

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE TIROFIBANA E IMPUREZAS DE SÍNTESE

Adriane Feijo¹

Fernanda Macke Hellwig²

Marcelo Donadel Malesuik³

Resumo:

As doenças cardiovasculares figuram entre as principais causas de mortalidade mundial, sendo responsáveis por 17,3 milhões de óbitos anuais. Uma das formas de tratamento destas doenças é através da administração de antiplaquetários. A tirofibana é um fármaco antiplaquetário que atua no final da cascata de coagulação, especificamente como antagonista dos receptores da glicoproteína IIb/IIIa, sendo o fármaco desta categoria mais utilizado mundialmente. Considerando que os fármacos utilizados no processo de produção das formulações farmacêuticas não são totalmente puros, guias regulatórios descrevem a necessidade de sua determinação e avaliação do perfil de impurezas presentes. Neste contexto, buscou-se desenvolver metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de tirofibana e duas de suas impurezas de síntese, a impureza A e impureza C. Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizada vazão de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL, diferentes colunas de fase reversa C18 e diferentes proporções de fase móvel, sendo estas compostas de uma fração aquosa de trietilamina 0,1%, acidificada com ácido fosfórico em diferentes pH (entre 3,0 e 6,0) e outra fração acetonitrílica, em proporções entre 50:50 e 90:10. A coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) apresentou maior eficiência na separação dos compostos. Dentre as condições testadas, a utilização da fase móvel trietilamina 0,1% pH 5,5 e acetonitrila, na proporção 75:25 apresentou melhores resultados nos parâmetros de adequabilidade do sistema para o cloridrato de tirofibana, no entanto, a impureza A apresentou baixo fator de capacidade, e a impureza C, tempo de retenção excessivamente longo. Sendo assim, optou-se por eluição em gradiente com variações nas proporções de fase móvel. A condição que se apresentou adequada foi trietilamina 0,1% pH 5,5 e acetonitrila 78:22 entre 0,0 e 2,5 minutos, passando para 75:25 até os 6,0 minutos, 65:35 até os 17,0 minutos e retornando à proporção inicial dos 17 aos 20 minutos. Na avaliação da performance do sistema cromatográfico foi possível verificar que o pico do fármaco e das impurezas apresentaram simetria (próximo a 1), resolução (> 2) e elevado número de pratos teóricos (> 2000), conforme preconizado na literatura. O perfil cromatográfico desenvolvido mostrou-se adequado para análise de cloridrato de tirofibana, na presença das impurezas A e C, com parâmetros de adequabilidade do sistema satisfatórios. Os resultados obtidos para o método desenvolvido apresentam ótimas perspectivas para o emprego no controle de qualidade de rotina do

fármaco.

Palavras-chave: Agrastat, Cromatografia líquida de alta eficiência, tirofibana, impureza

Modalidade de Participação: Pesquisador

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE TIROFIBANA E IMPUREZAS DE SÍNTESE

¹ Técnico Administrativo em Educação. adrianeifeijo@unipampa.edu.br. Autor principal

² Técnico Administrativo em Educação. fernandamacke@gmail.com. Co-autor

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

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE TIROFIBANA E IMPUREZAS DE SÍNTESE

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de mortalidade no mundo, sendo responsáveis por 17,3 milhões de mortes por ano (TOWNSEND et al., 2016). No Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia, as doenças cardiovasculares são as que mais matam no país, com registros de cerca de 350 mil óbitos anuais. As disfunções mais comuns são o infarto do miocárdio, a insuficiência cardíaca e o acidente vascular encefálico (AVE) (LORGA FILHO et al., 2016).

Uma das formas de tratamento destas doenças é através da administração de antiplaquetários. A tirofibana é um fármaco antiplaquetário inibidor molecular não peptídico derivado da tirosina que inibe a agregação plaquetária no final da cascata de coagulação, especificamente como antagonista dos receptores da glicoproteína (GP) IIb/IIIa. É o inibidor desta GP mais utilizado mundialmente desde a aprovação de sua nova dosagem pela FDA em 2013, sob nome comercial de Agrastat® (KING et al., 2016).

Levando-se em conta que os fármacos utilizados no processo de produção das formulações farmacêuticas não são considerados totalmente puros, os guias regulatórios descrevem a necessidade da caracterização e avaliação do perfil de impurezas presentes no fármaco ou no produto farmacêutico por meio do desenvolvimento de métodos analíticos. Atualmente é observada uma escassez de trabalhos sobre a determinação do cloridrato de tirofibana na presença de impurezas de síntese e produtos de degradação. El-Bagary e colaboradores (2018) desenvolveram metodologia para análise do fármaco na presença da tirosina, todavia, faz-se necessário método analítico capaz de determinar diferentes impurezas, já que diferentes rotas sintéticas para a concepção de um mesmo fármaco podem gerar impurezas distintas (NG; LUNN; FAUSTINO, 2007). Além disso, são necessários métodos que possam avaliar o cloridrato de tirofibana na presença de seus produtos de degradação, que também são impurezas, mas obtidas da decomposição do fármaco.

Considerando o exposto, o presente trabalho buscou desenvolver metodologia analítica indicativa da estabilidade por CLAE para determinação de tirofibana e duas de suas principais impurezas de síntese, a impureza A e impureza C.

2 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Thermo Scientific Ultimate 3000 (Dionex), acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD). A vazão utilizada foi 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A aquisição e análise de dados foi realizada pelo software Chromeleon versão 6.8 (Dionex, Thermo Fisher Scientific Inc.). A determinação do comprimento de onda foi realizada mediante varredura espectral, na região do ultravioleta, utilizando o DAD.

Durante a etapa de otimização da metodologia utilizou-se diferentes colunas de fase reversa C18 (50 x 2,1 mm, 3 µm e 250 x 4,6 mm, 5 µm) a temperatura ambiente. Foram experimentadas ainda diferentes proporções de fase móvel, sendo estas compostas de uma fração aquosa de trietilamina 0,1%, acidificada com ácido fosfórico em diferentes pH, e uma fração orgânica composta por acetonitrila grau HPLC. A fase móvel foi filtrada com membrana 0,45 µm e sonicada por 15 minutos para degaseificação.

Foram preparadas soluções mãe do cloridrato de tirofibana e das impurezas A e C, nas concentrações de 580 µg/mL, 240 µg/mL e 280 µg/mL, respectivamente, mediante solubilização do pó dos padrões analíticos em metanol, com o auxílio de sonicação por 5 minutos. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e mantidos sob refrigeração.

Para preparar as soluções de trabalho, as soluções mãe foram diluídas em metanol para obtenção das concentrações de 200 µg/mL para o cloridrato de tirofibana e 10 µg/mL para as

impurezas. A solução de trabalho da amostra comercial foi preparada mediante a diluição do Agrastat[®] em metanol para obtenção da concentração de 200 µg/mL. As amostras foram filtradas com filtro de seringa de nylon (0,45 µm; 13 mm) antes da injeção no cromatógrafo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a varredura espectral para o cloridrato de tirofibana, o medicamento Agrastat[®] e para as impurezas, sendo que os máximos de absorção encontrados foram muito próximos entre as amostras. O fármaco e a amostra comercial apresentaram os mesmo máximos de absorção, em 226 e 276 nm. A impureza A apresentou em 224 e 276 e a impureza C em 226 e 255 nm. Neste contexto, o comprimento de onda selecionado para o desenvolvimento da metodologia foi de 226 nm.

Considerando a necessidade de ensaios rápidos e eficientes, optou-se pela utilização de coluna cromatográfica com menor tamanho de partícula, visando elevar a eficiência de separação (C₁₈ de 50 x 2,1 mm, 3µm; Agela Technologies, Venusil ASB).

A composição da fase móvel foi avaliada em diferentes proporções de aquoso e orgânico, compreendidas entre 50:50 e 90:10 (v/v), respectivamente. A fração aquosa foi acidificada com ácido fosfórico para obtenção de soluções com pH compreendido entre 2,3 e 5,0. O fluxo foi isocrático (1 mL/min) e o volume de injeção foi de 20 µL. Porém, nestas condições não foi possível obter uma condição cromatográfica com resultados aceitáveis para os parâmetros de adequabilidade do sistema, sendo necessário readequar a metodologia.

A coluna foi substituída por uma C₁₈ com maiores dimensões (250 x 4,6 mm, 5 µm; Agela Technologies, Promosil C18) e as condições da fase móvel também foram readequadas, modificando-se sua composição e ampliando-se a faixa de pH estudado (2,5 e 6,0). A proporção entre trietilamina 0,1% acidificada e acetonitrila foi restringida para a faixa entre 65:35 e 75:25 (v/v).

As alterações propostas permitiram melhor interação do fármaco com a coluna e a fase móvel, proporcionando maior tempo de retenção. Pequenas alterações na proporção da fase móvel proporcionaram mudanças bruscas no tempo de retenção, um fator incomum, não relatado na bibliografia estudada. Na proporção de fase móvel 78:22 o tempo de retenção foi de 12,46 min. A redução de apenas 3,0% da fração aquosa (proporção de 75:25) reduziu o tempo de retenção para praticamente a metade (6,61 min). Na proporção de 70:30, com redução de 5,0% da fração aquosa, o tempo de retenção obtido novamente reduziu à metade, apresentando o pico em 3,55 min. Já na proporção de 65:35, novamente redução de 5,0% da fração aquosa, o tempo de retenção apresentou menor oscilação (3,19 min), porém esta condição não apresentou eficiência cromatográfica.

A variação em relação ao tempo de retenção pode ocorrer devido ao caráter da mistura água acidificada e acetonitrila, associada a capacidade de ionização do analito. Quando isolada, o caráter prótico e polar da água (um forte doador de ligações de hidrogênio) é amplificado ao ser acidificada, apresentando maior tendência de doar H ao soluto, enquanto que o solvente acetonitrila (caráter menos polar que a água, mas que apresenta H alcano de hibridização) possui capacidade de receber H do soluto (ANAIA, 2014).

Quando em mistura, água e acetonitrila apresentam caráter moderadamente básico, pelos pares elétricos isolados de ambos constituintes, favorecem que a mistura doe H para o soluto. Esta capacidade sofre grande variação de acordo com a proporção da mistura, com elevação da constante dielétrica na medida em que a fração aquosa é elevada, e da camada de solvatação, sendo amplificada pela acidificação do meio. Estas reações não se limitam a interação solvente/solvente, estendem-se a ligação química com a molécula. A mistura água/acetonitrila é microscopicamente heterogênea e apresenta interação inferior à interação entre agrupamentos de moléculas com acetonitrila (ANAIA, 2014).

Quando a molécula analisada apresenta baixa ionização, a proporção da fase móvel composta por água/acetonitrila apresenta menor interferência, visto que há menor interação

molécula/acetonitrila, favorecendo o equilíbrio solvente-solvente, pela solubilidade de Hildebrand, definida pela energia requerida para separar as moléculas do solvente entre si (ANAIA, 2014).

A tirofibana é um ácido fraco e se encontra majoritariamente ionizada, com dependência do pH do meio (O'NEIL, et al., 2013). Apresenta em sua estrutura molecular amina primária e ácido carboxílico que favorece a protonação e subsequente liberação de hidrogênio para o meio. Associando esta característica à capacidade da mistura na fase móvel utilizada em receber hidrogênio, sugere-se uma variação na capacidade de solvatação entre a mistura (microscopicamente heterogênea) constituinte da fase móvel. A interação com acetonitrila é favorecida pela força da ligação acetonitrila/molécula apresentando maior interação com a fase móvel, diminuindo o tempo de retenção, em outro momento, a interação com a fase aquosa é favorecida elevando o tempo de retenção. A camada de solvatação da fase aquosa é amplificada quando acidificada, estendendo ainda mais o tempo de retenção, devido a interação da fase molecular não dissociada da tirofibana e a cadeia da fase estacionária.

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 (HARRIS, 2012).

O pH da fase móvel aquosa também demonstrou influência sobre o tempo de retenção do cloridrato de tirofibana. 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 3,0; 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.

A variação do pH da fase móvel permitiu o ajuste do tempo de retenção da tirofibana e, conseqüentemente, a realização de corridas mais curtas. 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 (pK_a 3,3) a tirofibana encontra-se predominantemente ionizado 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.

As metodologias analíticas desenvolvidas para análise do cloridrato de tirofibana em forma farmacêutica descritas na literatura relatam, sem exceção, o controle do pH utilizado na fase móvel, sendo em sua maioria ácidos, com pH 2,3 (BERGQUIST et al., 1999; GARABITO et al., 2001), pH 3,0 (NATARAJ et al., 2013; RANJITHA & RAO, 2011) e pH 5,0 (GANDHIMATHI et al., 2013).

Por apresentar menor variação no tempo de retenção, melhor simetria e para evitar pH próximo ao pK_a do fármaco, optou-se por trabalhar com o pH 5,5 na fase aquosa, visto que o pH da fase móvel pode deslocar o equilíbrio da ionização do soluto para sua forma molecular.

Dentre as condições testadas, a utilização da fase móvel trietilamina 0,1% pH 5,5 e acetonitrila, na proporção 75:25 sob fluxo de 1,0 mL/min apresentou melhores resultados nos parâmetros de adequabilidade do sistema, com tempo de retenção de 6,6 minutos e simetria do pico igual a unidade. Nestas condições, a impureza A apresentou tempo de retenção de 3,8 minutos, com baixo fator de capacidade. A impureza C apresentou tempo de retenção de 78 minutos, tempo excessivo para viabilizar a determinação destes compostos em uma rotina analítica. Sendo assim, iniciou-se o desenvolvimento de metodologia com emprego de gradiente.

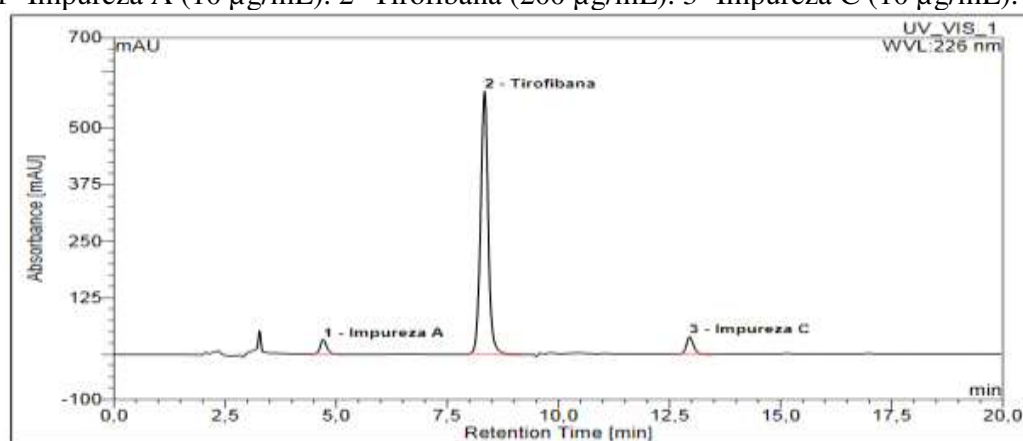
O emprego de gradiente possibilita obter uma metodologia com boa resolução entre os compostos analisados, com tempo de corrida inferior, quando comparado com a eluição

isocrática. Para eluição das substâncias por gradiente deve ser levado em consideração o tempo de residência da fase móvel que resulta em variações nos tempos de retenção, que pode comprometer a resolução no sinal das alterações dos teores dos constituintes da fase móvel. Visando minimizar o efeito da transição durante a eluição foi realizado um branco, utilizando o solvente diluente do padrão (metanol), para desconto da linha de base.

Para o desenvolvimento do método foram mantidas as variáveis de tipo de coluna, fluxo, volume de injeção e detecção já estipulados. Foram estudados gradientes com variações nas proporções de fase móvel, com alteração em diferentes tempos de corridas, visando obter uma condição que permitisse a detecção da tirofibana e suas impurezas, com adequabilidade do sistema, em um tempo de corrida que permitisse aplicação em rotinas analíticas.

Sendo assim, a condição do gradiente mais adequado foi com a proporção de trietilamina 0,1% pH 5,5 e acetonitrila em 78:22 entre 0,0 e 2,5 minutos, passando para 75:25 até os 6,0 minutos, 65:35 até os 17,0 minutos e retornando à proporção inicial até os 20 minutos. O cromatograma obtido a partir destas condições está ilustrado na figura 1.

Figura 1. Cromatograma do método desenvolvido para análise de cloridrato de tirofibana e impurezas. Picos: 1- Impureza A (10 µg/mL). 2- Tirofibana (200 µg/mL). 3- Impureza C (10 µg/mL).



Fonte: do autor, 2018.

A eluição do cloridrato de tirofibana (padrão) coincidiu com o tempo de retenção apresentado para a formulação comercial Agrastat[®], sendo assim, a metodologia desenvolvida permite identificar o cloridrato de tirofibana na forma farmacêutica, demonstrando adequabilidade da metodologia.

A literatura preconiza a verificação dos parâmetros de adequabilidade do sistema após o desenvolvimento e otimização de um método analítico, para posteriormente realizar a validação do mesmo (BRASIL, 2017). Na avaliação da performance do sistema cromatográfico foi possível verificar que o pico do fármaco e das impurezas apresentaram simetria (próximo a 1), resolução (> 2) e elevado número de pratos teóricos (> 2000), conforme preconizado na literatura (ERMER e MILLER, 2005).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O perfil cromatográfico desenvolvido mostrou-se adequado para análise de cloridrato de tirofibana, na presença das impurezas A e C, com parâmetros de adequabilidade do sistema satisfatórios. Os resultados obtidos para o método desenvolvido apresentam ótimas perspectivas para o emprego no controle de qualidade de rotina do fármaco.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPERGS e CNPq pelo auxílio financeiro (Edital ARD/PPP/FAPERGS/CNPq – processo 16/2551-0000185-5) e à Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda pela doação das amostras de Agrastat[®].

6 REFERÊNCIAS

- ANAIA, G.C. **Determinação multirresidual de pesticidas por HPLC no contexto de exposição ocupacional**. Tese (Doutorado em Química Analítica)- Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2014.
- BERGQUIST, P.A.; HUNKE, W. A.; MANAS, D.; et al.. Compatibility of tirofiban HCl with dopamine HCl, famotidine, sodium heparin, lidocaine HCl and potassium chloride during Y-site administration. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v.24 p.125-132, 1999.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2017.
- EL-BAGARY, R. I.; ELKADY, E. F.; FARID, N. A.; YOUSSEF, N. F. Stability study and validated reversed phase liquid chromatographic method for the determination of tirofiban hydrochloride in presence of tyrosine as a process impurity. **Journal of the Chellean Chemical Society**.v.63, n.2, 2018.
- ERMER J.; MILLER J.H. McB. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. A Guide to Best Practice. Eds. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
- GARABITO, M. J.; JIMENEZ, L.; BAUTISTA, F. J.; et al. Stability of tirofiban hydrochloride in 0,9% sodium chloride injection for 30 days. **América Journal Health-Syst Pharmaceutical**. v.58 p.1850-1852, 2001.
- GANDHIMATHI, M.; ATHOTI, S.T.; RAVI, T.K. Three newer methods for the estimation of tirofiban hydrochloride from pharmaceutical formulation. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 9310-9315, 2013.
- HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2012.
- KING, S.; SHORT, M.; HARMON, C. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: The resurgence of tirofiban, **Vascular Pharmacology**, v. 78, p. 10-16, 2016.
- LORGA FILHO, A. M.; AZMUS, A. D.; SOEIRO, A. M.; et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes brasileiras de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes em cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, n.3 p.1-116, 2013.
- NATARAJ, K.S.; SAI KUMAR, S.V.; KALYANI, N.V.V.S.; BADRU DUZA, M. Development and validation of a reverse phase high performance liquid chromatographic method for the estimation of tirofiban in pharmaceutical dosage forms, **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 200-203, 2013.
- NG L.; LUNN G.; FAUSTINO P. Organic impurities in drug substance: origin, control, and measurement. In: **Analysis of Drug Impurities**. SMITH R.J.; WEBB. M.L. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p 1 - 46.
- O'NEIL, M. J., ed. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**, 15th ed. New Jersey: Merck, 2013.
- RANJITHA, K. S.; RAO, A. L. Development and validation of new rp-hplc method for the determination of tirofiban in pharmaceutical formulation. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 1, p. 43-47, 2011.
- TOWNSEND, N.; WILSON, L.; BHATNAGAR, P.; et al. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. **European Heart Journal**. v.1 p. 1-14, 2016.