

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DA TIROFIBANA EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

Ana Laura Oviedo Bohrer¹

Fernanda Macke Hellwig²

Marcelo Donadel Malesuik³

Adriane Lettnin Roll Feijó⁴

Resumo:

As doenças cardiovasculares pertencem à classe de patologias relacionadas ao coração e vasos sanguíneos, atingindo cerca de 17,5 milhões de óbitos por ano no Brasil. Dentre os tratamentos de doenças coronarianas, pode-se optar pelos antiplaquetários, e uma opção de recurso terapêutico é o cloridrato de tirofibana, um medicamento não-peptídico intravenoso que mimetiza os sítios da sequência arginina-glicina-ácidoaspártico. O cloridrato de tirofibana foi lançado em 1998, pela Merck® e no mesmo ano se tornou o medicamento mais utilizado para doenças cardiovasculares. No Brasil é comercializado pelo nome de Agrastat®, dispensado na forma de solução injetável na concentração de 0,25 mg/mL. Sabendo da preocupação constante sobre a qualidade de medicamentos, foi desenvolvido método analítico, eficaz e confiável, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação do cloridrato de tirofibana, visto que não existe monografia para sua avaliação em compêndios oficiais. O trabalho visou encontrar condições cromatográficas satisfatórias para a determinação do cloridrato de tirofibana, a partir da diluição do fármaco Agrastat® em metanol para obter uma solução de trabalho na concentração de 50 µg/mL. O desenvolvimento da metodologia foi realizado em CLAE com detector DAD a 226 nm, utilizando coluna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) em temperatura ambiente, com fase móvel composta por trietilamina 0,1% acidificada e acetonitrila, em diferentes pH's e proporções. O pH da fase móvel foi acidificado com ácido fosfórico e testado nos valores de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0, sendo o resultado mais satisfatório obtido em pH 5,5. Os ensaios realizados com diferentes proporções de fase móvel foram compostos por 78:22, 75:25, 70:30 e 65:35, trietilamina 0,1%:acetonitrila, respectivamente. A melhor proporção foi em 75:25, apresentando ótima adequabilidade do sistema, com tempo de retenção 6,6 minutos, pratos teóricos de 9814 e simetria do pico igual a 1,0. O método foi otimizado e os resultados obtidos apresentam boas perspectivas para sua validação. No mesmo sentido, pretende-se evoluir os estudos e avaliar sua capacidade indicativa da estabilidade, bem como, seu emprego na determinação das principais impurezas de síntese da tirofibana.

Palavras-chave: tirofibana, qualidade, CLAE

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DA TIROFIBANA EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

¹ Aluno de graduação. albohrer09@gmail.com. Autor principal

² Técnico Administrativo em Educação. fernandahellwig@unipampa.edu.br. Co-autor

³ Docente. marcelomalesuik@unipampa.edu.br. Orientador

⁴ Aluno de pós-graduação. adrianefeijo@unipampa.edu.br. Co-orientador



DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DA TIROFIBANA EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares pertencem à classe de patologias ligadas ao coração e vasos sanguíneos, que podem desencadear complicações como enfarte no miocárdio ou acidente vascular cerebral. A incidência destas enfermidades pode estar relacionada à aterosclerose, pressão alta, diabetes mellitus, e ao estilo de vida das pessoas. Os fatores que agravam as doenças cardiovasculares são o fumo, álcool, sedentarismo, obesidade, dieta e alguns fatores hereditários (TOWNSEND et al., 2016).

Os antiplaquetários auxiliam a prevenir coágulos sanguíneos que podem acarretar nessas doenças coronarianas. Apesar de comprovada eficácia clínica, estes fármacos apresentam algumas limitações, como a inibição relativamente fraca da agregação plaquetária e a possibilidade de causar efeitos colaterais sistêmicos como úlceras pépticas que podem ser ocasionadas pela administração de aspirina, ou ainda à agranulocitose por vezes relacionada à administração da ticlopidina (GOMES et al., 2000). A fim de diminuir os efeitos colaterais e juntamente com a descoberta do receptor glicoproteína IIb/IIIa como via final da agregação plaquetária, iniciou-se a investigação de antagonistas terapêuticos para este sítio, como abciximab (anticorpo monoclonal), eptifibatide (heptapeptídeo sintético) e a tirofibana (não-peptídico intravenoso mimético dos sítios da sequência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD)) (ROCHA, 2001).

A tirofibana (figura 1) foi lançada em 1998 pela Merck, sendo aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) no mesmo ano e tornou-se o fármaco mais utilizado para síndromes coronarianas entre seu lançamento e o ano 2000 (KING et al., 2016). Em 2001 a tirofibana foi submetida à comparação de estudos com outros antiplaquetários o abciximab e verificou-se que era menos eficaz o que acarretou em diminuição de vendas. Novos estudos foram realizados com elevação de dose da tirofibana onde foi apurado que a inibição plaquetária tornara-se mais rápida, sendo novamente aprovada pela FDA em 2013 (NAZIF et al., 2014; NEY et al., 2011; MOLITERNO et al., 2011; OCHOA et al., 2015; STONE et al., 2007; TEBET et al., 2007; VALGIMIGLI et al., 2008; VALGIMIGLI et al., 2010; VALGIMIGLI et al., 2012; VALGIMIGLI et al., 2013).

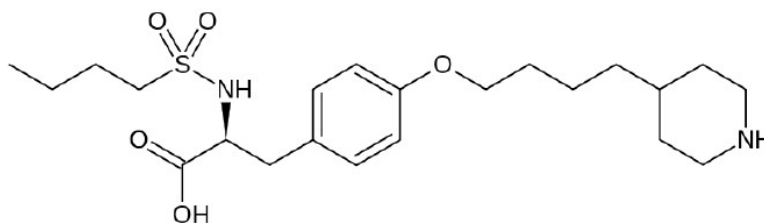


Figura 1. Estrutura química da tirofibana.

A tirofibana é apresentada como solução concentrada injetável em ampolas de 50 mL, sendo um medicamento de uso restritamente hospitalar (GOMES, et al., 2000). Atualmente, no Brasil, esse fármaco é comercializado com o nome de Agrastat[®] pela parceria entre as indústrias Aspen Pharma e Merck Sharp &Dohme.

Para avaliar a qualidade dos fármacos, métodos analíticos eficazes e confiáveis são utilizados, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que faz a separação de compostos químicos em solução. A aplicação de metodologia correta, bem como sua qualidade e acurácia estão sendo cada vez mais reconhecidas e exigidas. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreversíveis tornando-se imprescindível o desenvolvimento e validação de rotinas analíticas que garantam a qualidade e confiabilidade dos resultados e favoreçam sua implantação em comparação aos métodos usuais (ANVISA, 2004; LA ROCA, 2007).

Sabendo da crescente preocupação com a qualidade dos medicamentos, este trabalho se propôs a desenvolver um método analítico por CLAE para determinação de tirofibana em preparações farmacêuticas.

2. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizado o fármaco Agrastat[®] (cloridrato de tirofibana), na concentração de 0,25 mg/mL. A solução de trabalho foi obtida através da diluição de 1 mL do fármaco até 5 mL em metanol, obtendo concentração final de 50 µg/mL.

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando CLAE (UHPLC Ultimate 3000 ThermoScientific[®] com Software Chromeleon[™] 6.8 Chromatography Data System) com detecção por arranjo de diodos (DAD) a 226 nm, utilizando coluna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), em temperatura ambiente. Para adequação das condições cromatográficas utilizou-se fase móvel composta por uma mistura binária de solução aquosa de trietilamina 0,1%, acidificada com ácido fosfórico e acetonitrila, em diferentes proporções e pH da fase aquosa, fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

A variação do pH da porção aquosa da fase móvel contemplou diversas faixas entre os pH 3,0 e 6,0. Já a fase móvel foi testada sempre em fluxo isocrático, abrangendo as faixas compreendidas entre 65:35 e 78:22 (trietilamina 0,1%:acetonitrila).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Para a definição inicial da fase móvel a ser utilizada na quantificação de tirofibana foram testadas diferentes proporções e pH de fase móvel. O pH da porção aquosa foi ajustado com ácido fosfórico, para obtenção dos valores de pH 3,0; pH 4,0; pH 4,5; pH 5,0; pH 5,5 e pH 6,0, respectivamente. A influência do pH no tempo de retenção, bem como na adequabilidade do sistema, podem ser observados através da sobreposição dos cromatogramas ilustrados na figura 2.

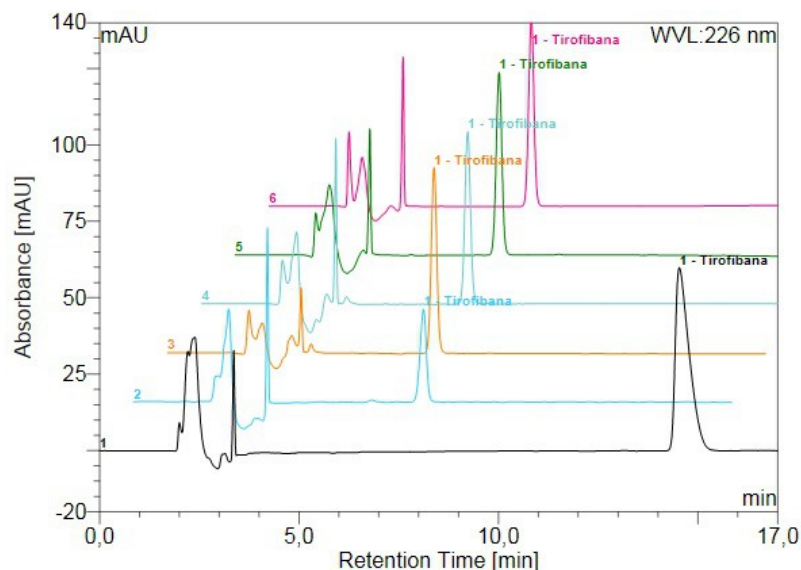


Figura 2. Cromatogramas da solução de tirofibana a 50µg/mL. Fase móvel composta portrietilamina 0,1 % acidificada em diferentes pH e acetonitrila (75:25). 1- pH 3,0; 2- pH 4,0; 3- pH 4,5; 4- pH 5,0; 5- pH 5,5 e 6- pH 6,0.

Os testes foram realizados em diferentes proporções de fase móvel, buscando a melhor adequabilidade do sistema. Observou-se que o tempo de retenção aumentou bruscamente em pH de 3,0 (15,1 minutos), apresentando simetria de 1,52. Ao elevar o pH da solução de trietilamina, ocorreu diminuição no tempo de retenção, apresentando os valores de 7,2 minutos para o pH 4,0; 6,7 minutos para o pH 4,5; 6,6 minutos para o pH 5,0 e pH 5,5; e 6,5 minutos para o pH 6,0. Foi possível também observar melhores simetrias associadas à elevação do pH, sendo de 0,93 para o pH 4,0; 0,99 à pH 4,5 e 1,0 para os demais pH mencionados.

As fases móveis majoritariamente aquosas são indicadas para compostos neutros, enquanto que para compostos ionizáveis como a tirofibana é preferível o uso combinado com uma fase orgânica e soluções com pH adequado, uma vez que estes mantêm o grau de ionização das moléculas e evitam os problemas de retenção secundária, responsáveis pela formação de picos com caudas. A variação do pH da fase móvel permitiu o ajuste do tempo de retenção da tirofibana e, conseqüentemente, a realização de corridas mais curtas (HARRIS, 2001).

Observou-se que o tempo de retenção é maior em pH ácido que em fases móveis com pH mais elevado, o que era esperado, pois, por se tratar de um ácido fraco, de pK_a 3,3, a tirofibana encontra-se predominantemente ionizada em valores de pH alcalinos e, desta forma, a interação do fármaco ionizado com a fase reversa é menor e o tempo de retenção provavelmente diminui. De modo contrário, valores de pH ácidos favorecem a forma molecular do fármaco e aumentam a afinidade do mesmo por colunas de fase reversa, elevando o tempo de retenção (HARRIS, 2001).

Além do pH da fração aquosa da fase móvel, a proporção de combinação com a acetonitrila também foi testada, conforme ilustrado na figura 3.

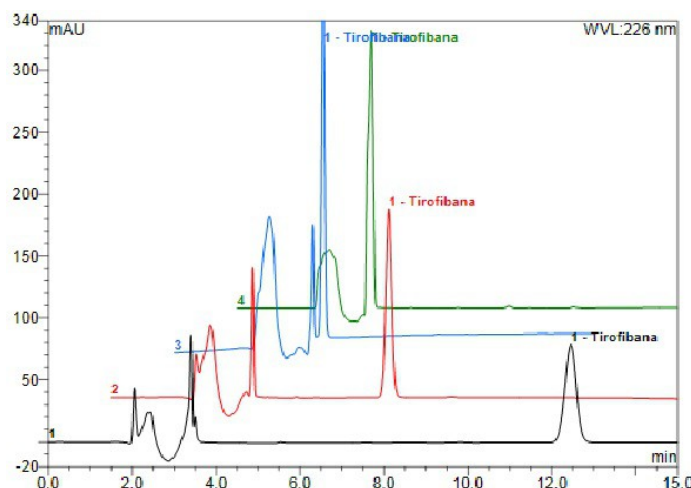


Figura 3. Cromatogramas da solução de tirofibana a 50µg/mL. Fase móvel composta por trietilamina 0,1% acidificada a pH 5,5 e ACN, nas proporções de: 1- 78:22; 2- 75:25; 3- 70:30 e 4- 65:35.

Embasando-se na figura 3, foi possível constatar que pequenas mudanças na proporção da fase móvel significaram grandes alterações no tempo de retenção. Pois enquanto que com a proporção de fase móvel 78:22, o tempo de retenção foi de 12,46 minutos, na proporção de 75:25, o tempo de retenção foi reduzido para 6,61 minutos. Na proporção de 70:30 o tempo de retenção obtido foi de 3,55 minutos e, na proporção de 65:35, o tempo de retenção do produto foi de 3,19 minutos, o que não apresentou eficiência nem satisfatoriedade em relação ao volume morto.

Por fim, as condições definidas foram: trietilamina 0,1% pH 5,5 (ajustado com ácido fosfórico) e acetonitrila, na proporção 75:25 e fluxo de 1,0 mL/min. Esta condição apresentou melhores resultados nos parâmetros de adequabilidade do sistema, como tempo de retenção de 6,6 minutos, número de pratos teóricos de 9814 e simetria do pico igual a unidade.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método foi otimizado e os resultados obtidos apresentam boas perspectivas para sua validação. No mesmo sentido, pretende-se evoluir os estudos e avaliar sua capacidade indicativa da estabilidade, bem como, seu emprego na determinação das principais impurezas de síntese da tirofibana.

5. REFERÊNCIAS

ANVISA ,Política vigente para a regulamentação de medicamentos no Brasil, Editora Comin/Anvisa, 2004.

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

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

LA ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; NETO, P. J. R., Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos, Revista Brasileira de Farmácia, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

MOLITERNO, D. J. A randomized two-by-two comparison of high-dose bolus tirofiban versus abciximab and unfractionated heparin versus bivalirudin during percutaneous coronary revascularization and stent placement: the tirofiban evaluation of novel dosing

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

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

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

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

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

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

TOWNSEND, N. et al. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016.

European Heart Journal.v.1 p. 1-14, 2016.

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

VALGIMIGLI, M. et al., Tirofiban as adjunctive therapy for acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention: a metaanalysis of randomized trials. European Heart Journal. v. 31 n.1 p. 35-49, 2010.

VALGIMIGLI, M. et al., Prasugrel versus tirofiban bolus with or without short post-bolus infusion with or without contaminant prasugrel administration in patients with myocardial infarction undergoing coronary stenting. Cardiovascular Interventions. v. 5 n.2 p. 268-278, 2012.

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