

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO AOS
ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO FÁRMACO
TICAGRELOR**

Danilo Rodrigues Cunha

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

Orientador(a): Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

Bolsista CNPQ

**São Carlos - SP
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Danilo Rodrigues Cunha, realizada em 31/08/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Luiza Gusmao Degani (EMS)

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

“A conquista é um acaso que talvez dependa mais das falhas dos vencidos do que do génio do vencedor”

Anne-Louise Germaine de Staël-Holstein

Dedico esse trabalho a meus Pais, Cecília e Joel

Ao meu irmão Lucas

Aos meus amigos e aos colaboradores que me ajudaram nessa jornada

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por sempre estar ao meu lado durante minha jornada.

Aos meus pais, Cecília e Joel pelo amor e por sempre me apoiarem em minhas escolhas e ao suporte nos momentos difíceis.

Ao meu irmão Lucas pelo companheirismo e amizade.

Aos meus familiares que sempre me apoiam e torcem por mim.

Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro pela oportunidade de realizar o mestrado, pela paciência, apoio técnico-científico e ensinamentos que ajudaram na minha formação profissional.

À Prof. Dr. Regina Vincenzi Oliveira e à aluna de pós-graduação Izadora Furlani pelo auxílio durante as etapas de LC-UV e LC-MS.

Aos membros do GQA por todo o auxílio e recepção que me foram proporcionados.

Aos membros do LABIE pela alegre convivência no laboratório e durante os cafezinhos.

A todos meus amigos, novos e de longa data, pela boa amizade e companheirismo que sempre me proporcionam.

Aos moradores e ex-moradores da República Irmãos do Joel por serem minha segunda família durante minha estadia em São Carlos.

Aos funcionários do departamento de química e da Universidade Federal de São Carlos

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa concedida.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina Difosfato

CCD – Central Composite Design (Planejamento de Composto Central

DoE – Design Of Experiments (Planejamento Experimental)

EDF – Ensaio de Degradação Forçada

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

HPLC-IT-MSⁿ - Liquid Chromatography Ion-Trap Multiple-Stage Mass Spectrometry
(Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada A Espectrometria De Massas
Com Analisador de Armadilha de Íons De Múltiplas Etapas)

HPLC-UV – High Performance Liquid Chromatography Ultraviolet detector
(Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de ultravioleta)

HR – Humidade Relativa

m/z – Razão massa/carga

pH – Potencial Hidrogeniônico

QbD – Quality by design

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SCA – Síndrome Coronária Aguda

TCGL – Ticagrelor

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Condições de degradação típicas	6
Tabela 2: Requisitos da ANVISA sobre a necessidade de notificação, identificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação	8
Tabela 3: Variáveis e níveis avaliados na degradação de TCGL sem irradiação UV	17
Tabela 4: Variáveis e níveis avaliados na degradação de TCGL com irradiação UV	18
Tabela 5: Matriz decodificada do planejamento experimental sem irradiação UV	20
Tabela 6: ANOVA.....	22
Tabela 7: ANOVA do modelo recalculado.....	23
Tabela 9: ANOVA do modelo recalculado (com experimentos 9 e 13 excluídos).....	25
Tabela 10: Matriz decodificada do planejamento experimental com irradiação UV	27
Tabela 11: Anova da regressão e equação da reta	27
Tabela 12. ANOVA do modelo sem os ensaios 26 e 27	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos experimentos em um domínio experimental para duas e três variáveis de um planejamento experimental fatorial de dois níveis com ponto central.....	10
Figura 2 - Distribuição dos experimentos em um domínio experimental para duas e três variáveis de um planejamento de composto central (CCD).	11
Figura 3 - Estrutura molecular do Ticagrelor e locais susceptíveis à processos de degradação.....	13
Figura 4 - Representação dos ensaios do planejamento experimental sem irradiação UV no espaço das variáveis.....	19
Figura 5 - Perfil cromatográfico dos ensaios 4,8,12,14,17, sem irradiação UV.....	21
Figura 6 - Gráfico de pareto dos efeitos das variáveis na degradação de TCGL.....	22
Figura 7 - Superfície do modelo para a degradação de TCGL sem irradiação UV	24
Figura 8 - Superfície empírica obtida por interpolação	24
Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do modelo sem os experimentos 9 e 13.....	25
Figura 10 - Representação dos ensaios do planejamento experimental com irradiação UV no espaço das variáveis.....	26
Figura 11 - Perfil cromatográfico dos ensaios 19,21,23,25 com irradiação UV.....	28
Figura 12 - Porcentagem de degradação obtida nos experimentos com irradiação UV	28
Figura 13 - Superfície empírica obtida por interpolação dos dados	29
Figura 14 Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do modelo sem os experimentos 26 e 27.....	30
Figura 15 – Equação obtida do modelo sem os experimentos 26 e 27	31

Figura 16 - (A) Cromatograma do pico base (roxo) e cromatograma UV (amarelo) da amostra padrão de TCGL. (B) Espectro de massas no ponto 5,5 minutos.	32
Figura 17 - (A) Cromatograma do pico base do experimento 8 (em preto) e seu respectivo controle branco (em vermelho). (B) Cromatograma UV do experimento 8 (em azul) e cromatograma do pico base deste ensaio (em preto).	33
Figura 18 - (A) Espectro de massas no tempo de retenção de 4 minutos para o experimento 8. (B) Cromatogramas de íon extraído dos íons m/z 433 e 457 no experimento 8 e no seu respectivo branco.	34
Figura 19 - (A) Espectro de massas no ponto 4,5 minutos referente ao P2. (B) Cromatograma de íon extraído do íon m/z 555.....	35
Figura 20 – Espectro de massas coletado na análise MS2 do íon m/z 555.....	36
Figura 21 - Rota de degradação sugerida para a formação do P2 (adaptado Yaye, H. S et. al. (2015) ⁶⁰).....	36
Figura 22 - Cromatogramas de íon extraído do íon m/z 577 no experimento 8 (em vermelho) e no seu respectivo branco (em preto).....	37
Figura 23 - Cromatogramas de pico base do experimento 21 (em preto) e seu respectivo branco (em verde).	38

RESUMO

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICADO AOS ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO FÁRMACO TICAGRELOR: A avaliação da estabilidade de um fármaco é essencial durante a produção de um medicamento, além de ser uma etapa obrigatória para a regulamentação perante os órgãos de fiscalização. Os estudos de degradação forçada têm como objetivo submeter o fármaco a condições severas de estresse, a fim de verificar a estabilidade intrínseca do fármaco e determinar produtos de degradação. Nestes testes o insumo farmacêutico é submetido de forma univariada a diferentes condições de estresse incluindo: meios ácidos, básicos e oxidativos, variações de temperatura, fotodegradação, humidade e presença de íons (Cu^{2+} ou Fe^{2+}). O presente trabalho avalia de forma multivariada a degradação do fármaco Ticagrelor (TGCL) utilizando planejamento experimental. Foram construídos dois planejamentos, o primeiro avaliou 3 variáveis em 5 níveis: pH (2; 4; 6; 8; 10), concentração de peróxido de hidrogênio em % v/v (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1) e temperatura em °C (26; 33; 40; 47; 54). O segundo planejamento avaliou de forma qualitativa a radiação UV em um planejamento de 2 variáveis pH e temperatura, nos mesmos níveis do planejamento anterior. Em cada experimento foi calculado a porcentagem de degradação do Ticagrelor e os resultados foram utilizados para a construção de modelos matemáticos. No planejamento sem irradiação UV a concentração de H_2O_2 seguida do pH foram as variáveis mais significativas no processo de degradação do Ticagrelor. Já no planejamento com irradiação UV apenas o pH foi significativo. Há indícios da existência entre uma interação entre a radiação UV e o pH. A temperatura e as interações entre as demais variáveis não foram significativas em nenhum dos planejamentos. Todos os experimentos foram submetidos à separação cromatográfica via HPLC-UV e os ensaios selecionados submetidos à análise por HPLC-IT-MS para elucidação dos produtos de degradação. O planejamento experimental se mostrou uma ferramenta útil na condução dos estudos de degradação forçada, permitindo avaliar o efeito das variáveis, bem como suas interações na degradação do Ticagrelor.

ABSTRACT

DESIGN OF EXPERIMENTS APPLIED TO THE FORCED DEGRADATION STUDIES OF TICAGRELOR: Stability indicating tests are an essential part during pharmaceutical drug production, besides being a mandatory step for the regulation and approval from the regulatory agencies. Forced degradation consist of an exposure of the drug substance to rough stress conditions in order to verify the intrinsic stability of the drug molecule and identify its degradation products. These tests are usually conducted by univariate analysis being the pharmaceutical drug submitted to different stress conditions, such as: acid, alkaline and oxidative media, photolysis and humidity exposure. This work aims to evaluate by multivariate analysis the forced degradation of Ticagrelor using design of experiments. Two designs were built, the first one evaluated 3 variables at 5 levels: pH (2; 4; 6; 8; 10), concentration of hydrogen peroxide in % v / v (0; 0.25; 0.5; 0, 75; 1) and temperature in °C (26; 33; 40; 47; 54). On the second one, the UV radiation was evaluated qualitatively while pH and Temperature were evaluated in a 2-variables design in the same levels as the first one. For each experiment, the degradation percentage of Ticagrelor was calculated and the results were used to build mathematical models using multiple regression. In the experiments without UV radiation, the concentration of H₂O₂ followed by pH were the most significant variables in the degradation process of Ticagrelor. In the experiments with UV irradiation, only the variable pH was significant. There are indications that an interaction between the variables pH and UV radiation is possible in this design. The temperature and other interactions between the variables were not significant in both experiments. All experiments were subjected to chromatographic separation by HPLC-UV and the assays with a good chromatographic profile were subjected to analysis by HPLC-IT-MS to structural elucidation of the degradation products. Thus, experimental planning proved to be a useful tool in conducting forced degradation studies, allowing the evaluation of the effect of multiple variables, as well as their interactions in the degradation process of Ticagrelor.

1.INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Introdução	1
1.2. Revisão bibliográfica.....	2
1.2.1. Estudos de degradação forçada	2
1.2.2. Recomendações sobre a condução dos testes de degradação forçada.....	5
1.2.3. Histórico sobre a legislação vigente no Brasil.....	7
1.2.4. Planejamento de experimentos.....	9
1.2.5. Princípio ativo usado nos estudos de degradação.....	12
2.OBJETIVOS.....	14
2.1. Geral.....	14
2.2. Específicos.....	14
3.METODOLOGIA.....	15
3.1. Instrumentação	15
3.1.1. Equipamentos gerais e reagentes.....	15
3.1.2. Soluções utilizadas	15
3.1.3. HPLC-UV	15
3.1.4. HPLC-IT-MS ⁿ	16
3.2. Planejamento experimental	16
3.2.1. Planejamento experimental sem irradiação UV	17
3.2.2. Planejamento experimental com irradiação UV	18
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Planejamento de experimentos	19

4.1.1. Planejamento experimental sem irradiação UV	19
4.1.2. Planejamento experimental com irradiação UV	26
4.1.3. Análise por LC-MS	31
5.CONCLUSÕES.....	39
6.REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Introdução

O uso de medicamentos faz parte do cotidiano da sociedade moderna, sendo utilizados para tratamento e prevenção de diversos quadros clínicos, contendo uma contribuição essencial para a manutenção da saúde da população. A facilidade de aquisição desses produtos associado ao grande crescimento demográfico dos últimos anos torna esse setor um importante polo econômico, sendo responsável por movimentar mais de 1,2 trilhões de dólares em 2018^{1,2}.

Em meio a esse mercado movimentado, a realização de um controle de qualidade é de suma importância para garantir a eficácia, segurança e qualidade desses produtos. A fim de garantir a qualidade dos medicamentos comercializados, as agências regulatórias, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), estabelecem normas para a produção e regulamentação de produtos farmacêuticos, que envolvem ensaios que comprovem a pureza, estabilidade e identidade das matérias primas e do produto acabado³.

Durante o processo de fabricação até o prazo estipulado como data de validade, o IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) e os demais componentes da formulação estão sujeitos a interações químicas que levam à formação de impurezas indesejadas que devem ser mapeadas para que não ultrapassem um limite que comprometa a segurança ou eficácia do medicamento. Quando essas impurezas são provenientes de processos de degradação devido à exposição a agentes externos como aquecimento, irradiação, humidade e oxigênio, são então denominadas produtos de degradação^{4,5}.

A fim de mapear esses produtos de degradação, os protocolos existentes exigem a realização de estudos de degradação forçada, que consistem na exposição do IFA e do medicamento acabado a condições de estresse, em geral mais severas que os testes de estabilidade acelerada⁶. Esses testes fornecem informações que podem ser utilizadas na seleção de excipientes e embalagem, no desenvolvimento de métodos analíticos, bem como na forma de armazenamento e de transporte^{4,6}.

Apesar de serem uma etapa obrigatória e de grande importância na produção e regulamentação de fármacos, os estudos de degradação são descritos de

forma genérica nos guias existentes, onde apenas os meios de degradação em que o fármaco deve ser submetido são informados, não especificando as condições em que os ensaios devem ser realizados, deixando a critério do analista ajustá-los para a molécula em estudo⁷. Além disso, esses experimentos são realizados de forma independente para cada variável, o que faz com que uma possível formação de produtos de degradação a partir de uma interação entre duas ou mais variáveis passe despercebida^{7,8}. Com o intuito de avaliar essas possíveis interações entre as variáveis no estudos de estabilidade, alguns autores vêm utilizando ferramentas de análise multivariada, como planejamento de experimentos (DoE, do inglês, Design of Experiments), no estudo de degradação forçada de fármacos⁹.

1.2. Revisão bibliográfica

1.2.1. Estudos de degradação forçada

A estabilidade de um fármaco é um parâmetro crítico durante as etapas de produção de medicamentos, uma vez que uma baixa estabilidade pode levar a alterações em relação à pureza, redução na eficácia devido a uma diminuição da concentração do IFA, além da possibilidade de afetar o fator segurança pelo surgimento de substâncias tóxicas¹⁰. Uma forma de determinar a estabilidade de um fármaco é via teste de estabilidade, que tem o intuito de avaliar as alterações na qualidade no IFA e no produto acabado em função do tempo quando exposto a uma série de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz. Nestes estudos também devem ser avaliados outros fatores relacionados ao produto final, como as propriedades físicas e químicas do IFA e dos excipientes farmacêuticos, bem como a estabilidade da formulação farmacêutica durante o processo de fabricação, além das propriedades dos materiais utilizados nas embalagens. Todas essas avaliações têm o intuito de simular situações naturais em que o fármaco pode ser submetido, a fim de determinar o prazo de validade, sendo assim, análises que demandam tempo^{6,11}.

Os estudos de estabilidade acelerada testam a estabilidade do fármaco utilizando temperaturas superiores à temperatura ambiente, simulando situações onde o fármaco é armazenado de forma incorreta e os processos de degradação são acelerados. Com os dados obtidos destes testes é feita uma projeção para predição do tempo de prateleira, o que pode ajudar na escolha de outros componentes para a

formulação e otimizar o teste de estabilidade de longa duração. Porém, apesar das condições serem mais severas que nos testes de longa duração, os testes de estabilidade acelerada também podem se estender por meses^{6,11}.

Já os estudos de degradação forçada são testes que promovem a formação de produtos de degradação através da exposição do IFA e do medicamento a condições de degradação extremas, superiores até mesmo às condições utilizadas nos testes de estabilidade acelerada, onde os resultados são obtidos em um tempo relativamente menor. Esses estudos são necessários para avaliar se o método analítico utilizado é eficiente na separação das impurezas de degradação das impurezas já existentes. Essa etapa é necessária para o balanço de massas que avalia se o que foi degradado do ativo foi recuperado em novos picos cromatográficos, referentes aos produtos de degradação. Além disso, os dados obtidos também podem ser utilizados em outras etapas do desenvolvimento de um medicamento, como na escolha de excipientes durante a etapa da formulação¹². Nesta etapa os estudos de degradação forçada podem ser utilizados para mostrar tendências dentro do planejamento e com o auxílio de ferramentas estatísticas são capazes de mostrar indicadores que ajudam a aumentar a chance de sucesso de uma formulação. Devido a isso, os ensaios de degradação forçada (EDFs) já eram realizados pela indústria farmacêutica antes mesmo de sua regulamentação¹³.

Os excipientes têm um papel fundamental para a produção de medicamentos, uma vez que a quantidade de IFA utilizada pode ser pequena, a utilização de excipientes se faz necessária para a produção de um medicamento de fácil consumo. Além disso, os excipientes têm diferentes aplicações na indústria farmacêutica como: lubrificantes, emulsificantes solubilizantes, desintegrantes, corantes, adoçantes, emulsificantes, conservantes, entre outros, que são de fundamental importância para adequar o processo de produção às operações unitárias farmacêuticas e atender às especificações do produto final, tais como perfil de dissolução, uniformidade de conteúdo, etc^{13,14}. Uma vez que os estudos de degradação forçada podem esclarecer as possíveis rotas de degradação, a utilização de um excipiente que proteja o fármaco de tal processo degradativo colabora para uma formulação mais estável, como pode ser verificado num estudo de QbD. Por exemplo, caso seja observado que o IFA é susceptível à degradação oxidativa, a utilização de um excipiente que seja antioxidante pode assegurar uma maior

estabilidade da formulação, como é o caso do hidroxianisol butilado um antioxidante comumente utilizado na estabilização de vitaminas^{14,15}.

Os estudos de degradação forçada também auxiliam na seleção de embalagens, uma vez que essas desempenham um papel importante na estabilidade da formulação. Se for observado que o fármaco é sensível a uma determinada condição de degradação, a alteração da embalagem em que o fármaco será armazenado poderá atenuar a reação. Um material comumente utilizado nas embalagens é o Policloreto de vinila (PVC, do inglês Polyvinyl Chloride) devido ao seu baixo custo e versatilidade. Porém, o PVC não oferece uma barreira eficiente contra umidade fazendo que fármacos que são susceptíveis a reações de hidrólise necessitem uma embalagem de um material que bloqueie a umidade de forma mais eficiente, como os filmes de alumínio¹⁶.

Quando o IFA é uma substância que sofre degradação com aquecimento, por exemplo, deve-se tomar os cuidados necessários para se ter um controle maior de temperatura no processo de fabricação do medicamento, bem como nas condições de armazenamento.

Os estudos de degradação forçada podem ser realizados em diversas etapas do processo de produção de um medicamento, mas geralmente são aplicados nas etapas iniciais, onde o fármaco é submetido a uma série de condições de estresse, como: hidrólise (ácido-base e neutra), oxidação, exposição a íons metálicos, fotoestabilidade e estabilidade térmica, a fim de elucidar a estrutura química dos produtos de degradação e desenvolver um método analítico que seja capaz de identificar o fármaco e seus produtos de degradação¹³.

Resumindo, os estudos de degradação forçada se propõem a ajudar a atingir os seguintes propósitos^{9,17,18}:

- Determinar as rotas de degradação do fármaco e do medicamento acabado;
- Diferenciar os produtos de degradação provenientes do IFA dos produtos de degradação provenientes de outros componentes da formulação;
- Elucidação estrutural dos produtos de degradação;

- Compreender as propriedades físico-químicas da molécula;
- Determinar a estabilidade intrínseca do fármaco na formulação;
- Entender os mecanismos de degradação como: hidrólise, oxidação, fotodegradação, etc;
- Desenvolver um método analítico adequado para separação, identificação dos produtos de degradação;
- Gerar formulações mais estáveis, auxiliando na escolha de embalagens e condições de armazenamento e transporte;

1.2.2. Recomendações sobre a condução dos testes de degradação forçada

Os estudos de degradação forçada são mencionados em diversas diretrizes de agências regulatórias internacionais como a norte americana^{19,20} (FDA, Food and Drug Administration), a europeia^{21,22} (EMA, European Medicines Agency) e a brasileira^{11,23} (ANVISA). O Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH, do inglês, The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) também possui uma série de guias sobre estudos de degradação forçada e análise de produtos de degradação que são implementados pela maioria dessas agências²⁴⁻²⁹. Esses guias e diretrizes contêm informações e definições que são úteis para o desenvolvimento dos estudos de degradação forçada, porém, não há detalhes sobre condições experimentais como tempo de reação e seleção da concentração dos meios reacionais¹⁸. Por exemplo, no guia Q1A(R2)²⁴ há recomendações para os testes de degradação térmica (incrementos de 10 em 10°C a partir da temperatura utilizada nos testes de estabilidade acelerada), mas apenas menciona que o fármaco deve ser submetido a um meio oxidativo e uma variação de pH, sem dar detalhes a respeito de quão agressivo o meio reacional pode chegar. É importante ressaltar que um meio muito agressivo pode levar a degradações que não são representativas, onde os produtos de degradação gerados são irrelevantes para o desenvolvimento do método analítico¹⁸.

Na literatura é possível encontrar autores que forneçam condições de degradação típicas, como as apresentadas por NGWA³⁰ representadas na Tabela 1. Porém, essas condições não se aplicam para uma grande quantidade de fármacos e geralmente o que é estabelecido é que os estudos de degradação forçada sejam capazes de degradar uma certa porcentagem do fármaco em que seja possível a identificação dos produtos de degradação. Não há um consenso sobre a porcentagem de degradação ideal, a ANVISA determina que os ensaios sejam capazes de submeter o IFA a uma degradação superior a 10% e inferior a degradação total do insumo, embora tais estudos raramente conduzam a uma degradação superior a 30%, de modo a evitar a formação de produtos de degradação secundários²³. BRÜMMER¹⁰ sugere que os estudos de degradação sejam capazes de apresentar uma diminuição de 5 a 20 % do insumo, já KURMI e SALGADO³¹ apontam que a porcentagem de degradação seja em torno de 10 a 30%. Além disso, moléculas que apresentem resistência até mesmo aos meios de degradação mais agressivos necessitam de uma justificativa técnica fundamentada que explique a estabilidade da molécula^{18,23}.

Tabela 1: Condições de degradação típicas^{6,30,32}

Condição de degradação	Condição Experimental	Condições de Armazenamento	Tempo (dias)
Hidrólise	Neutra	40°C,60°C	1,3,5
	0,1N HCL	40°C,60°C	1,3,5
	0,1N NaOH	40°C,60°C	1,3,5
	pH: 2,4,6,8	40°C,60°C	1,3,5
Oxidação	3% H ₂ O ₂	40°C,60°C	1,3,5
Fotolítica	Opção 1 do ICH Q1B	-	1,3,5
	Opção 2 do ICH Q1B	-	1,3,5
Térmica	Aquecimento 60°C	60°C	1,3,5
	Aquecimento 60°C/ 75% HR	60°C/ 75% HR	1,3,5
	Aquecimento 80°C	80°C	1,3,5
	Aquecimento 80°C/ 75% HR	80°C/ 75% HR	1,3,5
Íons metálicos	0,05M de Fe ²⁺ ou Cu ²⁺	Solução 1:1, temperatura ambiente	1-10

Diante disso, para a determinação das condições de degradação iniciais é recomendável que faça um estudo de predição dos produtos de degradação baseado na estrutura química da molécula e qual rota de degradação a molécula está sujeita a seguir. Posteriormente, utilizar as condições empregadas em moléculas com estrutura química semelhante e ajustar os valores para o insumo de interesse¹⁸.

1.2.3. Histórico sobre a legislação vigente no Brasil.

No Brasil a qualidade e a segurança de produtos farmacêuticos são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A ANVISA foi fundada pelo sancionamento da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro 1999, é uma autarquia sob regime especial que tem sede e foro no Distrito Federal, e está presente em todo o território nacional. Tem como foco promover a saúde da população por meio do controle sanitário da produção e do consumo de produtos submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados³³.

Em 2002 a ANVISA publicou a Resolução RE- N° 485, de 20 de março e a versão 01/2002 do “Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, que disponibilizava recomendações para as indústrias sobre os testes de estabilidade de longa duração^{34,35}. Esse documento sofreu diversas modificações e revogações até a sua versão final, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 318 de 06/11/2019¹¹. Já os estudos de degradação forçada foram primeiramente regulamentados em 2013, pela RDC N° 58, que estabelecia os parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com princípios ativos sintéticos e semi-sintéticos. Em 2015, a resolução N°58 foi revogada pela RDC N°53, que apesar de já ter sofrido novas alterações³⁶, é a regulamentação vigente no país atualmente^{23,37,38}.

Essa normativa informa que as empresas devem apresentar estudos submetendo as amostras às seguintes condições de degradação forçada: aquecimento; umidade; solução ácida; solução básica; solução oxidante; exposição fotolítica; e íons metálicos, mas não dá detalhes sobre a condução de cada experimento.

A RDC N°53 também determina que os ensaios devem promover uma degradação superior a 10% e estabelece os limites de notificação, identificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação obtidos nos testes de estabilidade acelerada e convencional de acordo com a Tabela 2. Dentro do limite de notificação, o produto de degradação deverá ser reportado e incluído nas impurezas totais dos produtos. Quando este limite é ultrapassado chegando ao limite de identificação, o produto de degradação deverá ter sua estrutura química identificada e realizada a quantificação individual. Os produtos de degradação que ultrapassarem os limites anteriores, deverão ser qualificados, ou seja, ter seu perfil de segurança estabelecido através da avaliação da segurança biológica, além da necessidade de serem identificados²³.

Tabela 2: Requisitos da ANVISA sobre a necessidade de notificação, identificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação

	Dose diária máxima ¹	Limites ²
Limites de Notificação	≤1g	0,1%
	>1g	0,05%
Limites de Identificação	<1mg	1,0% ou 5µg ATD, o que for menor
	1mg-10mg	0,5% ou 20µg ATD, o que for menor
	>10mg-2g	0,2% ou 2mg ATD, o que for menor
	> 2g	0,10%
Limites de Qualificação	<10 mg	1,0% ou 50µg ATD, o que for menor
	10 mg-100mg	0,5% ou 200µg ATD, o que for menor
	>100 mg - 2g	0,2% ou 3mg ATD, o que for menor
	>2g	0,15%

1- Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia

2- Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação.

Fonte: Anvisa²³

Os valores encontrados para cada produto de degradação individual e o limite total de produtos de degradação deverão ser incluídos nos relatórios de

liberação do medicamento e do estudo de estabilidade. Esta Resolução é destinada a todos os registros de medicamentos ou inclusão de nova concentração ou nova forma farmacêutica, bem como à renovação de registro e às alterações pós-registro de medicamentos. A resolução também diz que os medicamentos registrados anteriormente à data da publicação da normativa devem se adequar na próxima renovação de registro, mas a ANVISA pode requerer que um determinado produto de degradação seja monitorado caso o medicamento apresente problemas como perda de eficácia ou toxicidade²³.

Estudos recentes têm mostrado que a concentração ou o número de produtos de degradação podem variar devido a interações entre uma ou mais variáveis, porém não há normativas a respeito de testes que avaliam tal interação. Ardila³⁹ estudou a degradação de Ranitidina e Albendazol utilizando um planejamento experimental de composto central adaptado, onde avaliou o efeito das variáveis pH, concentração de peróxido de hidrogênio e temperatura em cinco níveis e verificou que as interações entre as variáveis geram produtos de degradação que não foram reportados em literatura científica ou farmacopeias. Resultados como esse mostram a importância de realizar experimentos multivariados durante os estudos de degradação forçada.

1.2.4. Planejamento de experimentos.

O avanço tecnológico da última década vem gerando uma crescente gama de dados e informações devido ao desenvolvimento de novas técnicas e instrumentações. Na química analítica, esses equipamentos permitem analisar uma vasta quantidade de variáveis em uma única amostra, fazendo desses dados algo complexo e variado, tornando a aplicação de ferramentas estatísticas algo indispensável^{40,41}.

No Brasil, onde recursos financeiros para aquisição de equipamentos e materiais de consumo são cada vez mais escassos, faz-se necessário maximizar a eficiência dos experimentos, para minimizar o desperdício e o custo. Dessa forma, antes de iniciar uma pesquisa científica, uma reflexão deve ser feita a fim de encontrar uma forma de obter o máximo de informação possível com o menor número de experimentos^{42,43}. Neste aspecto, o planejamento de experimentos é uma importante

ferramenta de trabalho, pois permite a avaliação simultânea do efeito de um grande número de variáveis com um número controlado de experimentos^{40,42}.

Para o melhor entendimento, alguns termos na utilização de um DoE precisam ser apresentados. As variáveis independentes são responsáveis por alterar a resposta de um sistema, por exemplo, temperatura, pH e concentração de reagentes. Essas variáveis são divididas em níveis, que são as condições de operação investigadas nos experimentos, ou seja, os valores de máximo, mínimo e valores intermediários que as variáveis atingem no planejamento. Em geral os níveis são codificados em -1, 0 e +1 para normalizar as variáveis a fim de evitar qualquer erro de interpretação dos resultados. Por fim, as respostas, ou variáveis dependentes, representam o que é monitorado no sistema, como por exemplo, a concentração de um determinado produto de degradação formado⁹. As respostas são denominadas variáveis dependentes pois seu valor depende do nível das variáveis independentes.

Existem diversos tipos de planejamento com variadas funções e aplicações. Os planejamentos fatoriais são utilizados em etapas iniciais quando se deseja realizar uma etapa de triagem, pois permitem avaliar o efeito de um grande número de variáveis e suas interações, permitindo eliminar as variáveis que não são significativas para o sistema. Esses planejamentos em geral possuem dois níveis e a variabilidade experimental é avaliada por meio de replicatas genuínas do DoE ou repetições no ponto central (0). A Figura 1 destaca como os experimentos se distribuem em um domínio experimental para duas e três variáveis independentes num planejamento fatorial de dois níveis com ponto central.

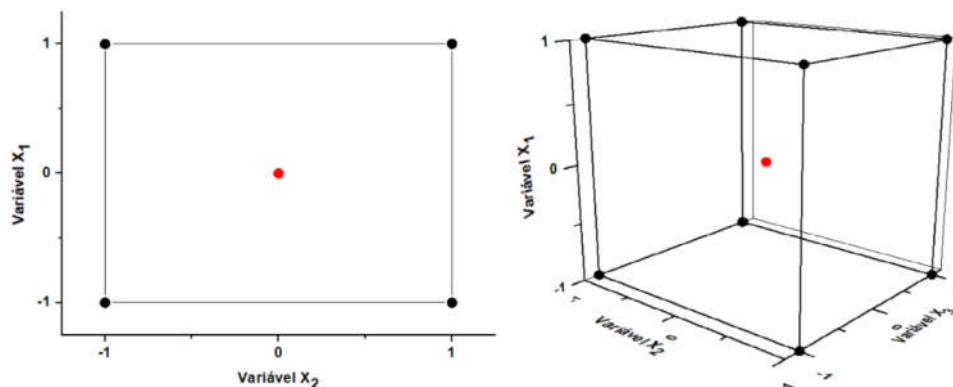


Figura 1 - Distribuição dos experimentos em um domínio experimental para duas e três variáveis de um planejamento experimental fatorial de dois níveis com ponto central.

Após a etapa de triagem as variáveis que são significativas para o sistema são utilizadas em uma metodologia de análise de superfície de resposta para a otimização do sistema, onde otimizar significa encontrar os valores de cada variável independente que produza a melhor resposta para o sistema em questão. Na literatura existem diversas configurações de planejamento para otimização, como Doehlert, Taguchi, e Box-Behnken, e sua aplicação depende do tipo de sistema a ser estudado⁴⁴. Na Figura 2 é mostrada a configuração de um planejamento de composto central (CCD, do inglês, Central Composite Design)

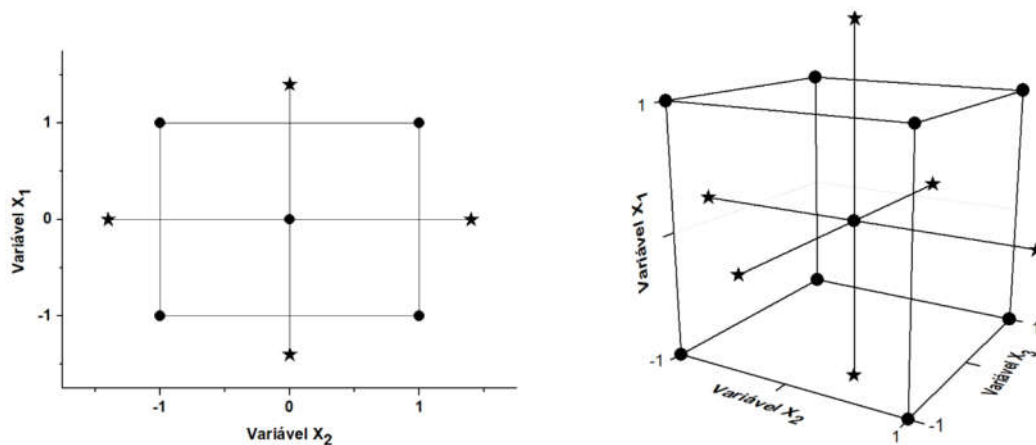


Figura 2 - Distribuição dos experimentos em um domínio experimental para duas e três variáveis de um planejamento de composto central (CCD).

Em resumo, a aplicação de planejamento experimental é importante pois^{9,42}:

- Permitem avaliar, com um número controlado de experimentos, quais variáveis são significativas e qual o efeito de cada uma em um sistema;
- Possui a capacidade de determinar interações entre duas ou mais variáveis;
- Permite otimizar o sistema para a obtenção da melhor resposta;
- Permite redução de tempo, custo e rejeitos;

Em uma revisão de literatura recentemente publicada, Alvarenga e Carneiro⁹ mostraram que o planejamento de experimentos vem sendo usado em

diversas etapas de estudos de degradação, como na otimização dos processo de degradação e na otimização dos métodos analíticos para a detecção do produtos de degradação.

1.2.5. O IFA Ticagrelor.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo, sendo responsáveis por 17,9 milhões de mortes em 2016, representando 31% do total de mortes⁴⁵. Dentre os diversos medicamentos no mercado, o Ticagrelor se destaca por ser um antiplaquetário de uso oral, utilizado na prevenção de eventos trombóticos, como: morte cardiovascular, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, em pacientes com síndromes coronárias agudas (SCA)⁴⁶.

Quimicamente é o ((1S,2S,3R,5S) -3-[7-[(1R,2S) -2-(3,4-Difluorofenil) ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3] triazol [4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxi)etoxi) ciclopentano-1,2-diol). É um fármaco pertencente à classe conhecida como ciclopentiltriazolpirimidinas, que foi desenvolvido pela AstraZeneca e comercializado com o nome Brilinta, sendo a comercialização aprovada pela Anvisa em 2010^{47,48}.

Quando administrado oralmente, o Ticagrelor atua como antagonista seletivo do receptor de adenosina difosfato (ADP) P2Y₁₂. Ele oferece uma ligação reversível e atua diretamente no receptor, em vez de exigir ser metabolizado no fígado, como Clopidogrel e Prasugrel, promovendo início e pico de ação mais rápido^{48,49}. Além disso, estudos mostram que o Ticagrelor é mais eficiente na prevenção de eventos trombóticos quando comparado aos dois tienopiridínicos citados⁴⁹⁻⁵¹.

A disposição no corpo ocorre rapidamente com pico de concentração em torno de 1 a 2 horas sendo metabolizado por uma perda oxidativa promovida majoritariamente pela enzima Citocromo P450 3A4. Seu principal metabólito ativo (AR-C124910XX) também age como antagonista do receptor P2Y₁₂, de forma semelhante ao composto original, o que aumenta sua eficiência⁵¹⁻⁵⁵. A Figura 3 mostra a estrutura química do Ticagrelor, destacando os pontos mais susceptíveis a um processo de degradação.

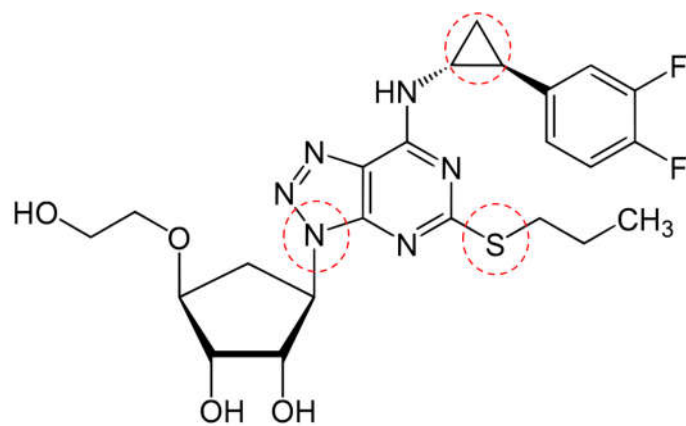


Figura 3 - Estrutura molecular do Ticagrelor e locais susceptíveis a processos de degradação

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Realizar um estudo multivariado utilizando um planejamento composto central adaptado nos estudos de degradação forçada do fármaco Ticagrelor.

2.2. Específicos

- Averiguar o efeito individual que cada variável tem na degradação do fármaco Ticagrelor, além de observar possíveis interações entre elas;
- Desenvolver e/ou adaptar métodos para a separação por cromatografia líquida e identificação dos produtos de degradação por espectrometria de massas;
- Compreender as rotas e os mecanismos de degradação do API em estudo;

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

3.1.1. Equipamentos gerais e reagentes

Os reagentes utilizados foram: ácido clorídrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, acetato de amônio e hidróxido de amônio, todos em grau analítico, acetonitrila grau HPLC e água ultra-pura obtida no sistema Millipore.

Foi utilizado um pHmetro Digimed DM 20 para as medidas de pH. As pesagens foram realizadas em uma balança analítica Shimadzu AUW220D e as reações foram realizadas em uma estufa Nova Ética com controle digital de temperatura.

3.1.2. Soluções utilizadas

Soluções estoque de TCGL com concentração de 1 mg.mL^{-1} foram preparadas dissolvendo uma massa de TCGL em 100% de acetonitrila. As soluções de degradação foram preparadas utilizando água ultra pura, fazendo adição gota a gota de solução de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (para as soluções de pH 2 e 4) e solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (para as soluções de pH 8 e 10). A solução de pH 6 teve seu pH ajustado com a solução de pH 8. Além disso, foi preparada uma solução de diluição, água:acetonitrila (50:50 v/v), para a realização das análises por HPLC-UV e HPLC-IT-MSⁿ. A fase móvel foi preparada diluindo 5 mL de uma solução filtrada de acetato de amônio 2 mol.L^{-1} em um litro de água ultra pura, que teve seu pH ajustado com uma solução de hidróxido de amônio 10% v/v.

3.1.3. HPLC-UV

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu LC system (Kyoto, Japão) equipado com módulo de comunicação modelo CBM-20A, duas bombas LC-20AD, um auto-injetor SIL-20A, acoplado a um detector UV/Vis SPD-20A com comprimento de onda fixado em 255 nm controlado pelo software LCsolution.

A coluna empregada na separação foi uma X-Terra C18 MS (100 x 3 mm, $5 \mu\text{m}$) com uma fase móvel composta de Acetato de amônio 10 mM, pH 8,2 (solvente A) e Acetonitrila (Solvente B) no modo gradiente de eluição (0 a 5 min:

20→85% B, 5 a 6 min: 85→20%B, 6 a 9 min: 20%B) vazão de 0,800 mL.min⁻¹, e volume de injeção de 15 µL.

Antes de cada análise por HPLC-UV uma alíquota de 1 mL da solução degradada foi diluída 5 vezes em solução de diluição, transferida para um frasco âmbar de 1,5 mL e colocado no auto injetor do equipamento para análise. O tempo de corrida para cada experimento foi de 9 minutos.

3.1.4. HPLC-IT-MSⁿ

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu LC system (Kyoto, Japão) equipado com módulo de comunicação modelo CBM-20A, duas bombas LC-20AD, um auto-amostrador SIL-20A, acoplado com um detector UV/Vis com comprimento de onda fixado em 254 nm e um espectrômetro de massas Ion Trap (3D IT) Bruker Esquire 6000 3D (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) com fonte de ionização eletrospray (ESI).

Foi utilizado uma coluna X-Terra C18 MS (100 x 3 mm, 5µm) e o método empregado foi uma adaptação do método utilizado no monitoramento por HPLC-UV. A fase móvel foi composta de Água ultra pura (solvente A) e Acetonitrila (Solvente B) no modo gradiente de eluição (0 a 10 min: 20→85% B, 10 a 11 min: 85% B, 11 a 12 min: 85 → 20% B, 12 a 14 min: 20% B), vazão de 0,800 mL.min⁻¹ com difusor de fluxo de modo que apenas 0,1 mL.min⁻¹ fosse direcionado para o analisador de massas e volume de injeção de 5 µL. Os parâmetros otimizados para o detector Ion trap foram: Voltagem do capilar 4500V, skimmer 16,39 V, voltagem do capilar de saída 144,26V

Antes de cada análise, uma alíquota de 125 µL foi diluída 40 vezes em solução de diluição, transferida para um frasco âmbar de 1,5 mL e introduzida no auto injetor do equipamento para análise. O tempo de coleta dos dados em cada experimento foi de 14 minutos.

3.2. Planejamento experimental

Foram realizados dois planejamentos experimentais para avaliar a degradação do TCGL, com e sem irradiação ultravioleta. A separação se faz necessária uma vez que a interação entre radiação UV e peróxido de hidrogênio já é conhecida na literatura, uma interação agressiva que é vastamente utilizada em

degradações de poluentes ambientais^{56,57}. Um meio reacional muito agressivo provocaria uma série de degradações não seletivas, onde os produtos de degradação seriam degradados em produtos de degradação secundários, ou terciários. Além disso, a produção de radicais livres $\bullet\text{OH}$ atacariam a molécula de maneira não seletiva, causando degradações não representativas do que ocorreria em condições convencionais, na qual a oxidação se dá em determinados sítios mais susceptíveis da molécula. Por esse motivo a variável radiação UV será avaliada de forma qualitativa apenas. O tratamento dos dados obtidos nos planejamentos foi realizado no software Minitab19.

3.2.1. Planejamento experimental sem irradiação UV

Foi realizado um planejamento experimental composto central modificado com as seguintes variáveis: pH, concentração do agente oxidante (H_2O_2) e Temperatura. As variáveis foram analisadas em cinco níveis (-1; -0,5; 0; +0,5; +1) como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Variáveis e níveis avaliados na degradação de TCGL sem irradiação UV

Níveis	Variáveis		
	pH	% H_2O_2 (v/v)	Temperatura(°C)
- 1	2	0	26
-0,5	4	0,25	33
0	6	0,5	40
+0,5	8	0,75	47
+ 1	10	1	54

As degradações foram realizadas de maneira aleatória em tubos de ensaio recobertos com papel alumínio, onde 1 mL da solução estoque de TCGL foi adicionado juntamente com um volume apropriado de solução de H_2O_2 30% para atingir as concentrações estabelecidas no planejamento e o volume foi completado para 5 mL com a soluções de degradação de pH correspondente. Para cada ensaio, foi realizado um experimento de controle onde as mesmas condições eram usadas em uma solução de acetonitrila que não continha o princípio ativo, para serem utilizados na subtração dos cromatogramas das amostras, para a remoção de

background. Os tubos foram colocados na estufa com temperatura fixada, onde foram deixados por 30 min. Após o término da reação os tubos foram resfriados à temperatura ambiente por 10 min, diluídos conforme descrito nos métodos de análise e seguiram para análise por HPLC-UV e HPLC-IT-MSⁿ.

3.2.2. Planejamento experimental com irradiação UV

Para a avaliação do efeito da radiação UV na degradação do TCGL foi realizado um planejamento experimental composto central modificado onde as variáveis foram pH e temperatura, variadas em 5 níveis (-1 ; -0,5 ; 0 ; +0,5 ; +1) como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Variáveis e níveis avaliados na degradação de TCGL com irradiação UV

Níveis	Variáveis	
	pH	Temperatura(°C)
- 1	2	26
-0,5	4	33
0	6	40
+0,5	8	47
+ 1	10	54

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória em tubos de ensaio transparentes onde 1 mL da solução estoque de TCGL foi adicionado juntamente com 4 mL da solução degradante de pH correspondente. Assim como no planejamento anterior, para cada ensaio havia uma amostra controle correspondente, para ser utilizada na subtração do cromatograma da amostra, para a remoção de background. Os tubos foram transferidos para estufa com temperatura fixada, onde foi adaptada uma lâmpada UV-C, marca OSRAM Puritec HNS S 9W com comprimento de onda dominante em 254 nm. O tempo de reação foi de 30 min e após o término da reação os tubos foram resfriados a temperatura ambiente por 10 minutos, diluídos conforme descrito nos métodos de análise e seguiram para análise por HPLC-UV e HPLC-IT-MSⁿ.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Planejamento de experimentos

4.1.1. Planejamento experimental sem irradiação UV

Os ensaios de degradação foram realizados um a um de forma aleatória conforme descrito no item (3.2.1) com as condições descritas no planejamento construído. Uma representação dos ensaios desse planejamento experimental plotado no espaço das variáveis é apresentada na Figura 4.

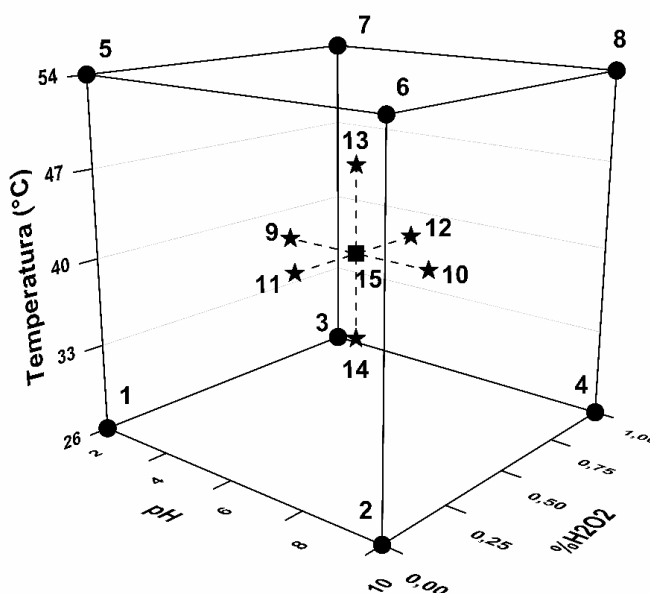


Figura 4 - Representação dos ensaios do planejamento experimental sem irradiação UV no espaço das variáveis.

O planejamento experimental proposto, uma adaptação de um planejamento de composto central de três variáveis, permitiu avaliar o efeito de cada variável na degradação do TCGL. Foram realizados 17 ensaios, contendo três repetições no ponto central das variáveis (experimentos 15 a 17). Os ensaios realizados nos vértices (experimentos 1 a 8) são as degradações que ocorreram nos extremos, superior e inferior, de cada variável. Os ensaios no interior do cubo (experimentos 9 a 14) permitiram a avaliação da degradação do TCGL em condições moderadas. Cada reação de degradação foi realizada por 30 minutos, que foi o tempo observado em testes preliminares para formação de produtos de degradação detectáveis por HPLC-UV.

A determinação da porcentagem de degradação do TCGL foi baseada na redução da área da banda cromatográfica do Ticagrelor nos cromatogramas obtidos por HPLC-UV. A porcentagem de degradação variou de 0,17% (ensaio 5) até 55,31% (ensaio 8), porcentagem superior ao que é estabelecido em algumas normativas. A Tabela 5 mostra porcentagem de degradação obtida em cada ensaio, em conjunto com a matriz decodificada do planejamento proposto.

Tabela 5: Matriz decodificada do planejamento experimental sem irradiação UV

Ensaio	pH	%H₂O₂	T(°C)	%Deg
1	2	0	26	1,09
2	10	0	26	13,32
3	2	1	26	12,89
4	10	1	26	48,01
5	2	0	54	0,17
6	10	0	54	9,75
7	2	1	54	14,97
8	10	1	54	55,31
9	4	0,5	40	4,22
10	8	0,5	40	20,55
11	6	0,25	40	17,31
12	6	0,75	40	39,85
13	6	0,5	33	4,81
14	6	0,5	47	44,51
15	6	0,5	40	30,43
16	6	0,5	40	26,44
17	6	0,5	40	29,94

O método cromatográfico desenvolvido foi uma adaptação de métodos encontrados na literatura para a separação do TCGL e seus produtos de degradação, quando os ensaios de degradação foram realizados pelo método tradicional^{48,58-60}. A Figura 5 mostra o perfil cromatográfico encontrado nesse conjunto de experimentos. A banda cromatográfica referente ao TCGL pode ser observada no tempo de retenção entre 4,5 e 5 min, sendo possível notar a presença de duas novas bandas cromatográficas que podem ser associadas a possíveis produtos de degradação. Os cromatogramas apresentados foram subtraídos dos pelos cromatogramas das amostras controle de cada experimento para a remoção de background.

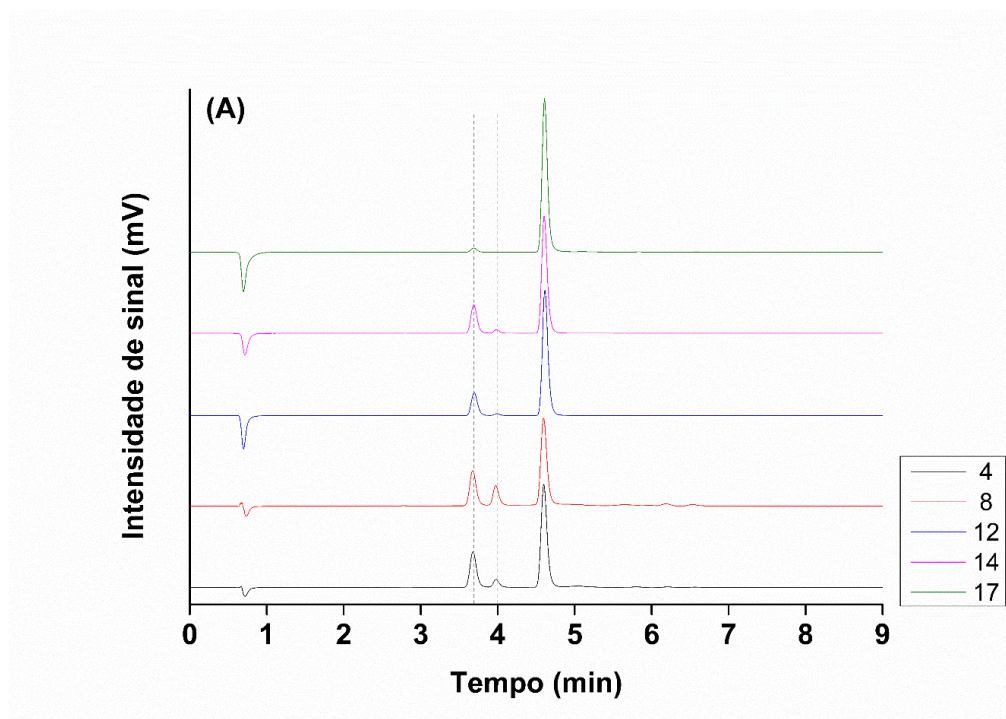


Figura 5 - Perfil cromatográfico dos ensaios 4,8,12,14,17, sem irradiação UV.

Foi construído um modelo matemático de segundo grau a partir dos dados da porcentagem de degradação contendo 10 coeficientes (C_n , A, B, C, AA, BB, CC, AB, AC, BC), onde C_n é a constante, A e AA são os termos linear e quadrático da variável pH, B e BB são os termos linear e quadrático da variável concentração de H_2O_2 , C e CC são os termos linear e quadrático da variável temperatura. Os coeficientes AB, AC e BC são as interações entre as variáveis. Os coeficientes foram calculados com intervalo de confiança com um t estatístico de 95% e a análise de variância é mostrada na Tabela 6. Os termos com valor de P menor que 0,05 são significativos para o sistema. É possível notar que somente os termos lineares do pH e da concentração de H_2O_2 foram significativas no processo de degradação do TCGL. A temperatura juntamente com as interações entre as variáveis e os termos quadráticos não foram significativos para o processo.

Uma representação gráfica dos efeitos padronizados das variáveis é representada no gráfico de Pareto mostrado na Figura 6. Os coeficientes com valor maior que 2,365 são significativos, sendo a concentração de H_2O_2 a variável de maior efeito na degradação de TCGL, seguido pelo pH. A Tabela 5 mostra que, de fato, os experimentos com os extremos positivos dessas duas variáveis (ensaios 4 e 8) provocaram as maiores degradações.

Tabela 6: ANOVA

Fonte	GL ^a	SQ ^b	MQ ^c	Valor F _{cal}	Valor-P
Modelo	9	3823,13	424,79	3,42	0,06
Linear	3	3049,79	1016,6	8,18	0,011
pH	1	1320,05	1320,05	10,62	0,014
%H2O2	1	1654,88	1654,88	13,32	0,008
T°C	1	74,85	74,85	0,6	0,463
Quadrado	3	397,19	132,4	1,07	0,423
pH*pH	1	294,84	294,84	2,37	0,167
T°C*T°C	1	16,23	16,23	0,13	0,728
Interação	3	376,15	125,38	1,01	0,444
pH*%H2O2	1	353,22	353,22	2,84	0,136
pH*T°C	1	0,54	0,54	0	0,949
%H2O2*T°C	1	22,4	22,4	0,18	0,684
Resíduo	7	869,87	124,27		
Falta de ajuste	5	860,39	172,08	36,31	0,027
Erro puro	2	9,48	4,74	*	*
Total	16	4693			

^aGraus de liberdade; ^bSoma Quadrática; ^cMédia Quadrática

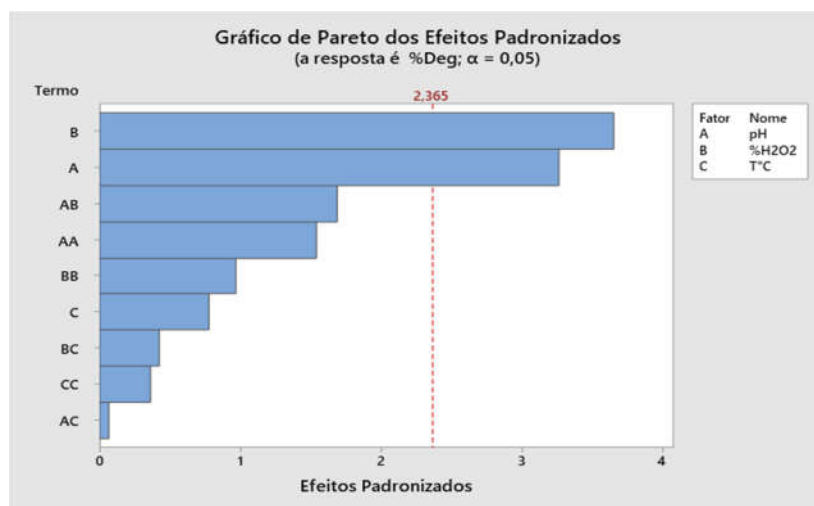


Figura 6 - Gráfico de pareto dos efeitos das variáveis na degradação de TCGL

A Tabela ANOVA também mostra que esse modelo não foi significativo, uma vez que média quadrática do modelo (MQ_m) e a média quadrática residual (MQ_r) não foram estatisticamente diferentes com $F_{calculado} (3,42) < F_{tabelado} (3,67)$, com 95% de confiança. O modelo foi então recalculado utilizando apenas os coeficientes que foram significativos e a nova ANOVA é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7: ANOVA do modelo recalculado

Fonte	GL ^a	SQ ^b	MQ ^c	Valor F _{cal}	Valor-P
Modelo	2	2949,3	1474,7	11,98	0,001
Linear	2	2949,3	1474,7	11,98	0,001
pH	1	1308	1308	10,63	0,006
%H2O2	1	1641,3	1641,3	13,34	0,003
Resíduo	14	1723,2	123,1		
Falta de ajuste	6	868,1	144,7	1,35	0,337
Erro puro	8	855,1	106,9	*	*
Total	16	4672,5			

^aGraus de liberdade; ^bSoma Quadrática; ^cMédia Quadráticas

O modelo final permitiu obter uma equação de 3 coeficientes que é mostrada na Equação 1. O modelo foi significativo uma vez que média quadrática do modelo (MQ_m) e a média quadrática residual (MQ_r) foram estatisticamente diferentes com $F_{\text{calculado}} (11,98) > F_{\text{tabelado}} (3,739)$, com 95% de confiança. Contudo, é recomendado que a média quadrática do modelo seja ao menos 5 x a média quadrática residual, para que o modelo seja considerado com potencial preditivo. Devido a isso, o modelo refletiu um baixo valor de R², de 0,63 (SQ_{modelo}/SQ_{total}). O modelo também não apresenta falta de ajuste, uma vez que o Valor de P (0,337) é maior que α (0,05) indicando que a falta de ajuste não é significativa.

$$\% \text{Deg} = 21,97 \pm 2,69 + 12,40 \pm 3,81 * \text{pH} + 13,90 \pm 3,81 * \% \text{H}_2\text{O}_2 \quad \text{Equação 1}$$

Com a equação do modelo é possível montar uma superfície de resposta (Figura 7) onde é possível visualizar as conclusões obtidas anteriormente. Quando a variável concentração de peróxido de hidrogênio (%H₂O₂) está no nível -1, onde a concentração de peróxido é zero, a porcentagem de degradação é relativamente pequena mesmo em pH alto e o máximo de degradação é atingido no extremo positivo das duas variáveis.

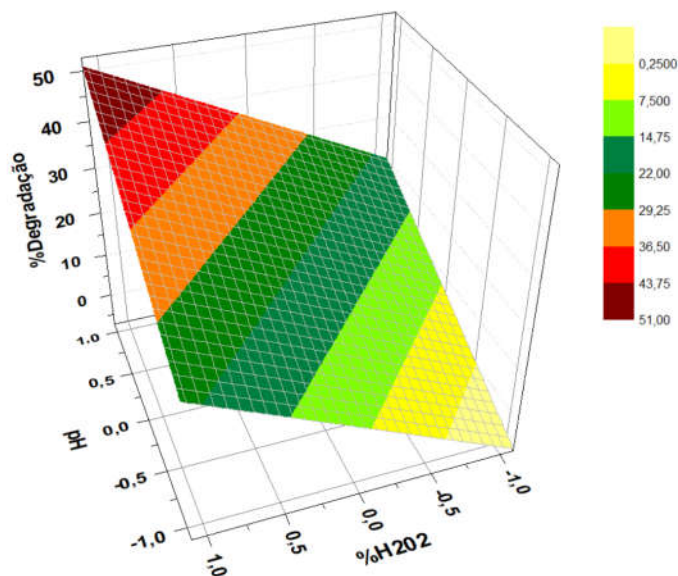


Figura 7 - Superfície do modelo para a degradação de TCGL sem irradiação UV

A Figura 8 mostra a superfície empírica que foi gerada por interpolação dos dados obtidos do planejamento, com finalidade de verificar se a mesma se ajustava ou não a uma equação quadrática. Ao observar a superfície empírica nota-se que há uma certa continuidade, onde não há muitos máximos ou mínimos, indicando que possivelmente existe um modelo quadrático que consiga descrever o sistema. Ao analisar novamente os dados contidos na Tabela 5 foi possível observar que os experimentos 9 (pH 4; %H₂O₂ 0,5) e 13 (pH 6; %H₂O₂ 0,5) apresentaram uma degradação menor do que o esperado, uma vez que o aumento das variáveis significativas pH e %H₂O₂ praticamente não gerou aumento na porcentagem de degradação.

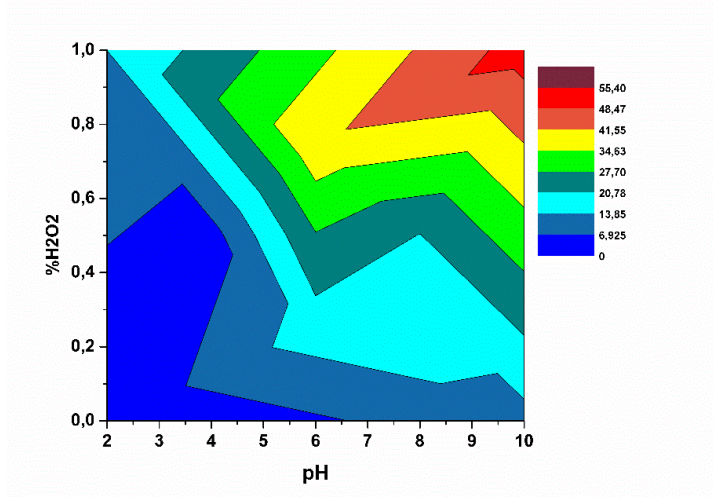


Figura 8 - Superfície empírica obtida por interpolação

Foi proposta a construção de um modelo matemático excluindo-se os experimentos 9 e 13 para verificar o que foi apresentado no parágrafo anterior. Assim como nos modelos propostos anteriormente, os coeficientes foram calculados com um *t* estatístico de 95% de confiança. Os coeficientes com valor superior a 2,57 foram significativos e podem ser vistos no Gráfico de Pareto mostrado na Figura 9.

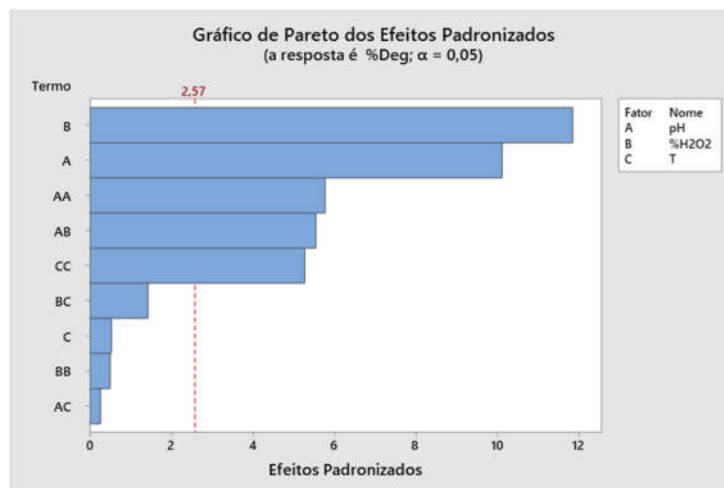


Figura 9 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do modelo sem os experimentos 9 e 13

O modelo foi então recalculado utilizando somente os coeficientes significativos: constante, %H₂O₂; pH; pH*pH; pH*%H₂O₂ e T*T, com *t* estatístico de 95% de confiança e a ANOVA é mostrada na Tabela 9.

Tabela 9: ANOVA do modelo recalculado (com experimentos 9 e 13 excluídos)

Fonte	GL ^a	SQ ^b	MQ ^c	Valor F _{cal}	Valor-P
Modelo	5	3891,13	778,23	77,66	0
Linear	2	2855,62	1427,81	142,49	0
pH	1	1214,28	1214,28	121,18	0
%H ₂ O ₂	1	1641,34	1641,34	163,8	0
Quadrado	2	784,69	392,34	39,15	0
pH*pH	1	517,04	517,04	51,6	0
T*T	1	372,27	372,27	37,15	0
Interação	1	359,71	359,71	35,9	0
pH*%H ₂ O ₂	1	359,71	359,71	35,9	0
Resíduo	9	90,19	10,02		
Falta de ajuste	7	80,71	11,53	2,43	0,322
Erro puro	2	9,48	4,74	*	*
Total	14	3981,31			

O modelo final permitiu obter uma equação quadrática de 6 coeficientes que é mostrada na Equação 2. O modelo foi significativo uma vez que a média quadrática do modelo (MQ_m) e a média quadrática residual (MQ_r) foram estatisticamente diferentes com $F_{calculado} (77,66) > F_{tabelado} (3,48)$, com 95% de confiança. Além disso, a média quadrática do modelo foi consideravelmente superior à média quadrática dos resíduos indicando que o modelo tem uma boa capacidade de predição. Isso refletiu em um bom R^2 , de 0,98 (SQ_{modelo}/SQ_{total}), mostrando uma significativa melhora em relação ao modelo contendo todos os ensaios.

$$\begin{aligned} \%Deg = & 29,29(\pm 1,24) + 12,25(\pm 1,11)*pH + 13,90(\pm 1,09)*\%H_2O_2 - 65,06(\pm 9,06)*pH*pH \\ & + 55,26(\pm 9,07)*T*T + 6,71(\pm 1,12)*pH*\%H_2O_2 \end{aligned} \quad \text{Equação 2}$$

A melhora no modelo com a remoção de dois ensaios se deve ao fato desses dois pontos não se ajustarem a uma superfície quadrática dentro do domínio experimental estudado, seja devido a erros experimentais ou por fazerem parte de um mínimo parcial dentro do domínio estudado.

4.1.2. Planejamento experimental com irradiação UV

Os ensaios de degradação foram realizados um a um de forma aleatória conforme descrito no item (3.2.2) com as condições descritas no planejamento construído. Uma representação dos ensaios desse planejamento experimental proposto plotado no espaço das variáveis é apresentada na Figura 10.

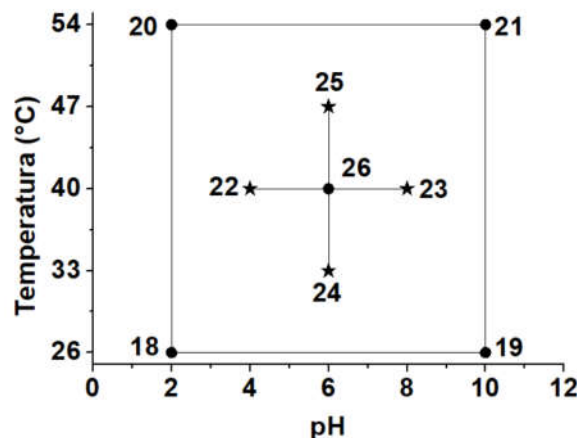


Figura 10 - Representação dos ensaios do planejamento experimental com irradiação UV no espaço das variáveis.

Neste planejamento de duas variáveis foram realizados 10 ensaios enumerados de 18 a 27 onde os pontos centrais foram os experimentos 26 e 27. Assim como no planejamento discutido anteriormente os vértices representam os extremos superior e inferior de cada variável e os ensaios no interior são associados às condições mais brandas de degradação. A degradação com a presença da radiação UV foi relativamente mais branda quando comparada às degradações obtidas com o peróxido de hidrogênio e variou de 5,38% (ensaio 26) a 22,08% (ensaio 21). A matriz completa do planejamento mostrando a degradação obtida em cada ensaio é mostrada na Tabela 10.

Tabela 10: Matriz decodificada do planejamento experimental com irradiação UV

Ensaio	pH	T(°C)	%Deg
18	2	26	6,15
19	10	26	10,13
20	2	54	6,68
21	10	54	22,08
22	4	40	10,81
23	8	40	14,80
24	6	33	9,89
25	6	47	10,88
26	6	40	5,38
27	6	40	6,15

No método cromatográfico utilizado não foi observada nenhuma nova banda cromatográfica para os experimentos com irradiação UV e os cromatogramas dos ensaios com maior porcentagem de degradação são mostrados na Figura 11.

Um modelo foi calculado de forma semelhante ao modelo anterior e somente o termo linear da variável pH foi significativo. Dessa forma, foi feita uma regressão linear utilizando apenas essa variável onde foi encontrado um $R^2(SQ_{regressão}/SQ_{total})=0,44$, uma variância explicada de apenas 44%. As informações obtidas na regressão são mostradas na Tabela 11

Tabela 11: Anova da regressão e equação da reta

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Regressão	1	101,59	101,59	6,25	0,037
Erro	8	130	16,251		
Total	9	231,59			
Equação		%Deg = 3,17 + 1,19*pH			

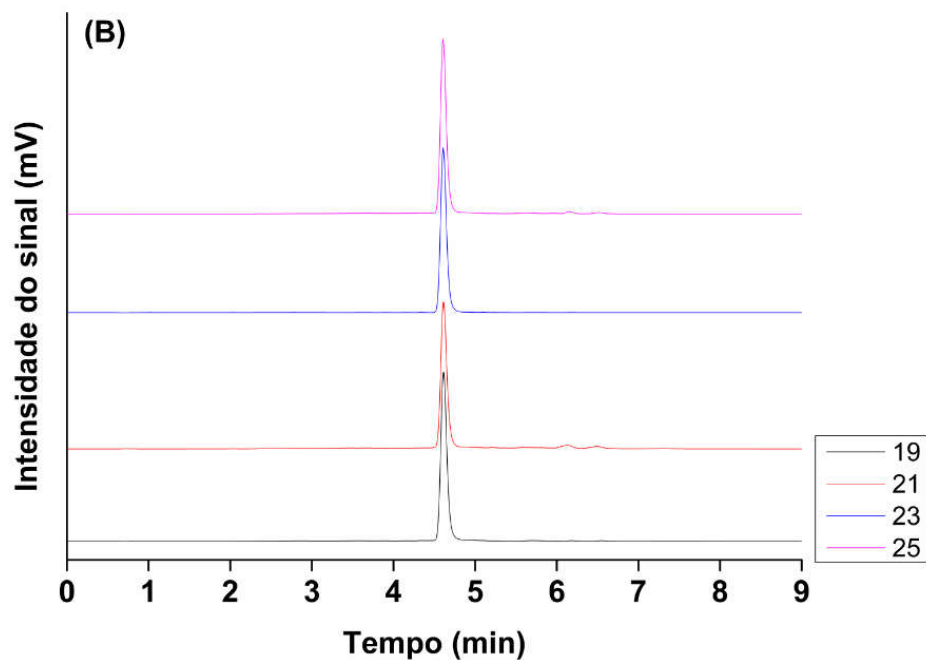


Figura 11 - Perfil cromatográfico dos ensaios 19, 21, 23, 25 com irradiação UV.

Para melhor visualização dos resultados foram plotadas as porcentagens de degradação atingidas em cada ensaio (Figura 12). É possível observar que as degradações são em geral brandas, exceto pelo experimento 21 que obteve 22,08% de degradação, indicando a possibilidade de haver uma interação entre a radiação UV e a alta concentração do íon hidroxila em pH alto.

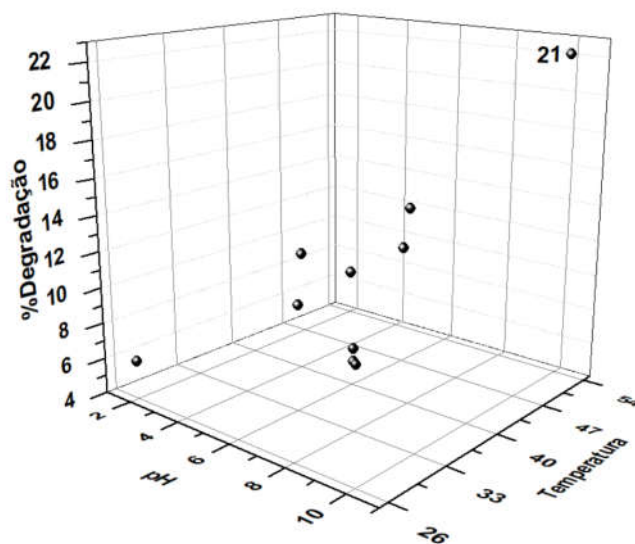


Figura 12 - Porcentagem de degradação obtida nos experimentos com irradiação UV

Assim como no modelo sem irradiação UV, uma superfície empírica foi plotada por interpolação dos dados obtidos no planejamento, para verificar se havia a possibilidade de ajuste a um modelo quadrático. Ao observar a superfície mostrada na Figura 13, nos pontos próximos a pH 6 e 40 °C (ponto central) é possível observar que há ensaios que aparentam inconsistências, assim como no planejamento sem UV, apresentando um mínimo local. Ao observar os experimentos em pH 2 (18 e 20) a alteração na temperatura não provoca mudança significativa na degradação, contudo o aumento na temperatura em pH 10 eleva a porcentagem de degradação ao dobro do valor (ensaios 19 e 21). Dessa forma, era esperado que os experimentos no ponto central (26 e 27) tivessem uma degradação superior a degradação aos ensaios 18, 22 e 24, o que não ocorreu. Devido a isso um modelo foi calculado excluindo-se os dois pontos centrais, assim como foi feito no modelo anterior.

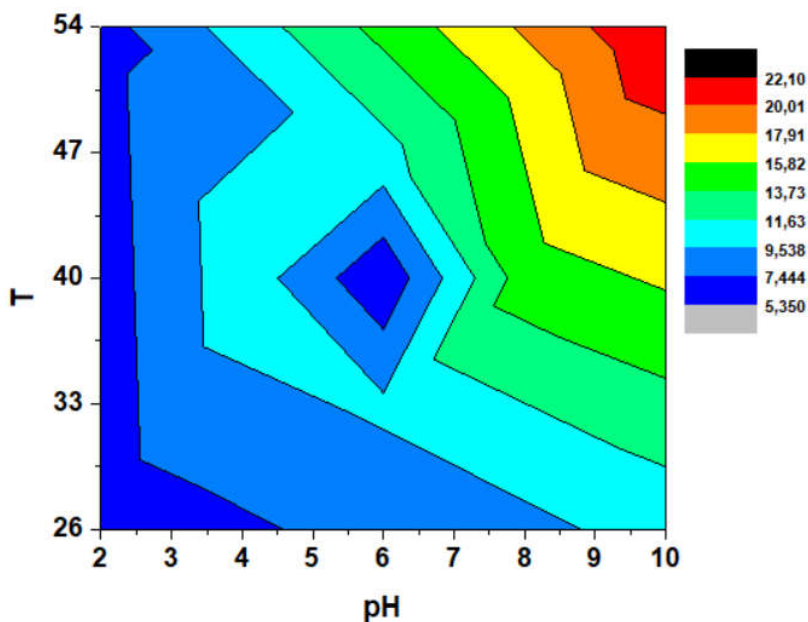


Figura 13 - Superfície empírica obtida por interpolação dos dados

O modelo foi calculado utilizando 6 coeficientes, com um t estatístico de 95% de confiança. As respostas obtidas da ANOVA foram plotadas no Gráfico de Pareto presente na Figura 14, onde é possível observar os coeficientes que foram significativos (coeficientes com valor superior a 4,303).

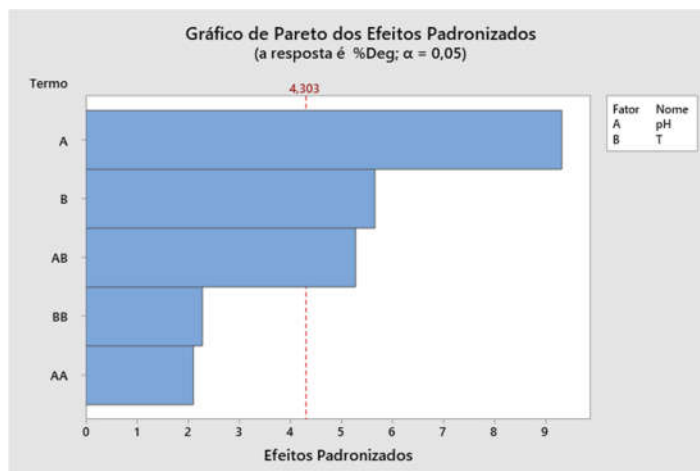


Figura 14 – Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do modelo sem os experimentos 26 e 27

O modelo foi recalculado utilizando somente os coeficientes significativos e a ANOVA do modelo é mostrada na Tabela 12. O modelo foi significativo uma vez que média quadrática do modelo (MQ_m) e a média quadrática residual (MQ_r) foram estatisticamente diferentes com $F_{calculado} (27,16) > F_{tabelado} (6,59)$, com 95% de confiança. A remoção dos ensaios 26 e 27 refletiu em um bom R^2 , de 0,95 (SQ_{modelo}/SQ_{total}), mostrando uma significativa melhora em relação ao modelo contendo todos os ensaios.

Tabela 12. ANOVA do modelo sem os ensaios 26 e 27.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	3	171,547	57,182	27,16	0,004
Linear	2	138,943	69,471	32,99	0,003
pH	1	101,531	101,531	48,22	0,002
T	1	37,411	37,411	17,77	0,014
Interação	1	32,604	32,604	15,48	0,017
pH*T	1	32,604	32,604	15,48	0,017
Erro	4	8,422	2,106		
Total	7	179,969			

Assim como no modelo sem utilização da radiação UV a remoção dos ensaios pode ser devido a erros experimentais ou esses ensaios não pertencerem ao domínio explicado pelo modelo. A Equação 3 mostra a equação final obtida para o modelo e a superfície obtida por ela é mostrada na Figura 15.

$$\%Deg = 11,428(\pm 0,513) + 4,750(\pm 0,68)*pH + 2,883(\pm 0,68)*T + 2,855(\pm 0,726)*pH*T$$

Equação 3

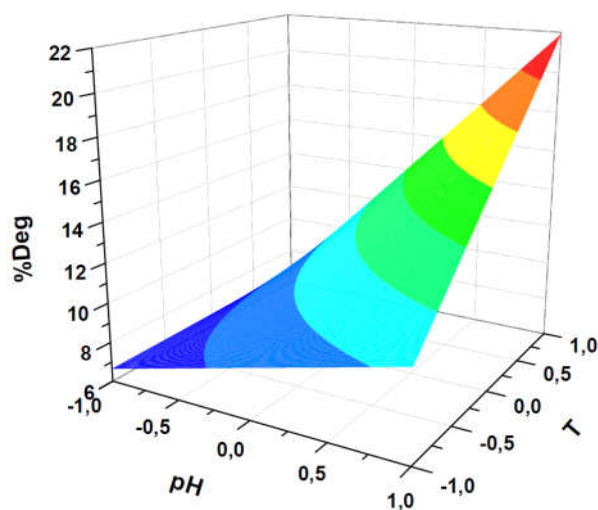


Figura 15 – Equação obtida do modelo sem os experimentos 26 e 27

Uma investigação criteriosa para averiguar se o motivo dos modelos se ajustarem melhor sem alguns ensaios deve ser conduzida, repetindo os ensaios que teoricamente apresentaram problemas para confirmação se foi um erro experimental ou estes ensaios pertencem a outro domínio não explicado pelos modelos propostos inicialmente. Independente disso, a compreensão da influência das variáveis na degradação do ativo não depende do ajuste dos experimentos a um modelo matemático preciso, sendo possível avalia-las de maneira qualitativa.

4.1.3. Análise por HPLC-IT-MS

A otimização dos parâmetros de ionização relatados na seção 3.1.4 foi realizada pelo software do equipamento via injeção direta de uma amostra padrão de TCGL na concentração de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Uma adaptação no método cromatográfico foi necessária devido ao grande número de íons contaminantes presentes após o tempo de retenção referente ao TCGL. Dessa forma, o tempo de coleta de dados foi de 14 minutos com intuito de tentar separar os contaminantes e verificar se havia produtos de degradação co-eluído com estes interferentes. Além disso, durante a otimização dos parâmetros de ionização foi observada a presença de um íon contaminante m/z 545, um aumento de 22 Da em relação ao íon molecular do TCGL de m/z 523. Esse íon é possivelmente um aduto de sódio que pode ser formado devido a fácil contaminação por sódio durante as análises. A ionização facilitada deste aduto dificultou a identificação estrutural dos produtos de degradação, uma vez que os

parâmetros que permitiam a visualização do íon m/z 523 junto ao seu aduto promoviam um sinal com intensidade próximo ao ruído. A fase móvel utilizada durante o método de HPLC-UV foi alterada buscando melhorar a ionização dos compostos de interesse. Foram testados água ultra pura sem adição de aditivos e uma solução contendo ácido fórmico como aditivo, onde os melhores resultados foram encontrados quando água ultra pura fora utilizada.

A Figura 16A mostra o cromatograma do pico base (roxo) e o cromatograma UV da amostra padrão com os parâmetros já otimizados. É possível notar grandes bandas cromatográficas após 6 minutos de análise, porém este mesmo perfil cromatográfico foi observado nas amostras de controle (Branco), indicando que essas bandas sejam referentes a contaminantes. A banda cromatográfica referente ao TCGL é destacada em vermelho e o espectro de massas desse ponto é mostrado na Figura 16B.

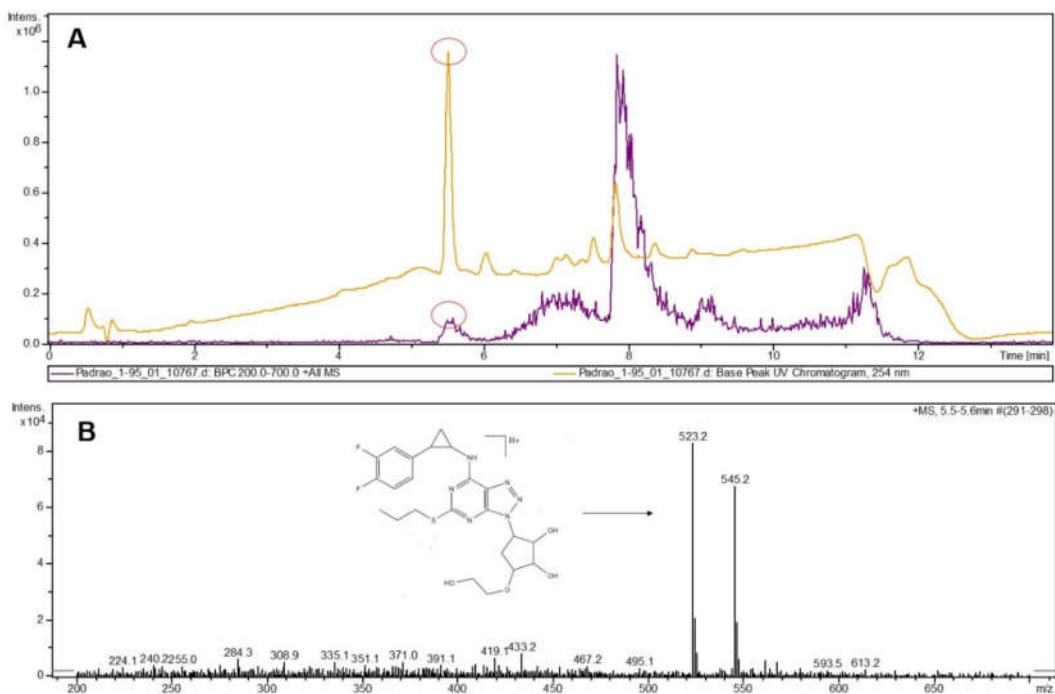


Figura 16 - (A) Cromatograma do pico base (roxo) e cromatograma UV (amarelo) da amostra padrão de TCGL. (B) Espectro de massas no ponto 5,5 minutos.

Para a determinação dos produtos de degradação do TCGL via HPLC-IT-MSⁿ foram selecionados um experimento de cada planejamento, uma vez que o perfil cromatográfico se mostrou constante dentro dos planejamentos. Para os

experimentos sem irradiação UV foi selecionado o ensaio 8 devido a maior intensidade de sinal das bandas cromatográficas referentes aos dois produtos de degradação formados. Como não foi observada nenhuma nova banda nos experimentos com irradiação UV, foi selecionado o ensaio 21 devido à maior porcentagem de degradação.

A Figura 17A mostra o cromatograma do pico base do experimento 8 (em preto) e amostra branco deste ensaio (em vermelho). É possível notar que a impureza presente no minuto 8 tem uma intensidade de sinal superior ao encontrado pela amostra padrão, o que dificulta a visualização das bandas cromatográficas, tanto do TCGL, quanto dos produtos de degradação. Essa grande diferença pode ter acontecido por uma possível dificuldade de ionização da molécula do TCGL e seus produtos de degradação (P1 e P2) em relação as moléculas dessa impureza. Dessa forma, a Figura 17B traz o cromatograma UV (em azul) sobreposto ao cromatograma do pico base (em preto), para melhor visualização de onde se encontram as bandas cromatográficas que serão mencionadas adiante.

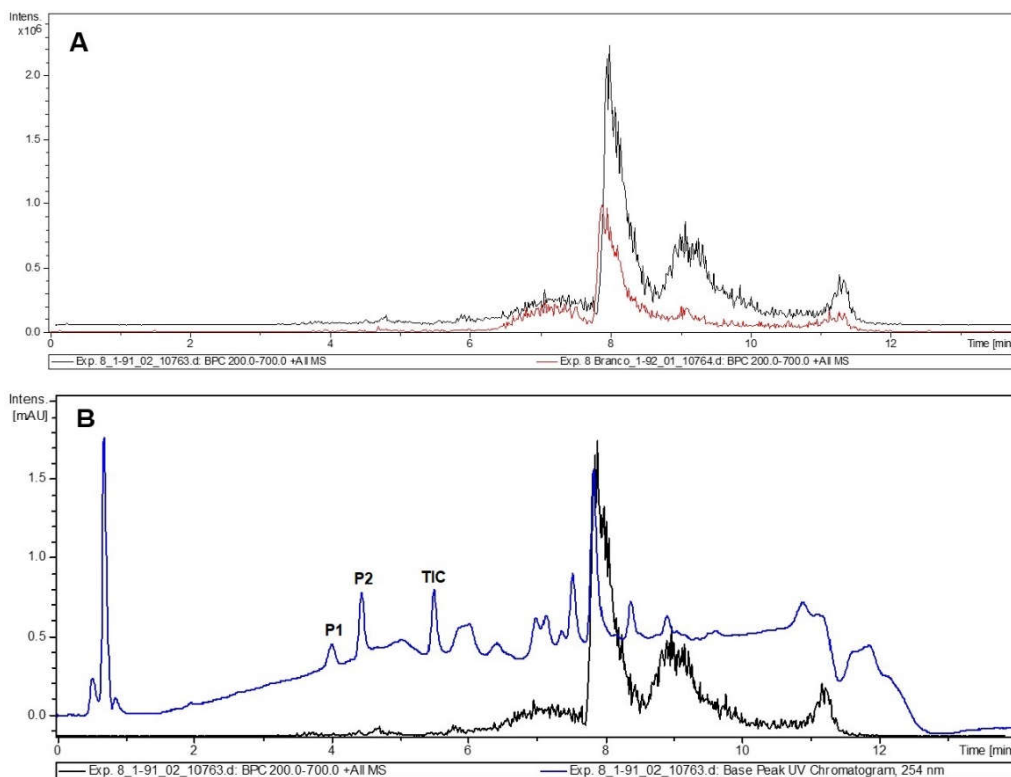


Figura 17 - (A) Cromatograma do pico base do experimento 8 (em preto) e seu respectivo controle branco (em vermelho). (B) Cromatograma UV do experimento 8 (em azul) e cromatograma do pico base deste ensaio (em preto).

A Figura 18A mostra o espectro de massas obtido na banda cromatográfica associada ao produto de degradação P1, eluído no tempo de retenção de 4 minutos. Não há nenhum íon que se destaque satisfatoriamente do sinal de ruído, sendo os íons de m/z 433 e 457 os mais intensos. Afim de verificar se estes íons são provenientes dos produtos de degradação ou apenas ruídos experimentais, foi realizada a extração destes íons no cromatograma do ensaio 8 e do branco. A Figura 18B mostra que o que cromatograma de íon extraído referente ao íon m/z 457 no experimento 8 (em preto) é semelhante ao encontrado no ensaio branco (em vermelho), indicando que é apenas ruído experimental. O mesmo pode ser observado para o íon m/z 433, onde o cromatograma de íon extraído do experimento 8 (em azul) se assemelha ao encontrado na amostra branco (em verde). Apesar de ser visível no cromatograma UV, essa banda cromatográfica não se apresentou muito intensa na espectrometria de massas, levando a inferir que a otimização nos parâmetros para ionização não foi eficiente para a ionização das moléculas do P1. Uma investigação mais profunda se faz necessária para entender melhor a ionização deste composto, afim de otimizar a intensidade do sinal analítico para que possa ser possível a identificação estrutural deste produto de degradação.

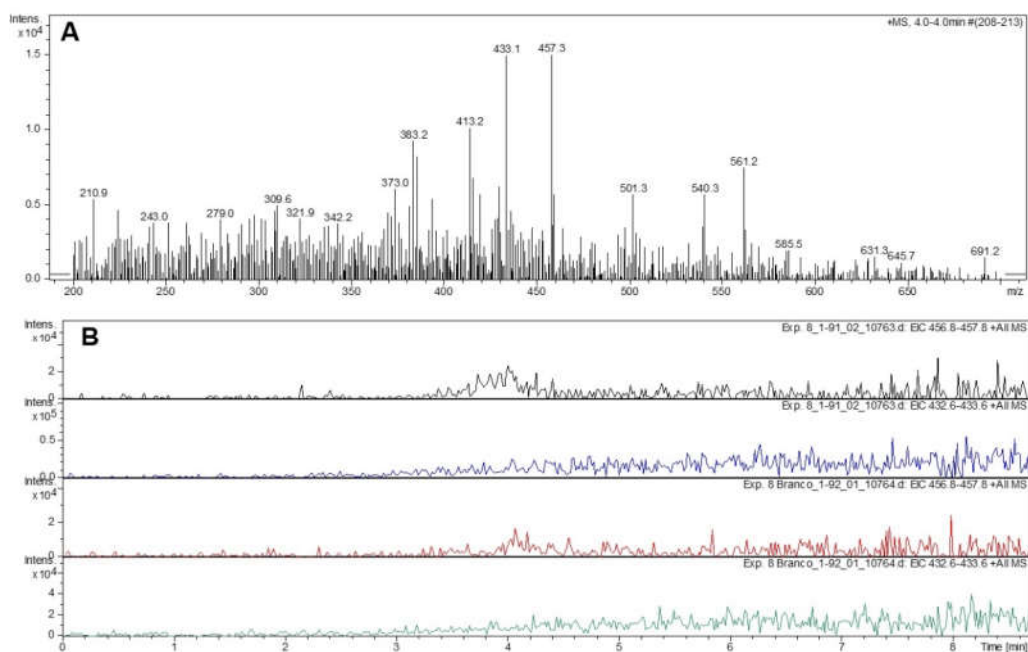


Figura 18 - (A) Espectro de massas no tempo de retenção de 4 minutos para o experimento 8. (B) Cromatogramas de íon extraído dos íons m/z 433 e 457 no experimento 8 e no seu respectivo branco.

O espectro de massas do composto P2 é mostrado na Figura 19A. Assim como no primeiro composto a razão sinal/ruído é baixa e os íons com maior intensidade são os de m/z 555 e 577. O cromatograma de íon extraído do íon m/z 555 é mostrado na Figura 19B, onde é possível observar a formação de uma banda cromatográfica no tempo de retenção de 4,5 minutos indicando que este íon não é somente ruído experimental, podendo ser um íon associado ao P2.

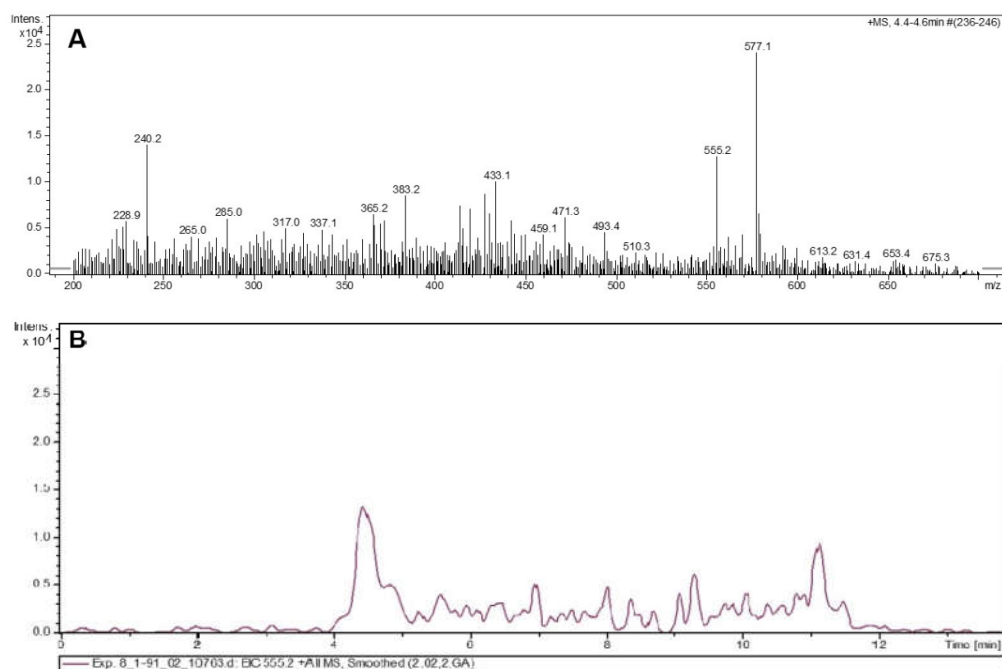


Figura 19 - (A) Espectro de massas no ponto 4,5 minutos referente ao P2. (B) Cromatograma de íon extraído do íon m/z 555

O íon de m/z 555 possui um incremento de 32 Da quando comparado ao íon protonado do TCGL (m/z 523), sugerindo a introdução de dois átomos de oxigênio na molécula de TCGL. Foi realizado um experimento de fragmentação MS^2 deste íon que é mostrado na Figura 20, onde é possível notar a presença dos íons fragmento de m/z 537, 493 e 395. Estes mesmos íons fragmentos foram encontrados por Yaye, H. S et. al. (2015)⁶⁰, que realizou a degradação de TCGL de forma semelhante aos protocolos tradicionais.

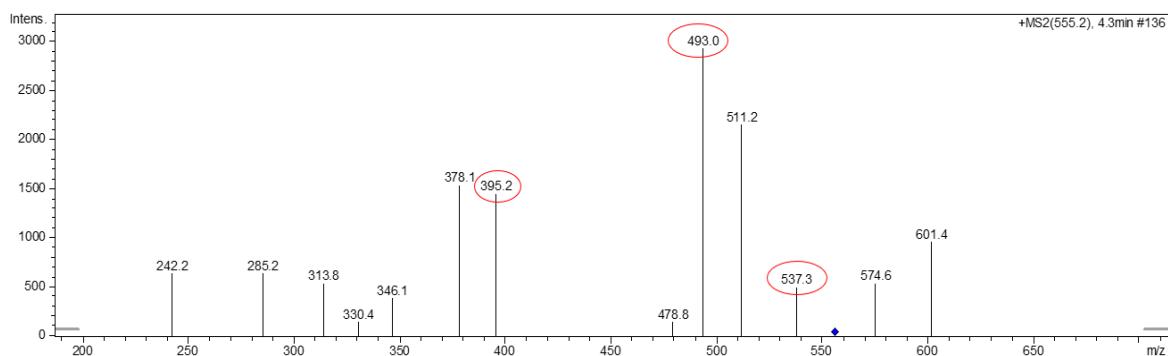


Figura 20 – Espectro de massas coletado na análise MS2 do íon m/z 555

Em seu estudo, Yeya et. al. associou o incremento de 32 Da a adição de dois oxigênios para a formação de um grupo sulfona na estrutura do TCGL. A formação de tal produto de degradação é proveniente de um processo oxidativo e uma representação da possível rota de degradação envolvida na formação do P2 é mostrada na Figura 21.

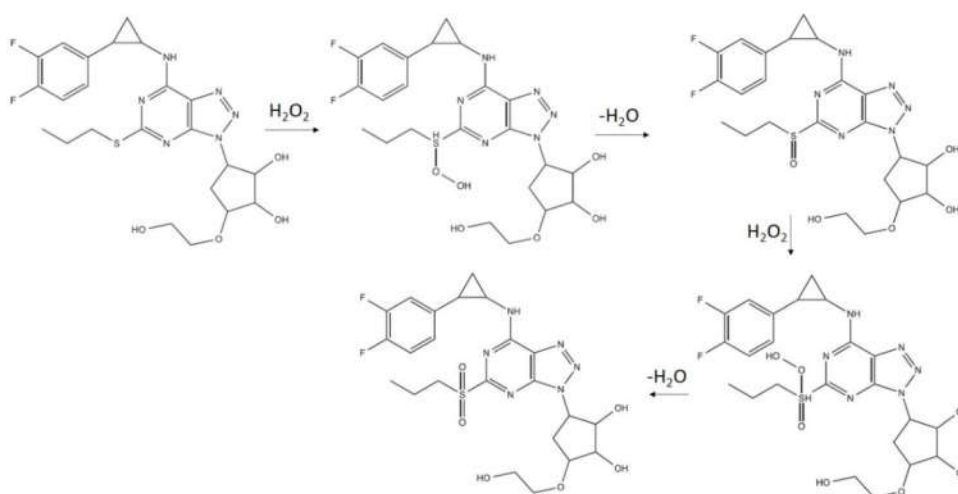


Figura 21 - Rota de degradação sugerida para a formação do P2 (adaptado Yaye, H. S et. al. (2015)⁶⁰).

O íon m/z 577 possui um incremento de 54 Da em relação a molécula protonada do TCGL. A Figura 22 mostra o cromatograma de íon extraído para este íon onde pode ser observado a formação de uma banda cromatográfica na região correspondente ao P2, indicando que possa haver uma co-eluição. Ao comparar o íon

m/z 577 com o íon m/z 555 é possível observar um incremento de 22 Da, indicando que o íon m/z 577 seja um aduto de sódio do P2, da mesma forma que foi observado com o padrão de TCGL. Este íon foi resistente a experimentos de fragmentação, o que dificultou a identificação estrutural que comprovasse a hipótese deste íon ser um aduto de sódio.

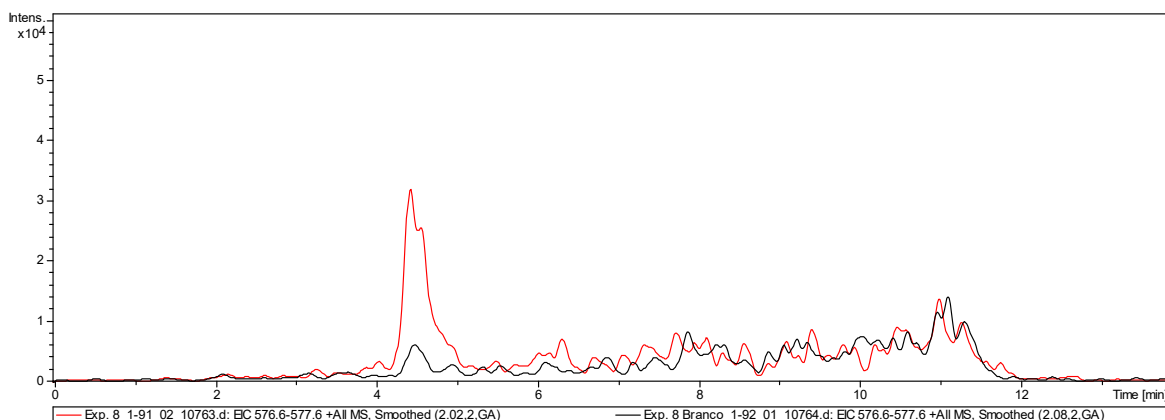


Figura 22 - Cromatogramas de íon extraído do íon m/z 577 no experimento 8 (em vermelho) e no seu respectivo branco (em preto).

A análise por HPLC-IT-MSⁿ do experimento 21, referente aos experimentos realizados com irradiação UV não mostrou nenhum novo produto de degradação. A Figura 23 mostra o cromatograma de pico base deste experimento e do seu respectivo branco. Neste caso, o espectro de massas de cada ponto desse cromatograma foi analisado buscando os íons mais intensos, posteriormente, foi obtido o cromatograma de íon extraído para cada um destes íons. Porém, em todos os casos, os íons mais intensos estavam presentes no branco ou eram apenas ruídos presentes em todo o cromatograma, indicando que os produtos de degradação formados não foram visíveis tanto no UV quanto no massas.

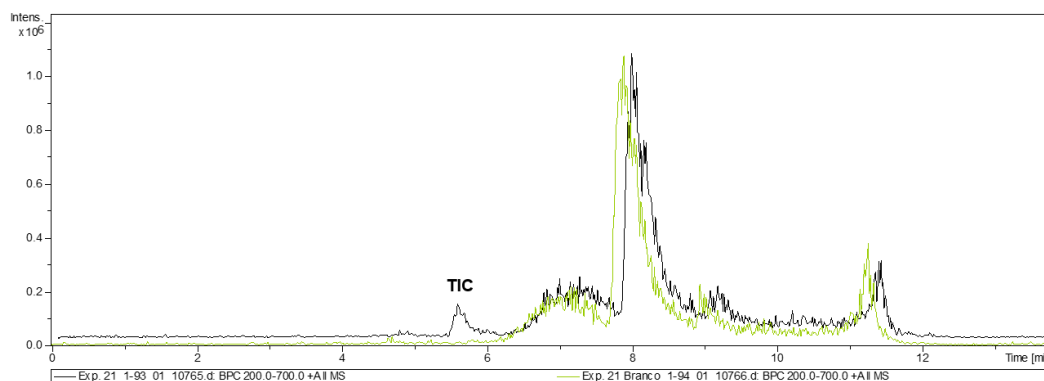


Figura 23 - Cromatogramas de pico base do experimento 21 (em preto) e seu respectivo branco (em verde).

Apesar da identificação estrutural do produto de degradação P2, ficou claro que os problemas na otimização na ionização do TCGL decorrente da presença dos adutos de sódio comprometeram a análise dos demais produtos de degradação formados. Um estudo profundo na otimização dos parâmetros de ionização para as moléculas de interesse ou um tratamento de amostra pra a remoção deste aduto se faz necessário visando a elucidação estrutural desses compostos.

5. CONCLUSÕES

O planejamento experimental foi uma ferramenta útil para estudar a degradação do Ticagrelor. Foi possível determinar que o termo linear da concentração de peróxido de hidrogênio e do pH interferiram mais significativamente no processo. A variável temperatura não foi significativa no processo no planejamento sem a radiação UV. Contudo nos experimentos com radiação UV, a passagem do nível menos para o nível mais da variável temperatura resultou no dobro da porcentagem de degradação. Além disso, o termo quadrático do pH e da temperatura foram significativos no modelo sem radiação UV que teve os ensaios 9 e 13 removidos. A radiação UV, que foi avaliada apenas qualitativamente, mostrou uma possível interação com os íons hidroxilas presentes em pH elevados, com as maiores degradações sendo encontradas nos ensaios com pH 10, indicando uma interação entre essas duas variáveis.

O método adaptado empregado na separação cromatográfica por HPLC-UV foi capaz de separar o Ticagrelor e seus produtos de degradação que são visíveis no detector UV. Porém, uma adaptação a esse método foi necessária nas análises por HPLC-IT-MSⁿ devido a presença de compostos que não eram vistos no UV.

A presença de adutos geraram problemas na ionização dos compostos de interesse, dificultando a elucidação estrutural de todos os produtos de degradação encontrados, indicando a necessidade de um estudo mais profundo para a obtenção de resultados melhores.

6. REFERENCIAS

1. DE OLIVEIRA, E. A., LABRA, M. E. & BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: Uma visão geral. *Cad. Saude Publica* 22(11): 2379, 2006.
2. IQVIA, I. The Global Use of Medicine in 2019 and Outlook to 2023. 60, <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/the-global-use-of-medicine-in-2019-and-outlook-to-2023> (2019).
3. ROCHA, T. G. & GALENDE, S. B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. *Uningá Rev.* 20(2): 97, 2014.
4. BAJAJ, S., SINGLA, D. & SAKHUJA, N. Stability testing of pharmaceutical products. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2(3): 129, 2012.
5. COSTA, G. N., VIANA, G. M., LIMA, U. F. & CABRAL, L. M. Diretrizes para elaboração de um protocolo e relatório de estudo de degradação forçada de medicamentos de acordo com a RDC 53/2015. *Infarma - Ciências Farm.* 30(3): 194, 2018.
6. SINGH, S., JUNWAL, M., MODHE, G., TIWARI, H., KURMI, M., PARASHAR, N. & SIDDURI, P. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. *Trends Anal. Chem.* 49: 71, 2013.
7. SONAWANE, S. & GIDE, P. Optimization of Forced Degradation Using Experimental Design and Development of a Stability-Indicating Liquid Chromatographic Assay Method for Rebamipide in Bulk and Tablet Dosage Form. *Sci. Pharm.* 79(1): 85, 2011.
8. SONAWANE, S. & GIDE, P. An Experimental Design Approach For The Forced Degradation Studies And Development Of A Stability-Indicating Lc Method For Eplerenone In Tablets. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34(17): 2020, 2011.
9. ALVARENGA JUNIOR, B. R. DE & CARNEIRO, R. L. Chemometrics Approaches in Forced Degradation Studies of Pharmaceutical Drugs. *Molecules* 24(20): 2019.
10. BRÜMMER, H. How to approach a forced degradation study. *LIFE Sci.* 31: 1, 2011.
11. ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. <http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-318-de-6-de-novembro-de-2019-226513805>.
12. RAWAT, T. & PANDEY, I. P. Forced degradation studies for Drug Substances and Drug Products-Scientific and Regulatory Considerations. *J. Pharm. Sci. Res.* 7(5): 238, 2015.

13. ALCÂNTARA, F. C., RESCIA, V. C., SANTOS, M. A. & VALDUGA, C. J. Testes de degradação forçada para fármacos e medicamentos. *Rev. Pesqui. e Inovação Farm.* 5(1): 38, 2013.
14. PIFFERI, G. & RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. *Farmaco* 58(8): 541, 2003.
15. CROWLEY, P. J. Excipients as stabilizers. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2(6): 237, 1999.
16. ALLINSON, J. G., DANSEREAU, R. J. & SAKR, A. The effects of packaging on the stability of a moisture sensitive compound. *Int. J. Pharm.* 221(1–2): 49, 2001.
17. BLESSY, M., PATEL, R. D., PRAJAPATI, P. N. & AGRAWAL, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. *J. Pharm. Anal.* 4(3): 159, 2014.
18. REYNOLDS, D., FACCHINE, K. L., MULLANEY, J. F., ALSANTE, K. M., HATAJIK, T. & MOTTO, M. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. *Pharm. Technol.* 26: 48, 2002.
19. FDA. *Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products*. <https://www.fda.gov/media/71707/download> (2003).
20. FDA. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs): Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/media/113760/download> (2020).
21. EMA. *GUIDELINE ON STABILITY TESTING: STABILITY TESTING OF EXISTING ACTIVE SUBSTANCES AND RELATED FINISHED PRODUCTS*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-stability-testing-stability-testing-existing-active-substances-related-finished-products_en-0.pdf (2008).
22. EMA. *Guideline on the chemistry of active substances*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-chemistry-active-substances_en.pdf (2016).
23. ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC N° 53, de 4 de dezembro de 2015. http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC_53_2015_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892.
24. ICH. *Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)*.

- [https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29 Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf) (2003).
25. ICH. *Stability testing: photostability testing of new drug substances and products Q1B*. PHOTOSTABILITY TESTING OF (1996).
 26. ICH. *Stability testing for new dosage forms Q1C*. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q1C Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q1C%20Guideline.pdf) (1996).
 27. ICH. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29 Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf) (2005).
 28. ICH. *Impurities in new drug substances Q3A(R2)*. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29 Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf) (2006).
 29. ICH. *Impurities in new drug products Q3B(R2)*. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29 Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf) (2006).
 30. NGWA, G. Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. *Drug Deliv. Technol.* 10(5): 2010.
 31. KURMI, M., KUMAR, S., SINGH, B. & SINGH, S. Implementation of design of experiments for optimization of forced degradation conditions and development of a stability-indicating method for furosemide. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 96: 135, 2014.
 32. WHO. *Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations, WHO Technical Report Series 929, Anexo 5, Guidelines for Registration of Fixed-Dose Combination Medicinal Products, Apêndice 3, Pharmaceutical Development (or Preformulation) Studies.* (2005).
 33. ANVISA. Institucional. <http://portal.anvisa.gov.br/institucional>.
 34. ANVISA. *Resolução-RE Nº 560, de 2 de Abril de 2002*. http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_560_2002_COMP.pdf/3862f935-e3c0-4eaa-bc21-3c344d1f7ce8.
 35. ANVISA. *Resolução-RE Nº 398, de 12 de Novembro de 2004*. [https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro28351/documento 1.pdf](https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro28351/documento%201.pdf).
 36. ANVISA. *Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 171, de 22 de agosto de 2017*. http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3192254/RDC_171_2017_.pdf/bdf990b9-5c8e-436b-b450-f592f48c0e89.
 37. ANVISA. *Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 58, de 20 de Dezembro*

- de 2013.
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0058_20_12_2013.pdf.
38. JANZEN, H. Forced Degradation Studies – Comparison Between ICH, EMA, FDA And WHO Guidelines and ANVISA’s Resolution RDC 53/2015. *Bonn, Master Drug Regul. Aff. - Univ. Bonn, 2016. Diss. Mestrado, 51 p.*
 39. ARDILA, J. A. Estudo Multivariado Dos Parâmetros De Degradação Forçada Em Ranitidina E Albendazol E Monitoramento Por Espectroscopia Raman Amplificada Por Superfície E Hplc. *São Carlos, Programa Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2016. Tese doutorado, 153 p.*
 40. PEREIRA-FILHO, E. R., POPPI, R. J. & ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. *Quim. Nova* 25(2): 246, 2002.
 41. FERREIRA, M. M. C., ANTUNES, A. M., MELGO, M. S. & VOLPE, P. L. O. Quimiometria i: Calibração multivariada, um tutorial. *Quim. Nova* 22(5): 724, 1999.
 42. CUNICO, M. W. M., CUNICO, M. M., MIGUEL, O. G., ZAWADZKI, S. F., PERALTA-ZAMORA, P. & VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica* 9(1): 2008.
 43. HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B* 910: 2, 2012.
 44. 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. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147: 590, 2018.
 45. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases (CVDs). 2017 [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
 46. ASTRAZENECA. *Bula Profissional - Brilinta*. <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351745856200990/> (2010).
 47. ANVISA. *Registro - Brilinta*. <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351745856200990/> (2010).
 48. GOBETTI, C., PEREIRA, R., MENDEZ, A. & GARCIA, C. Determination of the New Antiplatelet Agent Ticagrelor in Tablets by Stability-Indicating HPLC Method.

- Curr. Pharm. Anal.* 10(4): 279, 2014.
49. FALCÃO, F. J. DE A., CARVALHO, L., CHAN, M., ALVES, C. M. R., CARVALHO, A. C. C. & CAIXETA, A. M. Receptores plaquetários P2Y₁₂: Importância na intervenção coronariana percutânea. *Arq. Bras. Cardiol.* 101(3): 277, 2013.
 50. WALLENTIN, L., BECKER, R. C., BUDAJ, A., CANNON, C. P., EMANUELSSON, H., HELD, C., HORROW, J., HUSTED, S., JAMES, S., KATUS, H., MAHAFFEY, K. W., SCIRICA, B. M., SKENE, A., STEG, P. G., STOREY, R. F. & HARRINGTON, R. A. Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* 361(11): 1045, 2009.
 51. LEMESLE, G., SCHURTZ, G., BAUTERS, C. & HAMON, M. High on-treatment platelet reactivity with ticagrelor versus prasugrel: a systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost.* 13(6): 931, 2015.
 52. DHILLON, S. Ticagrelor: A Review of Its Use in Adults with Acute Coronary Syndromes. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 15(1): 51, 2015.
 53. TENG, R. & BUTLER, K. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist, in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 66(5): 487, 2010.
 54. TENG, R., OLIVER, S., HAYES, M. A. & BUTLER, K. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ticagrelor in healthy subjects. *Drug Metab. Dispos.* 38(9): 1514, 2010.
 55. ZHOU, D., ANDERSSON, T. B. & GRIMM, S. W. In vitro evaluation of potential drug-drug interactions with ticagrelor: Cytochrome P450 reaction phenotyping, inhibition, induction, and differential kinetics. *Drug Metab. Dispos.* 39(4): 703, 2011.
 56. OTURAN, M. A. & AARON, J.-J. Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications. A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44(23): 2577, 2014.
 57. FIOREZE, M., PEREIRA, E., SANTOS, D. & SCHMACHTENBERG, N. Processos oxidativos avançados: fundamentos e aplicação ambiental. 79, 2014 doi:10.5902/2236117010662.
 58. WINGERT, N. R., ELLWANGER, J. B., BUENO, L. M., GOBETTI, C., GARCIA, C. V., STEPPE, M. & SCHAPOVAL, E. E. S. Application of Quality by Design to optimize a

- stability-indicating LC method for the determination of ticagrelor and its impurities. *Eur. J. Pharm. Sci.* 118: 208, 2018.
59. BUENO, L. M., MANOEL, J. W., GIORDANI, C. F. A., MENDEZ, A. S. L., VOLPATO, N. M., SCHAPOVAL, E. E. S., STEPPE, M. & GARCIA, C. V. HPLC method for simultaneous analysis of ticagrelor and its organic impurities and identification of two major photodegradation products. *Eur. J. Pharm. Sci.* 97: 22, 2017.
60. YAYE, H. S., SECRÉTAN, P. H., HENRIET, T., BERNARD, M., AMRANI, F., AKROUT, W., TILLEUL, P., YAGOUBI, N. & DO, B. Identification of the major degradation pathways of ticagrelor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 105: 74, 2015.