

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA EM FASE
REVERSA PARA ANÁLISE DE RIVAROXABANA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maurício Elesbão Walter

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA
ANÁLISE DE RIVAROXABANA**

Maurício Elesbão Walter

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa 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 **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Departamento de Farmácia Industrial**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA ANÁLISE
DE RIVAROXABANA**

elaborada por
Maurício Elesbão Walter

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Iria Luiza Gomes Faria, Dr^a. (UFSM)

Lauren Rosa Crossetti Vaucher, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, de 27 de fevereiro de 2015

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada”.

Albert Einstein

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA PARA ANÁLISE DE RIVAROXABANA

AUTOR: MAURÍCIO ELESBÃO WALTER

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

A rivaroxabana é um fármaco com ação anticoagulante, de uso oral, clinicamente indicado para profilaxia de tromboembolismo venoso profundo. No presente trabalho foi desenvolvido e validado método por cromatografia líquida em fase reversa (CLAE-FR) para a determinação de rivaroxabana em produtos farmacêuticos. No método por CLAE-FR foi utilizada coluna Phenomenex Fusion-RP C₁₈ (150 mm x 4.6 mm d.i.), mantida a 40 °C. A fase móvel foi composta de água ultrapura:acetonitrila (30:70, v/v), eluída na vazão de 0,7 mL/min com detecção na faixa do ultravioleta a 249 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de retenção de 2,9 min, sendo linear na faixa de concentração de 0,04 – 200 µg/mL ($R^2 = 0.9992$). A especificidade do método foi comprovada através de estudos de degradação, demonstrando que não houve interferência dos excipientes e dos produtos de degradação na quantificação do fármaco. A exatidão foi de 99,77%, com “bias” menor que 1,67%. Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,012 e 0,041 µg/mL, respectivamente. O procedimento foi validado, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e teste de adequabilidade do sistema, cujos resultados estão de acordo com os requisitos preconizados. Paralelamente, executou-se o ensaio da atividade anti-fator Xa para avaliação comparativa de rivaroxabana em relação à enoxaparina sódica. Além disso, o teste de citotoxicidade *in vitro* das amostras degradadas, apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à forma intacta. O método proposto foi aplicado no estudo de dissolução, análise em plasma e determinação de rivaroxabana em comprimidos, contribuindo assim para aprimorar o controle de qualidade, garantir a segurança e eficácia no uso terapêutico.

Palavras-chave: Rivaroxabana, Cromatografia líquida em fase reversa, Validação, Citotoxicidade.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE ANALYSIS OF RIVAROXABAN

AUTHOR: MAURÍCIO ELESBÃO WALTER

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, February, 27th 2015.

Rivaroxaban is an oral anticoagulant drug indicated for deep venous thromboembolism prophylaxis. A reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was developed and validated for the determination of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. The LC method was carried out on a Phenomenex Fusion-RP C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm i.d.), maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of ultrapure water–acetonitrile (30:70, v/v), run at a flow-rate of 0.7 mL/min and using photodiode array (PDA) detection at 249 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time of 2.9 min, and was linear over the range of 0.04 – 200 µg/mL ($R^2 = 0.9992$). The specificity and stability-indicating capability of the method was through degradation studies, and showing also, that there was no interference of the excipients and degradation products in the quantification of the drug. The accuracy was 99.77% with bias lower than 1.67%. The limits of detection and quantitation were 0.012 and 0.041 µg/mL, respectively. The procedure was validated evaluating parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantitation, robustness and system suitability test, given results with acceptable range. In parallel, the anti-factor Xa assay was performed for the activity evaluation of rivaroxaban in relation to sodium enoxaparin. Moreover, the *in vitro* cytotoxicity test of the degraded products showed significant differences ($p < 0,05$). The proposed method was applied for dissolution studies, analysis in human plasma and the analysis of rivaroxaban in tablet dosage forms, contributing to assure the safety and therapeutic efficacy.

Keywords: Rivaroxaban; Reversed-phase liquid chromatography; Validation; Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Cascata de coagulação segundo PERZBORN, adaptada (2009).	15
FIGURA 2 - Estrutura da rivaroxabana segundo ROEHRIG et al., adaptada (2005)..	16
FIGURA 3 - Cristalografia de Raios-X da rivaroxabana complexada ao Fator Xa humano segundo ROEHRIG et al., adaptada (2005).....	17

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1.....24

FIGURE 1- Structure of Rivaroxaban, adapted (ROEHRIG et al., 2005)	26
FIGURE 2- Representative chromatogram showing peak 1 = rivaroxaban, peaks 2-3 = degraded forms, peak 4 = hydrogen peroxide: (a) Rivaroxaban reference solution; (b) sample of pharmaceutical formulation. Rivaroxaban reference solution after degradation under conditions: (c) acidic hydrolysis, (d) basic hydrolysis, (e) oxidative, (f) photolytic, (g) neutral.....	41

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1	24
TABLE 1 – Inter-days and between-analysts precision data of RP-LC for rivaroxaban in samples of pharmaceutical formulations.	42
TABLE 2 – Accuracy of RP-LC for rivaroxaban in the formulations..	43
TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure... ..	44
TABLE 4 – Determination of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms by the RP-LC method..	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AVC	Acidente vascular cerebral
BP	Farmacopéia Britânica
CL	Cromatografia líquida
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
C _{máx}	Concentração máxima
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
EMA	Agência Européia de Medicamentos
EP	Farmacopéia Européia
FA	Fibrilação arterial
FXa	Fator Xa
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
kg	Quilograma
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Espectrometria de massas
°C	Graus Celsius
P-gp	Glicoproteína-P
pH	Potencial hidrogeniônico
r ²	Coefficiente de determinação
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
TEV	Tromboembolismo venoso
TLC	Cromatografia em camada delgada

TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TVP	Trombose venosa profunda
USP	Farmacopéia Americana
UV	Ultravioleta
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	23
4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÕES.....	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As condições tromboembólicas representam consideráveis desafios para a área clínica, pois estão associadas com significativas taxas de morbidade e mortalidade. As principais ações para prevenção e tratamento baseiam-se no uso de anticoagulantes e agentes antiplaquetários, que apresentam limitações para o controle e manutenção dos seus efeitos. Assim, pesquisas para obtenção de novos anticoagulantes evoluíram nos últimos anos, procurando acrescentar vantagens e redução de efeitos colaterais em relação aos anticoagulantes tradicionais como a heparina não fracionada, a varfarina (uso oral) e as heparinas de baixo peso molecular (MISSELWITZ et al., 2011; YOSHIDA et al., 2011; THOMAS et al., 2013).

As limitações do uso desses anticoagulantes tradicionais justificaram estudos para a descoberta de novas substâncias ativas de origem natural, por síntese química e por processos biotecnológicos. Observa-se que desde 1998 novos anticoagulantes foram pesquisados, porém esses se encontram em estágio inicial de pesquisa clínica.

O estudo do mecanismo da coagulação e de ação dos fármacos é importante para o desenvolvimento de moléculas que possam ser usadas por diferentes vias de administração, em especial a via oral, não necessitando frequentes exames periódicos para controle da coagulação. É recomendável também que o efeito farmacológico esteja baseado em mecanismo de ação direto sobre os fatores da cascata de coagulação, evitando assim interações e efeitos colaterais indesejáveis. Neste contexto, a rivaroxabana (Xarelto[®]) foi desenvolvida pelo Laboratório Bayer Healthcare, como medicamento de uso oral com ação baseada na inibição seletiva do fator Xa da cascata de coagulação.

A rivaroxabana é um composto derivado da oxazolidinona, sua fórmula empírica é $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$, com peso molecular de 435,89 g/mol. É praticamente insolúvel em água. O produto farmacêutico foi aprovado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) no ano de 2008, sendo indicado para uso terapêutico na prevenção do tromboembolismo venoso profundo em pacientes submetidos a artroplastias de quadril e joelho. A partir de 2011, o medicamento teve seu uso aprovado para prevenção de acidente vascular cerebral, embolia pulmonar e sistêmica decorrentes da fibrilação arterial e também no tratamento e prevenção de trombose venosa profunda aguda e recorrente.

Os avanços na área farmacêutica viabilizaram a produção desse novo fármaco de interesse terapêutico, que requer métodos analíticos para sua identificação e determinação

quantitativa para o controle de qualidade. A escolha do procedimento baseia-se em fatores que incluem a estrutura e características do fármaco, pureza, quantidade de amostra e finalidade da análise. O desenvolvimento de métodos envolve a avaliação e a otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação. A cromatografia líquida em fase reversa (CLAE-FR), especialmente com detecção no UV, tem sido empregada devido à resolução, precisão e exatidão significativas. Atualmente é amplamente utilizada para análise de matéria-prima e produtos farmacêuticos, pois oferece eficiência na quantificação, especificidade, sensibilidade e tempo de ensaio adequados, razões pelas quais foi adotada no presente estudo (SHABIR et al., 2007; ROZET et al., 2007).

A validação é necessária para demonstrar, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Desse modo, garante-se a qualidade lote-a-lote e, ao mesmo tempo, a eficácia terapêutica e segurança, de acordo com os estudos pré-clínicos, analíticos e clínicos realizados na pesquisa da substância ativa e do produto farmacêutico, e etapas de registro nas áreas de vigilância sanitária (SHABIR, 2003; ICH, 2005; FDA 2014). Convém observar que não existem referências nas Farmacopeias sobre a rivaroxabana e nem monografias disponíveis para o controle da qualidade, justificando a realização dos estudos do presente trabalho (Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. 2010; BP, 2013; USP 37, 2014).

Desse modo, o presente trabalho teve por objetivos: a) desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia líquida em fase reversa para identificação e quantificação de rivaroxabana; b) avaliar a citotoxicidade das formas degradadas; c) aplicar o método para teste de dissolução e avaliação em matriz biológica. Nesse contexto, pretende-se contribuir para aprimorar o controle da qualidade de rivaroxabana em comprimidos, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

As pesquisas de novos anticoagulantes têm se fundamentado no efeito direto sobre as enzimas envolvidas na cascata de coagulação. Uma das abordagens utilizadas baseia-se na inibição do fator Xa (FXa), que desempenha função central na coagulação sanguínea, pois é ativado tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca em resposta a dano vascular ou estase sanguínea (figura 1). O FXa se combina com o fator Va na presença de íons cálcio para formar o complexo da protrombinase, que ativa protrombina em trombina, e catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina com conseqüente formação do coágulo (PERZBORN, 2009; APOSTOLAKIS et al., 2011; YEH et al., 2012). Neste contexto, a rivaroxabana (Xarelto[®]) foi desenvolvida pelo Laboratório Bayer Healthcare, como medicamento de uso oral com ação baseada na inibição seletiva do fator Xa da cascata de coagulação. Foi clinicamente aprovada pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) no ano de 2008, sendo indicada para a prevenção do tromboembolismo profundo em pacientes submetidos a cirurgias nos membros inferiores (SOLAYAR et al., 2011).

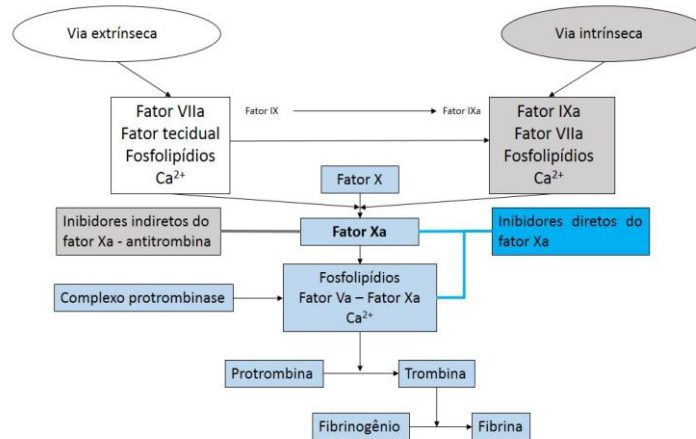


Figura 1. Cascata de coagulação segundo PERZBORN, adaptada (2009).

Derivados da oxazolidinona foram estudados como nova classe de potentes inibidores do fator Xa (FXa), inicialmente foi desenvolvido o composto denominado BAY-59-7939, e posteriormente rivaroxabana, que se mostrou altamente potente e inibidor seletivo direto do FXa com elevada atividade antitrombótica *in vivo*. A rivaroxabana é denominada

quimicamente como 5-Chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamida, e tem a estrutura química apresentada na figura 2. A fórmula empírica é $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$, com 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 (ROEHRIG et al., 2005).

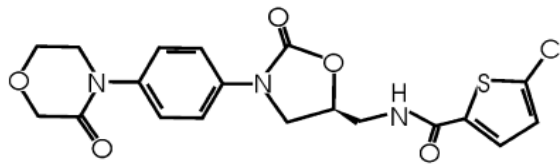


Figura 2. Estrutura da rivaroxabana segundo ROEHRIG et al., adaptada (2005).

Em estudos clínicos a rivaroxabana apresentou rápida absorção atingindo a concentração máxima 2-4 horas após ingestão. A biodisponibilidade determinada para a dose de 10 mg foi de 80-100%, sem interferência dos alimentos na sua absorção. É metabolizado por via hepática (CYP3A4) e excretado na urina e fezes, sendo um terço inalterado e o restante por metabólitos inativos. Tem meia-vida de 5-9 horas em indivíduos jovens e 11-13 horas em indivíduos idosos (MISSELWITZ et al., 2011; APOSTOLAKIS et al., 2011).

Estudos de fase II demonstraram as concentrações plasmáticas de rivaroxabana após administração de diferentes doses. Os $C_{máx}$ encontrados foram de 180 e 299 $\mu\text{g/L}$ para as doses de 10 e 20 mg, respectivamente (SAMAMA et al., 2013).

A estrutura da rivaroxabana ligada ao fator Xa humano foi estudada por cristalografia de raios-X, demonstrando o modo de ligação e a especificidade dos requisitos para maior afinidade (figura 3). A interação do ligante neutro clorotiofeno na posição S1 possibilita a combinação com boa biodisponibilidade oral e alta potência para o composto não básico, que foi submetido a estudos clínicos para a prevenção e tratamento de doenças tromboembólicas (ROEHRIG et al., 2005).

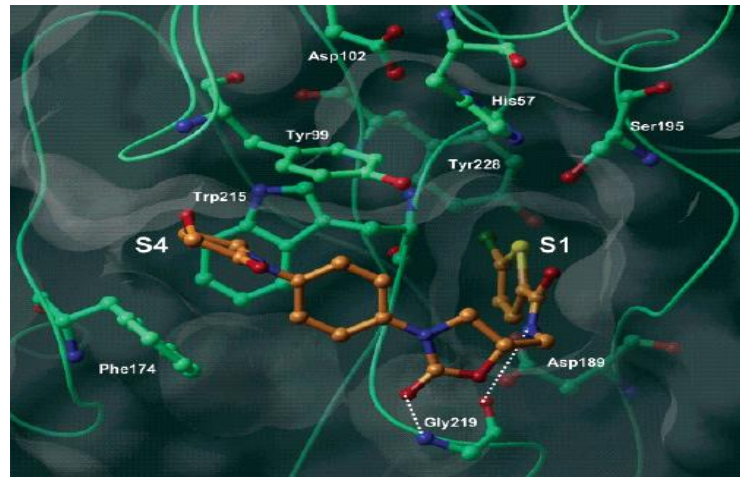


Figura 3. Cristalografia de Raios-X da rivaroxabana complexada ao Fator Xa humano segundo ROEHRIG et al., adaptada (2005).

Kubitza et al. (2010) avaliaram os efeitos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e segurança de rivaroxabana em pacientes com insuficiência renal, observando que um maior dano renal acarreta a elevação da concentração plasmática do fármaco, devido a não excreção do mesmo. A concentração máxima de 172,3 $\mu\text{g/L}$ foi alcançada em 2 horas.

Attard et al. (2012) investigaram a relação do efeito anticoagulante de rivaroxabana com a idade do paciente, através de estudo *in vitro*, que não indicou diferenças significativas. Concluíram então, que são necessários estudos *in vivo* para confirmar a consistência de dose-resposta do tratamento pediátrico.

O uso de rivaroxabana durante a gravidez e amamentação foi testado em animais, porém não em humanos. O fármaco atravessa a barreira placentária e pode ser secretado pelas glândulas mamárias, acarretando risco de sangramento e toxicidade ao feto, não sendo recomendado seu uso (ARCELUS et al., 2014).

A solubilidade de 4 fármacos com diferentes características ácido-básicas, rivaroxabana (não ionizável), furosemida (ácida), papaverina (básica) e ácido niflúmico (anfótero) foram determinadas em fluidos gástricos e intestinais simulados em estado de jejum e alimentado. Foram avaliados também os efeitos da bile. Os autores concluíram que a solubilidade sofre impacto dos fluidos gástrico e intestinal devido a propriedades ácido-base e lipossolubilidade dos compostos. A rivaroxabana apresenta solubilidade 2 vezes maior no fluido gástrico alimentado simulado, razão pela qual deve ser administrada com alimentos (TAKÁCS-NOVÁK et al., 2013).

Os efeitos do peso corporal sobre a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica de rivaroxabana foram avaliados em estudo com pessoas de pesos inferiores a 50 kg e superiores a 120 kg em relação a indivíduos na faixa de peso de 70-80 kg, de ambos os sexos. A inibição do fator Xa foi semelhante em todos os grupos testados, indicando que não há necessidade de ajuste da dose de acordo com o peso corporal (KUBITZA et al., 2007).

A rivaroxabana foi testada na profilaxia do tromboembolismo venoso (TEV) em cirurgia ortopédica maior em quatro grandes estudos, em comparação com a enoxaparina nas doses de 40 mg uma vez por dia (esquema europeu) ou 30 mg duas vezes por dia (esquema norte-americano). Análise conjunta dos quatro estudos, incluindo 12.500 pacientes, mostrou que houve redução de cerca de 50% no risco de TEV ou morte, sem diferença estatística com relação ao sangramento. O medicamento foi aprovado para uso em profilaxia do TEV após cirurgia ortopédica maior na Europa, Canadá, América Latina e Brasil (ERIKSSON et al., 2008; KAKKAR et al., 2008; LASSEN et al., 2008; TURPIE et al., 2009).

Foi investigada a eficácia e tolerabilidade de rivaroxabana durante 10 e 35 dias em pacientes graves hospitalizados com risco de desenvolvimento da trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar. Os resultados foram comparados como tratamento utilizando enoxaparina. No tratamento de 10 dias a rivaroxabana se mostrou comparável à enoxaparina na prevenção do tromboembolismo venoso profundo. No tratamento de 35 dias a rivaroxabana reduziu o risco de TVP, porém aumentou o risco de sangramentos (COHEN et al., 2013).

O uso de rivaroxabana foi testado isoladamente contra o tratamento padrão (enoxaparina subcutânea, seguido por um antagonista da vitamina K) em pacientes com TVP aguda sintomática. A rivaroxabana apresentou eficácia semelhante ao tratamento padrão, com taxas de sangramentos semelhantes. Assim a rivaroxabana demonstra uma abordagem simples para o tratamento de TVP aguda (AGNELLI et al., 2010).

Estudo comparativo entre tratamento com rivaroxabana e varfarina foi realizado para verificar a prevenção de acidente vascular cerebral (AVC) e embolismo sistêmico em pacientes portadores de fibrilação atrial (FA). A rivaroxabana se mostrou semelhante à varfarina, entretanto, eventos de hemorragias intracranianas foram menores no grupo tratado com rivaroxabana. O risco de sangramentos clinicamente relevantes foi maior no grupo tratado com rivaroxabana (PATEL et al., 2011).

Solayar et al. (2011) pesquisaram os efeitos da rivaroxabana em células osteoblásticas humanas, comparando as respostas com a enoxaparina. Os resultados demonstraram efeitos

negativos na função osteoblástica para a rivaroxabana e para a enoxaparina devido à interação com RNAm dos fatores de proliferação celular.

Do mesmo modo, os efeitos de rivaroxabana e sua interferência nas modulações fisiológicas de indução hormonal foram investigados com base nas respostas da linhagem celular humana osteoblástica Saos-2 (SOMJEN et al., 2013).

Gnoth et al. (2011) investigaram as características de transporte e efeitos da P-glicoproteína (P-gp) sobre a rivaroxabana em estudos *in vitro* através das células Caco-2 e expressão das células LLC-PK1. Rivaroxabana apresentou alta permeabilidade e transporte polarizado nas células Caco-2. Mostrou também ser um substrato, entretanto não inibe a P-gp. O estudo demonstrou também que a rivaroxabana apresenta penetração bastante baixa no cérebro e que além da P-gp, outra proteína pode estar envolvida na secreção do fármaco.

Harenberg et al. (2011) realizaram a determinação dos efeitos de rivaroxabana sobre os níveis plasmáticos de fator Xa, usando diferentes métodos cromogênicos. O plasma humano foi contaminado com rivaroxabana (25-900 ng/mL) e as respostas avaliadas em espectrofotômetro a 405 nm.

Os efeitos de rivaroxabana foram avaliados em plasma usando os ensaios de coagulação do TTPa, TP, antitrombina, fibrinogênio e proteína C ativada, demonstrando que os diferentes ensaios apresentam resultados variáveis para as concentrações terapêuticas (HILLARP et al., 2010; MOLENAAR et al., 2012).

O ensaio do anti-fator Xa tem sido usado na pesquisa de anticoagulantes e para a avaliação de potência dos produtos biológicos de heparinas convencionais e de baixo peso molecular. O método baseia-se na inibição do fator Xa e reação com substrato cromogênico, desenvolvendo coloração amarela proporcional ao fator residual e leitura espectrofotométrica da absorbância (DALMORA et al., 2004).

Çelebier et al. (2013) desenvolveram método por cromatografia líquida em fase reversa para dosagem de comprimidos de rivaroxabana. Utilizaram coluna Phenomenex Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm) a 40 °C, com eluição isocrática da fase móvel constituída de ACN:água (55:45 v/v). O fluxo foi de 1,2 mL/min e a detecção no UV a 249 nm. O tempo de retenção foi 3,37 minutos.

Método por cromatografia líquida em fase reversa foi pesquisado usando coluna Inertsil ODS C₁₈ (250 x 4,6 mm). A fase móvel foi constituída por tetraidrofurano:metanol:acetonitrila 10:40:50 (v/v/v), com fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 270 nm. Validaram parâmetros do método que foi aplicado para análise de rivaroxabana em

comprimidos com tempo de retenção de 2,55 minutos. O método foi linear na faixa de concentração de 40-100 ppm (SATYANARAYANA ; MADHAHAVI, 2012).

Método por CLAE-FR foi desenvolvido usando coluna Kromasil C₁₈ (250 x 4,6 mm), temperatura ambiente, fase móvel metanol:acetonitrila (80:20 v/v), eluição isocrática a 1,0 mL/min, detecção UV a 273 nm. O método foi aplicado para análise de solução concentrada de rivaroxabana e produtos farmacêuticos com tempo de retenção de 5,35 min. Os limites experimentais (não calculados) de detecção e quantificação foram de 0,5 e 1,5 ppm, respectivamente (RAO; REDDY, 2013).

Sekhar et al. (2012) desenvolveram método por CLAE-FR utilizando coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm), em temperatura ambiente. A fase móvel foi constituída por ACN:Metanol:Ácido orto-fosfórico 0,1% (90:8:2), pH ajustado para 4,06, vazão de 1,5 mL/min e detecção no UV a 236 nm. O método foi usado para análise de rivaroxabana em comprimidos, com tempo de retenção de 3,36 min e os resultados expressos em área e ppm.

Observam-se na literatura publicações de método por CLAE-FR que foi sucessivamente usado para análise da degradação em meio ácido, básico, condições fotolíticas e térmicas, e estudos de dissolução. Nos quatro artigos foi usado o mesmo método com coluna Phenomenex C₁₈ (250 x 4,6 mm), fase móvel composta de metanol:acetonitrila (50:50, v/v), vazão de 1 mL/min e detecção no UV a 250 nm. O LD e LQ foram de 0,1277 µg/mL e 0,38726 µg/mL, respectivamente. Em cada publicação os autores concluem que o procedimento possibilita a separação dos picos da degradação realizada (KASAD; MURALIKRISHNA 2013 a, b, c. KASAD, 2013).

Autores estudaram métodos para análise de rivaroxabana e degradações em meio alcalino, destacando-se CLAE-FR, cromatografia em camada delgada (TLC), e espectrofotometria com primeira derivatização e com razão espectral da derivada primeira. O método por CLAE-FR utilizou coluna C₁₈ (150 x 4,6 mm), fase móvel diidrogenofosfato de sódio 1,2% p/v, pH 3,5 e acetonitrila (70:30, v/v), vazão de 1,5 mL/min e detecção a 280 nm. TLC utilizou clorofórmio:isobutanol (50:50 v/v) com detecção a 280 nm. Concluíram que o método por CLAE-FR apresenta maior sensibilidade e vantagens em relação aos estudados para análise de matéria-prima e comprimidos de rivaroxabana (LORIES et al., 2013).

Método sensível e específico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi desenvolvido para quantificação de rivaroxabana em plasma humano, usando análogo (Bayer HealthCare) como padrão interno, com sensibilidade nas concentrações entre 0,50 e 500 µg/L. As condições cromatográficas basearam-se no uso de coluna C₁₈ (125 x 4 mm). A fase móvel foi constituída por acetonitrila e tampão acetato de

amônio ajustado para pH 3,0 com ácido fórmico e eluição em gradiente com vazão de 1 mL/min. A extração foi realizada por precipitação de proteínas com metanol. O método foi aplicado para estudos que possibilitaram determinação dos parâmetros farmacocinéticos de rivaroxabana em plasma humano (ROHDE, 2008).

A cromatografia líquida (CL) se destaca entre os métodos de análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas, pois apresenta resolução, precisão e exatidão significativas. É um método analítico amplamente utilizado, uma vez que, através da escolha adequada de colunas, fase móvel e método de detecção, possibilita a separação, quantificação e identificação de diferentes componentes de uma formulação (COLLINS et al., 1997).

O ensaio de dissolução é uma das ferramentas adequadas para se verificar o desempenho de um fármaco, sob a forma sólida, no que se refere à sua liberação a partir da forma farmacêutica (PITA et al., 2004). O teste de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais constitui-se em procedimento importante para a pesquisa, desenvolvimento, produção, controle e garantia da qualidade de formulações. Os estudos de dissolução *in vitro* são essenciais para a avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações, considerando também parâmetros importantes como: fármaco e a formulação, equipamento, meio de dissolução, temperatura e o método analítico. Para fármacos que não possuem monografia oficial, existe necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos (MANADAS et al., 2002).

Por sua vez, a validação de métodos analíticos é importante e se inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, materiais e operadores. O processo de validação bem desenvolvido e registrado fornece dados e resultados de que o sistema e o método atendem as exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005). A capacidade de um método analítico de separar, detectar e quantificar impurezas ou produtos de degradação é recomendada para avaliação de formulações farmacêuticas durante seu desenvolvimento e controle de qualidade. Assim, estudos forçados e de especificidade devem ser realizados a fim de demonstrar a capacidade e garantir a adequabilidade do procedimento analítico. Recomendam-se a obtenção dos prováveis produtos de degradação através da avaliação da susceptibilidade da molécula sob estudo a condições de estresse como temperaturas elevadas, oxidação, fotólise e hidrólises em ampla faixa de pH (ICH 2005; SHABIR et al., 2007; FDA, 2014).

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

3.1 - Maurício Elesbão Walter, Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior, Iorhann Silva da Silva, Francielle Santos da Silva, Rafaela Ferreira Perobelli, Sérgio Luiz Dalmora. Validation of a Stability-indicating RP- LC Method for the Determination of Rivaroxaban in Pharmaceutical Formulations. **Latin American Journal of Pharmacy**. Artigo a ser submetido.

**Validation of a Stability-indicating RP- LC Method for the Determination of
Rivaroxaban in Pharmaceutical Formulations**

Maurício Elesbão Walter, Clóvis Dervil Appratto Cardoso Júnior, Iorhann Silva da Silva,
Francielle Santos da Silva, Rafaela Ferreira Perobelli, Sérgio Luiz Dalmora[†]

**Department of Industrial Pharmacy, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences,
Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria-RS, Brazil*

[†] To whom correspondence should be addressed.

E-mail: sdalmora@terra.com.br

Abstract: A stability-indicating reversed-phase liquid chromatography method (RP-LC) was validated for the analysis of rivaroxaban. The method was carried out on a Synergi Fusion-RP column (150 mm x 4.6 mm i.d., with a particle size of 4 μm and pore size of 80 \AA), maintained at 45 $^{\circ}\text{C}$. The mobile phase consisted of acetonitrile and water (70:30), run isocratically at a flow rate of 0.7 mL/min, and using a photodiode array (PDA) detection at 249 nm. The separation was obtained with retention time of 2.9 min, and was linear over the concentration range of 0.04 – 200 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9992$). The specificity and stability-indicating capability of the method were proven through degradation studies. The *in vitro* cytotoxicity test of the degraded products showed significant differences ($p < 0.05$). The accuracy was 99.77% and bias lower than 1.67%. Moreover, acceptable results were demonstrated for precision, sensitivity and robustness. The proposed method was applied for the analysis in human plasma and of tablet dosage forms contributing to assure the quality and therapeutic efficacy.

Keywords: Rivaroxaban, Reversed-phase Liquid Chromatography, Validation, Cytotoxicity.

INTRODUCTION

Rivaroxaban is a novel, oral, selective, highly potent anticoagulant drug indicated for the prevention and treatment of deep vein thrombosis and of pulmonary stroke and systemic embolism (SAMAMA et al., 2013).

Rivaroxaban is 5-Chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamida (Figure 1). Its empirical formula is $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$ with a molecular weight of 435.89 g/mol. It is a non-hygroscopic powder, odourless and practically insoluble in water (ROEHRIG et al., 2005).

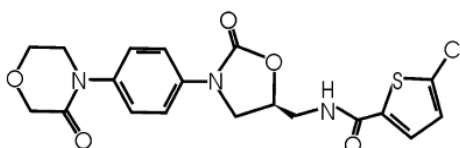


Figure 1. Structure of Rivaroxaban, adapted (ROEHRIG et al., 2005).

Factor X plays an important role in the coagulation pathway. Rivaroxaban has direct inhibition effects of factor Xa (FXa), and interrupts the intrinsic and extrinsic pathways of the coagulation cascade, inhibiting both thrombin formation and development of thromb (PERZBORN, 2009; YEH et al., 2012).

A RP-LC method was developed for the analysis of rivaroxaban in tablets dosage forms using a C_{18} column (250 x 4.6 mm), with isocratic elution, flow rate of 1.2 mL/min and detection at 249 nm. Separation was achieved with 3.37 min and was linear over the concentration range of 0.005 – 40 μ g/mL (ÇELEBIER et al., 2013). LC-MS/MS method was validated for the analysis of rivaroxaban in human plasma and applied to pharmacokinetic studies. The separation was obtained with the retention time of 3.30 min and 3.37 for the internal standard, respectively, and was linear over the concentration range of 0.50 - 500 μ g/L

(ROHDE, 2008). Pharmacokinetics studies showed rapid absorption reaching maximum concentration 2-4 hours after ingestion. It is metabolized by the liver (CYP3A4) with excretion of one-third unchanged by the kidneys (MISSELWITZ et al., 2010; APOSTOLAKIS et al., 2011).

Development and validation of stability-indicating methods, using the approach of stress testing as determined by the guidelines, is highly recommended for the quantitative analysis of pharmaceutical formulations and must be able to resolve from its potential impurities and degradation products, and validated as recommended (ICH, 2005; FDA, 2014). Rivaroxaban has been approved by FDA and EMA, but at the moment, it is not described in any Pharmacopoeia.

The aim of this article was to develop and validate a stability-indicating RP-LC method for the quantitative analysis of rivaroxaban in tablet dosage forms; to evaluate the cytotoxicity of degraded forms; thus contributing to monitor stability, improve quality control and thereby to assure safety and therapeutic efficacy.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

Rivaroxaban reference substance (RRS) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, United States). A total of eight batches of Xarelto[®], Bayer Schering Pharma AG (Leverkusen, Germany) tablets containing 10 and 20 mg of rivaroxaban were obtained from commercial sources within their shelf life period and were identified by Arabic numbers from 1 to 8. HPLC-grade acetonitrile and methanol was obtained from Tedia (Fairfield, USA). The USP Reference Standard Enoxaparin sodium for bioassays containing 500 IU AXa/vial was obtained from USP (Rockville, USA). The human antithrombin III,

factor Xa and chromogenic substrate S-2765 were purchased from Chromogenix (Milan, Italy). Tris (hydroxymethyl) aminomethane, sodium chloride and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Merck (Darmstadt, 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

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.

Reference solution preparation

The rivaroxaban stock solutions were prepared by weighing 2 mg of the RRS, transferred to individual flask and diluted to volume with acetonitrile for the RP-LC method, and in DMSO for the anti-factor Xa assay, to obtain a final concentration of 1 mg/mL. The stock solution was stored at 2-8 °C protected from light and daily diluted to 25 µg/mL in the mobile phase for the RP-LC method, and in 10% DMSO for the bioassay.

Samples solution preparation

To prepare the sample solution, tablets containing 10 and 20 mg of rivaroxaban were accurately weighed and crushed to a fine powder. An appropriated amount was transferred into an individual volumetric flask, diluted to volume with acetonitrile, and filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, Bedford, USA), to obtain a final concentration of 1 mg/mL of active pharmaceutical ingredient. This solution was stored at 2-8 °C protected from light and daily diluted to 25 µg/mL in mobile phase.

RP-LC method

The experiments were performed on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Synergi Fusion-RP C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm i.d., with a particle size of 4 μm and pore size of 80 Å). The LC system was operated isocratically at 40 °C using a mobile phase of water-acetonitrile (30:70, v/v). This was filtered through a 0.45 μm membrane filter Millipore (Bedford, USA), run at a constant flow rate of 0.7 mL/min and using photodiode array (PDA) detection at 249 nm. The injection volume was 20 μL for both standard and samples. Other columns were also tested: XTerra C₁₈ (150 mm x 3.9 mm i.d., 5 μm, 100 Å) (Waters, Dublin, Ireland); Jupiter C₁₈ (150 mm x 4.6 mm i.d., 3 μm, 300 Å) (Phenomenex, Torrance, USA); Gemini-NX C₁₈ (150 mm x 3.0 mm i.d., 5 μm, 110 Å); Synergi MAX-RP (150 mm x 4.6 mm i.d., 4 μm, 800 Å).

Anti-factor Xa assay

The bioassay was performed as described elsewhere (DALMORA et al., 2004; EP., 2013) and adjusted. Briefly a total of 30 μL of antithrombin III solution and 100 μL of the appropriate dilution of the sample or the RRS, respectively, were added to the 96 well-microplate. The solution was gently mixed and 25 μL of the mixture were transferred to the respective well of the plate, and then allowed to equilibrate at 37 °C before adding 50 μL of factor Xa solution. The plate was incubated for exactly 1 min and then 100 μL of chromogenic substrate S-2765 were added. The reaction was stopped after exactly 4 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).

In vitro cytotoxicity test

The *in vitro* cytotoxicity method 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) to the degraded samples of rivaroxaban. The pH of the samples was adjusted to 7.0, and the positive and diluent controls, together with the RRS were included in the assay. 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 released was evaluated by the addition of extracting solution, and the absorbance measured at 540 nm using a microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland).

Validation of the RP-LC method

The method was validated using samples of pharmaceutical formulations with the label claim of 10 and 20 mg by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LD), limit of quantitation (LOQ) and robustness, following the guidelines (ICH, 2005; FDA, 2014).

Specificity

Specificity is the ability of the method to measure the analyte response in the presence of its potential impurities (SHABIR, 2003). The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting a sample solution (1 mg/mL) to accelerated degradation by acidic, basic, oxidative, photolytic and neutral conditions to evaluate the interference in the quantitation of rivaroxaban. After the procedures, the samples were diluted in the mobile phase to a final concentration of 25 µg/mL. A sample solution prepared in 1 M hydrochloric

acid was used for the acidic hydrolysis, and a sample solution in 1 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation, maintained for 60 min, respectively, neutralized with acid or base, as necessary. Oxidative degradation was induced by exposing the samples to 3% H₂O₂ for 24 h. Photodegradation was induced by exposing the samples to 200 watt hours/square meter of near ultraviolet light for 24 h. For the study under neutral condition, the sample solution was diluted in acetonitrile and heated at 80 °C for 1 h 30 min. The pH 7.0 was adjusted for the analysis and the samples were diluted with the mobile phase to a final concentration of 25 µg/mL. The interference of the excipients of the pharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only a placebo added with rivaroxaban at a concentration of 25 µg/mL. Then, the stability-indicating capability of the method was established by determining the peak purity of rivaroxaban in the degraded samples using a PDA detector (FABRE et al., 1995). Additionally, the rivaroxaban reference substance and the degraded samples were evaluated by the *in vitro* cytotoxicity test.

Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves, each one with ten concentrations of reference substance concentrations of rivaroxaban, including the LOQ, over the range of 0.04 – 200 µg/mL prepared in the mobile phase. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 30 min with the mobile phase flowing through the system. Three replicates of 20 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 rivaroxaban to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and determination coefficient.

Precision and accuracy

Precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of the same concentration sample of rivaroxaban, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by analyzing two samples on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was evaluated by the recovery of known amounts of the reference substance added to sample solution to obtain solutions at concentrations of 20, 25, and 30 $\mu\text{g/mL}$, equivalent to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation and also expressed as the percentage relative error (bias %) between the measured mean concentrations and added concentrations.

Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH (ICH, 2005) by using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness was determined by analyzing the same

samples (25 µg/mL) under a variety of conditions of the method parameters, such as: flow rate, percent of acetonitrile, injection volume, column temperature. To assess the stability of sample solutions of rivaroxaban, the samples were tested after storage at 2-8 °C for 48 h, and also placed in an autosampler at room temperature for 24 h. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any changes in the chromatographic pattern, as compared with freshly prepared solutions.

System suitability test

The system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and repeatability of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference solution containing 25 µg/mL of rivaroxaban. The parameters measured were peak area, retention time, theoretical plates and tailing factor (peak symmetry).

Analysis of pharmaceutical tablet dosage forms

For the quantitative analysis of rivaroxaban in tablet formulations, the stock solution was diluted with the mobile phase to a concentration of 25 µg/mL, injected in triplicate, and the percentage recoveries were calculated against the RRS.

Determination of rivaroxaban in human plasma

A total of 500 µL of plasma spiked with 50 µg/mL of rivaroxaban solution was transferred to a 15 mL glass tube, followed by addition of 50 µL of loratadine (solution 50 µg/mL in methanol) as internal standard, and 50 µL of formic acid. All samples were mixed by vortex agitation for 30 s. Then, a 4 mL aliquot of extracting solvent, *tert*-butyl methyl ether, was added and vortex-mixed for 60 s. The tubes were centrifuged for 5 min at 3000 rpm

and the organic layer was filtered through a Millex GV 0.45 μm filter unit Millipore (Bedford, USA) into conical tubes and evaporated under nitrogen stream while immersed in a 40 $^{\circ}\text{C}$ water bath. The residues were reconstituted with 300 μL of mobile phase and the analysis performed by the validated RP-LC method.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of chromatographic conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time. Acetonitrile and methanol were tested as organic solvent, in different composition mixtures with water. Acetonitrile with 0.01 M ammonium acetate buffer pH 3.0 (70:30 v/v), showed low sensitivity and peak impurity, and a mixture of methanol-acetonitrile-water (40:40:20, v/v/v), showed also peak impurity. The composition of acetonitrile-water (70:30) was selected due to peak symmetry, separation time of the active pharmaceutical ingredient (API) and their degraded products, and excipients of the pharmaceutical formulation, with appropriate sensitivity and higher peak purity. C_{18} columns with 250 and 150 mm length and different pore size were tested showing for the 250 mm length, higher retention times. Then, the columns XTerra, Júpiter, Gemini, Max-RP and Synergi Fusion-RP were evaluated showing retention times of 2.1, 3.1, 2.6, 2.7 and 2.9 min; number of theoretical plates about 1681, 2678, 1354, 1393 and 3569, and peak symmetry of 1.61, 1.81, 1.76, 0.94 and 1.11 respectively. Thus, due to the best chromatographic performance and better resolution between the main peak of rivaroxaban and the degraded forms, the column Synergi Fusion-RP was selected. For the selection of the best wavelength detection a PDA detector was used. The optimized conditions of the LC method were validated for the analysis of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms.

A typical chromatogram obtained by the proposed RP-LC method, demonstrating the resolution of the symmetrical peak corresponding to rivaroxaban is shown in Fig. 2 (a,b). The retention time of 2.9 min was adjusted to enable separation of the drug and the degradation products, without interference in the peak purity, which is suitable for quality control laboratories.

Method validation

A stability-indicating method is defined as an analytical procedure that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients or other potential impurities (ALSANTE et al., 2007) as shown in Fig. 2. Under the acidic conditions, a significant decrease of the area (56.11%) was observed, with two additional peaks eluting at 2.1 and 2.3 min. The basic condition exhibited decrease of the area (59.40%), and two additional peaks were detected at 2.3 and 2.7 min. Under the oxidative condition rivaroxaban content exhibited significant decrease of the area (13.74%). The photolytic degradations showed decrease of the area (35.50%) and two additional peaks eluting at 1.4 and 2.7 min. The neutral condition resulted in decrease of the area (18.99%) and one additional peak. The studies with the PDA detector showed that the rivaroxaban peak was free from any coeluting peak, with values of peak purity index higher than 0.9999, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of rivaroxaban in pharmaceutical formulations (figure 2).

The analytical curves constructed for rivaroxaban were found to be linear over the range of 0.04 – 200 µg/mL. The value of the determination coefficient calculated ($r^2 = 0.9992$), $y = (89661.73 \pm 28.40) x + (107217.13 \pm 371.47)$, where, x is concentration and y is the peak absolute area) indicated the linearity of the analytical curve 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 precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of the concentration of 25 µg/mL, and the value obtained was 0.10%.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-day); the mean values obtained were 99.70 and 98.73% with RSD 0.87 and 0.57%, respectively. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by three analysts; the values were found to be 99.74 and 98.58% with RSD 0.63 and 0.58%, respectively.

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 20, 25 and 30 µg/mL giving concentrations of 19.81, 24.66 and 30.50 µg/mL, respectively, with RSD lower than 1.53%. The recoveries obtained for rivaroxaban with a mean value of 99.77% and bias lower than 1.67%, demonstrated that the method is accurate within the desired range.

For the calculation of the LD and LOQ, a calibration equation, $y = 89661.73 x + 107217.13$, was generated by using the mean values of the three independent analytical curves. The LD and LOQ were obtained by using the mean of the slope, 89661.73 ± 28.40 , and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as 371.47. The LD and LOQ calculated were 0.012 and 0.041 µg/mL, respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with the precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$, was found to be 0.04 µg/mL.

The robustness of the analytical procedure (DEJAEGHER; HEYDEN, 2007) was determined by analyzing samples containing 25 µg/mL 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 3, together with the optimized values. Additionally, the robustness was also evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT) approach (INJAC et al., 2008) at three levels (1 unit per parameter up or down around optimized values). The results for the OVAT and MVAT procedures were within the acceptable deviation (RSD < 2%), and an analysis of the variance showed non-significant differences ($p > 0.05$) for the dosage of the sample solutions. The analysis performed with a wider level of variations of the flow-rate, acetonitrile percentage and column temperature, showed changes of the retention time related to the optimized conditions. Moreover, the peak symmetry values were also evaluated showing non-significant differences ($p > 0.05$). The stability of reference and sample solutions was assessed after storage for 48 h at 2 - 8 °C, and also placed in to an autosampler for 24 h at room temperature, showing non-significant changes (< 2%), relative to freshly prepared samples, as recommended (SHABIR, 2003).

A system suitability test was performed and the RSD values calculated for the retention time, tailing factor and peak area were 0.25, 0.53 and 0.18%, respectively. The number of theoretical plates was about 3569, with RSD of 0.94%. The experimental results show that the parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the system is suitable for the analysis intended.

Cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity test of the degraded forms related to the intact molecule was performed trying to detect some possible effects resulting from the instability of the samples during storage. However, when subjected to degradation, such as acid, basic hydrolysis,

photodegradation and neutral conditions, increased toxicity was detected with the NCTC cell line giving $IC_{50} = 57.73 \mu\text{g/mL}$, $87.17 \mu\text{g/mL}$, $69.75 \mu\text{g/mL}$ and $56.74 \mu\text{g/mL}$, respectively, showing significant differences ($p < 0.05$) related to the intact molecule with mean $IC_{50} = 120.42 \mu\text{g/mL}$. In parallel, CHO cell line showed $IC_{50} = 58.13 \mu\text{g/mL}$, $96.50 \mu\text{g/mL}$, $65.73 \mu\text{g/mL}$ and $58.22 \mu\text{g/mL}$, respectively, with significant differences ($p < 0.05$) related to the intact molecule with mean $IC_{50} = 117.65 \mu\text{g/mL}$.

Method application

The validated RP-LC method was applied to the determination of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms, without prior separation of the excipients of the formulation. The results obtained for the pharmaceutical formulations were in accordance with the label claim, between 96.30 and 104.57%, as shown in Table 4. Besides the anti-factor Xa assay was carried out showing that 1 mg of RRS can be correlated to nearly about 5200 IU AXa of the low molecular weight heparin, USP Reference Standard for enoxaparin. In addition a dissolution test was developed for tablet dosage forms ($n = 12$), using USP apparatus 2, 75 rpm rotation speed, and 900 mL of deaerated sodium acetate buffer with 0.4% sodium lauryl sulphate at $\text{pH} = 4.5$ (adjusted with 2 M acetic acid solution), as dissolution medium. The percentage of rivaroxaban released was quantified by the RP-LC method showing dissolution greater than 89% at 15 and 30 min, with $\text{CV} < 0.94\%$, meeting the specifications (FDA, 1997). Moreover, the method was also successfully applied for the determination of rivaroxaban in human plasma by liquid-liquid extraction with the quantitation limit of $0.1 \mu\text{g/mL}$.

CONCLUSIONS

The results of the validation studies show that the RP-LC method is specific, stability-indicating, accurate, and possess significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients and degraded products. Therefore the proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy of the pharmaceutical products. Besides, the capability demonstrated for the method can also be useful for bioavailability and pharmacokinetic studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Project 306898/2011-0, for the support.

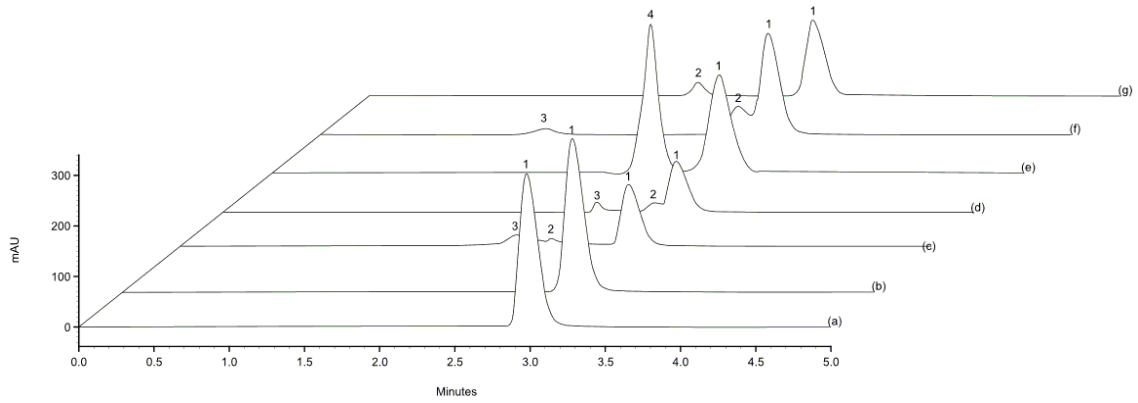


Figure 2. Representative chromatograms showing: peak 1 = rivaroxaban, peaks 2-3 = degraded forms, peak 4 = hydrogen peroxide: (a) Rivaroxaban reference solution; (b) sample of pharmaceutical formulation. Rivaroxaban reference solution after degradation under conditions: (c) acidic hydrolysis, (d) basic hydrolysis, (e) oxidative, (f) photolytic, (g) neutral.

Table 1. Inter-days and between-analysts precision data of RP-LC for rivaroxaban in samples of pharmaceutical formulations.

Sample	Inter-days			Between-analysts		
	Day	Recovery ^a (%)	RSD ^b (%)	Analyst	Recovery ^a (%)	RSD ^b (%)
1	1	100.69	0.87	A	99.52	0.63
	2	99.09		B	100.45	
	3	99.31		C	99.24	
2	1	98.46	0.57	A	97.98	0.58
	2	98.35		B	98.63	
	3	99.37		C	99.12	

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

Table 2. Accuracy of RP-LC for rivaroxaban in the formulations.

Nominal concentration (µg/mL)	Mean concentration measured ^a (µg/mL)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
20	19.81	1.53	99.03	-0.95
25	24.66	1.05	98.62	-1.36
30	30.50	0.08	101.66	1.67

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

^cBias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

Table 3. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing with the one-variable-at-a-time (OVAT) procedure.

Variable	Range investigated	Rivaroxaban ^a (%)	RSD ^b %	Optimized condition
Flow rate (mL/min)	0.5	99.62	0.15	0.7
	0.7	99.66	0.07	
	0.9	99.60	0.09	
Injection volume (μL)	15	99.87	0.33	20
	20	99.83	0.10	
	25	99.12	0.27	
Temperature (°C)	35	99.42	0.07	40
	40	99.28	0.02	
	45	99.46	0.17	
Acetonitrile (%)	60	99.56	0.15	70
	70	100.50	0.14	
	80	100.83	0.37	
Solution stability	Autosampler 24 h	98.59	0.24	-
	2-8°C 24 h	99.80	0.06	-
	2-8°C 48 h	98.85	0.18	-
Wavelength (nm)	210-320	-	-	249

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative Standard Deviation.

Table 4. Determination of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms by the RP-LC method.

Sample	Theoretical amount		Experimental amount	
	mg/tablet	mg	Recovery (%)	RSD ^b (%)
1	10	10.03	100.34	0.69
2	10	9.94	99.45	0.42
3	10	10.09	100.91	0.56
4	10	10.12	101.27	0.27
5	20	20.97	104.86	0.61
6	20	19.27	96.38	0.95
7	20	19.84	99.23	0.34
8	20	20.13	100.67	0.28

^aMean of three replicates.

^bRSD = Relative standard deviation.

REFERENCES

1. Samama, M. M., G. Contant, T. E. Spiro, E. Perzborn, L. L. Flem, C. Guinet, Y. Gourmelin, G. Rohde & J. Martinoli (2013) Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. *Thrombosis Journal*, **11**: 1-7.
2. Roehrig, S., A. Straub, J. Pohlmann, T. Lampe, J. Pernerstorfer, K. H. Schlemmer, P. Reinemer, & E. Perzborn (2005) 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*, **48**: 5900-5908.
3. Misselwitz, F., S. D. BERKOWITZ, & E. PERZBORN (2011) E. The discovery and development of rivaroxaban. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1222**: 64-75, 2011.
4. Perzborn, E. (2009) Factor Xa inhibitors, new anticoagulants for secondary haemostasis. *Hämostaseologie*, **29**: 260-267.
5. Yeh, C. H., J. C. Fredenburg & J. I. Weitz, J. I (2012) Oral direct factor Xa inhibitors. *Circulation Research*, **111**: 1069-1078.
6. Çelebier, M., T. Reçber, E. Koçak & S. Altinöz (2013) RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxabana in pharmaceutical dosage forms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **49**: 359-366.
7. Rohde, G (2008) 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*, **872**.
8. Apostolakis, S., G. Y. H. Lip, D. A. Lane, & E. Shantsila (2010) The quest for new anticoagulants: from clinical development to clinical practice. *Cardiovascular Therapeutics*, **29**: e12-e22.

9. ICH (2005) *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*; International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Geneva.
10. United States Food and Drug Administration (2014) *Guidance for industry, Analytical procedures and methods validation for drug and biologics*.
11. Dalmora, S. L., L. B. Júnior, C. A. Schmidt, S. F. Vaccari, P. R. Oliveira, & C. F. Codevilla (2004) Validation of the anti-factor Xa assay for the potency assessment of enoxaparin in pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC International*, **87**: 1305-1308.
12. European Pharmacopoeia, 7th ed., Council of Europe, Strasbourg, France, 2013.
13. Stamm, F. P., G. Z. Calegari, G. W. Freitas, R. B. Souto, L. P. Porto, C. D. A. Cardoso Jr & S. L. Dalmora (2013) Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays. *Analyst*, **138**: 1419-1426.
14. Shabir, G. A (2003) 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 Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, **987**: 57-66.
15. Fabre, H., A. Le Bris, & M. D. Blanchin (1995) Evaluation of different techniques for peak purity assessment on a diode-array detector in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **697**: 81-88.
16. Alsante, K. M., A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T. D. Hatajik, W. Kong & Y. Tsuda (2007) The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**: 29-37.

17. Dejaegher, B. & Y. V. Heyden (2007) Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, **1158**: 138–157.
18. Injac, R., M. Boskovic, N. Kocevar & T. Vovk (2008) 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. *Analitica Chimica Acta*, **620**, 150-161.
19. United States Food and Drug Administration (1997) *Guidance for Industry, Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A análise da substância ativa e do produto farmacêutico acabado é importante para assegurar a qualidade e eficácia terapêutica. Os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação e análise dos produtos farmacêuticos. Nesse contexto, observa-se que a rivaroxabana é um medicamento relativamente novo e encontram-se poucas publicações sobre análises desse fármaco. Avançou-se, então para o estudo de metodologias analíticas de acordo com as especificações descritas nos compêndios oficiais e na literatura, visando sua aplicação no controle de qualidade.

Observa-se que a discussão apresentada a seguir baseia-se no artigo a ser submetido, identificado como ARTIGO 3.1, em anexo.

O método proposto foi estudado em coluna cromatográfica C₁₈, de amplo uso em laboratórios de controle de qualidade, com base nas características estruturais da rivaroxabana. Assim, desenvolveu-se e validou-se o procedimento para a determinação de rivaroxabana em formulações farmacêuticas, conforme preconizado na literatura (ICH, 2005; FDA, 2014).

Na avaliação da especificidade obtiveram-se cromatogramas nos quais os picos dos produtos de degradação encontraram-se resolvidos em relação ao pico da solução de referência (Figura 2). Além disso, utilizando o detector de arranjo de diodos, verificou-se que a substância química de referência permaneceu com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando a especificidade e que o procedimento também pode ser usado para avaliação da estabilidade. O método apresentou-se linear na faixa de 0,04 - 200 µg/mL ($R^2 = 0,9992$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 0,87% (Tabela 1), o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza coeficiente de variação menor ou igual a 2,0%. O valor médio experimental do teste de exatidão foi de 99,77%, conforme Tabela 2, demonstrando exatidão significativa, pois o valor percentual sugerido é de $100 \pm 2\%$ em relação ao declarado (SHABIR, 2003). Na avaliação da robustez, observou-se que as variações na proporção de acetonitrila, na vazão, volume de injeção e temperatura da coluna alteraram os tempos de retenção, porém essas pequenas variações não alteram a capacidade do método em quantificar o fármaco. Os resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade, exatidão e precisão dos dados analíticos ($CV <$

2,0%). Demonstrou-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura em relação à validação, podendo ser empregado para análise de rivaroxabana em formulações farmacêuticas. A determinação quantitativa dos lotes de comprimidos selecionados para esse estudo forneceu resultados médios entre 96,38 e 104,86%, conforme a Tabela 4, cumprindo especificações farmacopeicas para produtos farmacêuticos, que preconizam teores entre 95 e 105% (FDA, 2014; BP, 2013; ICH, 2005).

Paralelamente, foi executado o ensaio da atividade anti-fator Xa para avaliação comparativa da atividade de rivaroxabana em relação ao Padrão de Referência USP de enoxaparina sódica, demonstrando-se que 1 mg de rivaroxabana apresenta 5200 UI de atividade anti-fator Xa. Esse dado poder ser aplicável para estudos de correlação de atividade farmacológica com as heparinas de baixo peso molecular, amplamente usadas na clínica.

Desenvolveu-se também o teste de dissolução com base na baixa solubilidade em água, testando diferentes condições, meios e velocidades de rotação, até atingir a condição selecionada que apresentou um melhor perfil de liberação do fármaco. As condições otimizadas foram: 75 rpm (velocidade de rotação) e 900 mL de tampão acetato de sódio com 0,4% de lauril sulfato de sódio a pH = 4,5 (ajustado com ácido acético 2 M), como meio de dissolução. Avaliou-se a dissolução dos comprimidos (n = 12) por CLAE-FR e os perfis de dissolução mostraram percentagens de fármaco dissolvidas superiores a 89% em 15 e 30 minutos, valores considerados adequados conforme descrito na literatura (FDA, 1997). Além disso, o método por CLAE-FR foi aplicado com sucesso para determinação de rivaroxabana em plasma humano com as condições de extração líquido-líquido validados com o LOQ de 0.1 µg/mL, podendo ser aplicado para estudos de biodisponibilidade e farmacocinética.

O teste de citotoxicidade foi realizado com as formas degradadas analisadas por CLAE-FR, que demonstraram as porcentagens de degradação, e comparados com a forma intacta da molécula. Os dados experimentais demonstraram que as amostras submetidas a meio ácido, básico, neutro e condições de fotodegradação apresentaram respectivamente, $CI_{50} = 57,73 \mu\text{g/mL}$, $87,17 \mu\text{g/mL}$, $56,74 \mu\text{g/mL}$ e $69,75 \mu\text{g/mL}$ para a linhagem celular NCTC. Nas células da linhagem CHO, os valores de CI_{50} foram de $58,13 \mu\text{g/mL}$, $96,50 \mu\text{g/mL}$, $58,22 \mu\text{g/mL}$ e $65,73 \mu\text{g/mL}$, para as formas submetidas a meio ácido, básico, neutro e fotodegradação, respectivamente. Ambas as respostas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à molécula íntegra que demonstrou $CI_{50} = 120,42 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} = 117,65 \mu\text{g/mL}$ para as linhagens celulares NCTC e CHO respectivamente. Esse teste tem adquirido importância recentemente, pela necessidade de prever possíveis efeitos toxicológicos no

organismo humano, devido às alterações originárias das condições de armazenagem ou estabilidade dos produtos farmacêuticos.

Observa-se que existem algumas publicações sobre métodos de análise de rivaroxabana por CLAE-FR, conforme descrito na revisão da literatura, porém esses estudos apresentam limitações. Neste contexto, além de publicados em revistas de menor impacto, com apresentação científica inadequada, cita-se que a substância de referência que não é descrita adequadamente, os resultados do produto farmacêutico com teor em massa, foram expressos em ppm, ou apenas com valores das áreas obtidas sem os devidos cálculos estatísticos. Os limites de quantificação não foram calculados, apenas expressos experimentalmente. As tabelas e figuras são repetitivas, com formatação e identificação inadequadas. Os estudos de validação foram realizados seguindo apenas parcialmente as recomendações do ICH, e realizaram publicação um de artigo para cada estudo de degradação, com textos idênticos na introdução (SATYANARAYANA et al. 2012; RAO; REDDY, 2013; KASAD et al. 2013 a, b, c; KASAD, 2013; LORIES et al., 2013). Destaca-se inclusive, publicação em cujo texto consta tabela com os resultados obtidos com outros fármacos, sem relação com a rivaroxabana (SATYANARAYANA, et al. 2012 ; LORIES et al., 2013).

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ O método validado por cromatografia líquida em fase reversa foi específico, sensível, preciso, exato e robusto para identificação, separação das formas degradadas e análise quantitativa de rivaroxabana em produtos farmacêuticos, sugerindo sua aplicação para a área de controle da qualidade.
- ✓ O método foi aplicado para separação cromatográfica dos produtos de degradação forçada da rivaroxabana, demonstrando sua importância para estudos de estabilidade.
- ✓ Realizaram-se estudos de citotoxicidade *in vitro* em células das linhagens NCTC e CHO, avaliando os efeitos dos produtos de degradação em relação à molécula íntegra, demonstrando-se diferença significativa dos resultados ($p < 0,05$).
- ✓ Demonstrou-se que 1 mg de rivaroxabana equivale a aproximadamente 5200 UI de atividade anti-fator Xa em relação ao Padrão de Referência USP de enoxaparina sódica.
- ✓ Estudou-se o teste de dissolução, suas condições e determinou-se a percentagem dissolvida dos comprimidos de rivaroxabana pelo método validado.
- ✓ Concluí-se que o método estudado e validado pode ser aplicado no estudo de estabilidade e representa contribuição para estabelecer metodologia analítica, aprimorar o controle da qualidade e garantir a segurança e eficácia terapêutica do produto farmacêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNELLI, G.; S. BERKOWITZ, H.; BOUNAMEAUX, H.; BÜLLER, A.; COHEN, A.; GALLUS, A.; LENSING A. W.; MISSELWITZ, F.; PETERS, G.; PRINS, M.; RASKOB, G.; SCHELLONG, S. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 26, p. 2499-2510, 2010.

APOSTOLAKIS, S.; LIP, G. Y.; LANE, D. A.; SHANTSILA, E. The quest for new anticoagulants: from clinical development to clinical practice. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 29, p. 12-22, 2011.

ARCELUS, J. I.; DOMÈNECH, P.; FERNÁNDEZ-CAPITAN M. C.; GUIJARRO, R.; JIMÉNEZ, D.; JIMÉNEZ S.; LOZANO, F. S.; MONREAL, M.; NIETO, J. A.; PÁRAMO, J. A. Rivaroxaban in the Treatment of Venous Thromboembolism and the Prevention of Recurrences A Practical Approach. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, p. 1-12, 2014.

ATTARD, C.; MONAGLEA, P.; KUBITZA, D.; IGNJATOVIC, V. The in vitro anticoagulant effect of rivaroxaban in children. **Thrombosis Research**, v. 130, p. 804-807, 2012.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5^a ed. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010.

BRITISH Pharmacopoeia, London: **The Stationery Office**, 2013.

ÇELEBIER, M.; REÇBER, T.; KOÇAK, E.; ALTINÖZ, S. 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.

COHEN, A. T.; SPIRO, T. E.; BÜLLER, H. R.; HASKELL, L.; HU, D.; HULL, R.; MEBAZAA, A.; MERLI, G.; SCHELLONG, S.; SPYROPOULOS, A. C.; TAPSON, V. Rivaroxaban for thromboprophylaxis in acutely ill medical patients. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 6, 513-523, 2013.

COLLINS C. H.; BRAGA G. L.; BONATO P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 7^a ed. Editora da Unicamp, Campinas-SP, 1997.

DALMORA S. L.; SOUTO, R. B.; MACHADO, F. T.; SCHRAMM, V. G.; PINTO, M. A.; WALTER, M. E. Validation of a stability-indicating micellar electrokinetic capillary method the assessment of febuxostat and its correlation with reversed-phase LC method. **Analytical methods**, v. 6, p. 3811-3816, 2014.

ERIKSSON, B. I.; BORRIS, L. C.; FRIEDMAN, R. J.; HAAS, S.; HUISMAN, M. V.; KAKKAR, A. K.; BANDEL, T. J.; BECKMAN, H.; MUEHLHOFER, E.; MISSELWITZ, F.; GEERTS, W. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 26, p. 2765-2775, 2008.

FABRE, H.; LE BRIS, A.; BLANCHIN, M. D. Evaluation of different techniques for peak purity assessment on a diode-array detector in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 697, v. 1, p. 81-88, 1995.

GNOTH, M. J. BUETEHORN, U. MUENSTER, U., SCHWARZ, T. SANDMANN, S. In vitro and in vivo P-glycoprotein transport characteristics of rivaroxaban. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 1, p. 372-380, 2011

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. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 32, p. 267-271, 2011.

HILLARP, A.; BAGHAEI, F.; BLIXTER, I. F.; GUSTAFSSON, K. M.; STIGENDAL, L.; STEN-LINDER, M.; STRANDBERG, K.; LINDAHL, L. 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.

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.

KASAD, P. A.; MURALIKRISHNA, K. S. Base degradation study and method development of rivaroxabana by RP-HPLC in bulk. **Asian Pharma Press**, v. 3, n. 3, p. 109-113, 2013 a.

KASAD, P. A.; MURALIKRISHNA, K. S. Method Development and Acid Degradation Study of Rivaroxaban by RP-HPLC in bulk. **Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 2, p.62-65, 2013 b.

KASAD, P. A.; MURALIKRISHNA, K. S. Design and validation of dissolution profile or rivaroxabana by using RP-HPLC method in dosage form. **Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 3, p. 75-78, 2013 c.

KASAD, P. A. Photolytic-thermal degradation study and method development or rivaroxabana by RP-HPLC. **International Journal of PharmaTech Research**, v. 5, n. 3, p. 1254-1263, 2013.

KAKKAR, A. K.; BRENNER, B.; DAHL, O. E.; ERIKSSON, B. I.; MOURET, P.; MUNTZ, J.; SOGLIAN, A. G.; PAP, Á. F.; MISSELWITZ, F.; HAAS, S. 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.; BECKA M.; ZUEHLSDORF, M.; MUECK, M. 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.; BECKA, M.; MUECK, W.; HALABI, A.; MAATOUK, H.; KLAUSE, N.; LUFFT, V.; WAND, D. D.; PHILIPP, T.; BRUCK, H. 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.

LASSEN, M. R.; AGENO, W.; BORRIS, L. C.; LIEBERMAN, J. R.; ROSENCHER, N.; BANDEL, T. J.; MISSELWITZ, F.; TURPIE, A. G. G. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 26, p. 2776-2786, 2008.

LORIES, I. B.; MOSTAFA, A. A.; GIRGES, M. A. High Performance Liquid Chromatography, TLC Densitometry, First-derivative and First-derivative ratio spectrophotometry for de-termination of Rivaroxaban and its alkaline Degradates in Bulk Powder and its Tablets. **Journal Chromatography Separation Techniques**, v. 4, n. 202, p. 2-6, 2013.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, p. 375-399, 2002.

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.

OLIVEIRA, P. R.; BARTH, T.; TODESCHINI, V. DALMORA, S. L. Simultaneous liquid chromatographic determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical products. **Journal of AOAC International**, n. 90, v. 6, p. 1566-1572, 2007.

PATEL, M. R.; MAHAFFEY, K. W.; GARG, J.; PAN, G.; SINGER, D. E.; HACKE, W.; BREITHARDT, G.; HALPERIN J. L.; HANKEY, G. J.; PICCINI, J. P.; BECKER, R. C.; NESSEL, C. C.; PAOLINI, J. F.; BERKOWITZ, S. D.; FOX, K. A.; CALIFF, R. M. 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.

PITA, N. O. G.; PRATES, E. C.; FERRAZ, H. G. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de ciprofloxacino 250 mg comercializados como similares no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 3, 2004.

RAO, N. V. B.; REDDY, B. S. A novel RP-HPLC method for the quantification of rivaroxaban in formulations. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 4, p. 756-764, 2013.

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. **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.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. 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.; CONTANT, G.; SPIRO, T. E.; PERZBORN, E.; FLEM, L. L.; GUINET, C.; GOURMELIN, Y.; ROHDE, G.; MARTINOLI, J. Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. **Thrombosis Journal**, v. 11, n. 11, p. 1-7, 2013.

SANGOI, M. D. S.; NOGUEIRA, D. R.; DA SILVA, L. M.; LEAL, D. P.; DALMORA, S. L. Validation of a stability indicating reversed phase LC method for the determination of fluticasone propionate in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 14, p. 2113-2127, 2008.

SATYANARAYANA, P. V. V.; MADHAHAVI, A. S. RP-HPLC method development and validation for the analysis of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Science Innovations and Discoveries**, v. 2, n. 1, p. 226-231, 2012.

SEKHAR, K. C.; VANI, P. S.; LAKSHMI, A. D.; DEVI, C. L. L.; BARIK, A.; DEVANABOYINA, N. A new method development and validation for analysis of rivaroxabana in formulation by RP HPLC. **Research Desk**, v. 1, n. 1, p. 24-33, 2012.

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 Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G. A.; LOUGH, W. J.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 30, p. 311-333, 2007.

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.; KATZBURG, S.; GIBI, R.; DOLKART, O.; SHARON, O.; SALAI, M.; STERN, N. 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.

TAKÁCS-NOVÁK, K.; SZŐKE, V.; VÖLGYI, G.; HORVÁTH, P.; AMBRUS, R.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. 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 UNITED States Pharmacopeia. 37. Ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2014.

THOMAS, T. F.; GANETSKY, V.; SPINLER, S. A. Rivaroxaban: an oral factor Xa inhibitor. **Clinical therapeutics**, v. 35, n. 1, p. 4-27, 2013.

TURPIE, A. G. G.; LASSEN, M. R.; DAVIDSON, B. L.; BAUER, K. A.; GENT, M.; KWONG, L. M.; CUSHNER, F. R.; LOTKE, P. A.; BERKOWITZ, S. D.; BANDEL, T. J.; BENSOM, A.; MISSELWITZ, F.; FISHER, W. D. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty (RECORD4): a randomized trial. **Lancet**, v. 373, p. 1673-1680, 2009.

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

YOSHIDA, R. A.; YOSHIDA, W. B.; ROLLO, H. A. Novos anticoagulantes para a profilaxia do tromboembolismo venoso em cirurgias ortopédicas de grande porte. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 2, p. 145-153, 2011.