

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Maurício Elesbão Walter

**ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, ELETROFORÉTICO
E BIOLÓGICOS *IN VITRO* PARA ANÁLISE DE RIVAROXABANA**

Santa Maria, RS

2019

MAURÍCIO ELESBÃO WALTER

**ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, ELETROFORÉTICO E
BIOLÓGICOS *IN VITRO* PARA ANÁLISE DE RIVAROXABANA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS

2019

Maurício Elesbão Walter

ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, ELETROFORÉTICO E BIOLÓGICOS *IN VITRO* PARA ANÁLISE DE RIVAROXABANA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 21 de agosto de 2019:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Marcelo Donadel Malesuik, Dr. (Unipampa)

Lisiane Bajerski, Dr^a. (Unipampa)

Carine Viana Silva, Dr^a. (UFSM)

Melânia Palermo Manfron, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS

2019

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente agradeço a Deus pela vida, saúde, força e proteção para guiar o meu caminho;

- ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora por toda confiança, amizade, apoio e revisão crítica, durante iniciação científica, mestrado e doutorado. Agradeço também pela oportunidade concedida de ingressar no CTEFAR, local que me proporcionou evolução como profissional farmacêutico;

- aos meus pais Marilei e Claudemir e minha irmã Juliana por todo carinho, educação, incentivo e valores que levarei de suporte para a vida;

- à Graciêla pelo amor, carinho, compreensão e suporte durante minha formação como profissional. Agradeço por me dar o melhor presente do mundo, nossa filha Lívia;

- à minha família por todo apoio que me foi dado e por todos os valores que me foram ensinados;

- aos meus amigos e colegas do CTEFAR e CEBIFAR, que durante 10 anos foram parte diária da minha vida. Agradeço a todos que fizeram parte dos laboratórios durante esse período;

- aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial e do PPGCF;

- à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho.

- à FATEC e CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

(Claude Levi-Strauss)

RESUMO

ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, ELETROFORÉTICO E BIOLÓGICOS *IN VITRO* PARA ANÁLISE DE RIVAROXABANA

AUTOR: Maurício Elesbão Walter
ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

A rivaroxabana (RIV) é um anticoagulante de uso oral que apresenta mecanismo de ação baseado na inibição do fator Xa (FXa) da cascata de coagulação. É indicada para prevenção e tratamento da trombose venosa profunda (TVP) e para pacientes com fibrilação arterial não-valvar. No presente trabalho foi desenvolvido e validado método por cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) para avaliação de RIV em comprimidos, e os resultados foram comparados com aqueles fornecidos pelo bioensaio da atividade antifator Xa e pelo método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR). Além disso foi otimizado método por cromatografia líquida quiral (CL-quiral) para separação dos enantiômeros. O método por MEKC foi executado com capilar de sílica fundida (40 cm de comprimento efetivo x 50 µm d.i.), mantido a temperatura de 25°C e a tensão aplicada foi de 30 kV. A solução eletrolítica foi composta de ácido morfolinoetano sulfônico (MES) 75 mM e dodecilsulfato de sódio (SDS) 25 mM, em pH 2,0. O tempo de injeção foi de 60s com pressão de 50 mBar, e detecção por arranjo de diodos (DAD) a 202 nm. O tempo de migração da RIV foi de 2,81 min e a linearidade do método determinada na faixa de concentração de 0,50 – 50 µg/mL ($r^2 = 0,9991$). Os limites de detecção e quantificação foram 0,16 e 0,54 µg/mL, respectivamente. A especificidade foi avaliada em estudos de degradação, e demonstrou-se também, que não houve interferência dos excipientes. A exatidão foi de 100,67%, com erro relativo inferior a 1,60%. A média dos teores encontrados pela aplicação do método proposto foi 0,66% maior e 0,59% menor, em relação aos resultados do bioensaio da atividade antifator Xa e do método por CL-FR, respectivamente, com diferenças não significativas ($p > 0,05$). Demonstrou-se que o método por MEKC representa alternativa para a análise de comprimidos de RIV. Executaram-se, então, estudos por CL-quiral e os enantiômeros separados foram submetidos a avaliação da atividade biológica e citotoxicidade, observando-se que a forma S é ativa e a R apresenta baixa atividade e menor citotoxicidade. Os resultados obtidos pelos métodos físico-químicos foram comparados com os fornecidos pelo ensaio biológico do antifator Xa, demonstrando que não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Além disso, destacou-se a capacidade analítica de cada método, e que somente a cromatografia quiral possibilita a análise qualitativa e quantitativa das formas enantioméricas. Neste contexto, a pesquisa representa contribuição analítica para assegurar a qualidade, contribui para garantir a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos, e estabelece bases para avanços no estudo de medicamento genérico contendo RIV.

Palavras-chave: Rivaroxabana. Cromatografia Eletrocínica Micelar. Cromatografia líquida quiral. Enantiômeros. Cromatografia líquida em fase reversa. Bioensaios.

ABSTRACT

STUDY OF CHROMATOGRAPHIC, ELETROFORETIC METHODS AND *IN VITRO* BIOASSAYS FOR THE ANALYSIS OF RIVAROXABAN

AUTHOR: MAURÍCIO ELESBÃO WALTER

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Rivaroxaban (RIV) is an oral anticoagulant with the mechanism of action based on the inhibition of the factor Xa of the coagulation cascade. It is clinically used for the prophylaxis and treatment of thromboembolic diseases and nonvalvular atrial fibrillation. In the present research, a stability-indicating micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) method was validated for the analysis of RIV in tablets dosage forms, and the results were compared to those of the anti-factor Xa bioassay and the reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method. Besides, the chiral-HPLC was optimized to separate the enantiomers. The MEKC method was performed on a fused-silica capillary (effective length 40 cm and 50 μm i.d.), maintained at 25°C, and the separation voltage was 30 kV. The background electrolyte solution consisted of 75 mM MES buffer and 25 mM sodium dodecyl sulphate (SDS) solution at pH 2.0. Injections were carried out using a pressure mode at 50 mbar for 60 s, with detection by a photodiode array detector set at 202 nm. The migration time was 2.81 min and the method was linear over the concentration range of 0.5 – 50 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 = 0.9991$). The detection limit (DL) and quantitation limit (QL) were 0.16 $\mu\text{g/mL}$ and 0.54 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Specificity and stability-indicating capability of the method were established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The accuracy was 100.67% with bias lower than 1.60%. The proposed method was applied to the quantitative analysis of RIV in tablet dosage forms and the results were correlated to those of the anti-factor Xa assay and the validated RP-HPLC method showing values 0.66% higher and 0.59% lower, respectively, with non-significant differences ($p > 0.05$). The results show that the MEKC could constitute an alternative for the analysis of the tablets. Then, the chiral-HPLC was performed to separate the enantiomers, which were subjected to the anti-factor Xa assay and cytotoxicity test, showing low activity for the R-enantiomer and lower toxicity. The results of the physicochemical methods were compared to those of the anti-factor Xa assay, which showed non-significant differences ($p > 0.05$). Besides, the analytical capability of each method was emphasized, and only the chiral RP-HPLC was able to detect and quantify the enantiomeric forms. In this context, the present research represents a contribution to guarantee the quality, to assure the safety and therapeutic efficacy of the pharmaceutical products, and to establish bases for advances in the study of the generic drug containing RIV.

Keywords: Rivaroxaban. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. Chiral liquid chromatography. Enantiomers. Reversed-phase liquid chromatography. Bioassay.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1 - Cascata de coagulação.....	18
FIGURA 2 - Cristalografia de raios-X da RIV complexada ao Fator Xa humano.....	19
FIGURA 3 - Estrutura molecular dos enantiômeros (S) e (R) de RIV.....	20

ARTIGO

FIGURE 1 - Representative MEKC electropherograms showing peak 1 = rivaroxabana, peak 2 = internal standard, peaks 3 - 4 = degraded forms. (a) Rivaroxaban reference substance solution; (b) Sample of pharmaceutical formulation. RRS solution following degradation under conditions: (c) basic hydrolysis, (d) acidic hydrolysis, (e) neutral hydrolysis, (f) oxidative, (g) photolytic	33
---	----

MANUSCRITO

FIGURE 1 - Representative chromatograms by Chiral HPLC and RP-HPLC showing: peak 1 = (R) enantiomer, peak 2 = (S) enantiomer, peak 3 = rivaroxaban. (a) Racemic mixture, (b) (R)-rivaroxaban reference substance, (c) (S)-rivaroxaban reference substance.....	50
--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

TABLE 1 – Accuracy of MEKC for rivaroxaban in the formulations.....	34
TABLE 2 – MEKC conditions and range investigated during robustness testing with one-variable-at-a-time (OVAT) procedure	34
TABLE 3 – Comparative content determination of RIV in tablet dosage forms by MEKC and RP-LC methods, and anti-factor Xa assay	35

MANUSCRITO

TABLE 1 – Comparative content determination of Rivaroxaban by chiral-HPLC, RP-HPLC, MEKC and anti-factor Xa assay against the (S)-Reference substance, and separation of the enantiomeric forms.....	51
TABLE 2 – Analysis of the (R) Reference substance and the racemic mixture by the in vitro bioassays against the (S) Reference substance.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
AVC	Acidente vascular cerebral
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
CL-quiral	Cromatografia líquida com separação quirál
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
CYP2J2	Citocromo P450 2J2
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
CYP450	Citocromo P450
DAD	Detector de arranjo de diodos
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
dTP	Tempo de protrombina diluído
EC	Eletroforese capilar
EMA	European Medicines Agency
ETP	Potencial endógeno de trombina
FDA	Food and Drug Administration
FXa	Fator X ativado
h	Horas
HI	Hemorragia intracraniana
IC50	Concentração inibitória 50%
ICH	International Conference on Harmonisation
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
°C	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
r	Coefficiente de correlação
RIV	Rivaroxabana
RMN	Ressonância magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TGA	Teste de geração da trombina
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TVP	Trombose venosa profunda
UGT	UDP-glicuronosiltransferase
UI	Unidade internacional
USP	Farmacopeia Americana
UV	Ultravioleta
UVC	Luz ultravioleta tipo C

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 CASCATA DE COAGULAÇÃO	18
3.2 DESENVOLVIMENTO E ESTRUTURA DA RIVAROXABANA	19
3.3 ESTUDOS CLÍNICOS, BIODISPONIBILIDADE E FARMACOCINÉTICA	20
3.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS	23
3.5 QUIRALIDADE DE FÁRMACOS	26
4 ARTIGO	29
5 MANUSCRITO	38
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	61

APRESENTAÇÃO

A presente Tese de Doutorado segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria do ano de 2015. O estudo compreende o desenvolvimento de métodos físico-químicos por eletroforese capilar e cromatografia quiral para avaliação de rivaroxabana, bem como avaliação da atividade da molécula por bioensaios *in vitro*. Os resultados obtidos geraram um artigo científico já publicado e um manuscrito submetido para publicação. Os tópicos de **MATERIAL E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** encontram-se no Artigo e no Manuscrito, que apresentam na íntegra a pesquisa realizada. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações nos capítulos **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO DA LITERATURA** e **DISCUSSÃO** na Tese, pois as referências utilizadas para elaboração do artigo e do manuscrito estão mencionadas nos mesmos.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A prevenção e o tratamento de distúrbios tromboembólicos são realizados pelo uso de anticoagulantes, que apresentam limitações para o controle e manutenção de seus efeitos, justificando a pesquisa de novos fármacos. O estudo com base no mecanismo de coagulação constitui-se em abordagem específica para obtenção de substâncias ativas com ação anticoagulante, que sejam alternativas em relação à terapia convencional com heparina não-fractionada, heparinas de baixo peso molecular e varfarina, para o tratamento de coágulos localizados ou trombos liberados na circulação sistêmica. Pesquisas recentes visaram à descoberta de moléculas de uso oral, que apresentassem ação direta sobre fatores de coagulação e que não necessitassem de monitoramento periódico para o ajuste da dose. Nesse contexto surgiu a Rivaroxabana (RIV), Xarelto[®], produzida pelo laboratório Bayer Healthcare, como um anticoagulante de uso oral com ação direta e altamente seletiva sobre o fator Xa (FXa) da cascata de coagulação (MISSELWITZ et al., 2011).

Estruturalmente a RIV é um composto derivado da oxazolidinona com fórmula empírica $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$, peso molecular de 435,89 g/mol, praticamente insolúvel em água. A molécula apresenta dois enantiômeros (S e R), mas apenas a forma isômera S é ativa e apresenta ação farmacológica, sendo usada nas formulações farmacêuticas. Foi aprovada pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em 2008 para o tratamento e prevenção de trombose venosa profunda (TVP) em pacientes submetidos a artroplastias de quadril e joelho (ROEHRIG et al., 2005; YAO et al., 2015).

Paralelamente à pesquisa de novas substâncias ativas para uso clínico, observa-se a necessidade de métodos analíticos para a identificação, determinação de pureza, estabilidade e dosagem da substância farmacêutica ativa nos produtos farmacêuticos. Na área de controle da qualidade destacam-se as tecnologias analíticas por cromatografia líquida (CL) e eletroforese capilar (EC) desenvolvidas com base nas características físico-químicas, estruturais e pureza das moléculas. Neste contexto, o método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) com detecção no ultravioleta (UV) tem sido amplamente utilizado no controle de qualidade de matérias-primas e dos produtos farmacêuticos. Do mesmo modo, a EC é uma técnica de uso crescente para análise farmacêutica, devido ao baixo consumo de reagentes e solventes, eficiente separação e detecção de impurezas (USP, 2019; DEEB et al., 2016).

A estrutura molecular da RIV, devido à presença de um átomo de carbono com ligantes em posições espaciais diferentes, pode apresentar dois enantiômeros. As

características físico-químicas dos isômeros de uma molécula são praticamente idênticas, mas as propriedades farmacológicas e tóxicas podem apresentar variações. Assim, o estudo de metodologias analíticas para separação e determinação das formas quirais é necessário para garantir a pureza, segurança e eficácia terapêutica do medicamento (RIBEIRO et al., 2014).

Por sua vez, a validação do método é fundamental para demonstrar através de estudos experimentais, que atende às exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Desse modo, assegura-se a qualidade lote-a-lote, eficácia terapêutica e segurança, de acordo com os estudos pré-clínicos, analíticos e clínicos realizados na pesquisa da substância ativa e do produto farmacêutico, nas etapas de registro na vigilância sanitária (SHABIR, 2003; ICH, 2005; FDA 2015). Convém observar que não existem especificações nas Farmacopeias sobre a RIV e nem monografias disponíveis para o controle da qualidade (BRASIL, 2010; USP, 2019).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar método por eletroforese capilar micelar (MEKC) e por cromatografia líquida quiral (CL-quiral) para análise qualitativa e quantitativa de RIV em comprimidos, e avaliar correlação entre os métodos físico-químicos e biológicos *in vitro*. Contribuir para aprimorar o controle de qualidade, segurança e eficácia terapêutica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A pesquisa teve por objetivo estudar métodos analíticos e biológicos necessários para o controle de qualidade de RIV em comprimidos através de:

- a) desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade por MEKC para identificação e análise do teor e formas degradadas;
- b) desenvolvimento de método por CL-quiral para separação, identificação e determinação de teor dos isômeros (S) e (R);
- c) aplicação do método, previamente desenvolvido e validado, por CL-FR;
- d) execução dos bioensaios da atividade antifator Xa, atividade antifator IIa e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) para avaliação da atividade biológica das formas isômeras da molécula;
- e) ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos isômeros (S) e (R);
- f) avaliação de correlação entre os métodos físico-químicos e biológicos *in vitro*;
- g) aplicação dos métodos desenvolvidos e validados para o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos disponíveis no País, estabelecendo bases para futuros estudos de medicamentos genéricos.

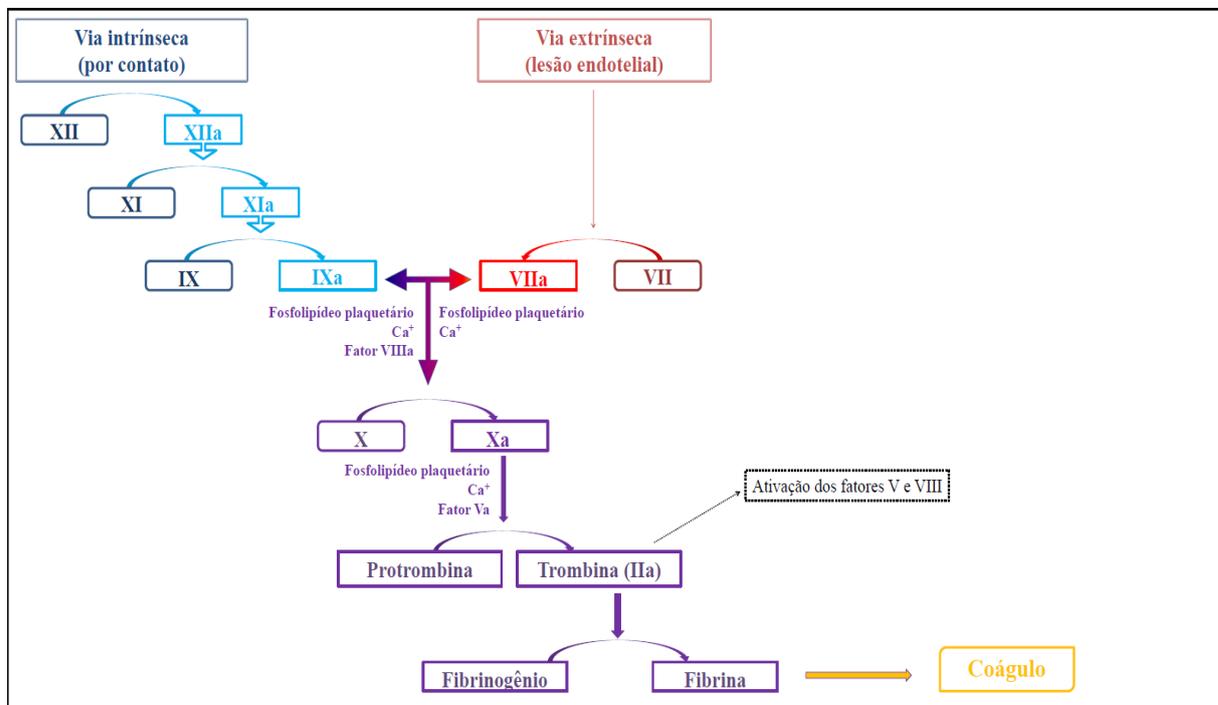
REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CASCATA DE COAGULAÇÃO

As enzimas envolvidas na cascata de coagulação têm sido pesquisadas como alvo da ação farmacológica de novos anticoagulantes. Uma das abordagens baseia-se no estudo da inibição do fator X, que desempenha função central na coagulação sanguínea, pois é ativado tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca, em resposta ao dano vascular ou estase sanguínea (Figura 1). O FXa, combinado com o fator Va, protrombina e íons Ca^{+2} , forma o complexo da protrombinase, que transforma protrombina em trombina. Então, a trombina catalisa a clivagem de fibrinogênio em fibrina, e as ativações do fator XIII (que estabiliza a rede de fibrina), das plaquetas e dos fatores das etapas iniciais da cascata de coagulação resulta em amplificação da resposta coagulante através do efeito de retroalimentação (PERZBORN, 2009; YEH et al., 2012).

Figura 1 – Cascata de coagulação.

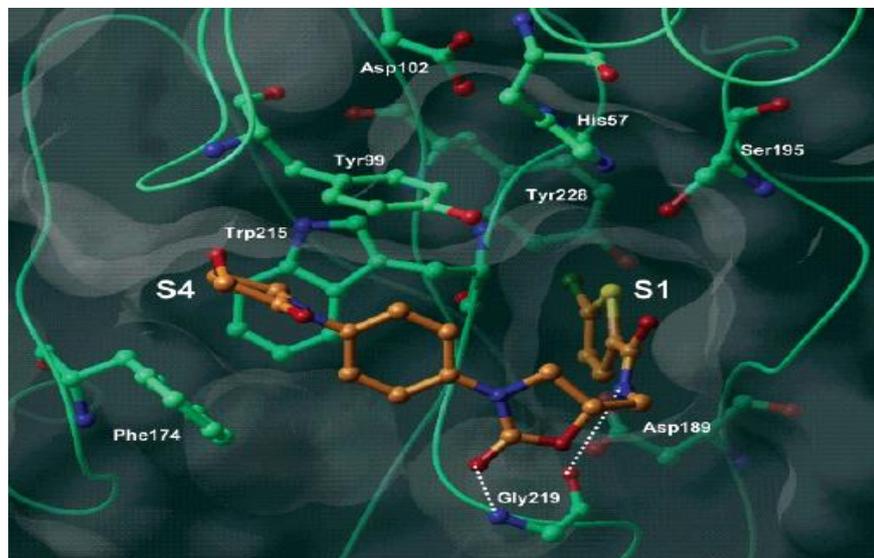


Fonte: adaptação de PERZBORN (2009, p. 261).

3.2 DESENVOLVIMENTO E ESTRUTURA DA RIVAROXABANA

Roehrig e colaboradores (2005) identificaram derivados da oxazolidinona como nova classe de potentes inibidores do FXa. Desenvolveram um derivado denominado inicialmente (BAY-59-7939), e posteriormente RIV, que se mostrou altamente potente e inibidor seletivo direto do FXa com elevada atividade antitrombótica *in vivo*. Os autores estudaram a estrutura do complexo com FXa humano por cristalografia de raios-X (Figura 2), demonstrando o modo de ligação e os requisitos específicos para maior afinidade.

Figura 2 – Cristalografia de raios-X da RIV complexada ao Fator Xa humano.



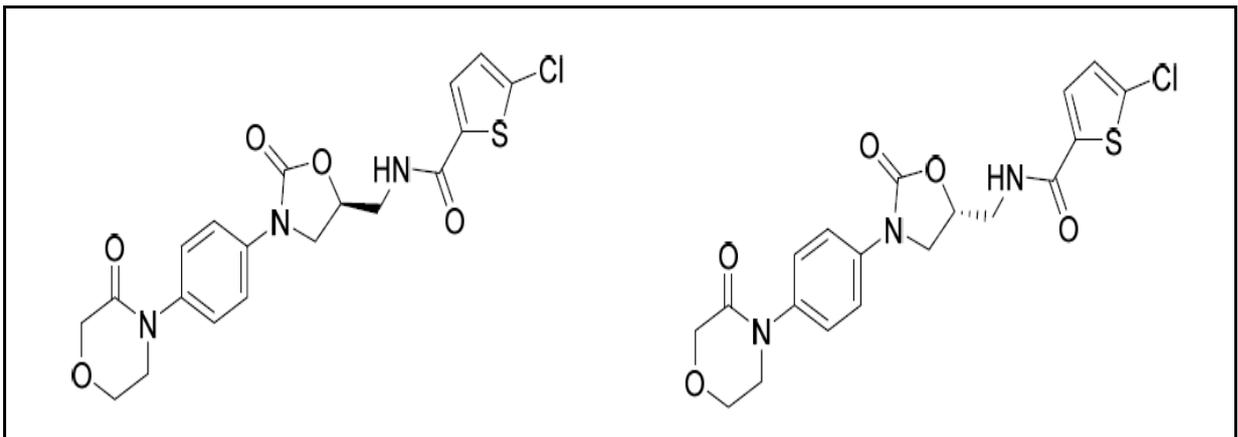
Fonte: ROEHRIG et al., (2005, p. 5904).

Nesse contexto, a RIV foi desenvolvida pelo Laboratório Bayer Healthcare, registrada como Xarelto[®], medicamento de uso oral com ação baseada na inibição seletiva do FXa. O fármaco é apresentado na forma de comprimidos de 10, 15 e 20 mg e foi clinicamente aprovado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) no ano de 2008, com indicação clínica para a prevenção do tromboembolismo profundo (TVP) em pacientes submetidos a cirurgias nos membros inferiores (SOLAYAR et al., 2011). Foi aprovada no Brasil pela ANVISA no ano de 2009, atualmente também é indicada clinicamente para prevenção de AVC e embolia sistêmica em pacientes com fibrilação atrial não valvular, para o tratamento

da trombose venosa profunda (TVP) e embolismo pulmonar (EP) e para reduzir o risco de TVP recorrente e EP após o tratamento inicial (GRILLO; MIRANDA, 2014).

A fórmula empírica da RIV é $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$, com nome químico (S)-5-Clor-N-{2-oxo-3-[4-(3-oxomorfolin-4-il)fenil]-1,3-oxazolidin-5-ilmetil}tiofen-2-carbamida, e apresenta peso molecular de 435,89 g/mol. É um pó não higroscópico, sem odor, de cor branca à amarelada. É praticamente insolúvel em água e em meio aquoso na faixa de pH 1 a 9. É levemente solúvel em solventes orgânicos como acetona e polietilenoglicol, e solúvel em acetonitrila, metanol e dimetilsulfóxido. A RIV pode apresentar dois enantiômeros (Figura 3), sendo a forma (S) responsável pela atividade farmacológica, devido sua orientação espacial específica para ligação ao FXa (ROEHRIG et al., 2005).

Figura 3 – Estrutura molecular dos enantiômeros (S) e (R) de RIV.



Fonte: CHEN et al., (2019, p. 306).

3.3 ESTUDOS CLÍNICOS, BIODISPONIBILIDADE E FARMACOCINÉTICA

A dose dos anticoagulantes é frequentemente ajustada de acordo com o peso corporal, razão pela qual foi estudada sua influência sobre a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica de RIV em pessoas com diferentes faixas de peso. A inibição do FXa foi semelhante em todos os grupos indicando que não há necessidade de ajuste da dose de acordo com o peso corporal (KUBITZA et al., 2007).

Os efeitos da insuficiência renal sobre a farmacocinética, farmacodinâmica e segurança de RIV foram estudados observando que, quanto maior o dano renal, maior a

concentração plasmática, pela menor excreção do fármaco. A concentração máxima de 172,3 µg/L foi alcançada em 2 h após sua administração (KUBITZA et al., 2010).

Os efeitos anticoagulantes da RIV em relação à idade foram investigados pelos ensaios do TTPA, Tempo de protrombina (TP), ensaio do antifator Xa *in vitro*, através da contaminação de plasma de voluntários com diferentes idades. Não foram detectadas diferenças significativas e os autores sugeriram novos estudos *in vivo* para confirmar a consistência da dose-resposta para o tratamento pediátrico (ATTARD et al., 2012).

O perfil farmacocinético da RIV foi avaliado por estudos clínicos em voluntários saudáveis. Apresenta rápida absorção via oral, atingindo seu C_{máx} em 2 - 4 h após administração, observando também aumento da absorção sob condições de alimentação. A RIV é metabolizada no fígado, via citocromo P450 (CYP3A4, CYP2J2), com excreção de um terço inalterado por via urinária e o restante por metabólitos inativos pelas fezes e urina. A meia vida do fármaco é de 5 - 9 h em indivíduos jovens e de 11 - 13 h em idosos. A RIV não induz as enzimas do CYP450 e sistemas transportadores, portanto o fármaco não apresenta interações relevantes com os principais medicamentos utilizados concomitante na clínica (MISSELWITZ et al., 2011; MUECK et al., 2013; YEH et al., 2012).

Samama e colaboradores (2013) publicaram revisão sobre o uso de RIV, destacando que, devido às características farmacocinética e farmacodinâmica, não há necessidade de monitoramento de rotina. Porém, se necessário, recomendam o ensaio do antifator Xa, cujos resultados devem ser comparados com a farmacocinética e fatores de risco associados à hemorragia do paciente.

Takács-Novák e colaboradores (2013) avaliaram a importância biológica da solubilidade de 4 fármacos com diferentes características ácido-base. A solubilidade de RIV (não ionizável), furosemida (ácida), papaverina (básica) e ácido niflúmico (anfótero) foi determinada em fluidos gástrico e intestinal, simulados em condições de jejum e alimentado, e presença da bile. Os autores concluíram que a solubilidade é influenciada pelas propriedades ácido-base e lipossolubilidade de cada molécula. A RIV apresentou solubilidade duas vezes maior no fluido gástrico com alimentação, razão pela qual se recomenda a administração concomitante com alimentos.

Os usos clínicos da RIV foram avaliados em três estudos. O primeiro avaliou a eficácia de RIV comparada a enoxaparina sódica, como terapia padrão na prevenção e tratamento de TVP em pacientes submetidos a cirurgias de quadril e joelho, demonstrando que a RIV apresentou resultados comparáveis, sendo então aprovada para uso na Europa, Canadá e América Latina (ERIKSSON et al., 2008; KAKKAR et al., 2008; LASSEN et al.,

2008; TURPIE et al., 2009). O segundo estudo avaliou o uso de RIV para tratamento e prevenção de TVP e embolia pulmonar, comparados com a terapia padrão de enoxaparina sódica e antagonistas da vitamina K. Os resultados demonstraram que a RIV apresentou eficácia semelhante, constituindo-se em abordagem simples para o tratamento agudo e em casos crônicos dessas doenças (EINSTEIN PE-INVESTIGATORS et al., 2010; EINSTEIN PE-INVESTIGATORS et al., 2012; PRINS et al., 2013). O terceiro estudo avaliou a eficácia de RIV em relação a varfarina em pacientes com fibrilação atrial não-valvar, um tipo de arritmia cardíaca que pode ocasionar acidente vascular cerebral (AVC). Foi demonstrada eficácia semelhante, porém com menor ocorrência de hemorragia intracraniana (HI) e sangramentos fatais (BANSILAL et al., 2015; FOX et al., 2011; HALPERIN et al., 2014; HANKEY et al., 2012; PATEL et al., 2011; VAN DIEPEN et al., 2013).

As hemorragias cerebrais representam complicação decorrente do uso contínuo de anticoagulantes, e neste sentido Sawada e colaboradores (2017) realizaram bioensaio *in vivo* para a avaliação da expansão de hematoma cerebral e extravasamento através da barreira hematoencefálica. Camundongos da linhagem ddY com 12 semanas de vida, foram distribuídos em grupos tratados com RIV 10 ou 30 mg/kg e varfarina 4 mg/Kg. O grupo controle foi tratado com carboximetilcelulose. Observaram que os animais tratados com RIV, após hemorragia intracerebral induzida, apresentaram menor dano a barreira hematoencefálica e expansão hemorrágica limitada em relação à varfarina.

A hemorragia intracraniana (HI) é o pior prognóstico nos casos de AVC. A HI causa cerca de 50% de mortalidade nos pacientes no período de 1 ano e, frequentemente, os sobreviventes apresentam sequelas. Nesses casos o uso de anticoagulantes piora o quadro clínico. Então, em maio de 2018 foi aprovado pelo FDA o andexanet alfa, como primeiro antídoto para reversão dos efeitos anticoagulantes de inibidores do FXa, como RIV, apixaban e também enoxaparina. É uma molécula recombinante que simula o FXa, e os inibidores têm a mesma afinidade, se ligando a essa molécula. À medida que o organismo produz novas moléculas de FXa, vai se reestabelecendo a hemostasia. O biofármaco demonstrou redução na progressão de hematomas em pacientes com HI, bem como uma hemostasia sanguínea adequada (KURAMATSU et al., 2019).

Os efeitos da RIV em células osteoblásticas humanas foram investigados comparando as respostas com a enoxaparina. Os autores demonstraram diminuição da função osteoblástica associada à redução da expressão de mRNA pelos marcadores ósseos (SOLAYAR et al., 2011).

Somjen e colaboradores (2013) pesquisaram os efeitos de RIV e sua interferência nas modulações fisiológicas de indução hormonal com base nas respostas da linhagem celular humana osteoblástica SaOS₂. Demonstraram inibição nas etapas iniciais da formação óssea e no estímulo de hormônios moduladores.

3.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Os efeitos da RIV sobre os ensaios de coagulação foram avaliados usando plasma humano contaminado com concentrações de 0 - 1000 µg/mL. Realizaram-se os ensaios TTPA, TP, antitrombina, antifator Xa, fibrinogênio e proteína C ativada, usando diferentes reagentes. Os autores observaram que os ensaios apresentam resultados variáveis para as concentrações terapêuticas de RIV (HILLARP et al., 2010).

A avaliação dos efeitos da RIV sobre o fator Xa foram estudados através de 5 métodos cromogênicos otimizados para reduzir a variabilidade interensaios. O plasma humano foi contaminado para preparar curvas na faixa de concentrações entre 25 - 900 ng/mL determinando-se as respostas pela liberação de para-nitroanilina por espectrofotometria a 405nm. Os autores demonstraram que a variação entre os diferentes métodos pode ser minimizada através de modelos matemáticos, e que deveria ser realizado estudo multicêntrico, para corroborar os dados encontrados (HARENBERG et al., 2011).

A concentração plasmática de RIV foi determinada por ensaios de coagulação de uso rotineiro na clínica e também nos testes baseados na inibição do fator Xa e geração de trombina. Concluíram que o TP é sensível representando o efeito sobre toda a cascata de coagulação do plasma dos pacientes. A atividade antifator Xa é sugerida para avaliar a concentração de RIV, e futuramente o ensaio do potencial endógeno de trombina (ETP) poderia contribuir como indicador do equilíbrio hemostático dos pacientes (MOLENAAR et al., 2012).

Douxflis e colaboradores (2012) estudaram o impacto da RIV sobre os testes de coagulação com a finalidade de escolher o ensaio para monitorar a dose e interpretar os dados laboratoriais. Plasma humano deficiente de plaquetas foi contaminado com RIV nas concentrações de 11 - 1090 ng/mL e então submetido aos ensaios do TP, TTPA, Tempo de protrombina diluído (dTP), Teste de geração da trombina (TGA) e antifator Xa. Os resultados demonstraram que o TP pode ser usado para avaliar o risco de hemorragias. O ensaio da atividade antifator Xa foi executado usando padrão de calibração, e se mostrou específico e sensível, sendo assim recomendado para avaliar níveis de RIV. Também foi sugerida

concentração limite para evitar sangramento ou trombose, com base em estudos de farmacocinética.

O ensaio da atividade antifator Xa tem sido usado na análise de anticoagulantes e para a avaliação de potência de produtos farmacêuticos de heparinas convencionais e de baixo peso molecular. O método cromogênico quantitativo com leitura espectrofotométrica tem sido adotado para estudos da avaliação da concentração/atividade de RIV tanto no plasma de pacientes, quanto em comprimidos e matéria-prima (ASMIS et al., 2012; DALMORA et al., 2004; YATES et al., 2016).

Método por CL-FR foi validado com coluna Luna C₁₈ (250 × 4,6 mm) a 40°C, eluição isocrática da fase móvel constituída de acetonitrila:água (55:45, v/v), fluxo de 1,2 mL/min, com padrão interno de cafeína e detecção a 249 nm. O procedimento foi aplicado para dosagem de RIV em comprimidos (ÇELEBIER et al., 2013).

Walter e colaboradores (2015) validaram método por CL-FR com coluna Synergi Fusion RP C₁₈ (150 mm × 4,6 mm), mantida a 40°C. A fase móvel foi constituída de acetonitrila:água (70:30, v/v), com fluxo isocrático de 0,7 mL/min e detecção por DAD a 249 nm. O procedimento foi aplicado para teste de dissolução, análise de RIV em comprimidos e avaliação em plasma humano contaminado. Os autores demonstraram também diminuição da atividade pelo bioensaio do antifator Xa *in vitro*, das formas degradadas de RIV originadas das condições de estresse, bem como aumento da citotoxicidade, em relação à molécula íntegra.

Albiol-Chiva e colaboradores (2019) desenvolveram e validaram método por cromatografia líquida micelar para determinação direta da concentração de RIV em plasma e urina. As amostras foram diluídas na fase móvel composta de solução tampão fosfato pH 7 com SDS 0,05M e de 1-propanol 12,5%. O método foi executado utilizando fluxo isocrático de 1 mL/min, coluna C₁₈ Kromasil (4,6 × 250 mm, 5 µm), volume de injeção de 20 µL e detecção em 250 nm. Demonstraram a aplicabilidade, praticidade, velocidade de execução e baixo custo do método.

A cinética de degradação de RIV foi estudada sob condições de hidrólise ácida, básica e por exposição à radiação UVC, demonstrando que o modelo de ordem zero é o mais adequado. Os produtos de degradação foram submetidos a diferentes testes de citotoxicidade *in vitro* usando células hepáticas HEPG2 e avaliação de genotoxicidade. Os autores observaram relação direta entre a degradação alcalina e o aumento do potencial citotóxico (WINGERT et al., 2018).

A cinética de degradação fotolítica de novos anticoagulantes orais, incluindo RIV, foi testada em amostras por CL-FR, CL-MS/MS, RMN e espectroscopia no UV. As amostras foram diluídas em meios aquosos de diferentes origens, e expostas a condições que simulam a luz solar. Detectaram um fotoisômero de degradação da RIV, identificado por RMN, bem como sete fotoprodutos derivados de apixabana, e dois da dabigatrana (YASSINE et al., 2018).

Ramiseti e Kuntamukkala (2014) desenvolveram e validaram método por CL-MS/MS para identificação e caracterização de impurezas relacionadas ao processo de produção de RIV e produtos de degradação do fármaco submetido às condições de hidrólise (ácida, alcalina e neutra), fotólise, oxidação e temperatura. Foram isoladas e sugeridas as estruturas de três formas degradadas e uma impureza do produto.

Método para quantificação de RIV em plasma humano foi desenvolvido e validado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-MS/MS), com sensibilidade na faixa de concentração entre 0,50 - 500 µg/L. As condições cromatográficas basearam-se no uso de coluna C₁₈ (125 × 4 mm), com fase móvel constituída por tampão acetato de amônio e acetonitrila, pH ajustado para 3,0 com ácido fórmico, com eluição em gradiente e vazão de 1 mL/min. A extração do fármaco foi realizada por precipitação de proteínas com metanol, e o método foi aplicado para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos de RIV (ROHDE, 2008).

Derogis e colaboradores (2017) e Studt e colaboradores (2017) realizaram a determinação de RIV no plasma de pacientes utilizando método por CL-MS/MS e demonstram correlação significativa com o bioensaio da atividade antifator Xa ($r = 0,98$). Sugerem a aplicação de ambos os métodos para monitorar o uso clínico, porém também destacam que o bioensaio eventualmente pode subestimar ou superestimar a concentração de RIV.

Ding e colaboradores (2017) analisaram formulações farmacêuticas de RIV por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-x. Demonstraram a compatibilidade dos excipientes (celulose microcristalina, lactose, hidroxipropilmetilcelulose, esterato de magnésio e lauril sulfato de sódio) com a RIV e sua estabilidade na formulação farmacêutica.

3.5 QUIRALIDADE DE FÁRMACOS

As formas enantioméricas de fármacos quirais influenciam o uso terapêutico devido às diferenças nas respostas biológicas. Os enantiômeros de uma determinada molécula podem diferir em sua atividade farmacodinâmica, qualitativa ou quantitativa, e também nas suas propriedades farmacocinéticas e tóxicas. O uso de um único enantiômero tem o potencial de apresentar vantagens clínicas, incluindo melhor perfil terapêutico/farmacológico, com a devida separação da eficácia/toxicidade. Por essa razão, o desenvolvimento de métodos analíticos enantiosseletivos é necessário, e na literatura destacam-se procedimentos por CL e por EC, observando-se que os diferentes isômeros podem apresentar características físico-químicas idênticas (GÜBITZ; SCHIMID, 2006; HUTT; TAN, 1995; WILLIAMS; LEE, 1985).

Brooks e colaboradores (2011) revisaram a importância da quiralidade para diferentes fármacos, observando que a afinidade de ligação pode diferir para as formas diastereoisômeras e enantioméricas. Destacam que os isômeros de determinados fármacos, eventualmente podem ser ineficazes, apresentar atividade clínica reduzida ou causar efeitos colaterais. A quiralidade é definida como potencial de uma molécula se apresentar em duas formas assimétricas que não são superponíveis, sem alteração da composição atômica, sequência ou ligações átomo-átomo, e identificadas como (S) ou (R), segundo nomenclatura IUPAC.

A CL tem sido o método adotado para a separação de enantiômeros, através do uso de reagentes de derivatização quiral (forma indireta) ou diretamente, com aditivos nas fases móveis ou fases estacionárias quirais, sendo essa última a mais usada devido às suas vantagens, especialmente sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez. Essas revisões destacam o estado-da-arte avaliando as diferentes fases estacionárias quirais, e as limitações e avanços atuais dos métodos por cromatografia (CAVAZZINI et al., 2011; RIBEIRO et al., 2014).

Yao e colaboradores (2015) investigaram os efeitos dos isômeros de RIV sobre as enzimas UDP-glicuronosiltransferases (UGT), observando que os centros quirais influenciaram significativamente seu comportamento. Essas enzimas desempenham função importante no metabolismo de substratos endógenos como esteroides e ácidos graxos, e diferentes fármacos podem inibir UGT, razão pela qual foi estudada a possível interação da RIV.

Prabhune e colaboradores (2015) desenvolveram método enantiosseletivo por CL-quiral usando coluna OD-H (250 × 4,6 mm) e fase móvel composta por n-hexano:etanol (50:50, v/v) com vazão de 1 mL/min, e detecção no comprimento de onda de 250 nm.

Elaboraram curva linear na faixa de 0,075 - 2,1 µg/mL, e validaram, com limitações, o método para separação do enantiômero (R) de RIV. Autores citam apenas na adequabilidade do sistema a resolução maior do que 1,5 entre os isômeros R e S.

Método por cromatografia líquida em fase reversa quiral acoplada à espectrometria de massas ESI (quiral-RP-UPLC-MS/MS) foi validado para a detecção dos isômeros de RIV. Foi usada coluna Chiralpak IC (4,6 × 250 mm, 5 µm) mantida a 25°C, fase móvel constituída de água:acetonitrila (10:90) e vazão de 0,4 mL/min. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,39 e 1,30 ng/mL respectivamente, e o método foi empregado para a análise em matriz biológica contaminada com a mistura dos dois isômeros (CHEN et al., 2019).

A validação durante o desenvolvimento dos métodos analíticos para caracterização e avaliação da pureza é necessária para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Entretanto, é fundamental demonstrar com dados experimentais que o método tem a capacidade de separar, detectar e quantificar o princípio ativo, impurezas e degradações, para que seja então recomendado seu uso no controle de qualidade (ROZET, et al., 2007; SHABIR, 2003; SHABIR, et al., 2007). Os procedimentos, parâmetros a serem avaliados e as especificações para a validação encontram-se disponíveis em guias oficiais (ICH 2005; FDA, 2015) e em teses e dissertações já desenvolvidas no Laboratório de Produtos Biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), bem como no artigo científico desta tese de doutorado, anexado a seguir no capítulo 1. Acrescenta-se que a avaliação comparativa dos resultados fornecidos por diferentes tecnologias analíticas constitui-se em avanço para aprimorar a determinação de identidade, pureza, formas degradadas e estabilidade contribuindo para garantir a qualidade, eficácia terapêutica e segurança dos produtos farmacêuticos (SOUTO, 2015; STAMM, 2013; WALTER, 2015).

A seguir está anexada a publicação científica, e o manuscrito submetido para publicação, ambos desenvolvidos no contexto dessa tese. Convém observar que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se devidamente descritos nos manuscritos.

ARTIGO

4 ARTIGO

4.1 – Maurício Elesbão Walter, Rafaela Ferreira Perobelli, Luís Gustavo Jung Motta, Alice Rosa da Silveira, Bruna Xavier and Sérgio Luiz Dalmora. Micellar electrokinetic capillary method for the analysis of rivaroxaban and its correlation with RP-LC method and bioassay.

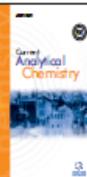
Current Analytical Chemistry, v.13, p. 379-385, 2017, DOI:
10.2174/1573411012666161025150131 Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.2174/1573411012666161025150131>.

RESEARCH ARTICLE



Micellar Electrokinetic Capillary Method for the Analysis of Rivaroxaban and its Correlation with RP-LC Method and Bioassay



Maurício Elesbão Walter^b, Rafaela Ferreira Perobelli^b, Luís Gustavo Jung Motta^a, Alice Rosa da Silveira^a, Bruna Xavier^{4b} and Sérgio Luiz Dalmora^{a*}

^aDepartment of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil; ^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Abstract: Background: Rivaroxaban is clinically indicated for the prophylaxis and treatment of thromboembolic diseases. A stability-indicating micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) method was validated for the analysis of rivaroxaban (RIV), using linezolid as an internal standard (IS), showing the capability to resolve from its potential impurities and degradation products, which is highly recommended for the quantitative analysis of pharmaceutical formulations.

Methods: The background electrolyte solution consisted of 75 mM MES buffer and 25 mM sodium dodecyl sulphate (SDS) solution at pH 2. Injections were carried out using a pressure mode at 50 mbar for 60 s, with detection by a photodiode array detector set at 202 nm.

Results: Specificity and stability-indicating capability of the method were established in degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The method was linear over the concentration range of 0.5 – 50 µg mL⁻¹ ($r^2 = 0.9991$) and the detection limit (DL) and quantitation limit (QL) were 0.16 µg mL⁻¹ and 0.54 µg mL⁻¹, respectively. The accuracy was 100.67% with bias lower than 1.60%.

Conclusion: The proposed method was applied to the quantitative analysis of RIV in tablet dosage forms and the results were correlated to those of the validated reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and the anti-factor Xa assay, with non-significant differences ($p > 0.05$), contributing to evaluate an alternative to improve quality control, and to assure therapeutic efficacy of the pharmaceutical product.

Keywords: Micellar electrokinetic capillary chromatography, rivaroxaban, anti-factor Xa, reversed-phase liquid chromatography, validation.

1. INTRODUCTION

Rivaroxaban (RIV), is 5-Chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide, with empirical formula C₁₉H₁₈ClN₃O₅S, and a molecular weight of 435.89 g mol⁻¹, practically insoluble in water [1].

RIV is a novel, orally available, highly selective direct factor Xa (FXa) inhibitor, and interrupts the intrinsic and extrinsic pathways of the coagulation cascade, inhibiting both thrombin formation and development of thrombi. It is clinically indicated for the prophylaxis and treatment of thromboembolic diseases [2, 3].

An isocratic reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was developed for the analysis of RIV in tablets dosage forms using C₁₈ column, and the separation was achieved with 3.37 min. with detection at 249 nm [4]. A

RP-LC method using C₁₈ column coupled with a ESI-MS/MS was validated for the identification and characterization of stress degradation products, of process related impurity and in bulk drugs, suggesting their structures [5]. A LC-MS/MS method was validated for the analysis of RIV in human plasma with retention time of 3.30 min, and was linear over the concentration range of 0.50 – 500 µg L⁻¹, and applied to pharmacokinetic studies [6]. Capillary electrophoresis (CE) is a powerful analytical approach, with high efficiency and resolution, representing an advance as a method of choice for research and quality control of pharmaceutical products, and many methods were validated for the determination of the active pharmaceutical ingredients and their impurities [7-10]. Different anti-factor Xa methods were optimized and used to determine RIV in spiked plasma samples, evaluating the inter-assay variability [11, 12]. An anti-factor Xa assay is recommended to assess the biological potency of anticoagulant drugs [13]. So far, RIV is not described in any Pharmacopeia, there is no CE method published and the validation of the method using the approach of stress testing showing the capability to resolve from its potential impuri-

*Address correspondence to this author at the Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil; Tel/Fax: +55 (55) 3220 8952; E-mail: sdalmora@terra.com.br

ties and degradation products, as determined by the guidelines, is highly recommended for the quantitative analysis of pharmaceutical formulations [14, 15].

This research aimed to develop and validate a stability-indicating micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) method for the quantitative analysis of RIV in tablet dosage forms; to correlate the results with a RP-LC method and an anti-factor Xa assay. Thus, contributing to the evaluation of alternative method to improve quality control, and thereby assuring the therapeutic efficacy of the pharmaceutical product.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Chemicals and Reagents

Rivaroxaban reference substance (RRS) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA) and linezolid, internal standard (IS), from Cristália (São Paulo, Brazil). A total of eight batches of Xarelto[®], Bayer Schering Pharma AG (Leverkusen, Germany) tablets containing 10, 15 and 20 mg of RIV were obtained from commercial sources within their shelf life period and were identified from 1 to 8. The factor Xa and chromogenic substrate S-2765 were purchased from Chromogenix (Milan, Italy). Analytical-grade 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (TRIS), sodium tetraborate and ultrapure sodium dodecyl sulphate (SDS) were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC-grade acetonitrile, methanol, phosphoric acid and tert-butyl methyl ether were purchased from Tedia (Fairfield, Ohio, USA) and dichloromethane, acetic acid and dimethyl sulfoxide (DMSO) from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system from Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Instrumentation and Software

MEKC experiments were performed on an Agilent^{3D}CE apparatus, Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), equipped with an autosampler, a photodiode array (PDA) detector, a temperature-controlling system (4 - 60°C), and a power supply able to deliver up to 30 kV. CE ChemStation software was used for instrument control, data acquisition and data analysis.

The RP-LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A_{VP} system controller, a LC-10 AD_{VP} pump, a DGU-14A degasser, a CTO-10A_{VP} column oven, a SIL-10AD_{VP} autosampler, and a SPD-M10A_{VP} PDA detector. Peak areas were automatically integrated by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program.

2.3. Solutions

2.3.1. Background Electrolyte Solutions (BGE-SDS and BGE)

The optimized background electrolyte solution (BGE) consisted of 75 mM MES at pH 2, adjusted by adding 8.5% (v/v) phosphoric acid, and filtered through a 0.22 µm mem-

brane. Equally, the BGE-SDS solution was prepared with 25 mM SDS, diluted to 1:5 (v/v) with ultrapure water.

2.3.2. Rivaroxaban Reference Substance (RRS) and Internal Standard (IS) Solutions

A stock solution was prepared by accurately weighing 1.85 mg of RRS, transferred to an individual 2 mL flask and diluted with 1.85 mL of acetonitrile, to obtain a final concentration of 1 mg mL⁻¹. Equally, IS stock solution was prepared by diluting the linezolid solution (2 mg mL⁻¹), in ultrapure water, to a final concentration of 1 mg mL⁻¹. The solutions were stored at 2 - 8°C, protected from light, and daily diluted with BGE to an appropriate concentration, and filtered through a 0.22 µm membrane.

2.3.3. Sample Solutions

To prepare the sample stock solutions, tablets containing, respectively, 10, 15 and 20 mg of RIV were accurately weighed and crushed to a fine powder. An appropriated amount was transferred into an individual 15 mL flask, and diluted to volume with acetonitrile, to obtain a concentration of 1 mg mL⁻¹. The stock solutions were processed as described for the RRS solution.

2.4. MEKC Method

Electrophoretic separations were performed on a fused-silica capillary with 50 µm i.d. and 48.5 cm of total length (effective length 40 cm), thermostated at 25°C, and detection with PDA set at 202 nm. Before the first use, the capillary was conditioned with 1 M NaOH for 30 min, followed by water for 15 min and BGE-SDS for 15 min. At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing it with 1 M NaOH for 5 min, followed by water for 2 min, and then with BGE-SDS for 5 min. After each rinsing, waiting steps of 5, 2 and 5 min, respectively, were used. To improve the reproducibility of the migration time between injections, after each run the capillary was conditioned again with 1 M NaOH (2 min), water (2 min) and BGE-SDS (2 min). Samples were injected hydrodynamically for 60 s at 50 mbar. The separation voltage was 30 kV (current about -71 µA), with negative polarity, applied during the analysis.

2.5. Validation of the MEKC Method

The method was validated using samples of a pharmaceutical dosage form of RIV with a label claim of 20 mg mL⁻¹. The following parameters were determined: specificity, linearity, detection limit (DL), quantitation limit (QL), precision, accuracy, robustness and system suitability test, according to the ICH guidelines [14].

2.6. Stress Testing Conditions

The specificity of the developed method was carried out using a RRS solution and a pharmaceutical formulation (1 mg mL⁻¹) subjected to accelerated degradation by different conditions. The working solution prepared in 0.1 M NaOH was used for basic hydrolysis, and working solution in 0.1 M HCl was employed for acidic hydrolysis evaluation. Both solutions were refluxed at 80°C for 60 min, cooled and neutralized, as necessary. Neutral condition was evaluated diluting the sample solution in acetonitrile and refluxed at 80 °C

for 1 h. Oxidative degradation was induced by storing the sample in 3% (v/v) H₂O₂ at ambient temperature for 24 h, protected from light. Photolytic studies were performed by exposing the sample to 200 Wh m⁻² of near-ultraviolet light for 24 h in a photostability chamber. Then, the solutions were diluted with BGE solution to a final concentration of 25 µg mL⁻¹. Potential interference of the excipients of the tablet formulation was detected by injecting a sample containing only placebo (in-house mixture of all the tablet additives), and by the standard addition method, where a calibration curve was constructed by the addition of known amounts of the RRS to the placebo [16]. Then, the peak purity of RIV in the samples was assessed using a PDA detector.

2.7. RP-LC Method

A validated RP-LC method was performed as previously published [17]. The elution was carried out on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Synergi Fusion-RP C₁₈ column (150 × 4.6 mm i.d., with a particle size of 4 µm and pore size of 80 Å), maintained at 40 °C. The LC system was operated isocratically using a mobile phase consisting of water:acetonitrile (30:70, v/v), run at a constant flow rate of 0.7 mL min⁻¹ and using PDA detection at 249 nm. The injection volume was 20 µL for both the RRS and the samples.

2.8. Anti-factor Xa Assay

The Anti-factor Xa assay was performed as described elsewhere [18] adjusted. Briefly, the RRS stock solution and the tablets crushed to a fine powder were diluted with DMSO to a concentration of 1 mg mL⁻¹, filtered through a 0.45 µm membrane filter, and then diluted with DMSO 10% (v/v) to 1 µg mL⁻¹. The reaction was performed in triplicate on a 96 well-microplate, with the doses between 15 - 40 ng mL⁻¹, and the absorbance was measured at 405 nm in a Multiskan FC microplate reader Thermo Scientific (Vantaa, Finland). Statistical analysis was carried out by the parallel line statistical method, using the CombiStats[®] software (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM Council of Europe).

2.9. Analysis of RIV in Pharmaceutical Formulations

Stock solutions of commercial formulations were diluted to a concentration of 25 µg mL⁻¹ with a BGE or a mobile phase, respectively, for the MEKC and RP-LC methods. The samples were injected in triplicate and the percentage recoveries were calculated against the RRS. For the anti-factor Xa assay, the working solutions were diluted with DMSO 10% (v/v) to a concentration of 1 µg mL⁻¹.

2.10. Determination of RIV in Human Plasma

Plasma samples were spiked with RRS (1 µg mL⁻¹) and linezolid (25 µg mL⁻¹), as IS. Then, a 4 mL aliquot of tert-butyl methyl ether:dichloromethane (60:40, v/v), was added and vortex-mixed for 90 s. The tubes were centrifuged for 20 min at 2700 rpm, the aqueous phase was frozen and the organic layer was filtered through a 0.22 µm membrane into conical tubes and evaporated under nitrogen stream while immersed in a 40 °C water bath. The residues were reconsti-

tuted with 300 µL of BGE and analyzed by the MEKC method.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Method Optimization

During the optimization phase of the method, some electrolyte solutions containing MES, TRIS, phosphoric acid and sodium tetraborate were tested by adding the surfactant SDS in the pH range from 2 - 9, selecting MES as the BGE. The MES concentration was evaluated from 10 - 100 mM, with constant 25 mM SDS at pH 2, which demonstrated a significant effect on the separation performance, through its influence on the electroosmotic flow (EOF) and the current produced in the capillary. Due to its low effect on current, increased sensitivity and non-significant increase on the migration time, a 75 mM solution was chosen as the optimum concentration. The pH 2 was selected as the optimum pH for the BGE solution, since it showed better peak symmetry (about 1.04), and higher pHs resulted in increased migration time and peak width. The influence of SDS was also investigated at the concentration range of 10 - 75 mM with constant 75 mM MES BGE solution at pH 2. The migration time of RIV increased with the increase of the SDS concentrations, giving it better efficiency combined with short analysis time with 25 mM SDS. The effects of organic modifiers, acetonitrile and methanol, in the concentration range of 5 - 10% (v/v), were also evaluated, but no improvement on the electrophoretic condition was achieved. The influence of temperature on the separation was investigated in the range of 20 - 30 °C, and a 25°C was chosen due to shorter analysis time and acceptable current. The effect of the voltage was studied through changes from 15 - 30 kV, showing that 30 kV yielded a short analysis time with not excessive current (about -71 µA). Sample solutions were injected hydrodynamically for 60 s at 50 mbar. Wavelength detection was evaluated in the range of 190 - 400 nm, and a 202 nm was chosen due to better sensitivity. In addition, loratadine, linezolid, propranolol and miconazole were tested as IS, selecting linezolid, to compensate for any injection errors and minor fluctuations of the migration time, thus improving the reproducibility of the MEKC method.

3.2. Validation of the MEKC Method

3.2.1. Specificity

The MEKC method was validated for the analysis of RIV in pharmaceutical formulations with a migration time of about 2.81 min, as shown in the typical electropherograms (Figs. 1a, 1b). The stability-indicating capability of the MEKC method [17] was evaluated under basic condition which resulted in a decrease of the RIV area (18.61%) and two additional peaks, detected at 2.71 and 2.77 min (Fig. 1c). The acidic condition exhibited a decrease of the area (10.35%) and two additional peaks at 2.64 and 2.70 min (Fig. 1d). The neutral condition exhibited a decrease of the area (11.98%) and only one additional peak was detected at 2.45 min (Fig. 1e). The oxidative degradation study exhibited a decrease of the area (13.08%) with one additional peak at 2.14 min (Fig. 1f). The photolytic condition showed a decrease of the area (14.72%) without any additional peak (Fig. 1g). The peak purity of the RRS and the IS, was determined

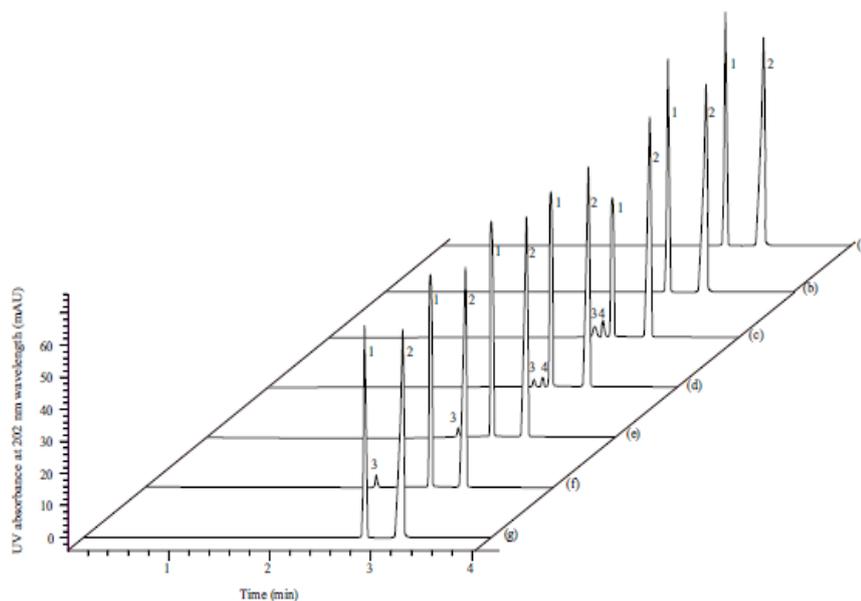


Fig. (1). Representative MEKC electropherograms showing peak 1 = rivaroxaban, peak 2 = internal standard, peaks 3 – 4 = degraded forms. (a) Rivaroxaban reference substance solution; (b) Sample of pharmaceutical formulation. RRS solution following degradation under conditions: (c) basic hydrolysis, (d) acidic hydrolysis, (e) neutral hydrolysis, (f) oxidative, (g) photolytic.

by overlaying the spectra captured at the apex, upslope and downslope using a PDA detector. Additionally, the interference from formulation excipients was assessed and non-significant difference ($p > 0.05$) was found between the slopes calculated for the calibration curve and the standard addition method. The data, together with the peak purity index in the range of 0.9999 – 1, showed that the peak was free from any co-migrating peak, thus confirming that the proposed method is specific for the analysis of RIV.

3.2.2. Linearity

The linearity was established in the concentration range of $0.5 - 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ for RRS, spiked with IS at $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. A typical calibration equation was $y = (0.0289 \pm 0.0006) x + (0.0112 \pm 0.0031)$, where, x is the concentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$, and y is the peaks-area ratio of RIV to IS. The correlation coefficient was ($r^2 = 0.9991$). The DL and the QL were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression model, by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 0.16 and $0.54 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and the QL determined experimentally was $0.50 \mu\text{g mL}^{-1}$, suitable as an alternative for quality control analysis [20, 21], also compared to the RP-LC method which showed $0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ [17].

3.2.3. Precision and Accuracy

The precision of the MEKC method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD %) of the RIV migration time and the peaks-area ratio of RIV to IS, for eight determinations at a concentration of $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD % values were 0.38 and 1.61%, respectively. The intermediate precision was assessed

by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) on three consecutive days (inter-days), giving RSD % values of 1.70 and 0.51%, respectively. The between-analysts precision was determined by calculating the RSD % for the analysis of two samples ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$); the values were found to be 1.30 and 0.93%, respectively.

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three solutions with known amounts of the RRS, corresponding to 80, 100, and 120% of the analytical concentrations, respectively. The absolute means, obtained with a mean value of 100.67% and a bias lower than 1.60% (Table 1), showed the accuracy within the desired range [22].

3.2.4. Robustness

Robustness testing is performed to avoid transfer problems and provides an indication of the reliability of the procedure for routine analysis, [23] and was determined by analyzing samples of the RRS solution containing $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, in triplicate, by the one-variable-at-a-time (OVAT) approach. The results and the experimental range of the selected variables evaluated are given in Table 2, together with the optimized values. Additionally, the robustness was also evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT) approach [24] at three levels (1 unit per parameter up or down around optimized values). This procedure gives results for minimum changing of maximum number of parameters at a time, and is a very useful, and efficient approach. The results for OVAT and MVAT procedures were within the acceptable deviation (RSD < 2%), and an analysis of variance showed non-significant differences ($p > 0.05$). Analyses performed with wider level of variations of the parameters tested, showed changes of the migration time related to the optimized conditions. Moreover, the peak

Table 1. Accuracy of MEKC for rivaroxaban in the formulations.

Nominal Concentration	Mean Concentration Found ^a	RSD ^b	Accuracy	Bias ^c
($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(%)	(%)	(%)
20	20.26	0.76	101.28	1.30
25	25.40	1.33	101.61	1.60
30	29.74	0.64	99.12	-0.87

^a = Mean of three replicates. ^b = RSD, relative standard deviation. ^c = Bias, [(measured concentration - nominal concentration)/nominal concentration] \times 100.

Table 2. MEKC conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure.

Variable	Values	RIV ^a	RSD ^b	Migration Time	RSD ^b	Symmetry	RSD ^b	Optimized Condition
		(%)	(%)	(min)	(%)	(%)	(%)	
BGE-SDS solution pH	1.8	99.93	1.31	2.79	0.56	1.52	0.55	2.0
	1.9	99.02	0.76	2.78	0.31	1.38	0.83	
	2.0	99.52	0.55	2.81	0.15	1.19	0.38	
	2.1	99.67	1.10	2.80	0.32	1.51	0.64	
	2.2	101.06	1.15	2.80	0.85	1.77	0.45	
BGE-SDS solution concentration (mM)	70	99.69	0.77	2.81	0.18	1.27	0.39	75
	72	99.22	0.89	2.79	0.06	1.62	1.12	
	75	99.46	0.51	2.80	0.11	1.33	0.59	
	77	100.55	1.11	2.79	0.19	1.29	0.74	
	80	99.83	0.55	2.78	0.59	1.46	0.57	
Capillary temperature (°C)	21	100.19	0.50	2.81	0.08	1.87	0.47	25
	23	99.63	1.35	2.79	0.19	1.53	0.79	
	25	99.43	0.49	2.80	0.14	1.39	0.52	
	27	100.72	0.88	2.81	0.12	1.44	0.64	
	29	101.93	0.74	2.78	0.09	1.34	0.49	
Time injection (s)	55	101.42	0.92	2.80	0.17	1.18	0.87	60
	57	101.71	1.42	2.81	0.37	1.73	0.64	
	60	100.18	0.46	2.80	0.10	1.26	0.59	
	62	100.98	1.67	2.79	0.16	1.58	0.55	
	65	100.99	0.75	2.79	0.40	1.47	0.83	
Voltage (kV)	26	100.14	0.72	3.12	0.30	1.64	0.87	30
	27	99.24	0.56	3.04	0.18	1.51	0.54	
	28	99.18	0.48	2.97	0.16	1.33	0.62	
	29	99.60	0.91	2.89	0.21	1.37	0.51	
	30	99.81	0.11	2.80	0.10	1.81	0.37	
Solution stability	Autosampler 24 h	99.97	0.49	2.81	0.84	1.59	0.42	-
	2 – 8 °C 48h	99.48	0.22	2.83	0.37	1.52	0.36	-
Wavelength (nm)	190 – 400	-	-	-	-	-	-	202

^a = Mean of three replicates. ^b = RSD, Relative standard deviation.

symmetry values were also evaluated showing non-significant differences ($p > 0.05$). The stability of RIV in BGE solution was assessed, showing non-significant changes (RSD < 2%) relative to freshly prepared samples, as suggested [22].

3.2.5. System Suitability

The test was carried out as a checking of the system to ensure that the resolution and repeatability are adequate for the analysis using five replicates injections of a RRS solution containing $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ of RIV. The RSD % values calculated for the migration time, peak area, peak symmetry and peak width, were 0.47, 0.56, 0.94 and 0.82%, respectively. The theoretical plates were approximately, 59423, with a RSD of 0.68%. The parameters tested were within an acceptable range (RSD < 2%).

3.3. Method Application to Pharmaceutical Samples

Tablet dosage forms of RIV were quantified by the validated MEKC method, and the results were compared to those obtained analyzing the same batches by a validated RP-LC method and an anti-factor Xa assay, giving mean differences of 0.59% lower and 0.66% higher, respectively, as shown in Table 3. The experimental values were com-

pared statistically by the Student's t-test, and no evidence of significant difference was observed ($p > 0.05$). Samples diluted and/or spiked and samples subjected to forced degradation conditions were also evaluated, showing reduction of the activity by the anti-factor Xa assay, and demonstrating the capability of the MEKC method (Table 3). Moreover, the method was also successfully applied for the determination of RIV in human plasma with QL of $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$, which showed lower sensitivity compared to the available methods, inclusive by the anti-factor Xa assay [25]. Analysis of biological samples has its own difficulties, because of the complex matrix, usually limited amount of sample, low analyte concentration, low injection volume and short optical path length.

CONCLUSION

A stability-indicating MEKC method was successfully validated for the determination of RIV in tablet dosage forms, showing a QL of $0.50 \mu\text{g mL}^{-1}$, accuracy, precision and selectivity. The proposed method was shown to effectively separate RIV from its major degradation products, without any interference from the excipients. Therefore, the method can be routinely applied as an alternative to the quantitative analysis of RIV, without prior separation of the

Table 3. Comparative content determination of RIV in tablet dosage forms by MEKC and RP-LC methods, and anti-factor Xa assay.

Sample	Label Claim/ mg Tablet	Experimental Amount					
		MEKC ^a		RP-LC ^a		Anti-Factor Xa ^a	
		(%)	RSD ^b (%)	(%)	RSD ^b (%)	(%)	Confidence Intervals (P = 0.95)
1	10	99.55	0.64	102.71	0.04	101.80	98.30 – 105.50
2	10	96.57	0.74	95.97	0.13	96.20	92.20 – 100.40
3	15	102.53	0.52	103.96	0.17	100.30	96.10 – 104.60
4	15	98.76	0.19	99.86	0.07	98.20	94.10 – 102.50
5	20	100.40	0.43	101.71	0.80	100.10	96.90 – 103.30
6	20	101.42	0.11	100.94	0.20	99.60	95.50 – 103.90
7	20	98.91	0.23	98.36	0.06	99.00	95.90 – 102.20
8	20	96.42	0.33	95.80	0.12	94.10	91.20 – 97.10
Mean	–	99.32	–	99.91	–	98.66	–
SD ^c	–	2.15	–	3.01	–	2.47	–
5 ^d	–	51.97	0.52	50.32	0.26	51.60	48.00 – 55.30
5 ^e	–	154.02	0.39	152.58	0.18	149.70	141.10 – 159.40
5 ^f	20	82.03	0.42	79.64	0.23	78.40	73.90 – 82.60
5 ^g	20	90.24	0.18	91.23	0.61	87.30	83.20 – 91.50
5 ^h	20	87.79	0.51	85.95	0.27	90.80	86.50 – 95.10
5 ⁱ	20	85.87	0.74	84.73	0.38	91.10	86.90 – 95.40
5 ^j	20	84.09	0.67	86.99	0.52	88.50	84.40 – 92.70

^a = Mean of three replicates; ^b = RSD, Relative standard deviation; ^c = SD, Standard deviation. Content of altered samples: ^d = 50%; ^e = 150%. Samples subjected to: ^f = basic hydrolysis; ^g = acidic hydrolysis; ^h = neutral hydrolysis; ⁱ = oxidative degradation; ^j = photolytic condition.

excipients of the formulation, with the added advantages of rapid analysis, high resolution power, small sample volumes without the consumption of organic solvents.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Brazilian National Research Council (CNPq) project 477013/2011-2 for financial support.

DISCLOSURE

Experimental section of this article has been previously published in "Anal. Methods, 2014, 6, 3811-3816 DOI: 10.1039/C4AY00145A, "Analytical Sciences Vol. 27 (2011) No. 3 P 265; <http://doi.org/10.2116/analsci.27.265>" and "Analytical Sciences Vol. 24 (2008) No. 4 PP. 499-503; <http://doi.org/10.2116/analsci.24.499>".

REFERENCES

- [1] Roehrig, S.; Straub, A.; Pohlmann, J.; Lampe, T.; Pernerstorfer, J.; Schlemmer, K.; Reinemer, P.; Perzborn, E. Discovery of a novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY-59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*(19), 5900-5908.
- [2] Apostolakis, S.; Lip, G.Y.; Lane, D.A.; Shantsila, E. The quest for new anticoagulants: From clinical development to clinical practice. *Cardiovasc. Ther.*, **2011**, *29*(6), 12-22.
- [3] Yeh, C.H.; Fredenburgh, J.C.; Weitz, J.I. Oral direct factor Xa inhibitors. *Circ. Res.*, **2012**, *111*(8), 1069-1078.
- [4] Celebier, M.; Reçber, T.; Koçak, E.; Altınöz, S. RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxabana in pharmaceutical dosage forms. *Braz. J. Pharm. Sci.*, **2013**, *49*(2), 359-366.
- [5] Ramisetti, N.R.; Kuntamukkala, R. Development and validation of a stability indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process related and stress degradation products of rivaroxaban. *RSC Adv.*, **2014**, *4*(44), 23155-23167.
- [6] Rohde, G. Determination of rivaroxaban – a novel, oral, direct factor Xa inhibitor - in human plasma by high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2008**, *872*(1), 43-50.
- [7] Landers, J.P. *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. 3rd ed; CRC press: New York, **2008**.
- [8] Nogueira, D.R.; Sangoi, M.S.; Silva, L.M.; Todeschini, V.; Dalmora, S.L. Determination of nupatadine in pharmaceutical formulations by a validated stability-indicating MEKC method. *J. Sep. Sci.*, **2008**, *31*, 3098-3105.
- [9] Dalmora, S.L.; Butzge, C.S.; Machado, F.T.; Walter, M.E.; Dalmora, M.E.A.; Souto, R.B. Stability-indicating capillary zone electrophoresis method for the assessment of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and this correlation with reversed-phase liquid chromatography method and bioassay. *Talanta*, **2012**, *94*, 1-7.
- [10] Dalmora, S.L.; Souto, R.B.; Machado, F.T.; Schramm, V.G.; Pinto, M.A.; Walter, M.E.; Stamm, F.P. Validation of a stability-indicating micellar electrokinetic capillary method for the assessment of febusostat and its correlation with the reversed phase LC method. *Anal. Methods*, **2014**, *6*(11), 3811-3816.
- [11] Harenberg, J.; Krämer, R.; Giese, C.; Marx, S.; Weiss, C.; Wehling, M. Determination of rivaroxaban by different factor Xa specific chromogenic substrate assays: reduction of interassay variability. *J. Thromb. Thrombolys.*, **2011**, *32*(3), 267-271.
- [12] Asmis, L.M.; Alberio, L.; Angelillo-Scherer, A.; Korte, W.; Mendez, A.; Reber, G.; Seifert, B.; Stricker, H.; Tsakiris, D.A.; Wullemis, W.A.M. Rivaroxaban: Quantification by anti-FXa assay and influence on coagulation tests A study in 9 Swiss laboratories. *Thromb. Res.*, **2012**, *129*(4), 492-498.
- [13] The United States Pharmacopeia. 39. Ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, **2016**.
- [14] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1), **2005**.
- [15] United States Food and Drug Administration (FDA): Guidance for industry, Analytical procedures and methods validation for drug and biologics, **2015**.
- [16] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use: Stability testing of new drugs substance and products Q1A(R2), **2003**.
- [17] Walter, M.E.; Perobelli, R.F.; da Silva, F.S.; Cardoso Júnior, C.D.A.; da Silva, L.S.; Dalmora, S.L. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of rivaroxaban in pharmaceutical formulations. *Lat. Am. J. Pharm.*, **2015**, *34*(8), 1503-1510.
- [18] EUROPEAN Pharmacopoeia, 8th ed., Strasbourg: Council of Europe, **2014**.
- [19] Alsante, K.M.; Ando, A.; Brown, R.; Ensing, J.; Hatjijk, T.D.; King, W.; Tsuda, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **2007**, *59*(1), 29-37.
- [20] J. Ermer; Miller, J.H.M. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.
- [21] Shabir, G.A.; Lough, W.J.; Amin, S.A.; Bradshaw, T.K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, **2007**, *30*(3), 311-333.
- [22] Rozet, E.; Ceccato, A.; Hubert, C.; Ziemons, E.; Oprean, R.; Rudaz, S.; Boulanger, B.; Hubert, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1158*(1), 111-125.
- [23] Dejaegher, B.; Heyden, Y.V. Ruggedness and robustness testing. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1158*(1), 138.
- [24] Injac, R.; Boskovic, M.; Kocevar, N.; Voyk, T. Comparative study of robustness between micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography using one-variable-at-a-time and a new multi-variable-at-a-time approach. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, *620*(1), 150-161.
- [25] Stief, T.W. Determination of the anti-F10a or anti-F2a generation action of rivaroxaban or dabigatran. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **2012**, *23*(7), 619-621.

MANUSCRITO

5 MANUSCRITO

Enantiomeric separation of Rivaroxaban by chiral-HPLC Method and analysis by physicochemical methods and *in vitro* biossays

Maurício Elesbão Walter, Francielle Santos da Silva, Ricardo Bizogne Souto, Rafaela Ferreira Perobelli, Bruna Xavier, Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior, Amanda Ferreira Escobar and Sérgio Luiz Dalmora.

Submetido para publicação.

Enantiomeric separation of Rivaroxaban by Chiral HPLC Method and analysis by physicochemical methods and *in vitro* bioassays

Maurício Elesbão Walter², Francielle Santos da Silva², Ricardo Bizogne Souto¹, Rafaela Ferreira Perobelli², Bruna Xavier², Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior², Amanda Ferreira Escobar¹ and Sérgio Luiz Dalmora^{1*}

¹Industrial Pharmacy Department, Federal University of Santa Maria, 97105–900 Santa Maria–RS, Brazil

²Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105–900 Santa Maria–RS, Brazil

Corresponding Author: Sérgio Luiz Dalmora, PhD

Industrial Pharmacy Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 97105–900, Brazil

E-mail: sdalmora@terra.com.br

Tel. +55 (55) 3220 –8952

ABSTRACT

A chiral liquid chromatography method (Chiral HPLC) was developed and applied for the analysis of the enantiomers of rivaroxaban (RIV). The method was carried out on a Chiralpak AGP (100 × 4 mm, 5 μm), maintained at 30°C. The mobile phase consisted of 50 mM citric acid buffer, pH 4.0, run isocratically at a flow rate of 1.0 mL/min, and using a photodiode array (PDA) detection at 249 nm. The separation was obtained with retention times of 12.66 and 16.37 min for the (R) and (S) isomers respectively, and the calibration curves were linear over the concentration ranges of 1.54 – 500 and 1.32 – 500 μg/mL, respectively. The anti-factor Xa assay showed very low activity for the (R) enantiomer related to the (S) enantiomer, as well lower toxicity by the *in vitro* cytotoxicity test. The results enabled by the Chiral HPLC method were compared to RP–HPLC, MEKC and the anti-factor Xa assay showing their capabilities and the detection of the enantiomeric forms. The employment of the methods in conjunction contributes to improve the quality control and thereby assure the therapeutic efficacy and safety of the pharmaceutical products.

Keywords: Rivaroxaban. Chiral HPLC. Anti-factor Xa assay. Cytotoxicity. Quality control.

INTRODUCTION

Rivaroxaban (RIV) is an oral, selective and direct factor Xa inhibitor that targets free and clot-bound factor Xa and factor Xa prothrombinase complex. It has been used clinically to prevent and treat thromboembolic disorders with a wide therapeutic window and a predictable anticoagulant effect (MUECK et al., 2014).

RIV is 5-Chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide, non-hygroscopic powder practically insoluble in water, with empirical formula $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$, and a molecular weight of 435.89 g/mol. The molecular structure of RIV has one chiral center, and two enantiomeric forms of the drug (ROEHRIG et al., 2005; YAO et al., 2015).

Many analytical methods were reported in the literature for the assessment of RIV in bulk, pharmaceutical dosage forms and biological matrices. They include an isocratic reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method, which was developed using a C_{18} column for the analysis of RIV in tablets dosage forms (ÇELEBIER et al., 2013). A stability-indicating RP-HPLC method was validated using a C_{18} column for the analysis of pharmaceutical formulations, evaluating also the cytotoxicity of degraded products (WALTER et al., 2015). Besides, high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) methods were developed and applied for the analysis of RIV in bulk, human plasma and degradation studies (ROHDE, 2008; RAMISSETTI, KUNTAMUKKALA, 2014). A micellar electrokinetic capillary (MEKC) method was validated and applied for the quantitative analysis of RIV in tablet dosage forms and the results were correlated to those of the RP-HPLC method and anti-factor Xa assay (WALTER et al., 2017). Chromogenic anti-factor Xa assays has been described to determine RIV in spiked plasma samples and for the potency assessment of anticoagulant drugs (HARENBERG et al., 2011; ASMIS et al., 2012; USP, 2019).

Enantioseparation of chiral pharmaceuticals is challenging, due to the same physical and chemical properties of the two enantiomers. The chiral drugs can have reduced, no or even deleterious effects, and the enantioselective methods are necessary to assure the purity of the active pharmaceutical ingredient (API) (BROOKS et al., 2011; CAVAZZINI et al., 2011; RIBEIRO et al., 2014). A bioanalytical chiral-RP-HPLC-MS/MS was validated and applied to biological matrix detecting the (S) and (R) enantiomers (CHEN et al., 2019). At the moment, RIV is not described in any Pharmacopoeia, and the publications related to the analysis of enantiomers are limited.

The aim of this study was to develop a chiral liquid chromatography (Chiral HPLC) method for the separation and identification of the enantiomers of RIV; to evaluate the bioactivity and cytotoxicity of the isomers, and to correlate the results enabled by validated RP-HPLC and MEKC methods, and bioassays. Thus contributing to improve quality control and thereby assure the safety and therapeutic efficacy of the pharmaceutical products.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and chemicals

Rivaroxaban reference substances (S) and (R) enantiomers (RRS and RRR) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, United States), and from Carbosynth (San Diego, United States), respectively. A total of nine batches of Xarelto[®], Bayer Schering Pharma AG (Leverkusen, Germany) tablets containing 10, 15, and 20 mg of RIV were obtained from commercial sources within their shelf life period and were identified by Arabic numbers from 1 to 9. Acetonitrile, methanol and isopropanol were obtained from Tedia (Fairfield, USA). The 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) acid, sodium dodecyl sulphate (SDS), Tris (hydroxymethyl) aminomethane, sodium chloride and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The citric acid was obtained from Amresco (Solon, USA). The factor Xa and chromogenic substrates S-2765 and S-2238 were purchased from Chromogenix (Milan, Italy). Human thrombin (Factor IIa) was purchased from Sigma (Saint Louis, United States). Calcium chloride and Dade[®] Actin[®] were obtained from Siemens (Marburg, Germany). All chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system Millipore (Bedford, USA).

Apparatus

The HPLC methods were performed on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A_{VP} system controller, a LC-10 AD_{VP} pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD_{VP} autosampler, CTO-10A_{VP} column oven, and a SPD-M10A_{VP} PDA detector. Peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program.

MEKC experiments were performed on an Agilent 3DCE apparatus, Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), equipped with an autosampler, a PDA detector, a temperature-controlling system (4 – 60°C), and a power supply able to deliver up to 30 kV. CE ChemStation software was used for instrument control, data acquisition and data analysis.

Activated partial thromboplastin time (APTT) assays were performed on a coagulometer Diagnostica Stago STart[®] 4 hemostasis analyzer (Paris, France).

The absorbances of the bioassays were measured on a microplate reader Multiskan[™] FC Thermo Scientific (Vantaa, Finland).

Reference solutions preparation

The stock solutions of the (S) and (R) enantiomers of RIV were separately prepared by weighing 2 mg of the RRS or RRR, transferred to individual flask and diluted to volume with acetonitrile for the RP-HPLC and MEKC methods, and in DMSO for the Chiral HPLC method and anti-factor Xa assay, to obtain a final concentration of 1 mg/mL. The stock solutions were stored at 2 – 8°C protected from light. The working solutions were daily diluted to 25 µg/mL in the mobile phase for the RP-HPLC, and to 50 µg/mL with the addition of 20% of isopropanol for the Chiral HPLC. For the bioassays, the solutions were diluted with 10% DMSO to the concentration of 1 µg/mL.

Samples solutions preparation

To prepare the sample solutions, tablets containing 10, 15, and 20 mg of RIV were accurately weighed and crushed to a fine powder. An appropriated amount was transferred into an individual volumetric flask, diluted to volume with acetonitrile or DMSO, and filtered through a 0.45 µm membrane filter Millipore (Bedford, USA), to obtain a stock solution with a concentration of 1 mg/mL of the API. This solution was stored at 2 - 8°C protected from light and daily diluted to appropriated concentrations as described for Reference solutions.

Procedures

Chiral HPLC. The chromatographic method was performed with the elution carried out on a Chiralpak AGP (100 × 4 mm, 5 µm) DAICEL[®] (Tokyo, Japan) column maintained at 30 °C. The LC system was operated isocratically using a mobile phase consisting of 50 mM citric acid buffer, pH 4.0, run at a constant flow rate of 1.0 mL/min, and using PDA detection at 249 nm. The injection volume was 25 µL for both the Rivaroxaban Reference and the samples. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 30 min with the mobile phase flowing through the system.

RP-HPLC. A validated RP-HPLC method was performed as previously published (WALTER et al., 2015). The elution was carried out on a reversed phase Phenomenex

(Torrance, USA) Synergi Fusion–RP C₁₈ column (150 × 4.6 mm i.d., with a particle size of 4 μm and pore size of 80 Å), maintained at 40°C. The LC system was operated isocratically using a mobile phase consisting of water:acetonitrile (30:70, v/v), run at a constant flow rate of 0.7 mL/min and using PDA detection at 249 nm. The injection volume was 20 μL for both the RRS and the samples.

MEKC. Electrophoretic separations were performed on a fused silica capillary with 50 μm i.d. and 48.5 cm of total length (effective length 40 cm), thermostated at 25°C, and detection with PDA set at 202 nm, as described previously (WALTER et al., 2017). At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing it with 1 M NaOH for 5 min, followed by water for 2 min, and then with buffer 75 mM MES and 25 mM SDS pH 2.0 (BGE–SDS) for 5 min. After each rinsing, waiting steps of 5, 2 and 5 min, respectively, were used. To improve the reproducibility of the migration time between injections, after each run the capillary was conditioned again with 1 M NaOH (2 min), water (2 min) and BGE–SDS (2 min). Samples were injected hydrodynamically for 60 s at 50 mbar. The separation voltage was 30 kV (current about -71 μA), with negative polarity, applied during the analysis.

Activity anti-factor Xa assay. The bioassay was performed as described elsewhere (WALTER et al., 2015; USP, 2019) and adjusted. Briefly a total of 25 μL of the appropriate dilution of the Reference solutions (RRS and RRR) and the samples were added to the respective well of the 96 well-microplate, and then allowed to equilibrate at 37°C. Then, 50 μL of factor Xa solution was added and the plate was incubated for exactly 1 min, before adding 125 μL of chromogenic substrate S-2765. The reaction was stopped after exactly 5 min by adding 75 μL of 20% acetic acid. The absorbance was measured at 405 nm in a microplate reader. The assay was performed in triplicate. Statistical analysis was carried out by the parallel line statistical method using the CombiStats[®] software (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM, Council of Europe).

Activity anti-factor IIa assay. The assay was performed as described for the anti-factor Xa, but using the human factor IIa and the chromogenic substrate S-2238.

APTT. The APTT assay was performed as described (EP, 2017) adjusted. The concentrations were selected in the linear region of the dose-response curve between 0.001 - 0.1 μg/mL. A total of 100 μL of sheep plasma and 100 μL of appropriate dilutions of the Reference or

sample solutions were added, respectively into the microcuvettes, and allowed to equilibrate at 37°C, for approximately, 2 min. Then, it was added 100 µL de Actin[®], and exactly 2 min after, added 100 µL of calcium chloride 25 mM and the coagulation time recorded in the coagulometer. Three independent assays were carried out in duplicate and the results calculated by the parallel-line statistical method, as described above.

Cytotoxicity test. The *in vitro* cytotoxicity test was performed as described elsewhere (STAMM et al., 2013) based on a neutral red uptake (NRU) assay, with the exposure of NCTC clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC number CCL-1) and CHO-K1 cell line (Chinese hamster ovary, ATCC number CCL-61) separately to each one of the enantiomers of RIV. The NRU assay was performed on the 96-well microplate, maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 24 h, with the cell suspension having a density of about 2×10^5 cells/mL. The neutral red release was evaluated and the absorbance measured at 540 nm using a microplate Reader.

Chiral HPLC Method Development

Linearity

Linearity of the Chiral HPLC method was determined by constructing three analytical curves, each one with nine concentrations of RRS or RRR, respectively, over the range of 1 – 500 µg/mL prepared in the mobile phase. Three replicates of 25 µL injections of the Reference solutions were prepared to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of RIV to obtain the analytical curves. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and determination coefficient.

Analysis of pharmaceutical tablet dosage forms

The enantioselective method was applied to separate and identify the isomeric forms in tablet formulations. Then, for the quantitative dosage of RIV the stock solution of commercial batches was diluted with the mobile phase to a concentration of 50 µg/mL, injected in triplicate, and the percentage recoveries were calculated against the RRS.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of chromatographic conditions

To obtain the best Chiral chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time. Buffer solutions containing different concentrations of acetate, phosphate (sodium and potassium) and citrate salts were tested in the pH range from 4 to 7. Then, a 50 mM citric acid buffer pH 4.0 was selected as it enabled better peaks symmetry and resolution of the (S) and (R) enantiomers, with appropriate sensitivity and higher peak purity. For the selection of the best wavelength detection, a PDA detector was used.

Typical chromatograms obtained by the proposed Chiral HPLC method, demonstrating the racemic mixture of RIV and the resolution of the symmetrical peak corresponding to the enantiomers are shown in Fig. 1 (a, b, c). The retention times of 12.66 min and 16.37 min were adjusted to enable separation of the isomers R and S respectively, with the resolution between the enantiomers higher than 2.0, without interference in the peak purity, which is suitable for quality control laboratories.

The analytical curves constructed for the (R) and (S) enantiomers were found to be linear over the ranges of 1.54 – 500 and 1.32 – 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The values of the determination coefficient (r^2) calculated for the (R) and (S) enantiomers were $r^2 = 0.9996$, $y = (71\,323 \pm 905.68)x + (57\,417 \pm 10\,989.20)$, and $r^2 = 0.9990$, $y = (71\,324 \pm 458.55)x + (31\,671 \pm 9\,555.45)$, where, x is concentration and y is the peak absolute area, indicated the linearity of the analytical curves for the method. Moreover, the relative standard error of slope can be used as a parameter with respect to the precision of the regression, as a general acceptance criterion for the linearity performance of the analytical procedure.

The limit of detection (DL) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated from the slope and the standard deviations of the intercept of the analytical curves, giving values of 0.46 and 1.54 $\mu\text{g/mL}$, and 0.40 and 1.32 $\mu\text{g/mL}$ for the (R) and (S) enantiomers, respectively.

Methods application

The enantioselective method was applied to the qualitative and quantitative determination of RIV in pharmaceutical dosage forms, giving results between 97.98 and 101.11% for the (S) isomer, as shown in Table I, and the (R) isomer was not detected. In-house samples of RIV were also prepared with mixture of identical composition of the (S) and (R) isomers, and then subjected to the physicochemical methods and bioassays. The Chiral

HPLC enabled the separation of the peaks related to the (S) and (R) enantiomers, and the anti-factor Xa bioassay showed reduced activity for the (R) isomer. A racemic mixture containing identical proportions of the enantiomeric forms, showed also activity reduced to 50% (Tables I, II), and the sample 1 spiked with the (R) isomer showed also activity reduced to 80% (Table I). The pharmaceutical samples were analyzed by the RP–HPLC and MEKC methods showing similar profiles, but they are unable to detect or separate the enantiomers as shown in Figure 1 (a,b,c). The results demonstrated the importance of the enantioselective chromatographic method to assess the purity and to assure the efficacy of the pharmaceutical product.

In addition, the anti-factor Xa assay performed using the solution of the (R) isomer prepared containing the concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, showed result that confirm activity, approximately 200 times lower, related to the (S) isomer as shown in Table II. The anti-factor IIa assay was unable to detect specific anticoagulant responses of the API. Besides, the APTT assay, that evaluates the effects on the coagulation cascade, showed potencies that were comparable to the anti-factor Xa assay.

Cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity test of the (S) and (R) enantiomers was performed using the NCTC cell line giving $\text{IC}_{50} = 136 \pm 17 \mu\text{g/mL}$ and $789 \pm 20 \mu\text{g/mL}$, respectively. In parallel, CHO cell line showed $\text{IC}_{50} = 128 \pm 14 \mu\text{g/mL}$ and $776 \pm 18 \mu\text{g/mL}$ for the (S) and (R) isomers respectively. The results are showing lower cytotoxic effects for the (R) isomer of the molecule.

CONCLUSIONS

The Chiral HPLC method enabled to identify and quantitate the (S) and (R) enantiomers of RIV. Moreover, the correlation studies showed that the enantiomers are not separated by the RP–HPLC and MEKC methods, and the (R) isomer showed highly reduced biological activity as evaluated by the *in vitro* bioassays, and lower cytotoxicity relate to the (S) isomer. Therefore, the combination of methods is suggested, contributing to improve the quality control, and to assure the therapeutic efficacy of the pharmaceutical products and to support analytical comparability studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Brazilian Coordination for the improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Brazilian National Research Council (CNPq), for the support.

REFERENCES

- ASMIS L. M. et al., Rivaroxaban: Quantification by anti-FXa assay and influence on coagulation tests A study in 9 Swiss laboratories. **Thrombosis Research**, v. 129, p. 492-498, 2012.
- BROOKS, W. H., GUIDA, W. C., DANIEL, K. G. The significance of chirality in drug design and development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 760-770, 2011.
- CAVAZZINI, A. et al. Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.706, p. 205-222, 2011.
- CELEBIER, M. et al. RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxabana in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 359-366, 2013.
- CHEN, F. et al. A validated Chiral-RP-UPLC-MS/MS Method for the Enantiomeric Detection of Rivaroxaban *In vitro*. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.15, p. 305-311, 2019.
- European Pharmacopoeia, 9th, 2017.
- HARENBERG, J. et al. Determination of rivaroxaban by different factor Xa specific chromogenic substrate assays: reduction of interassay variability. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 32, p. 267-271, 2011.
- MUECK, W. et al. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Rivaroxaban. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, p. 1-16, 2013.

RAMISSETTI, N. R.; KUNTAMUKKALA, R. Development and validation of a stability indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process related and stress degradation products of rivaroxaban. **RSC Advances**, n. 4, p. 23155-23167, 2014.

RIBEIRO, A. R. et al. Enantioseparation of chiral pharmaceuticals in biomedical and environmental analyses by liquid chromatography: An overview. **Journal of Chromatography B**, v. 968, p. 8-21, 2014.

ROEHRIG, S. et al. Discovery of a novel antithrombotic agent 5-Chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY-59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 5900-5908, 2005.

ROHDE, G. Determination of rivaroxaban – a novel, oral, direct factor Xa inhibitor – in human plasma by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.872, p. 43-50, 2008.

STAMM F. P. et al. Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays. **Analyst**, v.138, p. 1419-1426, 2013;

The United States Pharmacopeia. 42. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019.

WALTER, M. E. et al. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of rivaroxaban in pharmaceutical formulations. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 8, p. 1503-1510, 2015

WALTER, M. E. et al. Micellar electrokinetic capillary method for the analysis of rivaroxaban and its correlation with RP-LC method and bioassay. **Current Analytical Chemistry**, v. 13, p. 379-385, 2017.

YAO, Z. et al. Chiral inhibition of rivaroxaban derivatives towards UDP - glucuronosyltransferase (UGT) isoforms. **Chirality**, v. 27, p. 936-943, 2015.

Figure 1 - Representative chromatograms by Chiral HPLC and RP-HPLC showing: peak 1 = (R) enantiomer, peak 2 = (S) enantiomer, peak 3 = rivaroxaban. (a) Racemic mixture, (b) (R)-rivaroxaban reference substance, (c) (S)-rivaroxaban reference substance.

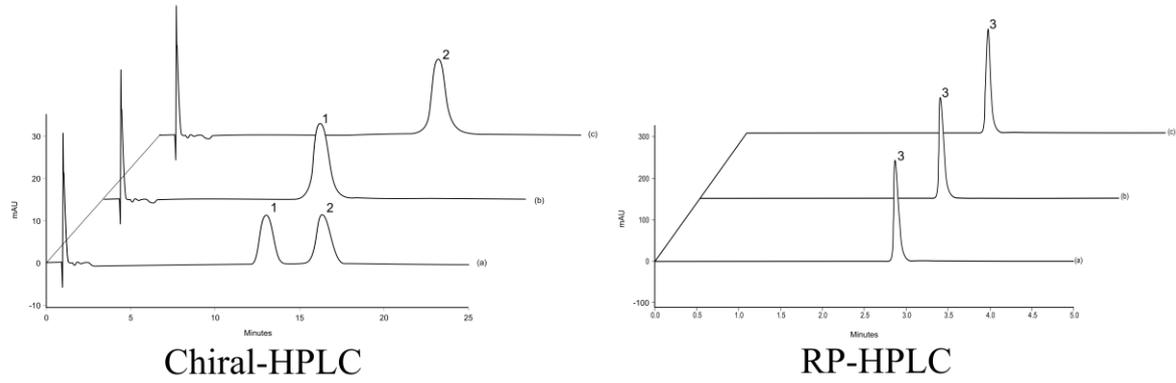


Table 1 - Comparative content determination of Rivaroxaban by chiral-HPLC, RP-HPLC, MEKC and anti-factor Xa assay against the (S)-Reference substance, and separation of the enantiomeric forms.

Sample	Label Claim/mg tablet	Experimental Amount								
		Chiral HPLC ^a			RP-HPLC ^a		MEKC ^a		Anti-factor Xa ^a	
		Enantiomer		RSD ^b	(%)	RSD ^b	(%)	RSD ^b	(%)	(%)
(S) (%)	(R) (%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)		
1	10	98.98	0.00	0.31	99.74	0.06	99.35	0.60	98.69	93.70–103.80
2	10	99.78	0.00	0.22	100.17	0.17	98.98	0.74	99.36	92.10–107.30
3	15	100.10	0.00	0.11	101.41	0.20	100.47	0.49	100.12	95.80–106.77
4	15	98.65	0.00	0.12	100.32	0.17	99.96	0.38	99.27	94.70–104.70
5	15	99.97	0.00	0.18	101.36	0.08	100.37	0.31	99.70	95.80–105.30
6	20	97.98	0.00	0.37	99.74	0.24	99.61	0.27	98.63	90.40–106.20
7	20	101.11	0.00	0.28	100.98	0.20	100.87	0.22	100.07	92.10–106.50
8	20	100.84	0.00	0.23	100.36	0.17	100.74	0.18	101.11	94.50–107.80
9	20	100.14	0.00	0.18	100.98	0.09	100.09	0.37	99.68	93.90–105.70
(R)-enantiomer	1	0.00	99.14	0.26	100.08	0.20	99.17	0.29	NS ^c	–
Racemic mixture	1	51.07	48.93	0.07	99.78	0.14	98.99	0.18	50.67	44.30–57.80
1 ^d	12.5 ^d	80.07	19.47	0.24	100.98	0.07	100.70	0.44	80.88	75.67–85.41

^a- Mean of three replicates.

^b- RSD – relative standard deviation.

^c- non significant.

^d- RIV commercial sample 1 spiked with 2.5 mg of (R)-enantiomer.

Table 2 - Analysis of the (R) Reference substance and the racemic mixture by the *in vitro* bioassays against the (S) Reference substance.

Sample	Working solutions (µg/mL)	Experimental amount			
		Anti-factor Xa		APTT	
		(%)	Confidence intervals (P = 0.95)	(%)	Confidence intervals (P = 0.95)
1	1	98.69	93.70 – 103.80	99.07	92.20 – 107.40
(R)-enantiomer	1	NS ^a	–	NS ^a	–
Racemic mixture ^b	1	50.31	44.10 – 55.60	49.11	42.80 – 57.10
Concentrated (R)-enantiomer ^c	200	99.78	93.70 – 104.80	100.74	91.90 – 108.40

^a - non significant.

^b - In-house solution containing 1 mg/mL with the proportion (50:50) of the enantiomeric forms (RRS e RRR).

^c - Working solution containing 200 µg/mL of (R) enantiomer.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A RIV foi descoberta e aprovada para uso terapêutico no ano de 2008, pertence a uma nova classe de fármacos anticoagulantes de uso oral, com atividade específica contra o fator Xa da cascata de coagulação. Nesse contexto, é fundamental o avanço no sentido do desenvolvimento e validação de tecnologias analíticas para aprimorar a determinação de identidade, pureza, dosagem de enantiômeros, estabilidade da substância ativa e dos produtos farmacêuticos.

A CL tem sido amplamente usada na área de controle de medicamentos. Então, o método por CL-FR foi desenvolvido e validado previamente, e aplicado para análise de lotes de produtos comerciais, e os resultados publicados (WALTER et al., 2015). Nesta etapa, optou-se por estudar e validar procedimento por MEKC, que apresenta vantagens em relação aos métodos por CL, destacando-se o menor consumo de solventes e o baixo custo, e foi aplicado para análise de RIV em produtos farmacêuticos. O artigo foi publicado na revista *Current Analytical Chemistry* conforme descrito no Capítulo 1, fundamentando a discussão apresentada a seguir.

Inicialmente, no desenvolvimento do método por MEKC, foram testados diferentes tampões (ácido MES, acetato, borato e fosfato), porém o ácido MES foi o que proporcionou melhor resolução, simetria e sensibilidade. A RIV é uma molécula não ionizável e a adição de SDS foi necessária para formação de micelas para migração da molécula, e a concentração de 25 mM foi a que apresentou melhor tempo de migração. Destaca-se que a concentração do tampão e a voltagem de -30 KV não ocasionaram aumento de temperatura por efeito Joule, proporcionando corrente adequada e separação eletroforética da RIV, padrão interno e formas degradadas. As condições foram otimizadas utilizando capilar de sílica fundida de 40 cm de comprimento efetivo, com solução eletrolítica composta por ácido MES 75 mM com SDS 25 mM, em pH 2,0. A separação por MEKC foi obtida com tempo de migração da RIV de 2,81 minutos (Figura 1). Picos adicionais relativos às formas degradadas da molécula foram gerados sob condições de estresse e detectados com tempos de retenção de 2,71 e 2,77 min para a condição ácida, 2,64 e 2,70 min para a básica, 2,45 min para a hidrólise neutra e 2,14 min para oxidação. Confirmou-se a especificidade do método que sugere a pureza dos picos de RIV e das formas alteradas com DAD, que forneceu valores na faixa de 0,9999 - 1. O método desenvolvido apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 0,5 - 50 µg/mL ($r^2=0,9991$). Os dados obtidos nos estudos de precisão (repetibilidade, precisão

interdias e interanalistas) forneceram CV inferiores a 1,70%, demonstrando assim a precisão do método analítico proposto, destacando-se que a literatura preconiza CV iguais ou inferiores a 2% (SHABIR, 2003). A Tabela 1 apresenta os valores experimentais obtidos no estudo de exatidão com média de 100,67%. Na Tabela 2, pode-se notar que não houve diferença significativa dos teores nas condições eletroforéticas testadas após pequenas mudanças nos parâmetros (pH e concentração do tampão, voltagem, temperatura do capilar e o tempo de injeção), demonstrando a robustez do método. Por sua vez, os dados da verificação da adequabilidade do sistema eletroforético mostram que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, pois os valores de CV% foram inferiores a 2% (ICH, 2005, FDA 2015).

Procedeu-se então à análise de 8 lotes de comprimidos de RIV pelos métodos já publicados por CL-FR, ensaio da atividade antifator Xa (WALTER et al., 2015) e pelo método desenvolvido por MEKC. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos, observando-se que os teores encontrados por MEKC foram 0,59% inferiores ao método por CL-FR e 0,66% superiores ao ensaio da atividade antifator Xa. Portanto, o método desenvolvido e validado por MEKC cumpre os requisitos preconizados nos compêndios oficiais, podendo ser empregado para a caracterização e determinação do teor de RIV em comprimidos.

Até o presente momento não existe monografia farmacopeica para a caracterização e análise de RIV. A validação de métodos, conforme realizada, é fundamental no contexto da produção e controle de medicamentos, sendo preconizada pela literatura da área (ANVISA, 2010; FDA 2015; ICH 2005; USP, 2019).

No Capítulo 2, está descrito o segundo manuscrito elaborado no contexto desta tese e submetido para publicação, com sua discussão apresentada a seguir.

As moléculas quirais originam fármacos que podem apresentar farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade diferentes, justificando estudo de métodos para identificação e separação da forma enantiomérica ativa. A RIV tem um centro quiral e pode se apresentar sob duas formas, a (S) que é farmacologicamente ativa e a (R) com baixa atividade antifator Xa, conforme demonstrado também no presente trabalho, Tabelas 1 e 2.

O método por CL-quiral foi desenvolvido utilizando coluna Chiralpak AGP. Testaram-se diferentes fases móveis com tampões fosfato, borato e citrato, e selecionou-se o tampão de ácido cítrico 50 mM em pH 4, que possibilitou melhor separação e resolução dos picos cromatográficos. Para aumentar a solubilidade da RIV, a solução trabalho da amostra foi diluída na fase móvel contendo 20% de isopropanol. O método foi aplicado para a separação e quantificação dos isômeros que apresentaram tempos de retenção de 12,6 min e

16,37 min, para as formas (R) e (S) respectivamente. Paralelamente foram preparadas no laboratório, mistura racêmica dos enantiômeros, bem como amostra contaminada com a forma R, equivalente a 80% (12,5mg de RIV), que foram submetidas à análise pelos métodos por CL-quiral, CL-FR, MEKC e bioensaio da atividade antifator Xa, conforme descrito na Tabela 1. A CL-quiral apresentou 2 picos, de acordo com a Figura 1 e a avaliação correspondente da potência pelo bioensaio demonstrou redução da atividade em relação à substância de referência isômera S (RRS). Por sua vez, os métodos por CL-FR e MEKC apresentaram perfis idênticos, sendo incapazes de diferenciar e detectar a presença dos enantiômeros (Figura 1). Destaca-se a importância dos resultados obtidos, pois demonstram a necessidade da determinação de pureza e quantificação do enantiômero (S), farmacologicamente ativo, em relação ao isômero (R), cuja bioatividade é significativamente reduzida. Sugere-se então, a combinação de métodos analíticos para avaliar a qualidade, garantindo a eficácia e segurança do produto farmacêutico. Paralelamente, a análise de 9 lotes de produtos farmacêuticos comerciais de RIV, pelo método desenvolvido por CL-quiral, demonstrou que todas as amostras comerciais testadas apresentaram apenas a forma S pura (Tabela 1). Foram testadas também amostras com prazo de validade expirado, bem como submetidas à condição de degradação em luz UV. Destaca-se que não foi detectada a presença da forma (R) nas amostras citadas, e que a exposição à luz UV não induziu transformação da forma (S) no seu isômero (R). Convém salientar que YASSINE e colaboradores (2018) descrevem um fotoisômero da RIV obtido com amostra em solução aquosa exposta a luz UV, mas os testes realizados em comprimidos de RIV íntegros dentro e fora do blíster, pó de comprimidos e o fármaco em solução, não apresentaram presença do isômero (R), que não foi detectado.

Por sua vez os bioensaios demonstraram que o isômero R apresenta atividade antifator Xa significativamente menor, aproximadamente 200 vezes em relação à forma S, ou seja, a atividade de 1 mg da forma S se equivale a 200 mg da forma R. O ensaio da atividade antifator IIa não apresentou respostas, inclusive para soluções concentradas (dados não mostrados), demonstrando que não é adequado para a RIV. Além disso o ensaio do TTPA, que avalia os efeitos na cascata de coagulação, forneceu resultados comparáveis aos descritos acima para o ensaio do antifator Xa (Tabela 2).

Recentemente, tem se destacado a importância de avaliar efeitos de toxicidade de produtos de degradação e/ou impurezas que poderiam estar presentes nos produtos farmacêuticos. Deste modo, foram realizados testes de citotoxicidade dos enantiômeros nas linhagens celulares NCTC e CHO, observando-se que a forma (R) apresentou $IC_{50} = 789 \pm 20$ e $776 \pm 18 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A citotoxicidade foi menor em relação à encontrada para

isômero (S), que apresentou $IC_{50} = 136 \pm 17$ e 128 ± 14 $\mu\text{g/mL}$ para linhagens NCTC e CHO respectivamente.

Nesse contexto, as pesquisas executadas e os resultados obtidos contribuem para aprimorar o controle de qualidade através da identificação da RIV e suas formas isômeras, da caracterização, da determinação de produtos de degradação e da análise das preparações farmacêuticas, ampliando o domínio tecnológico na área, que certamente também contribuirá para o estabelecimento futuro de medicamentos genéricos.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método indicativo de estabilidade por MEKC, que se mostrou preciso, exato e robusto, fornecendo resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para determinação de identidade, teor e formas degradadas de rivaroxabana.
- ✓ Estudou-se método por CL-quiral que foi aplicado para identificação e determinação dos enantiômeros S e R de rivaroxabana.
- ✓ Executou-se método por CL-FR, previamente desenvolvido e validado, e os resultados foram adotados para estudos de comparação dos métodos.
- ✓ Realizou-se o bioensaio *in vitro* da atividade antifator Xa e os resultados foram usados para estudo de comparação com os métodos físico-químicos.
- ✓ Os teores por MEKC quando comparados ao bioensaio da atividade antifator Xa e CL-FR não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).
- ✓ Realizaram-se os ensaios da atividade antifator Xa e TTPA demonstrando atividade biológica para a forma S e baixa atividade para a forma R, que é praticamente inativa, necessitando de aproximadamente 200 vezes maior concentração para apresentar efeitos comparáveis à forma S.
- ✓ Testou-se a citotoxicidade dos enantiômeros observando-se que o isômero S apresenta efeitos tóxicos superiores em relação à forma inativa R.
- ✓ Demonstrou-se a qualidade dos produtos farmacêuticos disponíveis comercialmente, nos quais se observou a presença pura do isômero S.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados, que apresentaram resultados comparáveis aos ensaios biológicos *in vitro*, constituem-se em contribuição para aprimorar o controle da qualidade garantindo a eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos

comercializados no País. Além disso, estabelecem bases para comparabilidade analítica em futuros estudos de medicamentos genéricos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALBIOL-CHIVA, J. et al. Micellar liquid chromatography determination of rivaroxaban in plasma and urine. Validation and theoretical aspects. **Journal of Chromatography B**, v. 1120, p. 8-15, 2019.
- ASMIS L. M. et al., Rivaroxaban: Quantification by anti-FXa assay and influence on coagulation tests A study in 9 Swiss laboratories. **Thrombosis Research**, v. 129, p. 492-498, 2012.
- ATTARD, C. et al. The *in vitro* anticoagulant effect of rivaroxaban in children. **Thrombosis Research**, v. 130, p. 804-807, 2012.
- BANSILAL, S. et al. Efficacy and safety of rivaroxaban in patients with diabetes and nonvalvular atrial fibrillation: The ROCKET AF trial. **American Heart Journal**, v. 170, n. 4, p. 675-682, 2015.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5^a ed. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010.
- BROOKS, W. H., GUIDA, W. C., DANIEL, K. G. The significance of chirality in drug design and development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 760-770, 2011.
- CAVAZZINI, A. et al. Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.706, p. 205-222, 2011.
- ÇELEBIER, M. et al. RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxabana in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 359-366, 2013.
- CHEN, F. et al. A validated Chiral-RP-UPLC-MS/MS Method for the Enantiomeric Detection of Rivaroxaban *In vitro*. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.15, p. 305-311, 2019.

DALMORA, S. L. et al. Validation of the anti-factor Xa assay for the potency assessment of enoxaparin in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 6, p. 1305-1308, 2004.

DEEB, S. E. et al. Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis (2013-2015). **Electrophoresis**, v.37, p. 1591-1608, 2016.

DEROGIS, P. B. M. et al. Determination of rivaroxaban in patient's plasma samples by anti-Xa chromogenic test associated to High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS). **PloS One**, v.12, n.2, p.1-14, 2017.

DING, T.; CHEN, L.; ZHAI, L.; FU, Y.; SUN, B. Compatibility study of rivaroxaban and its pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1-5, 2017.

DOUXFILS, J. et al. Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: Laboratory recommendations for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature. **Thrombosis Research**, v. 130, p. 956-966, 2012.

ERIKSSON, B. I. et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 26, p.2765-2775, 2008.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics**, 2015.

FOX, K. A. A.; PICCINI, J. P.; WOJDYLA, D.; et al. Prevention of stroke and systemic embolism with rivaroxaban compared with warfarin in patients with non-valvular atrial fibrillation and moderate renal impairment. **European Heart Journal**, v. 32, n. 19, p. 2387-2394, 2011.

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

GÜBITZ, G.; SCHMID, M. G. Chiral separation principles in chromatographic and electromigration techniques. **Molecular Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 159-179, 2006.

HALPERIN, J. L. et al. On behalf of the ROCKET AF Steering Committee and Investigators. Efficacy and safety of rivaroxaban compared with warfarin among elderly patients with nonvalvular atrial fibrillation in the Rivaroxaban Once Daily, Oral, Direct Factor Xa Inhibition Compared With Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation (ROCKET AF). **Circulation**, v. 130, n. 2, p. 138-146, 2014.

HANKEY, G. J. et al. For the ROCKET AF Steering Committee and Investigators. Rivaroxaban compared with warfarin in patients with atrial fibrillation and previous stroke or transient ischaemic attack: a subgroup analysis of ROCKET AF. **Lancet Neurology**, v. 11, n. 4, p. 315-322, 2012.

HARENBERG, J. et al. Determination of rivaroxaban by different factor Xa specific chromogenic substrate assays: reduction of interassay variability. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 32, p. 267-271, 2011.

HILLARP, A. et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxabana on commonly used coagulation assays. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, p. 133-139, 2010.

HUTT, A. J.; TAN, S. C. Drug chirality and its clinical significance. **Drugs**, v. 52, p. 1-12, 1995.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.

KAKKAR, A. K. et al. Extended duration rivaroxabana versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double-blind, randomized controlled trial. **Lancet**, v. 372, p. 31-39, 2008.

KUBITZA, D. et al. Body Weight Has Limited Influence on the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, or Pharmacodynamics of Rivaroxaban (BAY 59- 7939) in Healthy Subjects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 2, p. 218-226, 2007.

KUBITZA, D. et al. Effects of renal impairment on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of rivaroxaban, an oral, direct Factor Xa inhibitor. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 703-712, 2010.

KURAMATSU, J. B.; SEMBILL, J. A.; HUTTNER, H. B. Reversal of oral anticoagulation in patients with acute intracerebral hemorrhage. **Critical care**, v. 23, n. 1, p. 206, 2019.

LASSEN, M. R. et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 26, p. 2776-2786, 2008.

MISSELWITZ, F.; BERKOWITZ, S. D.; PERZBORN, E. The discovery and development of rivaroxaban. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1222, p.64-75, 2011.

MOLENAAR, P. J.; DINKELAAR, J. ; LEYTE, A. Measuring rivaroxaban in clinical setting, using common coagulation assays, Xa inhibition and thrombin generation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.10, n. 50, p. 1799-1807, 2012.

MUECK, W. et al. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Rivaroxaban. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, p. 1-16, 2013.

PATEL, M. R. et al. And the ROCKET AF Steering Committee, for the ROCKET AF Investigators. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 10, p. 883-891, 2011.

PERZBORN, E. Factor Xa inhibitors, new anticoagulants for secondary haemostasis. **Hämostaseologie**, v. 29, p. 260-267, 2009.

PRABHUNE, S. S.; DIGHE, V.; PRADHNA, N. S. Enantiomeric Separation Of Rivaroxaban By A Chiral Liquid Chromatographic Method. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, 2015.

PRINS, M. H. et al. On behalf of the EINSTEIN Investigators. Oral rivaroxaban versus standard therapy for the treatment of symptomatic venous thromboembolism: a pooled analysis of the EINSTEIN-DVT and PE randomized studies. **Thrombosis Journal**, v. 11, n.1, p. 21, 2013.

RAMISSETTI, N. R.; KUNTAMUKKALA, R. Development and validation of a stability indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process related and stress degradation products of rivaroxaban. **RSC Advances**, n. 4, p. 23155-23167, 2014.

RIBEIRO, A. R. et al. Enantioseparation of chiral pharmaceuticals in biomedical and environmental analyses by liquid chromatography: An overview. **Journal of Chromatography B**, v. 968, p. 8-21, 2014.

ROEHRIG, S. et al. Discovery of a novel antithrombotic agent 5-Chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY-59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 5900-5908, 2005.

ROHDE, G. Determination of rivaroxaban – a novel, oral, direct factor Xa inhibitor – in human plasma by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.872, p. 43-50, 2008.

ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 111-125, 2007.

SAMAMA, M. M. et al. Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. **Thrombosis Journal**, v. 11, n. 11, p. 1-7, 2013.

SAWADA, S. et al. In models of intracerebral hemorrhage, rivaroxaban is superior to warfarin to limit blood brain barrier disruption and hematoma expansion. **Current Neurovascular Research**, v. 14, p. 96-103, 2017.

SHABIR, G. A. et al. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 30, p. 311-333, 2007.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n.1-2, p. 57-66, 2003.

SOLAYAR, G. N.; WALSH, P. M.; MULHALL, K. J. The effect of a new direct Factor Xa inhibitor on human osteoblasts: an in-vitro study comparing the effect of rivaroxaban with enoxaparin. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.12, p.247, 2011.

SOMJEN, D. et al. Rivaroxaban, a direct inhibitor of the coagulation factor Xa interferes with hormonal-induced physiological modulations in human female osteoblastic cell line SaSO₂. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v.135, p.67-70, 2013.

SOUTO, R. B. **Estudos analíticos para caracterização e avaliação de interleucina-11 humana recombinante**. 2015. 80 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

STAMM, F. P. **Estudo de metodologias para avaliação do hormônio da paratireóide humano recombinante**. 2013. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

STUDT, J. et al. Accuracy and consistency of anti-Xa activity measurement for determination of rivaroxaban plasma levels. **Clinical Haemostasis and Thrombosis**, v. 15, p. 1576-1583, 2017.

TAKÁCS-NOVÁK, K. et al. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 279-285, 2013.

The EINSTEIN Investigators. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 26, p. 2499-2510, 2010.

The EINSTEIN-PE Investigators. Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 14, p. 1287-1297, 2012.

THE UNITED States Pharmacopeia. 42. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019.

TURPIE, A. G. G. et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty (RECORD4): a randomized trial. **Lancet**, v. 373, p. 1673-1680, 2009.

VAN DIEPEN, S. et al. Efficacy and safety of rivaroxaban in patients with heart failure and nonvalvular atrial fibrillation: insights from ROCKET AF. **Circulation: Heart Failure**, v. 4, n. 4, p. 740-747, 2013.

WALTER, M. E. **Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida em fase reversa para análise de rivaroxabana**. 201. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

WALTER, M. E. et al. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of rivaroxaban in pharmaceutical formulations. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.34, n.8, p. 1503-1510, 2015.

WILLIAMS, K.; LEE, E. Importance of drug enantiomers in clinical pharmacology. **Drugs**, v. 30, n. 4, p. 333-354, 1985.

WINGERT, N. R. et al. *In vitro* toxicity assessment of rivaroxaban degradation products and kinetic evaluation to decay process. **Drug and Chemical Toxicology**, p.1-10, 2018.

YAO, Z. et al. Chiral inhibition of rivaroxaban derivatives towards UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms. **Chirality**, v. 27, p. 936-943, 2015.

YASSINE, M. et al. Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices. **Chemosphere**, v. 193, p. 329-336, 2018.

YATES, S. G. et al. Can an anti-Xa assay for low-molecular-weight heparin be used to assess the presence of rivaroxaban? **Transfusion and Apheresis Science**, v. 55, p. 212-215, 2016.

YEH, C. H.; FREDENBURGH, J. C.; WEITZ, J. I. Oral direct factor Xa inhibitors. **Circulation research**, v. 111, p. 1069-1078, 2012.