

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO APLICANDO
QUALITY BY DESIGN NA AVALIAÇÃO ENANTIOMÉRICA DA RIVAROXABANA**

NATÁLIA OLEGÁRIO DOS SANTOS

Porto Alegre, 2022.

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO APLICANDO
QUALITY BY DESIGN NA AVALIAÇÃO ENANTIOMÉRICA DA RIVAROXABANA**

Dissertação/Tese apresentada por Natália
Olegário dos Santos para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe
Co-Orientadora: Prof. Dra. Nathalie Ribeiro Wingert

Porto Alegre, 2022.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30/09/2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andréa Inês Horn Adams

Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Cássia Virginia Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Jacqueline Arguello da Silva

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Olegário dos Santos, Natália
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
APLICANDO QUALITY BY DESIGN NA AVALIAÇÃO ENANTIOMÉRICA
DA RIVAROXABANA / Natália Olegário dos Santos. --
2022.

75 f.

Orientador: Martin Steppe.

Coorientadora: Nathalie Ribeiro Wingert.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Impurezas quirais. 2. Rivaroxabana. 3. Quality
by Design. 4. Método analítico. 5. Controle de
Qualidade. I. Steppe, Martin, orient. II. Ribeiro
Wingert, Nathalie, 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 desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

“Se você realmente quer algo, não espere.
Ensine você mesmo a ser paciente.”

Gurbaksh Chahal

RESUMO

A rivaroxabana (RIV) é um fármaco pertencente à classe dos novos anticoagulantes orais, o qual age inibindo o fator X ativado (FXa) da cascata de coagulação, tendo como indicações profilaxia de trombose venosa profunda após cirurgia de reposição de quadril ou joelho, embolia pulmonar e sistêmica, prevenção de derrame e, mais recentemente, utilizada em pacientes com COVID-19, devido as complicações geradas por esta infecção. Essa molécula possui um centro quiral, mas apenas o enantiômero (S)-rivaroxabana (S-RIV) apresenta atividade farmacológica, sendo (R)-rivaroxabana (R-RIV) considerada uma impureza. O controle de qualidade tem como principal objetivo a garantia da segurança e da eficácia, tanto de produtos farmacêuticos quanto dos insumos ativos, sendo a análise de impurezas uma etapa necessária para assegurar estes fins. O *Quality by Design* (QbD) é um modelo fundamental de qualidade farmacêutico sendo utilizado no desenvolvimento de produtos e processos. No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase quiral para separação enantiomérica da RIV. Para o planejamento experimental foi aplicada a abordagem QbD utilizando o software MODDE[®] 13 (Sartorius, Alemanha), com o qual, desenvolveu-se um método analítico que empregou uma coluna Chiralpak[®] AD-RH, fase móvel constituída de mistura de acetonitrila (ACN): água (92:8 v/v), com vazão de 0,35 mL/min, temperatura de 40 °C, detecção a 250 nm e tempo total de análise de 12 minutos. Os parâmetros de adequabilidade do sistema ficaram dentro das faixas de aceitação, e obteve-se uma resolução de 1,6 entre os enantiômeros. O método foi validado de acordo com as especificações contidas nas guias oficiais e na legislação vigente, abrangendo os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para S-RIV foram 0,20 µg/mL e 0,68 µg/mL e para R-RIV foram 0,30 µg/mL e 1,0 µg/mL, respectivamente. O método proposto demonstrou ser confiável e exequível, podendo ser aplicado para o controle de qualidade de matéria-prima e preparações farmacêuticas contendo RIV.

Palavras-chave: controle de qualidade; impurezas; método analítico; quality by design; rivaroxabana.

ABSTRACT

Rivaroxaban (RIV) is a drug of the class of new oral anticoagulants which acts by inhibiting the activated factor X (FXa) of the coagulation cascade having as indications prophylaxis of deep vein thrombosis after hip or knee replacement surgery, prevention of stroke, pulmonary and systemic embolism and currently also used in patients with COVID-19 due to complications of this infection. This molecule has a chiral center but only the enantiomer (S)-Rivaroxaban (S-RIV) presents pharmacological activity being (R)-Rivaroxaban (R-RIV) an impurity. Quality control has as main objective the guarantee of safety and efficacy of both pharmaceutical products and active inputs and the analysis of impurities is a necessary step to ensure these objectives. Quality by Design (QbD) is a fundamental model of pharmaceutical quality used in the development of products and processes. In the present work a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and validated for enantiomeric separation of RIV. For experimental planning the QbD approach was applied using the MODDE[®] 13 software (Sartorius, Germany) with which an analytical method was developed using a Chiralpak[®] AD-RH column and a mobile phase consisting of acetonitrile (ACN) mixture: water (92:8 v/v) with flow of 0.35 mL/min, temperature of 40 °C, detection at 250 nm and total running time of 12 minutes. The system suitability parameters were within the acceptance ranges and a resolution of 1.6 was obtained among the enantiomers. The method was validated according to the specifications contained in the official guides and current legislation covering the analytical parameters: selectivity, linearity, precision, accuracy, and robustness. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) obtained for S-RIV were 0.20 µg/mL and 0.68 µg/mL and for R-RIV were 0.30 µg/mL and 1.0 µg/mL respectively. The proposed method proved to be reliable and feasible and can be applied to quality control of raw material and pharmaceutical preparations containing RIV.

Keywords: analytical method; impurities; quality by design; quality control; rivaroxaban.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: Local de ação dos NOACs na cascata de coagulação	31
Figura 2: Estrutura química da (S)-Rivaroxabana	32
Figura 3: Estrutura química da (R)-Rivaroxabana	32

CAPÍTULO I

Figure 1: Fishbone diagram with the CMP evaluated	49
Figure 2: Contour Plot - Influence of pH and % ACN in the resolution response	50
Figure 3: Design Space – Demonstrating the prediction of the robust working region in the green area	51
Figure 4: Chromatogram of S-RIV (30 µg/mL) and R-RIV (3 µg/mL)	51
Figure 5: Chromatograms of drug products in impurities analysis at the concentration of 1 mg/mL	54
Figure 6: Table of experimental optimization analysis generated by MODDE® software	57
Figure 7: Table of experimental screening analysis generated by MODDE® software	58
Figure 8: Residual analysis of R and S-RIV	58

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 - Limites aceitáveis para impurezas de acordo com o guia do ICH Q3A (R2), 2006.	34
---	----

CAPÍTULO 1

Table 1 – CMP evaluated in the screening and optimization design.	48
Table 2 – Results of Method Validation.	53
Table 3 – Results of recovery test.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

ANOVA - Análise de Variância / Analysis of Variance

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AQbD – Analytical Quality by Design

ATP – Analytical Target Profile

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMP – Critical Method Parameter

COVID-19 – Corona Vírus 2019

CQA – Critical Quality Attribute

DoE – Design of Experiments

DPR - Desvio Padrão Relativo

FDA - Food and Drug Administration

FXa - Fator X ativado

ICH - International Conference on Harmonization

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

LD - Limite de detecção

LOD - Limit of Detection

LOQ - Limit of Quantification

LQ - Limite de quantificação

MRC – Material de Referência Certificado

N – Number of Theoretical Plates

NOACS – Novos Anticoagulantes Orais

OFAT – One Factor at the Time

QbD - Quality by Design

R – Coeficiente de Correlação

RIV - Rivaroxabana

R-RIV - (R)-rivaroxabana

RSD – Relative Standard Deviation

S-RIV - (S)-rivaroxabana

USP – United States Pharmacopoeia

VTE – Venous Thromboembolism

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. REVISÃO.....	29
3.1. Aspectos Gerais	30
3.2. Rivaroxabana	31
3.3. Análise quantitativa da rivaroxabana.....	33
3.4. Impurezas.....	33
3.5. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	35
3.6. <i>Quality by Design</i>	37
3.7. Validação de métodos analíticos	38
4. CAPÍTULO I - Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Separação e Quantificação da Rivaroxabana e sua Impureza Quiral.....	41
4.1. Apresentação do capítulo	42
4.2. ARTIGO CIENTÍFICO: <i>Quality by Design</i> approach for enantiomeric evaluation of Rivaroxaban and its chiral impurity.....	43
5. DISCUSSÃO GERAL.....	61
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência anual de tromboembolismo venoso na população geral é de dois para cada mil indivíduos, sendo agravada, entre outros fatores, pela idade do paciente. Em pessoas acima de 70 anos essa proporção aumenta para sete a cada mil e possui uma taxa de recorrência de 25%, sendo considerada uma importante causa de morbimortalidade, pois pode evoluir para embolia pulmonar, insuficiência venosa crônica, entre outras patologias (Piaty, 2019). Além disso, alguns dos pacientes acometidos pela doença do corona vírus em 2019 (COVID-19), principalmente nos casos mais críticos, apresentaram um aumento no número de casos de embolia pulmonar devido as complicações resultantes dessa infecção (Barbosa Junior, 2021).

A rivaroxabana (RIV) é um anticoagulante que age de maneira seletiva e reversível inibindo o fator Xa da cascata de coagulação, sendo comercializada na forma de comprimidos revestidos, indicada principalmente no tratamento e prevenção de trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar após artoplastia de quadril e joelho. Possui biodisponibilidade oral de 80 a 100% tempo de meia-vida de 12 horas, e pouca interação com alimentos e outros medicamentos (Afonso, 2016; Galego, 2017). A molécula possui um centro quiral, porém apenas a (S)-Rivaroxabana, denominada (S)-5-cloro-N-[[2-oxo-3-[4-(3-oxomorfolin-4-il)fenil]oxazolidin-5-il]metil]tiofeno-2-carboxamida, possui atividade inibitória do fator Xa (Drabina, 2019; Fattah, 2017).

Impurezas em insumos farmacêuticos ativos (IFA) podem advir do próprio processo de síntese ou de diversas fontes, como, por exemplo, materiais de partida, catalisadores, solventes e/ou reagentes residuais, sendo essencial a identificação e quantificação destas substâncias para obtenção de um efetivo controle de qualidade (Nath, 2019). Impurezas quirais são originadas no processo de síntese, tornando necessária a determinação da quantidade de cada enantiômero presente, visto que apenas um enantiômero irá apresentar a atividade farmacológica requerida, enquanto os outros não apresentarão nenhum efeito ou até podem vir a apresentar alguma toxicidade (Prajapati, 2014). A avaliação do perfil de impurezas faz parte da garantia e manutenção da qualidade de IFA e produtos farmacêuticos, havendo disponíveis diversificadas técnicas para esse tipo de análise, sendo a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência uma das mais utilizadas, destacando-se por sua sensibilidade e pela obtenção de resultados rápidos e precisos (Raikar, 2020; Görög, 2015; Zhou, 2007).

O *International Conference on Harmonization* (ICH) introduziu o *Quality by*

Design (QbD) como um modelo fundamental de qualidade farmacêutica para ser utilizado no desenvolvimento de produtos e processos, o qual têm como definição “Uma abordagem sistemática ao desenvolvimento que inicia com objetivos pré-definidos e enfatiza a compreensão do produto e do processo e o controle do processo, baseado na ciência e na gestão de risco da qualidade.”, objetivando a melhora na qualidade do método (Zagalo, 2022; Boussès 2015). A aplicação do QbD no desenvolvimento de metodologias analíticas é denominado *Analytical Quality by Design* (AQbD), tendo o mesmo propósito, possibilitando a otimização da robustez através da identificação e do controle de atributos críticos de qualidade (CQA) em relação aos parâmetros críticos do método (CMP) (Bastogne, 2022). O desenvolvimento de métodos analíticos é usualmente baseado em uma abordagem de tentativa e erro, enquanto o AQbD emprega quimiometria, que permite avaliar a interação entre todos os fatores analisados para garantir o desenvolvimento de um método que realmente possua condições ideais para sua finalidade (Sahu, 2018).

Até a data vigente foram encontrados apenas dois estudos (Chen, 2019; Prahbune, 2015) relacionados a metodologias para separação quiral da RIV e sua impureza enantiomérica, tanto em plasma quanto em produto farmacêutico, não sendo encontrado nenhum estudo que utiliza-se a abordagem QbD para o desenvolvimento dos métodos de separação enantiomérica da RIV.

Tendo em vista que a presença de impurezas em produtos farmacêuticos tem impacto no seu perfil de segurança e que as impurezas são uma das principais razões para retirada de produtos do mercado (Sengupta, 2020), torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos e para avaliação de suas impurezas, com o propósito de garantir produtos finais seguros e eficazes. Em razão disso, justifica-se a realização deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar um método analítico por CLAE para separação quiral da (S)-Rivaroxabana e sua impureza enantiomérica (R)-Rivaroxabana, utilizando o delineamento experimental QbD.

2.2. Objetivos específicos

- Aplicação da estratégia QbD no desenvolvimento de método analítico para separação e determinação enantiomérica da RIV;
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para separação e determinação dos enantiômeros R e S da RIV;
- Avaliação da presença da impureza enantiomérica (R)-Rivaroxabana em medicamentos disponíveis no mercado;

3. REVISÃO

3.1. Aspectos gerais

Uma das principais causas de óbito por doenças cardiovasculares é o tromboembolismo venoso, podendo apresentar-se como trombose venosa profunda até o tromboembolismo pulmonar e , de acordo com sua gravidade, tem o tratamento dos pacientes usualmente baseado na administração de anticoagulantes (Fernandes, 2016).

Pacientes submetidos a procedimentos como artroplastia total de joelho e quadril tem alto risco de desenvolver tromboembolismo venoso, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. A trombose venosa profunda tem uma incidência de 60% até 90 dias após a cirurgia e a embolia pulmonar fatal de 1,5%, sendo então altamente recomendado o uso de anticoagulantes após a realização destes procedimentos (Colleoni, 2018).

A pandemia de COVID-19, também foi responsável pelo aumento no número de casos de pacientes apresentando patologias relacionadas a coagulação, como, por exemplo, tromboembolismo venoso, embolia pulmonar e coagulação intravascular disseminada, sendo consideradas altamente prevalentes em pacientes com COVID-19 (Wu, 2020).

Apenas os antagonistas da vitamina K estavam disponíveis na forma oral, e eram amplamente utilizados, até o surgimento dos chamados “novos anticoagulantes orais” (NOACs) que possuem como mecanismo de ação a inibição direta da trombina ou do fator de coagulação X ativado (FXa), e que trouxeram como vantagens janela terapêutica mais ampla, regimes de dosagem simplificados, menor interação com alimentos e outros fármacos, farmacocinética e farmacodinâmica mais previsíveis e redução na necessidade de monitoramento da coagulação, proporcionando maior segurança e comodidade no tratamento (Silvestre, 2012; Cohen, 2019).

Os NOACs podem ser representados por quatro fármacos principais, sendo eles rivaroxabana, apixabana, edoxabana e dabigatrana. Os três primeiros apresentam como mecanismo de ação a inibição direta do Fxa, já a dabigatrana têm como mecanismo a inibição direta da trombina (Paul, 2020). A cascata de coagulação e o local de ação dos anticoagulantes estão representados na Figura 1.

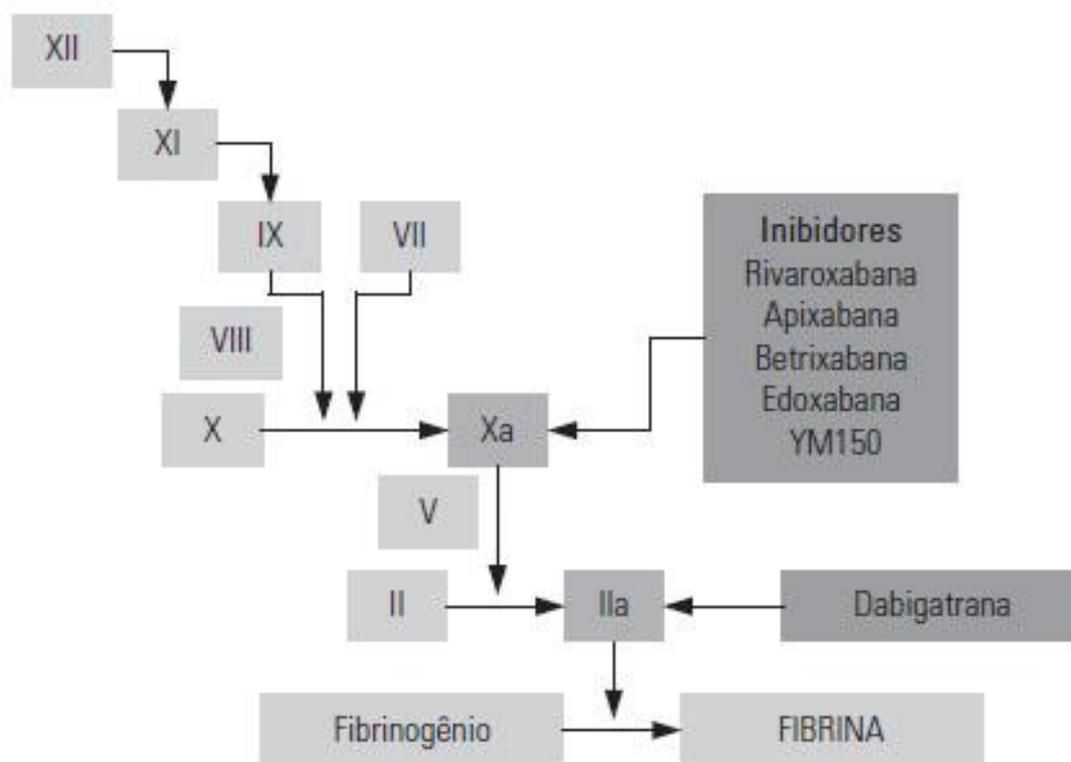


Figura 1. Local de ação dos NOACs na cascata de coagulação (Grillo, 2014).

3.2. Rivaroxabana

A rivaroxabana é um inibidor direto e altamente seletivo do FXa. É uma molécula com peso molecular de 436 g/mol, é praticamente insolúvel em água e possui alta (92 a 95%) ligação às proteínas plasmáticas (Kreutz, 2012). Além disso, apresenta valores de pKa em 13,6 e -1,6 e log de P no intervalo de 1,74 a 1,9 (Reçber, 2020).

A RIV tem como indicações a profilaxia da trombose venosa profunda após cirurgia de substituição de quadril ou joelho, tratamento e prevenção de trombose venosa profunda, prevenção de acidente vascular cerebral, embolia pulmonar e sistêmica (Janssen, 2020).

Este fármaco apresenta uma biodisponibilidade oral de 80 a 100%, considerando a dose de 10 mg, independentemente da ingestão de alimentos, e é absorvido rapidamente atingindo concentração plasmática máxima de 2 a 4 horas

após a administração do comprimido (Meyer, 2013).

Em 2011, teve sua aprovação nos Estados Unidos como o primeiro anticoagulante oral inibidor do FXa (Ashton, 2021) e no Brasil foi aprovada pela ANVISA em 2009, vendida sob o nome comercial de Xarelto[®], na forma de comprimidos revestidos nas dosagens de 2,5 mg, 10 mg, 15 mg e 20 mg sendo desenvolvido e fabricado pela Bayer AG e importado pela Bayer S.A. Atualmente, além do Xarelto[®] (medicamento referência), também possui apresentações como similares e genéricos. Sua estrutura química está representada na Figura 2.

Durante seu processo de síntese é obtida a forma ativa da RIV, a (S)-rivaroxabana, a qual é comercializada, mas está também presente seu enantiômero não ativo (R)-rivaroxabana (Figura 3), motivo pelo qual se torna necessário um método analítico de separação enantiomérica que garanta a pureza, eficácia e segurança da matéria-prima e dos medicamentos que contenham esse insumo farmacêutico ativo (Prabhune, 2015).

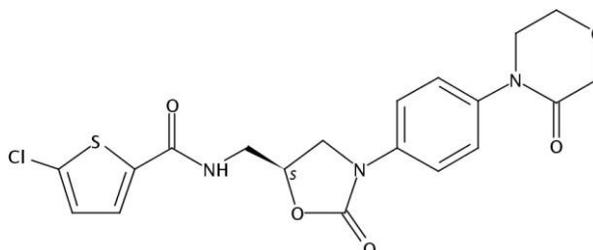


Figura 2. Estrutura Química (S)-Rivaroxabana (Fonte: SciFinder)

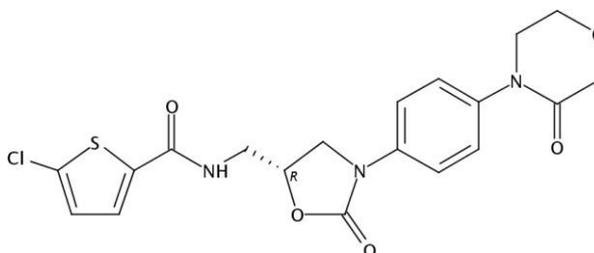


Figura 3. Estrutura Química (R)-Rivaroxabana(Fonte: SciFinder)

3.3. Análise quantitativa da rivaroxabana

Na literatura pesquisada foram encontrados estudos que realizaram a quantificação da RIV em produto acabado por CLAE (Çelebier, 2013; Rao, 2015; Arous, 2018). Jebaliya (2015) desenvolveu um método para quantificação da RIV por CLAE e, posteriormente, por CLUE.

Foi encontrada na literatura a utilização de eletroforese capilar empregando a técnica de cromatografia eletrocínética em microemulsão (Wingert, 2018), e também um estudo em que correlacionou os resultados de um método utilizando eletroforese capilar com os de um método para quantificação de RIV em CLAE (Walter, 2017). Além da RIV isolada, também foi encontrado um trabalho que relata a quantificação juntamente com a apixabana e a dabigatrana em plasma humano utilizando a técnica de CLAE acoplada à espectrometria de massas (Lagoutte-Renosi, 2018).

Em relação a separação enantiomérica da RIV, apenas dois estudos relacionados a este tema foram encontrados. O primeiro estudo encontrado visava a separação quiral da RIV para avaliação de matéria-prima realizada por CLAE-UV, utilizando uma coluna Chiralpak OD-H (250 x 4,6 mm; 5 µm) com fase móvel constituída de hexano e etanol (50:50 v/v) com vazão de 1,0 mL/min, detecção a 250 nm, temperatura de 35 °C e um tempo total de análise de 30 minutos (Prabhune, 2015). O segundo estudo encontrado tinha como objetivo a separação enantiomérica de RIV em plasma realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM/EM). Para tal, foi utilizada uma coluna Chiralpak IC (250 x 4,6 mm; 5 µm) com uma fase móvel composta por acetonitrila e água (90:10) com fluxo de 0,4 mL/min, temperatura de 25 °C, apresentando 16 e 18 minutos de tempo de retenção para R-RIV e S-RIV, respectivamente (Chen, 2019). Até o momento não foram encontrados mais estudos na temática de Rivaroxabana e separação de sua impureza quiral.

3.4. Impurezas

Todos os medicamentos possuem em sua composição o insumo farmacêutico ativo, responsável pela ação terapêutica, e também outros componentes que não possuem atividade farmacológica. Apesar do requisito de alta pureza dos IFA

utilizados para produção, os mesmos podem possuir impurezas, que são classificadas como qualquer substância presente na formulação que afeta o grau de pureza do IFA (Nagpal, 2011). Essas impurezas presentes na formulação podem ser originadas por processos de catálises que são reações comumente utilizadas na síntese de fármacos, por resíduos de solventes ou podem ser impurezas quirais. As impurezas quirais podem estar presentes, pois geralmente fármacos de origem sintética são comercializados como racematos em função da dificuldade de realização de sínteses assimétricas ou enantiosseletivas (Tzanavaras, 2010; Singh, 2017). A presença de apenas um enantiômero, em alguns casos, é preferível visto que este pode apresentar um melhor perfil farmacológico, aumento no índice terapêutico, e muitas vezes diminuição de efeitos adversos (Roy, 2002). Em termos farmacodinâmicos, a estereoseletividade farmacológica no corpo humano faz com que os enantiômeros liguem-se e interajam de maneira diferente com as moléculas presentes no organismo, enquanto que, em termos farmacocinéticos, essa estereoseletividade ocasiona diferenças na absorção, distribuição, metabolização e eliminação dos enantiômeros, podendo acarretar uma menor efetividade e, conseqüentemente, uma menor segurança na administração de medicamentos com moléculas quirais (Rayala, 2022).

O International Council for Harmonization (ICH) possui o guia Q3 A (R2) – Impurities in new drug substances, no qual as impurezas são divididas em três classes: impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas e solventes residuais. As impurezas inorgânicas usualmente advindas de processos de fabricação e as impurezas orgânicas oriundas do processo de fabricação e/ou das condições de armazenamento do insumo. Já os solventes residuais, são líquidos orgânicos ou inorgânicos utilizados na síntese do insumo. Este guia possui uma tabela (Tabela 1) a qual especifica os valores de limites aceitáveis para reportar, identificar e qualificar as impurezas baseado na dose máxima diária da substância utilizada.

Tabela 1. Limites aceitáveis para impurezas de acordo com o guia do ICH Q3A (R2), 2006.

Dose Máxima Diária¹	Limite de Notificação^{2,3}	Limite de Identificação³	Limite de Qualificação³
≤ 2 g/dia	0,05%	0,10% ou 1 mg da ingestão diária (o que	0,15% ou 1 mg da ingestão diária (o

		for menor)	que for menor)
> 2 g/dia	0,03%	0,05%	0,05%
¹ Quantidade máxima da substância ativa administrada por dia; ² Limites de notificação maiores devem ser cientificamente justificados; ³ Limites menores podem ser adequados se a impureza for excessivamente tóxica.			

Em resumo, qualquer substância que afete a pureza do material de interesse pode ser considerado uma impureza. As impurezas quirais são caracterizadas por apresentar exatamente a mesma fórmula molecular diferindo apenas no arranjo tridimensional de seus átomos, diferenças essas que podem ocasionar mudanças tanto no perfil farmacológico quanto no toxicológico, sendo de extrema importância um monitoramento mais criterioso (Ahuja, 2007).

Um dos marcos nas impurezas enantioméricas foi a Talidomida, fármaco que era comercializado como mistura racêmica, e que, posteriormente, se descobriu que apenas o enantiômero R apresentava atividade farmacológica enquanto que o enantiômero S era teratogênico ocasionando anomalias fetais (Vargesson, 2015). Outros exemplos são a varfarina, cujo o isômero S possui atividade cinco vezes maior do que o isômero R, e o propranolol no qual apenas o isômero S possui atividade farmacológica (Tengli, 2020).

3.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

Os métodos cromatográficos estão entre as principais técnicas de separação devido à eficiência e ao poder de resolução das colunas que proporcionam uma alta capacidade de separação mesmo no caso de matrizes complexas (Lanças, 2009).

Houve um crescimento no desenvolvimento das análises de separação enantioméricas em resposta a demanda de tecnologias que fossem eficientes tanto na área de desenvolvimento de produtos, quanto no controle de qualidade dos mesmos (Hordern, 2010).

A maioria dos fármacos tem sua obtenção a partir de síntese química, e muitos destes são comercializados como uma mistura contendo quantidade iguais de dois enantiômeros, denominada racemato. A administração de um racemato possibilita

diferenças na absorção, distribuição, metabolização e excreção devido à estereosseletividade, o que deve ser levado em consideração durante o planejamento e o processo de produção de insumos farmacêuticos. Entretanto, métodos envolvendo análise quantitativa e separação enantiomérica são de difícil desenvolvimento, visto que os enantiômeros possuem as mesmas propriedades físicas e químicas tornando a separação mais complexa. Entre as técnicas de separação de enantiômeros, uma das mais utilizadas é a cromatografia líquida de alta eficiência, na qual são utilizadas fases estacionárias quirais ou fases móveis contendo aditivos quirais (Bonato, 2005). A alta sensibilidade analítica da CLAE possibilita a utilização para isolamento de estereoisômeros e determinação de pureza óptica (Lima, 1997).

Na CLAE quiral em fase quiral existem duas técnicas que podem ser aplicadas, a direta e a indireta, onde na técnica indireta é utilizado um reagente de derivatização quiral que proporciona a formação de um par de diastereoisômeros que, por possuírem propriedades físicas diferentes, são separados em uma coluna convencional (aquiral). Na técnica direta é utilizado um seletor quiral na fase estacionária (coluna quiral) ou introduzido na fase móvel, porém a adição de um seletor quiral na fase móvel normalmente envolve um alto custo e baixa eficiência, sendo preferível separações quirais diretas utilizando fases estacionárias quirais (Hancu, 2020). Atualmente estão disponíveis no mercado uma grande quantidade de fases estacionárias quirais, o que possibilita a aplicação desta técnica nos mais variados compostos, facilitando a execução e demonstrando a relevância da escolha correta da fase estacionária para obtenção de um método confiável e adequado (Lourenço, 2010).

Estão disponíveis fases estacionárias quirais com diferentes constituintes em sua composição como: polissacarídeos (amilose e celulose), proteínas (albumina sérica, α -1-glicoproteína ácida, ovomucoide, celobiohidrolase 1), glicopeptídeos macrocíclicos (vancomicina, teicoplanina, ristocetina A), ciclodextrinas (α -, β - , γ -ciclodextrinas), alcaloides de cinchona (quinina e quinidina), seletores do tipo "Pirkle" (compostos de baixo peso molecular, geralmente aminoácidos modificados ligados ao suporte), éteres de coroa (poliéteres macrocíclicos sintéticos), troca de ligantes (complexos formados entre aminoácidos e íons metálicos) e polímeros sintéticos (Cavazzini, 2011; Cass, 2010). Em meio a toda essa diversidade, as colunas quirais compostas por polissacarídeos são conhecidas por apresentarem boa performance, ampla aplicação e serem responsáveis por, aproximadamente, 99% das separações quirais relatadas, entre elas, destacam-se as constituídas de tris (3,5-

dimetilfenilcarbamato) de amilose e celulose (Teixeira, 2019).

3.6. *Quality by Design*

O desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos para impurezas em formas farmacêuticas exige conhecimento sobre o método, sendo comumente realizado pelo *Quality by Testing* (QbT) ou abordagem de tentativa e erro, porém esse tipo de abordagem não possibilita a realização de um gerenciamento de riscos relacionados a qualidade e nem uma avaliação adequada da robustez, diferentemente da técnica de QbD, a qual permite a identificação e uma maior compreensão de variáveis que influenciam no desempenho do método, e também, a implementação de uma estratégia de controle que tem como base um maior entendimento sobre o método analítico (Hubert, 2014).

Usualmente utiliza-se o QbT, uma abordagem empírica na qual são testadas diversas condições variando um fator por vez, o que ocasiona um número muito maior de experimentos, além do fato de não estar sendo avaliada a interação entre os fatores implicando na escolha de uma falsa condição ideal e acarretando uma perda de qualidade (Deidda, 2018).

O QbD é uma abordagem científica baseada em análise de riscos, utilizada no desenvolvimento farmacêutico e que busca um entendimento integral dos fatores, tendo objetivos pré-definidos para controle dos processos ou produtos, e que busca a garantia da qualidade dos mesmos. Essa abordagem avalia e identifica características críticas inerentes ao processo para que o produto final seja obtido com os atributos desejados e adequados (Yu, 2008).

Para aplicação do QbD a métodos analíticos torna-se necessário o total entendimento do sistema analítico através de um estudo aprofundado dos parâmetros críticos do método baseado na avaliação dos riscos e dos variados procedimentos, permitindo a otimização e conferindo robustez ao mesmo (Pasquini, 2018). A implementação do AQbD inicia através da definição dos requisitos que o método deve atender, incluindo tanto os parâmetros do processo quanto da validação. A partir disto, devem ser identificados os parâmetros críticos para um desempenho adequado do método, sendo denominados estes de atributos críticos de qualidade (CQA). Além da identificação dos mesmos é realizada também a escolha de valores de aceitação e/ou valores limite para cada um dos CQA. Posteriormente, é iniciada a etapa de análise

de risco, na qual são definidas as variáveis experimentais críticas, conhecidas como parâmetros críticos do método (CMP), os quais influenciam no método de forma a impactar os CQA. Em etapa subsequente é realizado o planejamento experimental (DoE), onde usualmente é efetuado um primeiro estágio de varredura, para posteriormente passar ao processo de otimização do método, e finalmente, definição do *Design Space*, região na qual os CQA são atendidos (Breitkreitz, 2021).

O guia Q8 (R2) – Pharmaceutical development do ICH descreve de forma detalhada o uso de QbD para processos de fabricação, mas que atualmente é aplicado em diferentes áreas, como citado acima.

Outro ponto a ser considerado é a robustez, pois através dela é constatada que os CQA permanecem significativamente inalterados mesmo com pequenas variações em alguns parâmetros do método. Sendo assim, o desenvolvimento do método deve ter como base não apenas a qualidade, mas a garantia da qualidade, a qual é avaliada através da variabilidade proporcionada pelo teste de robustez (Debrus, 2013).

3.7. Validação de métodos analíticos

Em um cenário com aumento de competitividade e globalização intensiva as indústrias farmacêuticas necessitam vencer novos desafios para conseguir se destacar no mercado mundial, logo o controle de qualidade apresenta grande relevância, podendo ser considerada a etapa mais importante na fabricação de medicamentos, pois através dele é possível assegurar eficácia, segurança, e qualidade do produto final, e conseqüentemente, conquistar a confiança e a satisfação do consumidor (Rocha, 2014).

O desenvolvimento de um método analítico compreende um processo de avaliação no qual estime sua eficiência para o objetivo proposto e na rotina laboratorial, essa avaliação geralmente é denominada validação (Brito, 2003).

O método desenvolvido deve ser bem caracterizado e passar por um processo de validação para garantir resultados adequados e confiáveis (Shah et al., 2000). Para a realização da validação existem compêndios oficiais e diretrizes legais que servem de guia para a execução da mesma como, por exemplo, RDC 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *United States Pharmacopeia* (USP), ICH Q2-R1 (ICH, 1995) e o *Food and Drug Administration* (FDA), avaliando geralmente os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação,

exatidão e robustez, podendo haver variações conforme o tipo de método a ser utilizado. De maneira geral, a validação de um método assegura que o mesmo é apropriado para a sua finalidade, além de auxiliar na garantia de máxima eficácia e segurança dos medicamentos (Görög, 2007).

4. CAPÍTULO I – Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Separação e Quantificação da Rivaroxabana e sua Impureza Quiral.

4.1. Apresentação do Capítulo

A análise de impurezas é um assunto de extrema importância, que apesar de já vir sendo explorado, apresenta insuficiência de metodologias analíticas adequadas e reprodutíveis.

O controle de qualidade exerce papel fundamental tanto no desenvolvimento quanto na aplicação destas análises para garantia da segurança e eficácia de produtos farmacêuticos e insumos ativos.

O *Quality by Design* é uma abordagem que vem sendo progressivamente aplicada ao desenvolvimento de métodos analíticos, permitindo a seleção das condições experimentais ótimas, auxiliando no entendimento de quais são os fatores críticos e a influência que eles possuem nas respostas obtidas, possibilitando estabelecer um *Design Space* robusto permitindo a obtenção de um método adequado e com qualidade.

Considerando a necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas para avaliação de impurezas, esse trabalho utilizou a estratégia QbD para desenvolver um método analítico empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase quiral para resolver e quantificar a rivaroxabana e sua impureza enantiomérica.

Através deste estudo foi possível desenvolver um método capaz de resolver a rivaroxabana e seus enantiômeros R e S, confiável, de fácil execução e possuindo um tempo de análise aplicável em rotinas de controle de qualidade, possibilitando não apenas a análise em matéria-prima, mas também em produtos farmacêuticos acabados.

Após o desenvolvimento, o método foi validado e todos os parâmetros demonstraram estar em conformidade com o estipulado nos compêndios oficiais e na legislação vigente.

4.2. ARTIGO CIENTÍFICO: Quality by Design approach for enantiomeric evaluation of Rivaroxaban and its chiral impurity.

5. DISCUSSÃO GERAL

Durante o desenvolvimento do método a primeira etapa foi a seleção da fase estacionária, iniciando o teste com a coluna Chiralpak® AD-RH (150 x 4,6 mm; 5 µm), a qual é empregada a técnica cromatográfica mais usual, ou seja, fase reversa. Inicialmente a coluna já demonstrou ser adequada, não sendo necessária a utilização da Chiralpak® AD-H e, conseqüentemente, a aplicação da fase normal que, geralmente, utiliza solventes mais tóxicos, e com maior impacto ambiental para produção de resíduos em comparação com a fase reversa.

A segunda etapa foi a realização de testes com fases móveis variadas para estabelecer uma pré-seleção de quais realmente poderiam ser candidatas a avaliação para o método. Os testes iniciaram com misturas contendo os solventes mais usuais, a mistura de metanol e água, em diferentes proporções, não demonstrou resultado satisfatório, pois não foi possível observar nenhum sinal referente a S-RIV e R-RIV, mesmo com um tempo longo de análise.

A mistura de acetonitrila e água apresentou ser mais promissora, permitindo a visualização do sinal de ambos enantiômeros com um tempo relativamente curto de análise, e demonstrando efetividade na separação quando utilizada proporção de fase orgânica a partir de 90%. Outra mistura testada foi constituída de acetonitrila com acetato de amônio 10 mM, a qual apresentava melhores resultados quando a proporção de acetonitrila partia de 80%, além de possuir um tempo de análise levemente reduzido em comparação a utilização de acetonitrila. Ao longo do estudo, outro fator que inicialmente já expressava influência foi a temperatura, ficando claro que em temperaturas inferiores a 35 °C a separação não era satisfatória, independente da fase móvel em análise. Na literatura foram encontrados relatos de que o aumento da temperatura promove uma diminuição na seletividade enantiomérica, porém alguns trabalhos apresentaram o efeito oposto, alcançando um aumento na resolução ocasionado pelo aumento de temperatura, visto que os efeitos da temperatura sobre a resolução quiral são dependentes dos analitos avaliados (Chankvetadze, 2019; Heyden, 2012).

Habitualmente o desenvolvimento de métodos analíticos é feito de através de tentativa e erro, tendo enfoque em um fator por vez, o que impossibilita a avaliação do todo, da interação que existe entre os fatores e da influência que essa interação traz como consequência. O QbD é uma ferramenta que une análise de risco com estudo multivariado das respostas (CQA) em relação aos parâmetros críticos (CMP)

avaliados, o que proporciona um maior entendimento durante a etapa de desenvolvimento e a garantia da qualidade final do método. Após o estudo preliminar, foi realizada a etapa de varredura, na qual avaliou-se os CMP selecionados (pH, temperatura, fluxo, percentual de fase orgânica e fase móvel aquosa) em relação aos CQA (resolução, simetria, número de pratos teóricos e tempo total de análise). Nesta avaliação foi possível constatar que a faixa de pH não exercia influência significativa sobre os CQA estudados e que tanto o acetato de amônio 10 mM quanto a água poderiam ser utilizados como fase móvel aquosa (Capítulo 1).

Durante a seleção da fase móvel aquosa, percebeu-se que ambas não apresentavam diferenças significativas em relação a número de pratos teóricos e tempo total de análise. Em relação a simetria, o acetato de amônio demonstrou valores levemente superiores aos da água. Quanto ao parâmetro resolução, a água exibiu resultados melhores em comparação com o acetato de amônio, e em razão disso optou-se pela água, visto que o método visava separar e quantificar os enantiômeros.

Além disso, com a combinação de acetato de amônio com a acetonitrila em elevada proporção, seria necessária a implementação de uma etapa de limpeza bastante rigorosa após as análises, o que não seria necessário com a utilização da água, ademais a comparação entre as duas fases móveis aquosas em relação a facilidade de preparo. Com a seleção da água como fase móvel considerou-se que, apesar do pH não apresentar influência na resolução enantiomérica, seria pertinente estabelecer um valor de pH que não permitisse eventuais flutuações do pH da água original, coletada a partir do equipamento de ultrapurificação. A utilização de água acidificada com ácido fórmico 0,1% (pH 4,5), foi então estabelecida como fase aquosa final. A definição deste valor de pH deu-se em razão do valor 4,5 ter sido estudado durante a etapa de varredura, e de não ser necessária a adição de uma grande quantidade de acidificante na água. Apesar de neste estudo o pH não apresentar influência, usualmente, ele é um parâmetro que afeta a separação enantiomérica, em razão de alterar a ionização do analito e/ou do seletor quiral, influenciando no equilíbrio de dissociação (Ali, 2020).

Outro CMP investigado foi a vazão da fase móvel, percebendo-se que a diminuição do fluxo impactava em uma melhora em todos os CQA, exceto tempo de análise, e que vazões acima de 0,5 mL/min não demonstravam efetividade, mas sim, decréscimo na qualidade do método. Quanto a avaliação da temperatura, constatou-

se que temperaturas a partir 38 °C promoviam um aumento na resolução, nos pratos teóricos e uma diminuição no tempo total de análise.

A partir dos resultados obtidos na etapa de varredura, foram selecionados, em faixas mais estreitas, três CMP (percentual de ACN, vazão e temperatura) para avaliação na fase de otimização do método. Através da otimização do método obteve-se um *Design Space* e as condições finais selecionadas foram: fase móvel constituída de mistura de acetonitrila e água (92:8) pH 4,5, com um fluxo de 0,35 mL/min, na temperatura de 40 °C e apresentando um tempo total de análise de 12 minutos (Figure 3 – Capítulo 1).

Posteriormente, foi realizada a validação do método analítico, iniciada através da determinação dos limites de detecção e quantificação de S-RIV e R-RIV, determinados experimentalmente. Como comentado anteriormente, foram encontrados dois estudos relacionados à separação quiral da rivaroxabana, sendo o primeiro um estudo que utilizou a técnica de fase normal (Prabhune, 2015), obtendo valores de LOD e LOQ para R-Rivaroxabana de 0,025 µg/mL e 0,075 µg/mL, respectivamente, e o segundo um trabalho que utilizou fase reversa e espectrometria de massas para avaliação da R-RIV em plasma (Chen, 2019) apresentou LOD de 0,39 ng/mL e LOQ de 1,3 ng/mL, demonstrando alta sensibilidade em função da técnica utilizada. Ainda que os valores encontrados neste trabalho sejam superiores, em comparação aos dos dois estudos, eles demonstram ser adequados, e abrangem os limites para impurezas reportados pelo ICH (ICH, 2006). Os valores obtidos de LOD e LOQ para S-RIV neste estudo foram 0,20 µg/mL e 0,68 µg/mL, respectivamente.

Quanto a seletividade, o método não apresentou nenhum interferente próximo aos tempos de retenção dos analitos em análise (Figure 4 – Capítulo 1), sendo considerado seletivo.

Para a linearidade foram estudadas três curvas padrão obtidas a partir de soluções estoque em seis níveis diferentes, para cada enantiômero, abrangendo a faixa de concentração de 1 a 10 µg/mL para R-RIV e de 10 a 100 µg/mL para S-RIV. Os valores de coeficiente de correlação (r) foram 0,999 para R-RIV e 0,998 para S-RIV, os dois valores próximos a unidade, apresentando-se de acordo com o estipulado na RDC nº 166 de 2017. Para o coeficiente de determinação (R^2) o valor encontrado foi de 0,997 para ambos. Foi realizada a análise de regressão avaliada pela análise de variância (ANOVA), obtendo-se um valor de $F = 6097,01$ para R-RIV e de $F =$

5247,98 para S-RIV, confirmando que os valores obtidos correspondem a uma regressão linear nos dois casos ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, $p < 0,05$), confirmando a linearidade do método. Também foi realizada a análise de resíduos, os quais demonstraram homoscedasticidade e normalidade através do teste de Shapiro-Wilk.

Com relação a precisão, a repetibilidade foi avaliada contemplando seis amostras independentes com concentrações de 3 µg/mL para R-RIV e 30 µg/mL para S-RIV, e a precisão intermediária foi estudada através de três dias distintos. Os valores de desvio padrão relativo (DPR), tanto na precisão intra-dia quanto inter-dia, obtidos para os dois compostos foram todos abaixo de 2%. O teor médio encontrado para R-RIV e S-RIV foi de 98,42 e 100,53%, respectivamente.

Nas normativas tanto da ANVISA quanto do ICH (Brasil, 2017; ICH, 2005) está descrito que a avaliação de exatidão em insumo farmacêutico ativo (IFA) é feita através da aplicação do método proposto em substância de pureza conhecida (SQR) e que o resultado deve ser comparado com aqueles resultantes da aplicação de um segundo método validado, ou pelo teste de recuperação no caso de analitos em matriz complexa. Como não havia a possibilidade de comparação com outro método, por este não existir, e a avaliação era de IFA não sendo considerado analito em matriz complexa, a avaliação da exatidão foi feita através do erro relativo. O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) possui um documento de orientação sobre a validação de métodos analíticos (INMETRO, 2010), e nele está descrito que uma das maneiras possíveis para avaliar a exatidão de um método é através do erro relativo, o qual é obtido através da comparação do valor obtido experimentalmente com o valor verdadeiro, que seria o valor certificado do material de referência certificado (MRC), o que corresponderia a SQR. Os valores certificados, segundo o fabricante, para as SQR de R-RIV e S-RIV são 99,88 e 99,63%, respectivamente. A exatidão foi estudada em três níveis de concentração para cada analito, sendo elas baixa (R-RIV 2,4 µg/mL; S-RIV 24 µg/mL), média (R-RIV 3,0 µg/mL; S-RIV 30 µg/mL) e alta (R-RIV 3,6 µg/mL; S-RIV 36 µg/mL), os resultados encontrados para teor foram todos acima de 99% e os erros relativos abaixo de 1, para ambos, demonstrando a exatidão do método.

A robustez foi avaliada durante a fase de desenvolvimento do método através da implementação do QbD, com o qual foi possível avaliar como as variações em faixa de pH, proporção de fase móvel orgânica, temperatura, entre outras, impactavam

significativamente ou não nos parâmetros de adequabilidade do sistema, em conformidade com o que está descrito no guia Q2 (R1) – Validation of Analytical Procedures (ICH, 2005).

Após a validação do método analítico, o mesmo foi utilizado para avaliação da presença da impureza R-RIV em medicamentos disponíveis no mercado, sendo eles dois medicamentos similares, um genérico e o medicamento referência. Para cada medicamento foi feito um homogeneizado de 10 comprimidos, e a partir deste, a preparação de uma solução estoque. As análises foram realizadas com amostras compreendendo concentrações de 500 até 1000 µg/mL, considerando-se 1000 µg/mL a concentração máxima, pois caso nessa concentração fosse identificada a impureza, ela estaria dentro do limite para identificação estipulado, sendo ele 0,10% (ICH, 2006), e o método proposto seria capaz de identificar e quantificá-la. Nenhum dos medicamentos avaliados apresentou presença da impureza quiral em sua composição (Figure 5 – Capítulo 1), estando em conformidade com o guia mencionado.

O medicamento referência foi adquirido não apenas para esta análise, mas também, para realização de mais uma avaliação de exatidão do método. Em relação a impurezas, a ANVISA e o ICH (Brasil, 2017; ICH, 2005) sugerem que seja feito o teste de recuperação, ou seja, utilização de amostra com adição de quantidades conhecidas de impureza para avaliação. Em termos de concentração foram selecionadas as mesmas utilizadas na etapa anterior de exatidão, a qual avaliava o erro relativo. Apesar desta avaliação ser exigida apenas para a impureza quiral, o teste também foi aplicado a S-RIV, visto que possuímos tanto a SQR quanto a amostra (medicamento comercial). A R-RIV apresentou um teor médio de 100,01% e um DPR de 0,82%, enquanto para S-RIV os valores obtidos de teor médio e DPR, respectivamente, foram 99,95% e 1,70%, constatando novamente a exatidão do método (Table 5 – Capítulo 1).

1. CONCLUSÕES

- Foi possível desenvolver e validar um método analítico para avaliação da rivaroxabana e sua impureza quiral;
- A implementação do QbD na etapa de desenvolvimento proporcionou um maior conhecimento sobre o método, auxiliando na obtenção das melhores condições e garantindo a obtenção de respostas confiáveis e reprodutíveis;
- O método proposto demonstrou ser de fácil execução, confiável e adequado para sua finalidade;
- O trabalho apresenta relevante contribuição para metodologias analíticas quirais e na avaliação de impurezas em preparações farmacêuticas contendo Rivaroxabana;
- Concomitantemente a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias, é necessário também um aumento de estudos com enfoque na avaliação toxicológica destas impurezas, tendo este trabalho como próxima perspectiva a análise toxicológica da impureza quiral (R)-Rivaroxabana.

2. REFERÊNCIAS

AFONSO, A.; MARQUES, G.; GONÇALVES, A.; BARROSO, P.; GONZALES, A.; RODRIGUES, H.; FERREIRA, M.J. A terapêutica antitrombótica: atual e em desenvolvimento. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, v. 12, n. 3, p. 170-179, 2016.

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

ALI, I.; SUHAIL, M.; ASNIN, L.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Effect of Various Parameters and Mechanism of Reversal Order of Elution in Chiral HPLC. **Current Analytical Chemistry**, v. 16, p. 59-78, 2020.

AROUS B.; AL-MARDINI, M.A.; KARABET, F.; DAGHESTANI, M.; AL-LAHHAM, F.; AL-ASKAR, A. Development and validation of a liquid chromatography method for the analysis of rivaroxaban and determination of its production related impurities. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 52, n. 5, p. 483-490, 2018.

ASHTON, V.; KEROLUS-GEORGI, S.; T.MOORE, K. The Pharmacology, Efficacy, and Safety of Rivaroxaban in Renally Impaired Patient Populations. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1010-1026, 2021.

BARBOSA JUNIOR, A.; FARIA, L.S.P; GLORIA, L.F.P; SILVA, G.V.S.; OLIVEIRA, P.H.R.; ARAUJO, F.V.; PESSANHA, F.E.B. Embolia pulmonar aguda extensa como complicação de COVID-19 oligossintomática: relato de caso. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 20, p. 1-5, 2021.

BASTOGNE, T.; CAPUTO, F.; PRINA-MELLO, A.; BORGOS, S.; BARBERI-HEYOB, M. A state of the art in analytical-quality-by-design and perspectives in characterization of nano-enabled medicinal products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 219, 114911, 2022.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P. Análise Enantioseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.

Química Nova, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

BOUSSÈS, C.; FERREY, L.; VEDRINES, E.; GAUDIN, K. Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 114-122, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 166, de 24 de julho de 2017, Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia nº 10/2017 - Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica, 2017.

BREITKREITZ, M. Analytical Quality by Design. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 8, n. 32, p. 1-5, 2021.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CASS, Q.B.; CASSIANO, N.M.; LOURENÇO, T.C. Fases Estacionárias Quirais para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.

CAVAZZINI, A.; PASTI, L.; MASSI, A.; MARCHETTI, N.; DONDI, F. Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, p. 205-222, 2011.

CHANKVETADZE, B.; FARKAS, T.; JIBUTI, G.; BERIDZE, N.; DOLIDZE, G.; CHELIDZE, A.; KOBIDZE, G.; MATARASHVILI, I. The effect of temperature on the separation of enantiomers with coated and covalently immobilized polysaccharide-

based chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1599, p. 172-179, 2019.

ÇELEBIER, M.; REÇBER, T.; KOÇAK, E.; ALTINÖZ, S. RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 359-366, 2013.

CHEN, F.; MA, X.; CHEN, C.; LI, K.; CHEN, S.; WEN, H.; GONG, P. A Validated Chiral RP-UPLC-MS/MS Method for the Enantiomeric Detection of Rivaroxaban *In vitro*. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 305-311, 2019.

COHEN, A.T.; BAUERSACHS, R. Rivaroxaban and the EINSTEIN clinical trial programme. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 30, n.3, p. 85-95, 2019.

COLLEONI, J.L; RIBEIRO, F. N.; MOS, P. A. C.; REIS, J. P.; OLIVEIRA, H. R.; MIURA, B. K. Profilaxia do tromboembolismo venoso após artroplastia total de joelho: aspirina vs. rivaroxabana. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 53, n.1, p. 22-27, 2018.

DEBRUS, B.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S. Improved quality-by-design compliant methodology for method development in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 215-223, 2013.

DEIDDA, R.; ORLANDINI, S.; HUBERT, P.; HUBERT, C. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 161, p.110-121, 2018.

DRABINA, P.; FEIXOVÁ, V.; MILOS, S. New synthetic strategy for preparation of the anticoagulant drug rivaroxaban via an asymmetric Henry reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 2, p. 99-101, 2019.

FATTAH, T.A.; SAEED, A. A review on the synthetic approaches of rivaroxaban: an anticoagulant drug. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 28, n. 170, p. 485-504, 2017.

FERNANDES, C.J.C.S.; JUNIOR, J.L.A.; GAVILANES, F.; PRADA, L.F.; MONAGA, L.K.; SOUZA, R. Os novos anticoagulantes no tratamento do tromboembolismo venoso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.42, n.2, 2016.

GALEGO, G.N.; SILVEIRA, P.G.; FRANKLIN, R.N.; BORTOLUZZI, C.T.; ELI, E.S.; BROERING, J.J. O uso da rivaroxabana como monoterapia no tratamento do tromboembolismo venoso baseado em evidências. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 46, n. 2, p. 124-132, 2017.

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

GÖRÖG, S. Identification in drug quality control and drug research. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 114-122, 2015.

GOUVEIA, F.; BICKER, J.; GONÇALVES, J.; ALVES, G.; FALCÃO, A.; FORTUNA, A. Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1076, p. 18-31, 2019.

GRILLO, T.A.; MIRANDA, R.C. Os novos anticoagulantes orais na prática clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, n. 8, p. 87-95, 2014.

HANCU, G.; LUPU, D.; MILAN, A.; BUDAU, M.; BARABAS-HAJDU, E. Enantioselective analysis of venlafaxine and its active metabolites, a review on the separation methodologies. **Biomedical Chromatography**, v. 4874, 2020.

HEYDEN, Y.V.; MANGELINGS, D.; YOUNES, A.A. Chiral separations in reversed-phase liquid chromatography: Evaluation of several polysaccharide-based

chiral stationary phases for a separation strategy update. **Journal of Chromatography A**, v. 1269, p. 154-167, 2012.

HORDERN, B.K. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. **Chemical Society Reviews**, v. 11, 2010.

HUBERT, C.; LEBRUN, P. HOUARI, S.; ZIEMONS, E.; ROZET, E.; HUBERT, P. Improvement of a stability-indicating method by Quality-by-Design versus Quality- by-Testing: A case of a learning process. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 401-409, 2014.

ICH; International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, 2005.

ICH; International Conference on Harmonization. Harmonized Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances – Q3A (R2), In: Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use, 2006.

ICH; International Conference on Harmonization. Harmonized Tripartite Guideline, Pharmaceutical development Q8(R2), In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009.

INMETRO; Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos – DOC-CGCRE-008, 2010.

JANSSEN PHARMACEUTICAL, INC. Xarelto information for US healthcare professionals Disponível em: <https://www.xareltohcp.com>.

JEBALIYA, H.; DABHI, B.; PATEL, M.; JADEJA, Y.; SHAH, A. Stress study and

estimation of a potent anticoagulant drug rivaroxaban by a validated HPLC method: Technology transfer to UPLC. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 10, p. 65-74, 2015.

KREUTZ, R. Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 26, p. 27-32, 2012.

LAGOUTTE-RENOSI, J.; LE POUPON, J.; GIRARD, A.; MONTANGE, D.; DAVANI, S. A simple and fast HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, rivaroxaban in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 1000-1001, p. 43-49, 2018.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, n.2, p. 35-61, 2009.

LIMA, V.L.E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 657-663, 1997.

LOURENÇO, T.C.; CASSIANO, N.M.; CASS, Q.B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.

MEYER, M.S.; CONTANT, G.; SPIRO, T.E.; PERZBORN, E.; FLEM, L.L.; GUINET, C.; GOURMELLIN, G.; ROHDE, G.; MARTINOLI, J. Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. **Thrombosis Journal**, v.11, n.1, p. 1-7, 2013.

NAGPAL, S.; KARAN; UPADHYAY, A.; BHARDWAJ, T.R.; THAKKAR, A. A Review on Need and Importance of Impurity Profiling. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 1, p. 62-70, 2011.

NATH, D.; SHARMA, B. Impurity Profiling – A Significant Approach in Pharmaceuticals. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 15, p. 669-680, 2019.

PASQUINI, B.; ORLANDINI, S.; VILLAR-NAVARRO, M.; CAPRINI, C.; DEL BUBBA, M.; DOUSA, M.; GIUFFRIDA, A.; GOTTI, R.; FURLANETTO, S. Chiral capillary zone electrophoresis in enantioseparation and analysis of cinacalcet impurities: use of quality by design principles in method development. **Journal of Chromatography A**, v. 1568, p. 205-213, 2018.

PAUL, C. BABY, M.; ANTHRAPER, A.F.; KRISHNAKUMAR, K. NOACs: an emerging class of oral anticoagulants – a review article. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 95, 2020.

PIATI, P.K.; PERES, A.K.; ANDRADE, D.O.; JORGE, M.A.; TOREGANI, J.F. Análise do grau de recanalização da trombose venosa profunda: estudo comparativo de pacientes tratados com varfarina versus rivaroxabana. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.18, p. 1-6, 2019.

PRABHUNE, S.S.; DIGHE, V.; PRADHAN, N.S. Enantiomeric separation of rivaroxaban by a chiral liquid chromatographic method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 2, p. 399-402, 2015.

RAIKAR, P.; BANNIMATH, G. Recent Trends in Chiral Separation – A Collective Paradigm of Selected Chiral Impurities. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 456-473, 2020.

RAO, P.S.P.; CHOLLETI, V.K.; REDDY, V.R. Stability-indicating UPLC method for determining related substances and degradants in Rivaroxaban. **International Journal of Research in Pharmacy and Science**, v.5, n. 2, p. 17-24, 2015.

RAYALA, P.K.; KANDULA, J.S.; RADHAKRISHNANAND, P. Advances and challenges in the pharmacokinetics and bioanalysis of chiral drugs. **Chirality**, p. 1-13, 2022.

REÇBER, T.; HAZNEDAROGLU, I.C.; ÇELEBIER, M. Review on Characteristics and Analytical Methods of Rivaroxaban. *Critical Reviews in Analytical*

Chemistry, v. 52, n. 4, p. 865-877, 2020.

ROCHA, T.G.; GALENDE, S.B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 2, p. 97-103, 2014.

ROY, J. Pharmaceutical Impurities – A – Mini-Review. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2002.

SAHU, P.K.; RAMISETTI, N.R.; CECCHI, T.; SWAIN, S.; PATRO, C.S.; PANDA, J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 590-611, 2018.

SENGUPTA, P.; POKAR, D.; RAJPUT, N. Industrial approaches and consideration of clinical relevance in setting impurity level specification for drug substances and drug products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 576, 119018, 2020.

SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; FINDLAY J.W.A.; HILL, H.M.; HULSE, J.D.; MCGILVERAY, I.J. et al. Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. **Pharmaceutical Research**, v.17, n.12, p.1551-1557, 2000.

SILVESTRE, L.; MINISTRO, A.; EVANGELISTA, A.; PEDRO, L.M. Novos anticoagulantes orais no tromboembolismo venoso e fibrilação auricular. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, v.8, n.1, 2012.

SINGH, A.; AFREEN, S.; SINGH, D.P.; KUMAR, R. A review on pharmaceutical impurities and their importance. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1337-1354, 2017.

TEIXEIRA, J.; TIRITAN, M.E.; PINTO, M.M.M.; FERNANDES, C. Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography: Recent Developments. **Molecules**, v. 24, n. 5, 865, 2019.

TENGLI, A.K.; SURAJ, K.R.; AKSHAY, N.; NISHANTH G.; CHANDAN, R.S. A Review on Chiral Columns/Stationary Phases for HPLC. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 2466-2480, 2020.

TZANAVARAS, P.D. Recent Advances in the Analysis of Organic Impurities of Active Pharmaceutical Ingredients and Formulations: A Review. **Current Organic Chemistry**, v. 14, p. 2348-2364, 2010.

VARGESSON, N. Thalidomide – Induced Teratogenesis: History and Mechanisms. **Embryo Today: Reviews**, v. 5, n. 2, p. 140-156, 2015.

WALTER, M.E.; PEROBELLI, R.F.; MOTTA, L.G.J.; SILVEIRA, A.R.; XAVIER, B.; DALMORA, S.L. Micellar Electrokinetic Capillary Method for the Analysis of Rivaroxaban and its Correlation with RP-LC Method and Bioassay. **Current Analytical Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 379-385, 2017.

WINGERT, N.R.; DOS SANTOS, N.O.; CAMPANHARO, S.C.; JABLONSKI, A.; STEPPE, M. Quantitative Assessment of Poorly Soluble Anticoagulant Rivaroxaban by Microemulsion Electrokinetic Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 56, p. 650-655, 2018.

WU, L.; O'KANE, A.M.; PENG, H.; BI, Y.; MOTRIUK-SMITH, D.; REN, J. SARS-CoV-2 and cardiovascular complications: From molecular mechanisms to pharmaceutical management. **Biochemical Pharmacology**, v. 178, p. 5-11, 2020.

YU, L.W. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n.4, p. 781-791, 2008.

ZAGALO, D.M.; SILVA, B.M.A.; SILVA, C.; SIMÕES, S.; SOUSA, J.J. A quality by design (QbD) approach in pharmaceutical development of lipid-based nanosystems: A systematic review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 70, 103207, 2022.

ZHOU, L.; MAO, B.; REAMER, R.; NOVAK, T. GE, Z. Impurity profile tracking for active pharmaceutical ingredients: Case reports. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 421-429, 2007.