.; RAO, B. M. A validated specific stability-indicating RP-HPLC assay method for Ambrisentan and its related substances. *Journal of chromatographic science*, v. 52, n. 8, p. 818–25, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23926121>>.

NIROGI, R. *et al.* LC-ESI-MS/MS method for quantification of ambrisentan in plasma and application to rat pharmacokinetic study. *Biomedical chromatography : BMC*, v. 26, n. 10, p. 1150–6, out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22222607>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2009. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=9DiWLAwNyaUC>>. (SpringerLink: Springer e-Books).

RAMISETTI, N. R.; KUNTAMUKKALA, R. LC-MS/MS characterization of forced degradation products of ambrisentan: development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method. *New Journal of Chemistry*, v. 38, n. 7, p. 3050, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c4nj00075g>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

RIMKUS, K. *et al. Amorphous ambrisentan*. . [S.l.]: Google Patents. Disponível em: <<https://www.google.com.br/patents/US20120022087>>. , 2012

ROMANO, S. E. Revisão conceitual de hipertensão pulmonar; Pulmonary hypertension. *Pulmão RJ*, v. 19, n. 1/2, p. 33–39, 2010.

ROSENKRANZ, S. Pulmonary hypertension: current diagnosis and treatment. *Clinical Research in Cardiology*, v. 96, n. 8, p. 527–541, 2007.

ROWE, R.; SHESKEY, P. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 5<sup>a</sup>. ed. [S.l.: s.n.], 2006. p. 945 Disponível em: <<http://datastandards.co.uk/casepdf/case5.pdf>>. Acesso em: 24 dez. 2014.

RUFINO, R. *et al.* Hipertensão arterial pulmonar: uma proposta multidisciplinar. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 12, n. 3, p. 61–73, 20 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/7084>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th Edition*. [S.l.]: Wiley Global Education, 2005. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=mQ8cAAAAQBAJ>>.

SIMONNEAU, G.; ROBBINS, I. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the ...*, v. 54, n. 1, p. S43–S54, 2009. Disponível em: <<http://content.onlinejacc.org/article.aspx?articleid=1139839>>. Acesso em: 1 dez. 2014.

TAICHMAN, D. B.; MANDEL, J. Epidemiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Clinics in Chest Medicine*, v. 34, n. 4, p. 619–637, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2013.08.010>>.

VENTETUOLO, C. E.; KLINGER, J. R. WHO Group 1 pulmonary arterial hypertension : Current and investigative therapies. *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 55, n. 2, p. 89–103, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pcad.2012.07.002>>.

WHO. *Quality Assurance of Pharmaceuticals: A Compendium of Guidelines and Related Materials*. [S.l.]: World Health Organization, 1997. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=31AHSwAACAAJ>>. (Quality Assurance of Pharmaceuticals).

YOKOYAMA, Y. *et al.* Simultaneous microdetermination of bosentan, ambrisentan, sildenafil, and tadalafil in plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 89, p. 227–32, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309556>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

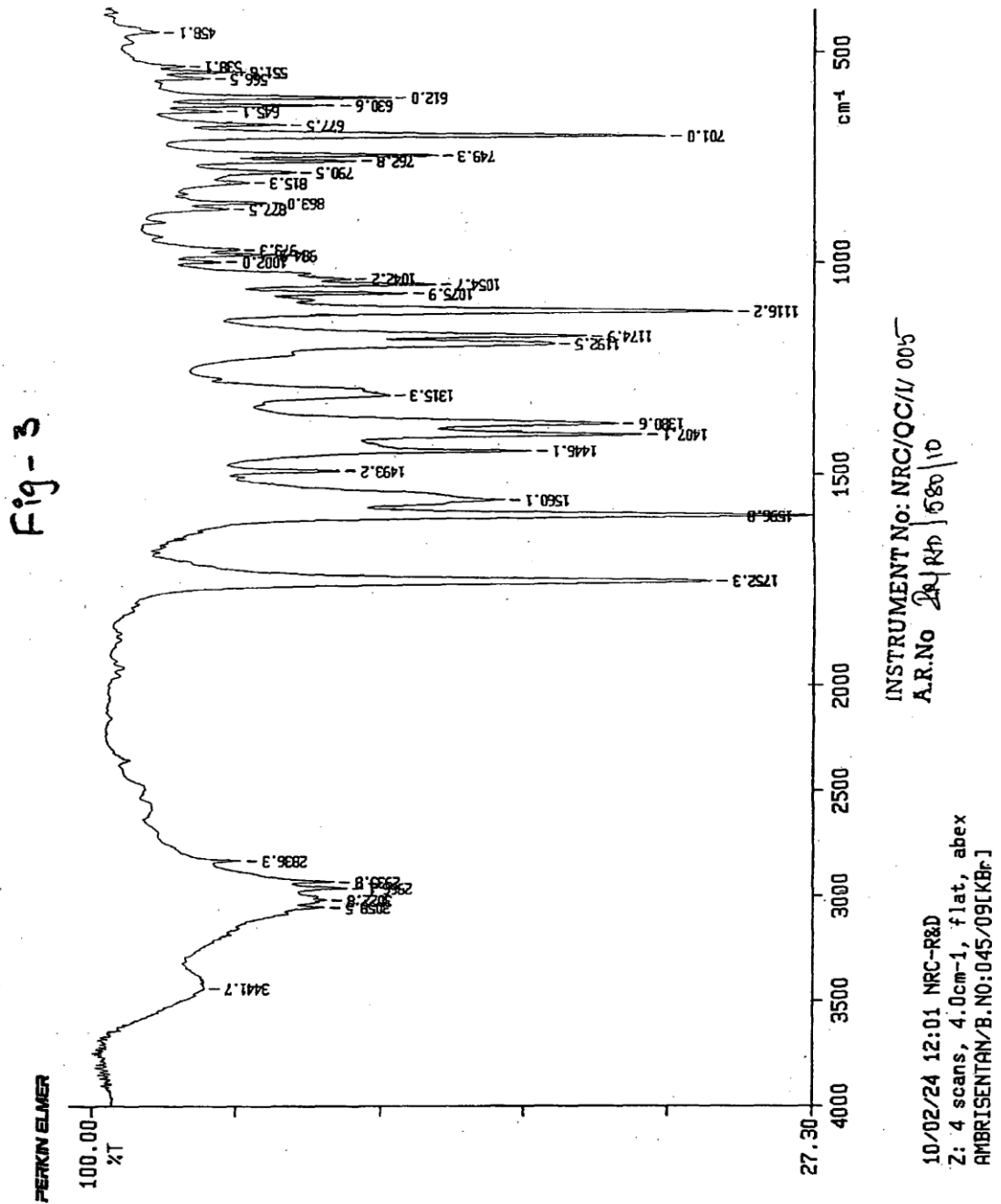








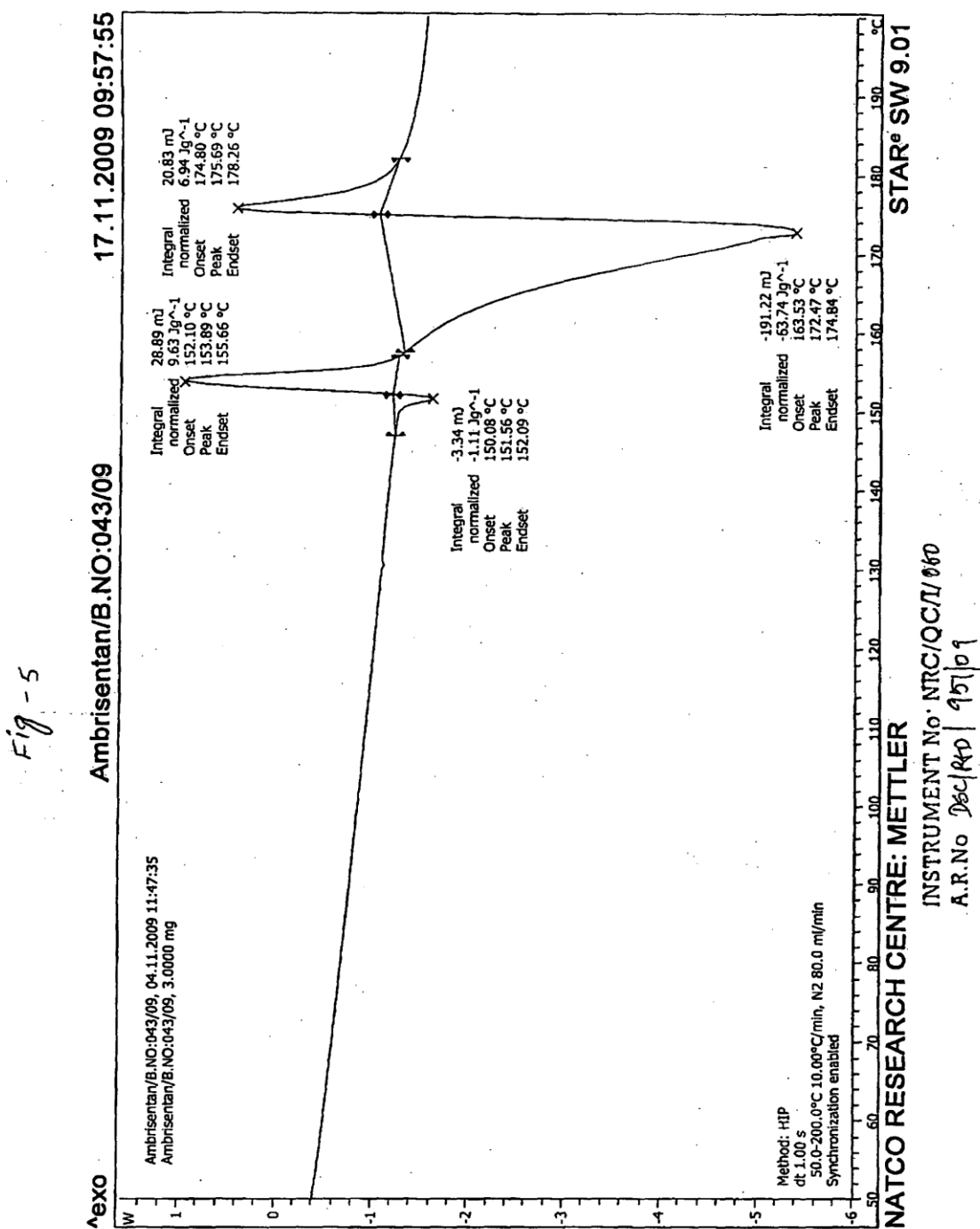
Anexo 1 - Espectro de infravermelho da ambrisentana - patente US 20130060031 A1



Fonte: (KOMPELLA *et al.*, 2013)



Anexo 2 - Termograma de Ambrisentana de material sob patente de processo produtivo para alta pureza.



Fonte: (KOMPELLA *et al.*, 2013)