



LÍVIA RIBERTI RODRIGUES

**“ANÁLISE DE IMPUREZAS DE FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS  
POR MALDI *MASS SPECTROMETRY IMAGING* (MALDI-MSI)”**

**“ANALYSIS OF IMPURITIES IN SOLID DOSAGE FORMS BY MALDI  
MASS SPECTROMETRY IMAGING (MALDI-MSI)”**

CAMPINAS  
2014





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LÍVIA RIBERTI RODRIGUES

**“ANÁLISE DE IMPUREZAS DE FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS  
POR MALDI MASS SPECTROMETRY IMAGING (MALDI-MSI)”**

**“ANALYSIS OF IMPURITIES IN SOLID DOSAGE FORMS BY MALDI  
MASS SPECTROMETRY IMAGING (MALDI-MSI)”**

**Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

Master's dissertation presented to the Medical Sciences Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the MSc grade in Sciences.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA LÍVIA RIBERTI RODRIGUES E ORIENTADA  
PELO PROF. DR. RODRIGO RAMOS CATHARINO.

-----  
Assinatura do Orientador

CAMPINAS  
2014

iii

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R618a Rodrigues, Livia Riberti, 1988-  
Análise de impurezas de formas farmacêuticas sólidas por MALDI Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI) / Livia Riberti Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Rodrigo Ramos Catharino.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Atorvastatina. 2. Contaminação de medicamentos . 3. Controle de qualidade. 4. Espectrometria de massas. I. Catharino, Rodrigo Ramos,1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Analysis of impurities in solid dosage form by MALDI *Mass Spectrometry Imaging* (MALDI-MSI)

**Palavras-chave em inglês:**

Atorvastatin  
Drug contamination  
Quality Control  
Mass Spectrometry

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestra em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Rodrigo Ramos Catharino [Orientador]

Daisy Machado

Celia Regina Garlipp

**Data de defesa:** 29-05-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

---

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LÍVIA RIBERTI RODRIGUES

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO

---

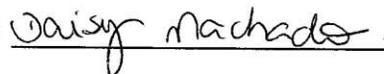
### MEMBROS:

---

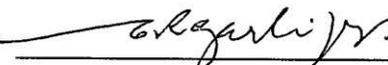
1. PROF(A). DR(A). RODRIGO RAMOS CATHARINO



2. PROF(A). DR(A). DAISY MACHADO



3. PROF(A). DR(A). CELIA REGINA GARLIPP



---

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 29 de maio de 2014

---

## RESUMO

Atualmente, as doenças cardiovasculares constituem uma das primeiras causas de mortes no Brasil e no mundo. Neste cenário, as estatinas constituem uma notável classe de medicamentos redutores de colesterol e têm sido associadas com uma expressiva diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular para pacientes em prevenção primária ou secundária da doença coronariana. Elas agem inibindo competitivamente a enzima HMG-CoA redutase, através da afinidade destes fármacos pelo sítio ativo da enzima. Esta enzima é responsável por catalisar a conversão do substrato HMG-CoA em mevalonato, um dos precursores do colesterol. A crescente necessidade e busca por medicamentos cada vez mais efetivos traz a preocupação na segurança destes produtos para seus usuários. Neste sentido, o conhecimento das impurezas e produtos de degradação torna-se necessário para garantir sua qualidade. Uma técnica muito utilizada para análises de impurezas e degradantes é a espectrometria de massas, pois é uma técnica sensível e seletiva e permite elucidar as estruturas químicas presentes na formulação do medicamento. Sendo assim, amostras de Atorvastatina cálcica foram analisadas pela técnica de espectrometria de massas por imagem (MALDI-MSI), permitindo a quantificação de impurezas do medicamento através da imagem da distribuição dessa impureza no comprimido. Dessa forma, é possível minimizar o preparo de amostra e obter um melhor conhecimento da formulação.

## ABSTRACT

Currently, cardiovascular diseases constitute one of the first causes of deaths in Brazil and in the world. In this scenario, the statins are a notable class of medicines and cholesterol reducers have been associated with a significant reduction in cardiovascular morbidity and mortality for patients in primary or secondary prevention of coronary heart disease. They act by inhibiting competitively the enzyme HMG-CoA reductase, through the affinity of these drugs by the active site of the enzyme. This enzyme is responsible for catalyzing the conversion of HMG-CoA to mevalonate substrate, one of the precursors of cholesterol. The growing need and search for increasingly effective drugs brings the concern on the safety of these drugs for their users. In this sense, the knowledge of the impurities and degradation products becomes necessary to ensure their quality. A widely used technique for analysis of impurities and degrading is mass spectrometry, because it is a sensitive and selective technique and allows elucidating the chemical structures of the present formulation of the medicinal product. Thus, samples of Atorvastatin calcium were analyzed by the technique of mass spectrometry imaging (MALDI-MSI), which allows the quantification of impurities from the medicine through the image of the distribution of impurity in the tablet. That way, it is possible minimize sample preparation and get a better understanding of the formulation.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DEDICATÓRIA.....	ix
AGRADECIMENTOS.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	30
OBJETIVOS.....	32

### CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO *IN SITU* DE IMPUREZA DE ATORVASTATINA UTILIZANDO MALDI *MASS SPECTROMETRY IMAGING* (MALDI-MSI).....

Abstract.....	34
Introdução.....	34
Materiais e Métodos.....	41
Resultados e Discussão.....	47
Conclusão.....	50
Referências.....	51

CONCLUSÕES GERAIS.....	54
------------------------	----

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, Antonio, Neusa e Renato por todo o apoio, amor e confiança que depositaram em mim. Eu amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino por todas as conversas e orientação dada desde a minha graduação. O que o Rondon une jamais será rompido, certo?

Aos meus pais, Antonio e Neusa que sempre fizeram de tudo para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Tô e mãe, muito obrigada! Sem o esforço de vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada por todo apoio, amor, carinho e incentivo que vocês continuam dando a mim.

Ao meu irmão Renato pelo companheirismo da vida toda, sempre disposto a ajudar e socorrer a irmã mais nova.

Ao meu namorado, Samuel, por todo amor e apoio e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus amigos do Laboratório Innovare: Nati, Diogo, Mônica, Tati, Cibele, Maico, Gustavo. Obrigada por toda a ajuda que vocês me deram, pelas conversas e por todos os bons momentos que passamos juntos!

Aos meus amigos que sempre torceram por mim! Muito obrigada, vocês são muito especiais!

À Medley Farmacêutica Ltda pela parceria nesse projeto, pelas informações e amostras cedidas.

Obrigada!

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANVISA</b>	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabricação
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CHCA</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
<b>CID</b>	Dissociação induzida por colisão ( <i>Collision-induced dissociation</i> )
<b>C<sub>máx</sub></b>	Concentração plasmática máxima
<b>DAC</b>	Doença Arterial Coronariana
<b>DAD</b>	Detector de arranjos de diodos ( <i>Detector diode array</i> )
<b>DESI</b>	Ionização de dessorção por elétron-spray ( <i>Desorption electrospray ionization</i> )
<b>ESI</b>	Ionização por elétron-spray ( <i>Electrospray ionization</i> )
<b>GC</b>	Cromatografia gasosa ( <i>Gas chromatography</i> )
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade ( <i>High density lipoprotein</i> )
<b>HMG</b>	Hidroximetilglutarílico
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High-performance liquid chromatography</i> )
<b>LC</b>	Cromatografia líquida ( <i>Liquid chromatography</i> )
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade ( <i>Low density lipoprotein</i> )
<b>MALDI</b>	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
<b>MS</b>	Espectrometria de massas ( <i>Mass spectrometry</i> )
<b>MSI</b>	Espectrometria de massas por imagem ( <i>Mass spectrometry imaging</i> )

<b>MS/MS</b>	Espectrometria de massas em <i>tandem</i>
<b>PNA</b>	p-nitroanilina
<b>SA</b>	Ácido sinapínico (sinapinic acid)
<b>TSA</b>	Ácido trifluoroacético (Trifluoroacetic acid)
<b>UR</b>	Umidade relativa
<b>USP</b>	Pharmacopeia Estados Unidos (United States Pharmacopeia)
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de densidade muito baixa (Very low density lipoprotein)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema simplificado mostrando a biossíntese do colesterol. Em destaque, a enzima HMG-CoA redutase, que é inibida pela ação das estatinas.....	16
<b>Figura 2</b>	Estrutura química da Atorvastatina cálcica.....	17
<b>Figura 3</b>	Estrutura da Atorvastatina mostrando em destaque o análogo da HMG-CoA, região que se liga ao sítio ativo da enzima HMG-CoA redutase.....	18
<b>Figura 4</b>	Estrutura química da Atorvastatina Lactona.....	24
<b>Figure 5</b>	Representative mass spectrum (MS/MS) of atorvastatin calcium (AtC, <i>m/z</i> 557): (A) standard and (B) in the tablet, using PNA as matrix. Data collected in the negative ion mode.....	39
<b>Figure 6</b>	Representative mass spectrum (MS/MS) of Atorvastatin Lactone (AtL, <i>m/z</i> 541): (A) standard and (B) in the tablet, using PNA as matrix. Data collected in the positive ion mode.....	40
<b>Figure 7</b>	Representative mass spectrum (MS <sup>3</sup> ) of the selected fragment of AtL at <i>m/z</i> 448: (A) standard and (B) in the tablet, using PNA as matrix. Structural proposals calculated with Mass Frontier software are assigned in the respective signals. Data collected in the positive ion mode.....	45
<b>Figure 8</b>	Analytical curve obtained by MSI for the atorvastatin lactone ( $R^2 = 0.9572$ ). Error bars for the standard error are noted in each point ( $P < 0.05$ ).....	46
<b>Figure 9</b>	Concentrations of AtL for the replicates of the three different brands of AtC obtained. All differences were significant ( $P < 0.05$ ).....	46
<b>Figure 10</b>	HPLC Chromatogram of AtC (noted as ATV) and AtL (noted as lactone).....	47
<b>Figure 11</b>	Concentrations of AtL in Brand 1 tablets, monitored by stability studies: long-term stability (6, 12 and 24 months at 30°C) and accelerated stability (6 months at 40°C). * Represents $P < 0.05$ when compared to the initial and # represents $P < 0.05$ when compared to the condition at 30°C for 6 months (long-term).....	50

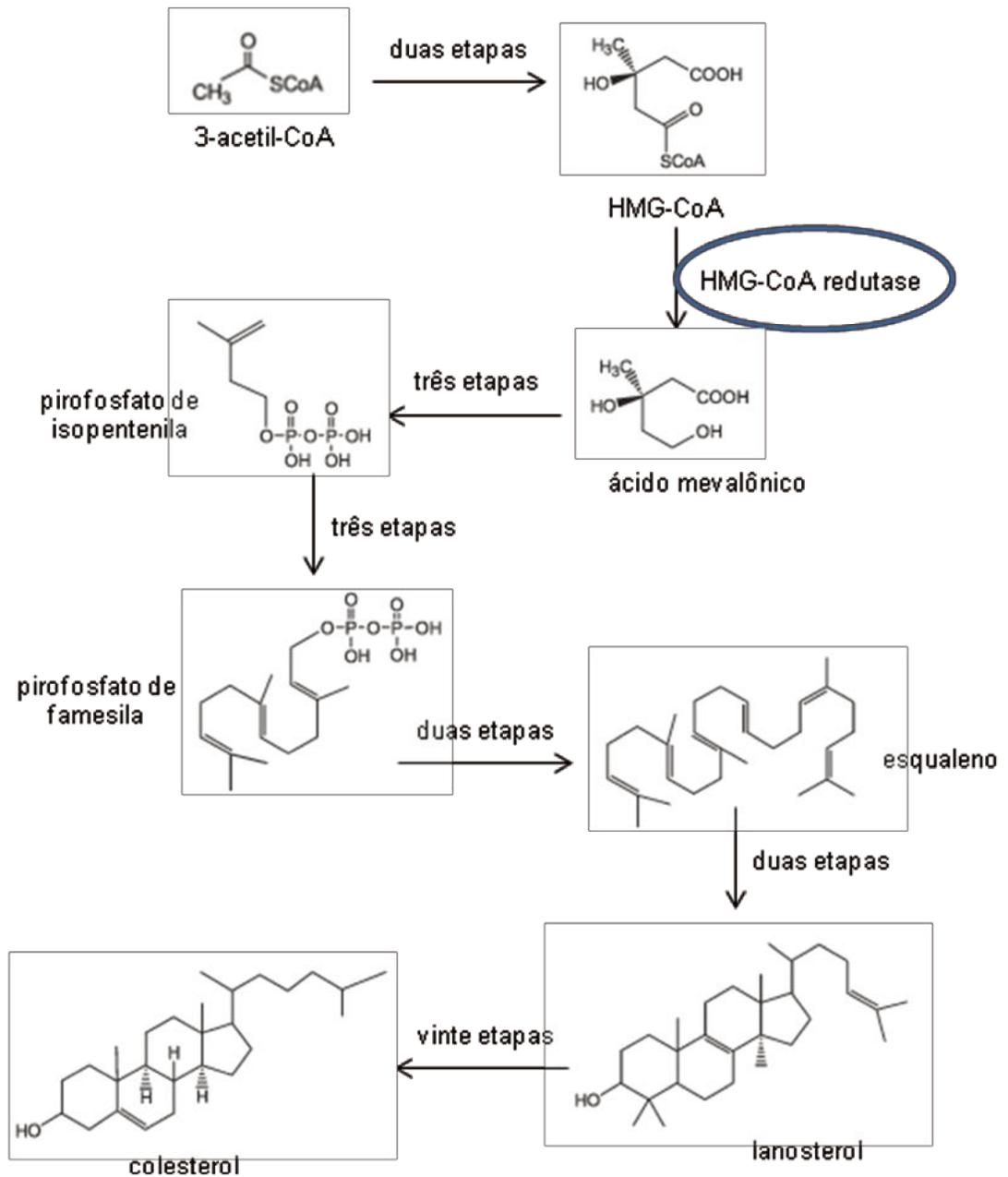
## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1</b>	MS <sup>3</sup> fragmentation of lactone via MALDI-MSI (positive ion mode).....	41
----------------	---	----

## INTRODUÇÃO GERAL

### **Importância das estatinas**

As estatinas são os fármacos mais usados para tratamento das hiperlipidemias em prevenção primária e secundária, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doença arterial coronariana (DAC). Estes efeitos são resultantes da atividade inibidora das estatinas sobre a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, com a propriedade de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em mevalonato, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol. Estas substâncias, capazes de mimetizar o substrato natural, podem ser divididas em naturais e sintéticas e diferem fundamentalmente em termos de potência, perfil farmacocinético, interação farmacológica e efeito indesejado relacionado à miotoxicidade. (1-4)



**Figura 1:** esquema simplificado mostrando a biossíntese do colesterol. Em destaque, a enzima HMG-CoA redutase, que é inibida pela ação das estatinas.

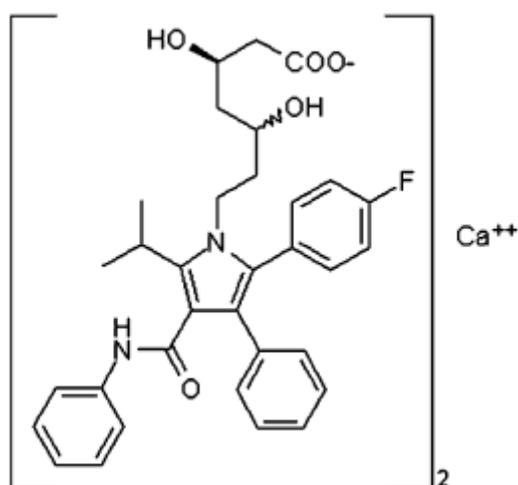
As estatinas são bem toleradas com boa margem de segurança durante a utilização prolongada. Os efeitos colaterais não são frequentes, mas um dos mais sérios está relacionado à ação hepatotóxica, com possível aumento das enzimas

aspartato e alanina transaminases. Miopatias, com evolução a rabdomiólises e insuficiência renal, são raras, mas são efeitos graves associados ao uso de estatinas. O uso concomitante de estatinas com eritromicina, ciclosporina, niacina e fibratos aumenta o risco de miopatias em 10-30% dos pacientes. (1-4)

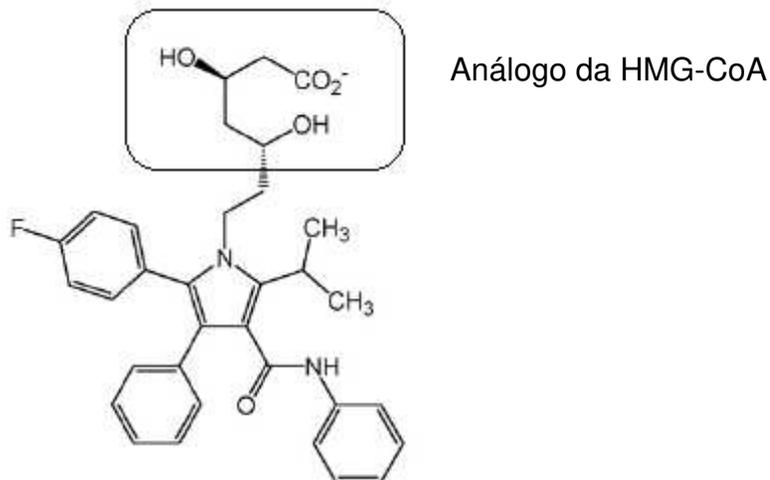
Em 2002, atorvastatina foi o fármaco mais vendido no mundo, rendendo para o fabricante Pfizer cerca de US\$ 8 bilhões (5). A figura 1 mostra a estrutura química da Atorvastatina cálcica.

Todas as estatinas possuem um grupo hidroximetilglutarílico (HMG) que se liga na mesma região enzimática do grupo HMG do substrato, bloqueando seu acesso ao sítio catalítico. (1-4). A figura 2 mostra em destaque a região análoga a HMG-CoA.

A faixa terapêutica das estatinas é de 10-80 mg/dia. A concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) foi relatada para ser 27-66 ng/ml para a atorvastatina. (6,7) Doses elevadas devem ser usadas com precaução em idosos, em pacientes com insuficiência renal ou hepática, hipotireoidismo ou diabetes.



**Figura 2:** Estrutura química da Atorvastatina cálcica



**Figura 3:** Estrutura da Atorvastatina mostrando em destaque o análogo da HMG-CoA, região que se liga ao sítio ativo da enzima HMG-CoA redutase.

### Aplicações de tratamento

A atorvastatina, um agente hipolipemiante, é um inibidor seletivo e competitivo da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, a enzima limitante responsável pela conversão da HMG-CoA a mevalonato, um precursor dos esteróis, inclusive do colesterol.

Em pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica e heterozigótica, formas não-familiares de hipercolesterolemia e dislipidemia mista, a atorvastatina reduz o colesterol total, LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) e apolipoproteína B. A atorvastatina também reduz o VLDL-colesterol (lipoproteínas de densidade muito baixa) e os triglicérides e produz aumentos variáveis no HDL-colesterol (lipoproteínas de alta densidade).

De uma forma geral, ela aumenta o número de receptores de LDL hepáticos na superfície da célula, aumentando a absorção e o catabolismo do LDL.

O fármaco é eficaz na redução de LDL em pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica, uma população que não responde normalmente à medicação de redução lipídica.

A atorvastatina e alguns de seus metabólitos são farmacologicamente ativos em humanos. O principal sítio de ação da atorvastatina é o fígado, que é o principal local de síntese de colesterol e *clearance* de LDL.

A redução no LDL-colesterol está mais relacionada à dose do medicamento do que à concentração sistêmica do fármaco. A individualização da dose do medicamento deve ser baseada na resposta terapêutica.

## **Controle de Qualidade de Processos**

Na fabricação de medicamentos, gerenciamento da qualidade é um instrumento fiscalizador e normatizador, responsável por garantir uma infraestrutura apropriada, englobando a estrutura organizacional, os procedimentos, os processos e os recursos.

As ações sistemáticas e precisas para assegurar que determinado produto satisfaça as exigências quanto à sua qualidade é chamada de "Garantia da Qualidade".

Os conceitos de Garantia da Qualidade, de Boas Práticas de Fabricação e de Controle de Qualidade são aspectos inter-relacionados do gerenciamento da qualidade e fundamentais para a fabricação de medicamentos com qualidade.

Podemos afirmar que a "Garantia da Qualidade" é a totalidade das providências tomadas com objetivo de garantir que os medicamentos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, para que possam ser utilizados para o consumo da população.

Portanto a Garantia da Qualidade incorpora as Boas Práticas de Fabricação, e outros fatores como projetos arquitetônicos, plantas industriais para que os fluxos de produção não sofram contaminação cruzadas.

Um sistema apropriado da Garantia da Qualidade aplicado à fabricação de medicamentos deve assegurar:

- Que os medicamentos sejam desenvolvidos considerando a necessidade do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação.
- As operações de produção e controle estejam especificadas por escrito e as exigências de BPF cumpridas.
- As responsabilidades gerenciais estejam claramente especificadas na descrição de cargos e funções.
- Sejam tomadas providências à fabricação, suprimento e utilização correta das matérias primas.
- Sejam realizados todos os controles nas matérias primas, produtos intermediários, produtos granel, bem como outros controles em processo, calibrações e validações.

- O produto terminado seja corretamente processado e conferido segundo procedimentos definidos.
- Sejam fornecidas instruções e tomadas as providências necessárias para garantir que os medicamentos sejam armazenados, transportados, distribuídos e manuseados, de forma que a qualidade seja mantida por todo prazo de validade.
- Haja procedimento de auto-inspeção e/ou auditoria interna de qualidade que avalie regularmente a efetividade e a aplicação do Sistema de Garantia da Qualidade.
- Que haja um sistema de treinamento e capacitação contínua dos funcionários de toda a indústria.
- Que os fornecedores de materiais e matérias-primas sejam classificados, segundo os critérios de qualidade.

### **Contaminantes orgânicos**

Para garantir a segurança e qualidade de um fármaco, a pureza da substância ativa farmacêutica torna-se um ponto essencial. Nas diversas etapas da produção de um fármaco, pode ocorrer o surgimento de impurezas, e, além disso, muitos ativos farmacêuticos são sensíveis às influências ambientais, como temperatura, umidade, pH, luz, gases, oxigênio, gás carbônico. Esses fatores podem transformar a substância farmacêutica ativa em produtos de degradação,

que são menos eficazes que o ativo e podem até causar efeitos colaterais, prejudicando a segurança do medicamento. Portanto, o ideal seria que o ativo seja o mais puro possível e que a porcentagem de impurezas e produtos de degradação seja mínima.

Além disso, os excipientes presentes na formulação podem sofrer degradação e influenciar nas reações de degradação do ativo.

A degradação oxidativa é uma das reações mais comuns que ocorre com as formulações farmacêuticas. (8) O oxigênio molecular da atmosfera reage com cristais orgânicos e sua reatividade depende da forma cristalina e morfologia da substância ativa, o que determina a permeabilidade ao oxigênio e sua solubilidade na estrutura cristalina. (9)

Para reduzir a ocorrência da oxidação em uma formulação, pode-se aumentar a concentração do ativo, adicionar agentes quelantes para remover impurezas metálicas presentes nos excipientes, usar excipientes de alta pureza e adicionar antioxidantes à formulação. (10,11)

Devido à importância de se obter um ativo farmacêutico com alto grau de pureza, há uma necessidade de caracterizar as impurezas ou produtos de degradação presentes na formulação farmacêutica. (10,11)

Vários produtos de degradação são formados durante a exposição de atorvastatina ao ambiente oxidativo, que geralmente está presente durante o processo de produção, no armazenamento da substância e da formulação farmacêutica. (10,11)

Estes compostos resultantes da degradação oxidativa da Atorvastatina cálcica podem ser tóxicos ou apresentar riscos ao paciente. Por isso, é importante

que suas concentrações sejam quantificadas e monitoradas. Através de padrões puros destes compostos, pode-se determinar a quantidade destes compostos indesejados para serem analisados por uma técnica analítica adequada.

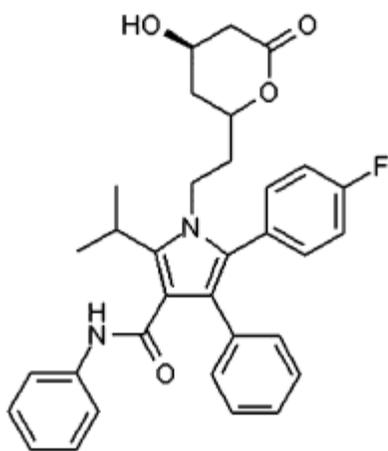
A principal impureza da Atorvastatina cálcica é a Atorvastatina Lactona. A figura 3 mostra sua estrutura química. Esta impureza está presente já no ativo puro da Atorvastatina cálcica, mas também é formada quando o ativo ou o produto acabado é exposto a condições de estresse, principalmente oxidação. Essa impureza não possui atividade farmacológica e pode estar relacionada aos efeitos colaterais do medicamento Atorvastatina cálcica.

As indústrias farmacêuticas, sob regulamentação da Anvisa, monitoram essas impurezas e produtos de degradação em seus produtos comercializados. Para acelerar o processo de degradação e mimetizar as reações que acontecem com os medicamentos durante seu prazo de validade, são realizados estudos de estabilidade. O Brasil situa-se na zona climática IVb, que caracteriza países com climas quentes e úmidos. Nesses estudos, os medicamentos são expostos a temperaturas e umidades controladas em câmaras climáticas por um determinado período. Após determinados tempos de exposição, esses medicamentos são retirados dessas câmaras e realiza-se a quantificação das impurezas e do teor do ativo, dentre outros testes.

No estudo de estabilidade de longa duração, as amostras são expostas a 30°C com 75% UR por 24 meses. São realizadas análises nos períodos inicial (sem exposição), após 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses de exposição.

No estudo de estabilidade acelerada, as amostras são expostas a 40°C com 75% UR por 6 meses. São realizadas análises nos períodos inicial (sem exposição), após 3 e 6 meses de exposição.

A elucidação desses contaminantes bem como as técnicas de quantificação são um assunto de constante discussão e atualização das indústrias de medicamentos, uma vez que, se for provado que seus medicamentos possuem altos níveis de contaminantes, seus produtos são retirados do mercado para não prejudicar a saúde de seus consumidores.



**Figura 4:** Estrutura química da Atorvastatina Lactona

### **Técnicas Analíticas**

A caracterização de medicamentos e de seus contaminantes ou de produtos de degradação exige técnicas analíticas sensíveis e seletivas para determinar compostos existentes em sua composição, bem como, para elucidação

de mecanismos de reações bioquímicas. (12) A complexidade das substâncias existentes em medicamentos pode gerar problemas à cromatografia e à espectrometria de massas (MS), devido à separação de matriz e ativo e supressão de íons, além de outros efeitos, sendo um grande desafio científico. (12) Contudo, a análise, avaliação de processos da qualidade e do controle tecnológico a partir do estudo de contaminantes e produtos de degradação visando melhorias no produto final, começa a ser considerado e elucidado através do uso de cromatografia e espectrometria de massas. (12) A ampliação do campo de pesquisa em cromatografia e espectrometria para análise de substâncias em produtos farmacêuticos, e a certificação de qualidade tecnológica nos produtos de origem nacional, são desafios, que auxiliarão na melhoria dos medicamentos brasileiros.

## **Cromatografia**

Entre os métodos de análise em controle de qualidade, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação e auxiliar a identificação e quantificação das espécies químicas, principalmente em conjunto com outras técnicas de análise. A cromatografia é um método físico de separação dos componentes de uma mistura, no qual esses componentes são distribuídos entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária. A separação é obtida através de suas migrações diferenciais durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária. É um método que, embora não identifique os compostos

separados, pode auxiliar neste processo. Sua maior vantagem consiste na conservação estrutural dos compostos separados. (13)

Entre os contaminantes e produtos de degradação das estatinas existem compostos com diferentes toxicidades, portanto, é necessária para uma determinação mais exata a separação e quantificação individual de cada composto considerando-se a atividade de cada um deles. (13) As técnicas cromatográficas se aplicam muito bem a essa finalidade. Concomitantemente, um grande número de medicamentos apresenta estatinas, contudo o controle desses compostos tem sido dificultado pela falta de laboratórios preparados para a realização das análises, mas, principalmente, pela falta de metodologias analíticas adequadas. A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método barato, rápido e muito eficiente para separação de compostos e atende muito bem as necessidades analíticas de uma avaliação inicial (*screening*). (14, 15)

A determinação de estatinas, através de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido desenvolvida em função de sua rapidez, resolução, alta sensibilidade, precisão, exatidão e pela possibilidade de determinação das diferentes contaminantes de estatinas em uma única corrida para cada classe desses compostos é sem dúvida uma boa alternativa para análise quantitativa. (16)

Por outro lado, essa técnica apresenta algumas desvantagens como: (I) o alto consumo de solventes orgânicos tanto no preparo de amostra como na fase móvel; (II) as longas corridas cromatográficas, chegando a até 60 minutos em uma análise de impurezas; (III) a necessidade de extração da amostra para não haver contaminantes na corrida cromatográfica; (IV) o baixo tempo de vida útil das

colunas cromatográficas; (V) o preço das colunas cromatográficas, que se torna um fator limitante dessa técnica pois para cada tipo de substâncias é necessário utilizar uma coluna específica e (VI) impossibilidade de determinar compostos desconhecidos presentes da corrida cromatográfica.

### **Espectrometria de massas (MS)**

A importância da MS na elucidação estrutural e testes para avaliação preliminar (*screening*) para produtos farmacêuticos e correlatos é inquestionável. (16) Indubitavelmente, os avanços significativos das técnicas de ionização (“*Electrospray*”) ESI, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) e recentemente o (“*Desorption Electrospray Ionization*”) DESI e o aumento da sensibilidade dos equipamentos contribuíram muito para a aplicação da MS. (17) As análises de biomoléculas e biomarcadores de processos encontradas em perfumes (18), ativos de limpeza (19), energéticos (20) e matrizes complexas (21) foram facilitadas, sendo a chave da difusão da técnica nos últimos anos. Na ionização por *electrospray*, as substâncias da solução analítica são protonadas ou desprotonadas, formando cátions ou ânions. Esta solução é então nebulizada através de um tubo capilar onde se aplica uma alta voltagem. Devido a ação deste potencial aplicado no capilar e dos gases de solvatação e nebulização, o solvente presente nas gotículas é evaporado restando assim a molécula protonada ou desprotonada na fase gasosa. (17) Entre as características da ionização por

*electrospray*, pode-se citar a baixa energia dos íons formados e a possibilidade da formação de íons multicarregados. (17)

### **MALDI-MSI (*Mass Spectrometry Imaging*)**

A técnica MALDI-MS *Imaging* (MALDI-MSI), uma variação do MALDI, permite a visualização espacial dos componentes de uma amostra. Sua aplicação vem crescendo, podendo ser usada em secções de tecido, células e em diferentes formas farmacêuticas.

Sua vantagem baseia-se na rápida análise e sensibilidade e especificidade muito satisfatórias. A preparação de amostra é mínima, pois a amostra deve ser fixada em uma placa específica para MALDI e deve ser aplicada matriz de forma homogênea sobre essa amostra. (22) A função da matriz é absorver a energia do *laser* e transferir para o analito para promover sua ionização. A matriz é uma molécula orgânica com grau de volatilidade elevado e eficiente dessorção que é aplicada na superfície da amostra. Pode ser utilizado o ácido sinapínico (SA) para proteínas e peptídeos, ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) e p-nitroanilina (PNA) para pequenas moléculas.

A aplicação da matriz é fundamental para obter resultados de qualidade. Uma técnica que permite a aplicação homogênea na amostra é o *airspray*. Neste caso, a matriz deve ser dissolvida em um solvente apropriado e uma fina camada de *spray* é aplicada em cima da amostra, até cobrir toda sua superfície.

As classes de compostos estudadas são validadas por reações de MS/MS, que consiste na fragmentação de um íon específico a partir de uma determinada energia de colisão. Os íons produtos gerados podem ser confirmados a partir de *softwares* como o *Mass Frontier* que simulam todos os íons que podem ser gerados a partir da fragmentação de um íon inicial,

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Shitara, Y.; Sugiyama, Y. *Pharmacol. Ther.* 112: 71, 2006
- (2) World Health Organization, World Health Report, Report of the Director-General, Geneva,WHO, 1998
- (3) Sacks, F.M. *Am J. Cardiol.* 88 (Suppl.): 14N, 2001
- (4) Bertolini, S.; Bon, G.B.; Campbell, L.M.; Farnier, M.; Lagan, J.; Mahla, G. *Atherosclerosis* 130: 191–197, 1997
- (5) Blenkinsopp, J, The statin wars: why AstraZeneca must retreat, *The Lancet* 362 (9393): 1341, 2003
- (6) Bellosa, S.; Paoletti, R.; Corsini, A. *Circulation* 109 (3): 50, 2004
- (7) Lins, R.L.; Katelijne, E.; Matthys, G.A.; Verpooten, P.C.; Peeters, M.; Dratwa, J.C.; Stolear, N.H., Lameire, N. *Dial Transplant* 18: 967, 2003
- (8) Waterman, K.C. *Stabilization of Pharmaceutical Development and Technology* 7 (1): 1-32, 2002
- (9) Byrn, S.R. *Solid-State Chemistry of Drugs*, 2<sup>a</sup> Ed, SSCI, West Lafayette Ocidental, 1999
- (10) Khedr, A., J. *AOAC Int.* 90: 1547–1553, 2007
- (11) Shah, R.P.; Kumar, V.; Singh, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 613–622, 2008
- (12) Modhave, D. T.; Handa, T.; Shah, R. P.; Singh, S. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 56 (3): 538-545, 2011
- (13) Raju, B.; Ramesh, M.; Srinivas, R.; Raju, S. S.; Venkateswarlu, Y. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 56 (3): 560-568, 2011

- (14) Starek, M.; Krzek, J.; Tarsa, M. *Jpc-J. Planar Chromat.-Modern Tlc* 24 (4): 337-343, 2011
- (15) Thomas, A. B.; Patil, S. D.; Nanda, R. K.; Kothapalli, L. P.; Bhosle, S. S.; Deshpande, A. D. *Saudi Pharmaceutical Journal* 19 (4): 221-231, 2011
- (16) Martin, J.; Buchberger, W.; Alonso, E.; Himmelsbach, M.; Aparicio, I. *Talanta* 85 (1): 607-615, 2011
- (17) Gillespie, T. A.; Winger, B. E. *Mass Spec. Rev.* 30 (3): 479-490, 2011
- (18) Haddad, R.; Catharino, R. R.; Marques, L. A.; Eberlin, M. N. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 22 (22): 3662-3666, 2008
- (19) Saraiva, S. A.; Abdeinur, P. V.; Catharino, R. R.; Nunes, G.; Eberlin, M. N. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 23 (3): 357-362, 2009
- (20) Catharino, R. R.; Haddad, R.; Godoy, H. T.; Eberlin, M. N.; Santos, L. S. *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (4): 801-807, 2011
- (21) Riccio, M. F.; Saraiva, S. A.; Marques, L. A.; Alberici, R.; Haddad, R.; Moller, J. C.; Eberlin, M. N.; Catharino, R. R. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 112 (4): 434-438, 2011
- (22) Zhoua, Y.; Lia, J.; Hea, X.; Jiaa, M.; Liub, M.; Lia, H.; Xiongca, Z.; Fand, Y.; Lia, W. *J. Pharm Biomed Anal* 83: 101-107, 2013

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Quantificação da impureza Atorvastatina Lactona diretamente nos comprimidos de Atorvastatina cálcica através da técnica de Espectrometria de Massas por Imagem (MALDI-MSI).

### **Objetivos Específicos**

- Desenvolver uma nova técnica para quantificar a impureza Atorvastattina Lactona diretamente nos comprimidos de 80mg de Atorvastatina cálcica de diferentes marcas de genéricos.
- Realizar um estudo de estabilidade com uma das marcas de genéricos para quantificar essa impureza nos comprimidos de Atorvastatina cálcica.

## **CAPÍTULO I**

# **AVALIAÇÃO *IN SITU* DE IMPUREZA DE ATORVASTATINA UTILIZANDO MALDI *MASS* *SPECTROMETRY IMAGING* (MALDI-MSI)**

# ***In situ* assessment of atorvastatin impurity using MALDI mass spectrometry imaging (MALDI-MSI)**

*Lívia Riberti Rodrigues, Diogo Noin de Oliveira, Mônica Siqueira Ferreira, Rodrigo Ramos Catharino*

---

**Abstract:** The analysis of impurities and degradation products in pharmaceutical preparations are usually performed by chromatographic techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC). This approach demands extensive analysis time, mostly due to extraction and separation phases. These steps must be carried out in samples in order to adapt them to the requirements of the analytical method of choice. In the present contribution, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) was employed to quantify an important degradation product in atorvastatin calcium 80 mg tablets: the atorvastatin lactone. Through the standard of the impurity, it was possible to perform quantitative analysis directly on the drug tablet, using a quick and novel approach, suitable for quality control processes in the pharmaceutical industry.

**Key words:** Atorvastatin, impurities, quality control, mass spectrometry imaging

---

## **1. Introduction**

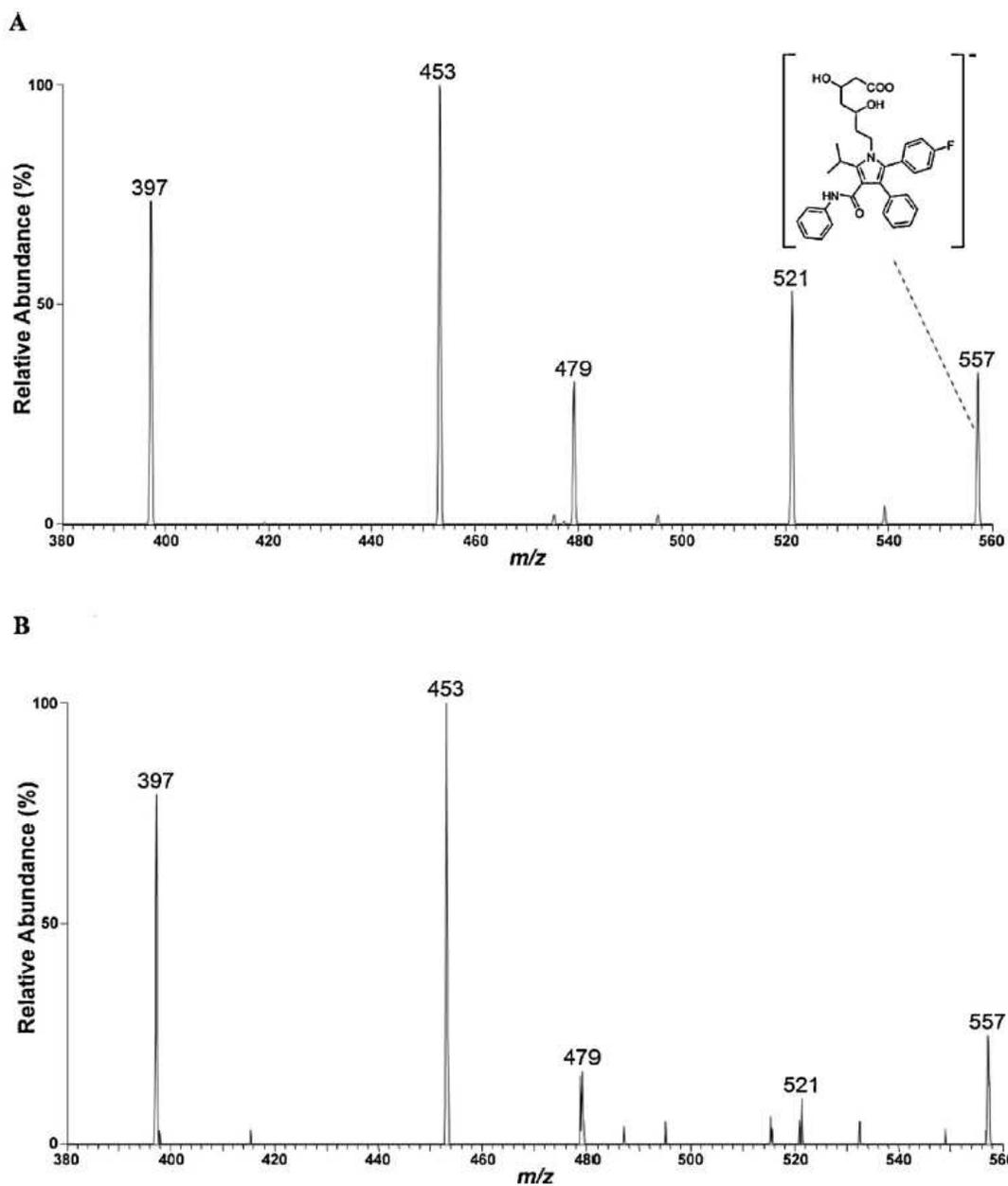
Statins are the most commonly used drugs for treatment of hyperlipidemia in primary and secondary prevention. Their purpose is to reduce the plasmatic levels of lipoproteins rich in cholesterol thus reducing the risk of coronary heart disease

(CHD). These effects are a result of the inhibitory activity of statins on the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase; as these substances are able to mimic its natural substrate, they inhibit the first steps of cholesterol biosynthesis in the liver by blocking the conversion of the HMG-CoA substrate in mevalonate. They can be divided into natural and synthetic and differ fundamentally in terms of potency, pharmacokinetic profile, pharmacological interaction and adverse effects related to myotoxicity [1–3]. Atorvastatin calcium (AtC) was the drug of choice in this work because it is one of the most widely used drugs in the treatment of hyperlipidemia. It acts by: (i) decreasing cholesterol and lipoproteins plasma levels by inhibiting HMG-CoA reductase and cholesterol synthesis in the liver, (ii) increasing the number of hepatic LDL receptors on the surface of the cell and (iii) increasing LDL absorption and catabolism [3]. When ensuring the quality and safety aspects of a pharmaceutical product, assessing the purity of the active molecule is a crucial step, since impurities may emerge in the many synthetic and productive stages that will precede the final product. Furthermore, some molecules may be susceptible to environmental influences, such as temperature, humidity, pH, light and atmosphere exposure. These factors can also accelerate the degradation process of the active ingredient into less effective molecules that can even cause undesired side effects, jeopardizing the safety of drug. This reinforces the importance of obtaining highly purified active molecules and the need to characterize the impurities or degradation products present in pharmaceutical formulations [4,5]. Among the many possible contaminants and degradation products of statins, there are compounds with different toxicities. For that reason, a more accurate means of characterization and

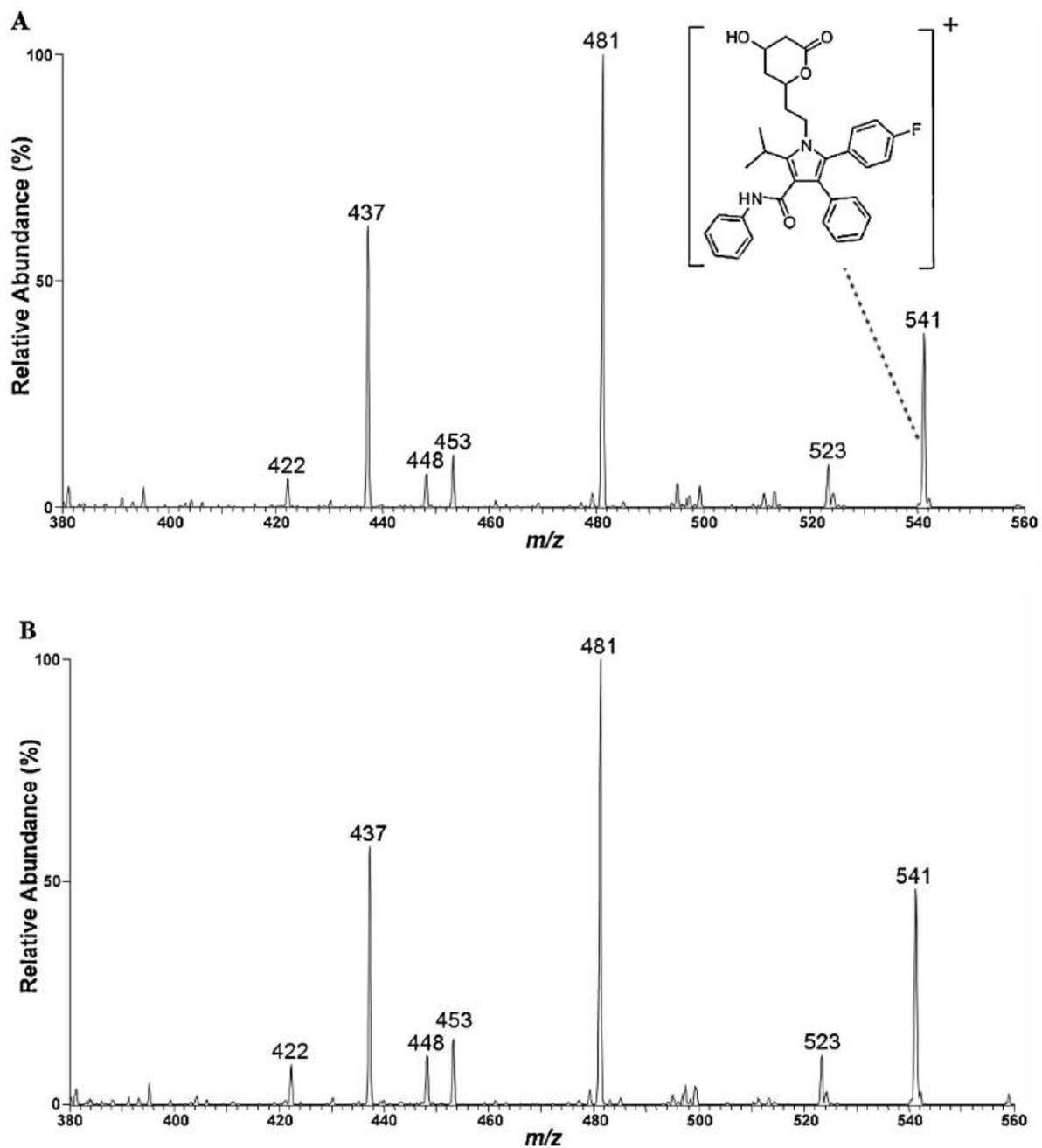
quantification of these individual molecules is needed, according to their intrinsic activity [6]. For AtC, one of the most common impurities found is a lactone-derivative, known as atorvastatin lactone (AtL) [7,8]. The characterization of medicines and their contaminants or degradation products requires sensitive and selective analytical techniques in order to determine their composition and to elucidate mechanisms of biochemical reactions. The complexity of the existing substances in drugs can sometimes be challenging for chromatography (separation of the active ingredient from the matrix) and mass spectrometry (MS) (due to ion suppression phenomena). For that reason, advanced chromatographic techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (CG) coupled with MS have been increasingly employed in these analyses [9]. A large number of medicines have statins in their compositions. The determination of this class of molecules through HPLC is still the most employed method because of its speed, resolution and high sensitivity. Moreover, the possibility of determining different contaminants in a single experiment for each class of these compounds makes HPLC a good analytical tool to perform quantitative analysis [10]. Structural elucidation is highly important in screenings for preliminary evaluation of pharmaceuticals [11]. MS emerges as the technique of choice in these assays, in particular soft ionization methods that help avoiding analyte fragmentation in the source [12,13]. For example, in matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), the sample is either mixed or coated with a small molecule (matrix), which primarily absorbs energy at the laser wavelength and transfers it to the analyte in order to promote efficient ionization. Its modern variation, MALDI-MS imaging (MSI) [13–15] is a recent technique that offers all the

benefits of conventional MALDI mass spectrometry, such as rapid analysis time, specificity and sensitivity. Additionally, by plotting the spatial dimensions of the X- and Y-axes according to the abundance/ intensity of selected ion/ions, chemical images can be generated. These characteristics make MSI a very suitable and interesting alternative for the analysis of a wide range of samples, such as tissue sections [16], drug tablets [17] and even cosmetics [18]. Other techniques were also developed with MSI, such as SIMS (secondary ion mass spectrometry) [19,20], the first imaging-based method, and DESI (desorption electrospray ionization) [21], a more recent approach of MSI. Recently, quantitative aspects of MSI have begun to be explored by several groups [22–24]. This interesting and innovative approach is presented as a viable alternative to classical methods such as LC-MS. Our group has previously introduced a semi-quantitative strategy using MSI in combination with imaging softwares that calculate pixel intensity as a function of concentration, based on gray scale images. Results are expressed as non-dimensional numbers, which can be directly associated to the concentration of the desired compound in a relative comparison with the same molecule in different samples [18]. This principle is very similar to the way that DAD-HPLC quantification is performed, where chromatographic peaks are integrated to result in a non-dimensional number that can be associated to a specific concentration with basis on an analytical curve. Based on these premises, the aim of the present work is to report, for the first time, a MSI-based methodology for the absolute quantification of the main Atorvastatin Calcium degradation product – the atorvastatin lactone – directly from a tablet using MALDI-MSI technology. This novel approach requires minimum sample preparation steps, as no extractions or chromatographic

separation are needed. Fast analytical procedures and readiness of data are also important remarks of this approach, since the time elapsed from sample preparation and results is diminished. We have also conducted two stability studies of AtC tablets to monitor the increase in AtL concentrations, demonstrating that this is a powerful method for monitoring different steps in quality control.



**Fig. 5.** Representative mass spectrum (MS/MS) of atorvastatin calcium (AtC,  $m/z$  557): (A) standard and (B) in the tablet, using PNA as matrix. Data collected in the negative ion mode.



**Fig. 6.** Representative mass spectrum (MS/MS) of Atorvastatin Lactone (AtL,  $m/z$  541): (A) standard and (B) in the tablet, using PNA as matrix. Data collected in the positive ion mode.

**Table 1.** MS<sup>3</sup> fragmentation of lactone via MALDI-MSI (positive ion mode).

	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Products ( <i>m/z</i> )
MS <sup>2</sup>	541	523, 448, 422
MS <sup>3</sup>	448	430, 406, 388

## Materials and method

### *2.1. Reagents and standards*

All solvents utilized in the experiments (methanol, acetonitrile, chloroform and water) were HPLC grade, purchased from J.T. Baker Chemical Co. (Center Valley, PA, USA). Atorvastatin calcium standard was purchased from Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) and atorvastatin lactone standard was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). For analytical curve, customized tablets with increasing concentrations of AtL were produced to mimic the same ionization environment as the commercially available tablets. The formulation and industrial conditions must remain undisclosed due to ethical and legal purposes.

### *2.2. Sample preparation*

In this study, 80 mg tablets of AtC were obtained from three different manufacturers (Brand 1, Brand 2 and Brand 3, with three different batches for each manufacturer), purchased from regular drug retailers in the Brazilian market. The tablets were not submitted to any previous treatment: they were removed from their packaging and utilized in the experiments. Cross sections of approximately 1 mm thickness were obtained using a regular tablet cutter. The exposed surface was fixed in a stainless steel plate suitable for MALDI-MSI using a polyacrylate

adhesive. The tablet was then coated with a MALDI matrix using a customized airspray technique. Three matrices were tested: sinapinic acid (SA),  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) and para-nitroaniline (PNA). The concentrations used were: 50 mg/mL SA (60% acetonitrile: 40% water), 50 mg/mL CHCA (50% acetonitrile: methanol + 0.1% TFA) and 23.5 mg/ mL PNA (100:50 chloroform:methanol).

### *2.3. MALDI mass spectrometry imaging*

A MALDI-LTQ-XL with imaging capabilities (Thermo Fisher, California, USA) was used to acquire mass spectrometric data. Typical operating conditions were 10 mJ Nitrogen laser power, 100 mm raster step size, sample size of 600 x 600 mm (standardized area), three shots per step and 25-40 eV of collision-induced dissociation (CID) for MS/MS experiments. Full scan analyses were performed in the  $m/z$  range of 100–600. AtC tablets were analyzed in the negative ion mode and AtL was analyzed in the positive ion mode. The identified compound classes were proposed using MS/ MS data. Spectra were interpreted using literature information and software calculations with Mass Frontier (v. 6.0, Thermo Scientific, California, USA).

### *2.4. Mass spectrometry imaging (MSI) quantification*

Three tablets were used and imaging data were analyzed in triplicates using ImageQuest software (Thermo Scientific, California, USA). The quantification was performed using ImageJ (National Institutes of Health, USA – Open Source) on grayscale images. This software is already commonly used as a tool for western

blot quantification [25]. The area was standardized in number of pixels for all the replicates and the ImageJ software assigned a value for the selection based on the intensity of each pixel. An analytical curve using AtL standard was constructed using linear regression in the following concentrations: 1 mM, 0.75 mM, 0.5 mM, 0.25 mM and 0.125 mM.

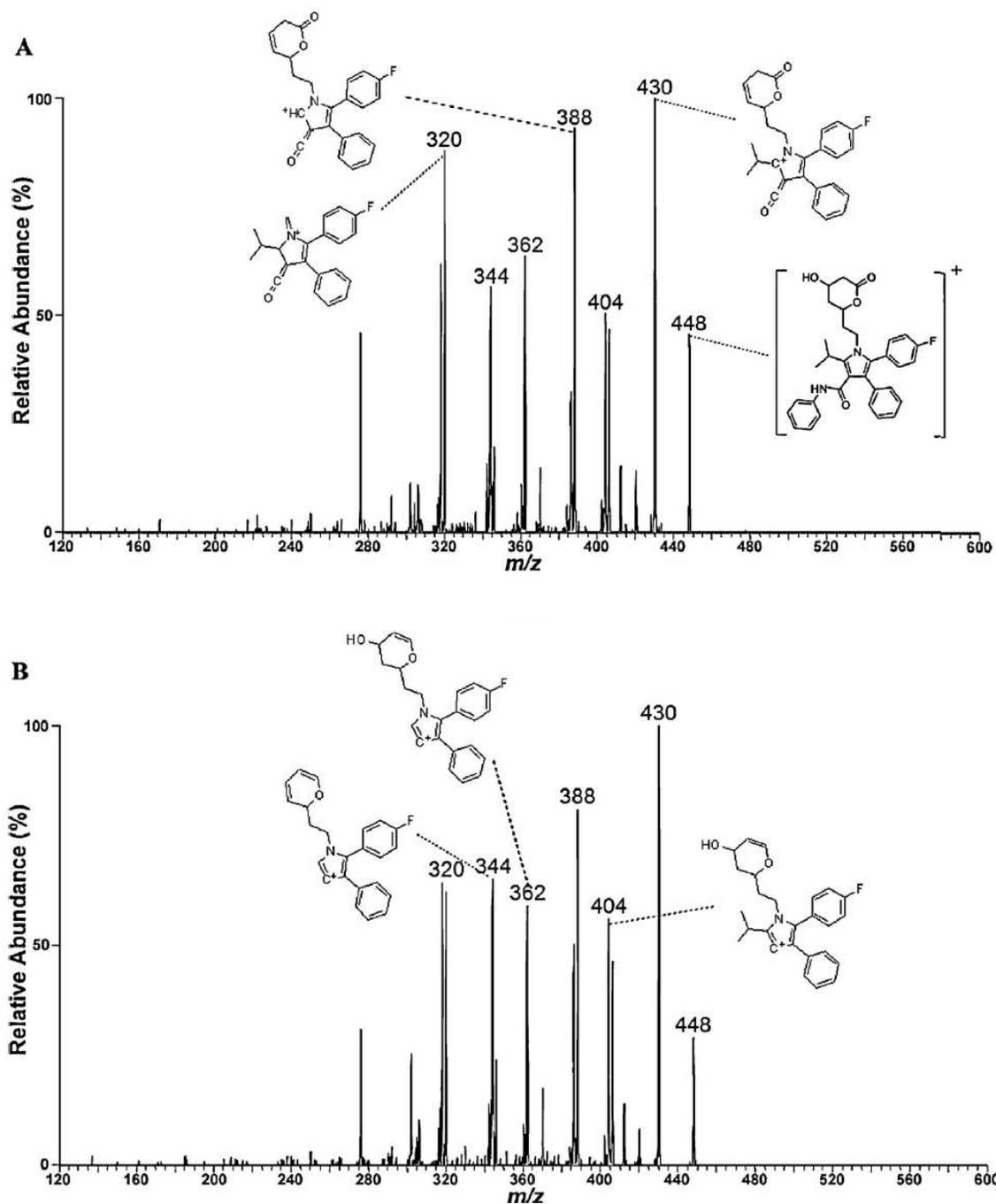
### *2.5. Comparison with official methodology*

Samples of the industrial active ingredient (AtC) were analyzed by two distinct methodologies: HPLC (Agilent 1290 Infinity UHPLC system, Agilent Technology, Waldbronn, Germany), which is the official methodology from the United States Pharmacopeia [26] and MALDI-MSI. Three samples, collected in three different days, from three different manufacturers, were run in triplicates (n=9). Comparison was performed by statistical analysis with Student's t-test, comparing the mean values of the two methodologies using GraphPad Prism v.5.0 for Windows (GraphPad Software, California, USA).

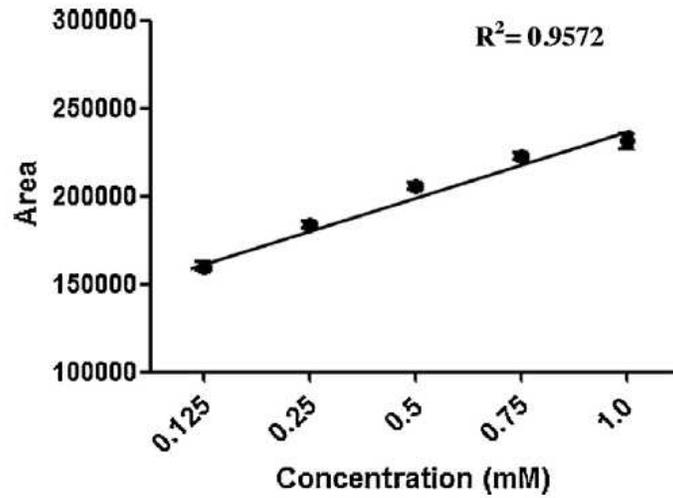
### *2.6. Stability study assays*

The stability study was conducted with samples from Brand 1, using two climate chambers set with two distinct and constant temperatures: at 30°C for long-term stability and at 40°C for accelerated stability. Both chambers had controlled relative humidity, established at 75%. The tablets were exposed in their primary packaging (blister pack), and were collected for analysis as follows: (i) no exposure for both studies (obtained right after production – control group), (ii) 6 months, 12 months and 24 months of exposure at 30°C (defined as long-term stability [27]) and (iii) 6 months of exposure at 40°C (defined as accelerated stability [27]). All conditions

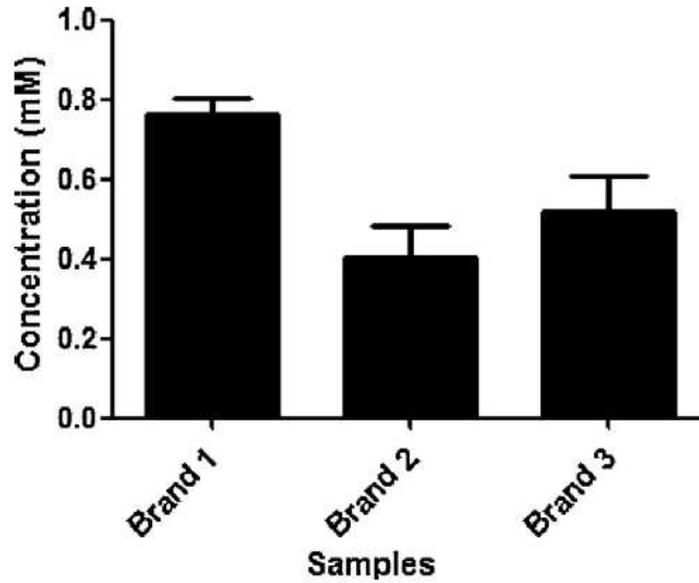
were analyzed in triplicates (i.e., 3 tablets collected in each of the different times and temperature of exposure, as stated above). Three distinct standardized areas for were chosen in each tablet. Analysis of Variance (ANOVA) test was performed using GraphPad Prism (v.5.0, Windows) software to assess significance between replicates and among different brands.



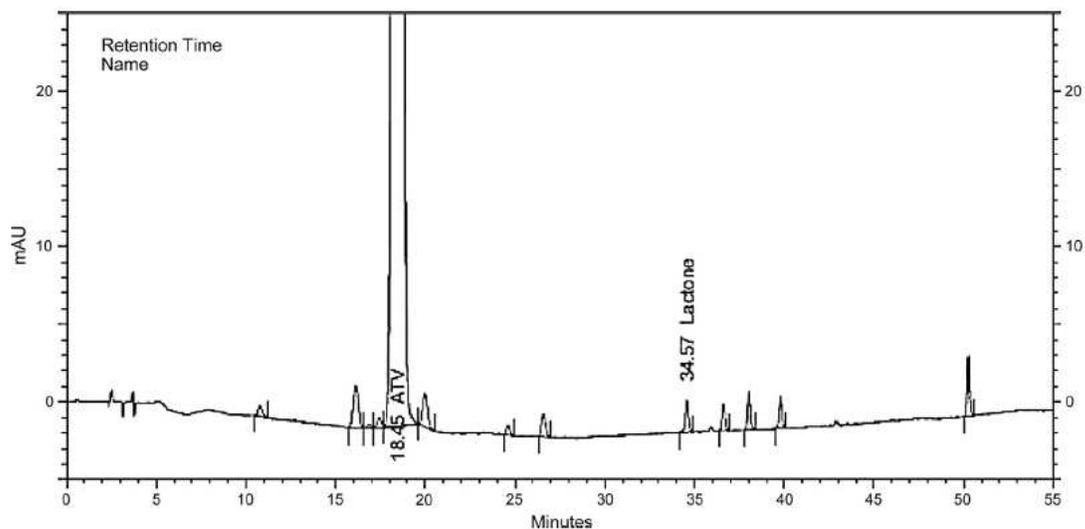
**Fig. 7.** Representative mass spectrum ( $MS^3$ ) of the selected fragment of AtL at  $m/z$  448: (A) standard and (B) in the tablet, using PNA as matrix. Structural proposals calculated with Mass Frontier software are assigned in the respective signals. Data collected in the positive ion mode.



**Fig. 8.** Analytical curve obtained by MSI for the atorvastatin lactone ( $R^2 = 0.9572$ ). Error bars for the standard error are noted in each point.



**Fig. 9.** Concentrations of AtL for the replicates of the three different brands of AtC obtained. All differences were significant ( $P < 0.05$ ).



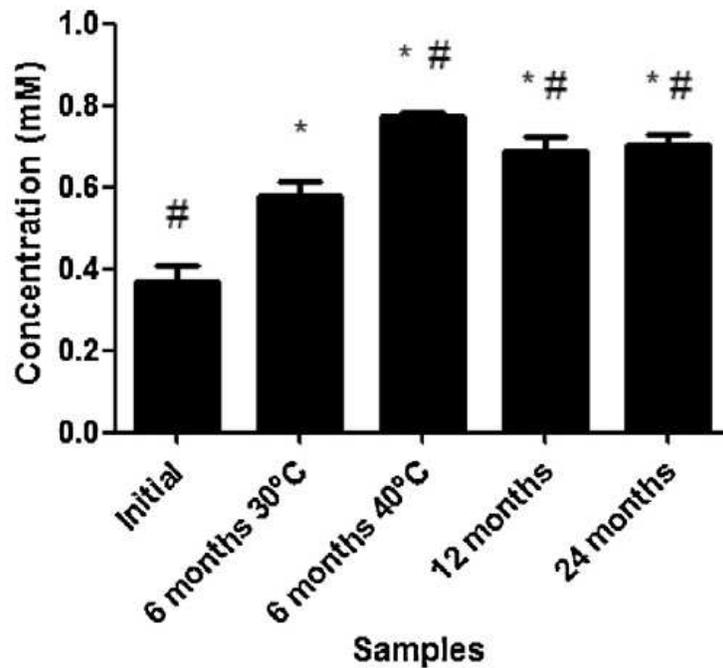
**Fig. 10.** HPLC Chromatogram of AtC (noted as ATV) and AtL (noted as lactone).

### 3. Results and discussion

Our preliminary studies have shown that para-nitroaniline (PNA) has had the best ionization response to AtC and AtL. CHCA and SA have presented no satisfactory results in terms of signal presence or intensity, and therefore were not further employed. Atorvastatin has shown better signal intensity in the negative ion mode on survey scan, whereas its lactone derivative has presented improved visualization in the positive ion mode. This is reflected by the chemical structure of the investigated molecules: AtC has an acidic chain, facilitating the formation of  $[M - H]^-$  ions, whereas AtL shows greater potential to form  $[M + H]^+$  ions due to the absence of negatively-charged species. It is possible to observe the signal at  $m/z$  557, corresponding AtC. Fig.5 shows characteristic CID products for (A) AtC standard and (B) analyzed sample tablets, confirming that the signal was indeed attributable to the active ingredient. Fig. 6 shows the fragmentation pattern of AtL

as (A) the standard and (B) in the tablet, thus corroborating the presence of impurities in the drug. Calculations performed with Mass Frontier software have shown that AtL produces the specific fragments observed. The characteristic ion at  $m/z$  448 has already been reported previously as being characteristic for AtL. [8] For that reason, it has been the product ion of choice to monitor and perform MS3 reactions for compound characterization. The pathway for AtL analysis is described in Table 1, the fragmentation pattern of the ion 448 and structural assignments for characteristic fragments are depicted in Fig. 7. After compound identification and structural elucidation, the next step was to perform the construction of an analytical curve of the lactone impurity for quantification by MSI. This approach is based on the direct relationship between intensity x concentration, which is reflected in the chemical images. The grayscale images present a variation from white to black, which is directly proportional to the absence and presence of ions, respectively. Hence, the darker the image, the more concentrated the sample is. All of the obtained MS3 images of AtL in the tablets had standardized areas, equal to those obtained with the standard. For that reason, it was possible to compare their profile with the ones obtained from the analytical curve, depicted in Fig. 8 ( $R^2 = 0.9572$ ). ImageJ software attributes a dimensionless value to an established area, based on the grayscale intensity of the pixels that form it. When comparing the results from the analytical curve with the ones obtained in the real samples, it was possible to infer the concentrations observed in all replicates according to each brand, as stated in Fig. 9. By converting the results in percentage of content (w/w), values as high as 0.045% of AtL were found in AtC tablets. These results are compliant with the United States Pharmacopeia (USP) [26] and are considered acceptable by

regulatory agencies worldwide. These data are supported by the comparison between our proposed methodology and an official HPLC methodology described by USP. Our results were compared as AtL percentage in the active ingredient (AtC) standard, obtaining a P-value = 0.1697, resulting in no significance in variability between the two methodologies. A sample HPLC chromatogram is depicted in Fig. 10. Stability studies are a series of tests conducted by pharmaceutical industries in order to mimic the degradation conditions that a tablet may suffer. In these assays, both the physical and chemical characteristics of the product are monitored during the period of exposure to certain conditions, which are regulated by the international conference for harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use [27]. In our study, AtL was also the impurity of choice for quantification to verify if their levels remained within the specification limits throughout the stability study. Fig. 11 plots the values for both the long-term and the accelerated stability studies. It is possible to observe that the concentration of AtL increases as a function of time and temperature, presenting significantly different results depending on the type of stability study to which it has been subjected. Such results are expected, since AtL is a natural degradation product of AtC and is therefore influenced by these factors. Interestingly, none of the results presented any lactone levels higher than those permitted by regulatory agencies, proving that safety aspects are being monitored effectively.



**Fig. 11.** Concentrations of AtL in Brand 1 tablets, monitored by stability studies: long-term stability (6, 12 and 24 months at 30°C) and accelerated stability (6 months at 40°C). \* Represents  $P < 0.05$  when compared to the initial and # represents  $P < 0.05$  when compared to the condition at 30°C for 6 months (long-term).

#### 4. Conclusions

This report has presented a novel approach for fast and high-throughput analysis of atorvastatin calcium 80 mg tablets using an interesting method of impurity quantification by mass spectrometry imaging. The proposed quantification of an impurity in a tablet through imaging data has proven to be satisfactory to the extent of this work. This technique has highly-desirable characteristics, since it is faster, simpler to implement and presents the same specificity as the standard techniques commonly used for this purpose. Sample preparation was minimized, as it was not

necessary to perform any type of extraction or separation. In this way, this methodology shows actual potential for future uses on improvements on drug quality control in pharmaceutical industries, ensuring that the degradation products and impurities will be monitored even more effectively.

### **Acknowledgements**

INNOVARE Biomarkers Lab would like to acknowledge CAPES, FAPESP and INCT for the financial support that allowed this work to be developed.

### **References**

- [1] Y. Shitara, Y. Sugiyama, *Pharmacology and Therapeutics* 112 (2006) 71.
- [2] F.M. Sacks, *American Journal of Cardiology* 88 (2001) 14N.
- [3] S. Bertolini, G.B. Bon, L.M. Campbell, M. Farnier, J. Langan, G. Mahla, P. Pauciullo, C. Sirtori, F. Egros, R. Fayyad, J.W. Nawrocki, *Atherosclerosis* 130 (1997) 191.
- [4] A. Khedr, *Journal of AOAC International* 90 (2007) 1547.
- [5] R.P. Shah, V. Kumar, S. Singh, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 22 (2008) 613.
- [6] B. Raju, M. Ramesh, R. Srinivas, S.S. Raju, Y. Venkateswarlu, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56 (2011) 560.
- [7] J. Stach, J. Havlíček, L. Placek, S. Rádl, *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* 73 (2008) 229.

- [8] M. Jemal, Z. Ouyang, B.C. Chen, D. Teitz, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 13 (1999) 1003.
- [9] D.T. Modhave, T. Handa, R.P. Shah, S. Singh, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56 (2011) 538.
- [10] J. Martin, W. Buchberger, E. Alonso, M. Himmelsbach, I. Aparicio, *Talanta* 85 (2011) 607.
- [11] T.A. Gillespie, B.E. Winger, *Mass Spectrometry Reviews* 30 (2011) 479. [12] V. Cunsolo, A. Costa, R. Saletti, V. Muccilli, S. Foti, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 21 (2007) 1438.
- [13] M. Karas, F. Hillenkamp, *Analytical Chemistry* 60 (1988) 2299.
- [14] R.M. Caprioli, T.B. Farmer, J. Gile, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 4751. [15] M.S. Ferreira, D.N. de Oliveira, R.N. de Oliveira, S.M. Allegretti, A.E. Vercesi, R.R. Catharino, *Journal of Mass Spectrometry* 49 (2014) 86.
- [16] E.G. Solon, *Expert Opinion on Drug Discovery* 2 (2007) 503.
- [17] C.J. Earnshaw, V.A. Carolan, D.S. Richards, M.R. Clench, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 24 (2010) 1665.
- [18] D. de Oliveira, S. de Bona Sartor, M. Ferreira, R. Catharino, *Materials* 6 (2013) 1000.
- [19] T. Hoshi, M. Kudo, *Applied Surface Science* 203 (2003) 818.
- [20] R. Strick, P.L. Strissel, K. Gavrilov, R. Levi-Setti, *The Journal of Cell Biology* 155 (2001) 899.
- [21] S. Gunduz, S. Akman, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 65 (2013) 34.

- [22] S.L. Koeniger, N. Talaty, Y. Luo, D. Ready, M. Voorbach, T. Seifert, S. Cepa, J.A. Fagerland, J. Bouska, W. Buck, R.W. Johnson, S. Spanton, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 25 (2011) 503.
- [23] R. Vismeh, D.J. Waldon, Y. Teffera, Z. Zhao, *Analytical Chemistry* 84 (2012) 5439.
- [24] M.L. Steinhauser, A.P. Bailey, S.E. Senyo, C. Guillermier, T.S. Perlstein, A.P. Gould, R.T. Lee, C.P. Lechene, *Nature* 481 (2012) 516.
- [25] M. Gassmann, B. Grenacher, B. Rohde, J. Vogel, *Electrophoresis* 30 (2009) 1845.
- [26] U.S. Pharmacopeia, *Atorvastatin Calcium – Authorized USP Pending Monograph Version 1*, (2012).
- [27] ICH, *International Conference Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q3B Impurities in New Drug Products*, London (CPMP/ICH/2738/99): European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2003).

## **CONCLUSÕES GERAIS**

A proposta de quantificação da impureza Atorvastatina Lactona no medicamento Atorvastatina cálcica através da técnica *Mass Spectrometry Imaging* se mostrou satisfatória.

Utilizando a nova técnica desenvolvida foi possível quantificar a impureza Atorvastatina Lactona tanto nas amostras de mercado como nas amostras do estudo de estabilidade diretamente dos comprimidos de Atorvastatina cálcica.

A metodologia proposta apresenta muitas vantagens em relação às técnicas comumente utilizadas, como mínimo preparo de amostra, tempo de análise reduzido, pouco uso de solvente orgânico e análise realizada diretamente no comprimido.

A quantificação eficaz durante o estudo de estabilidade permite que essa técnica seja utilizada no controle de qualidade de indústrias farmacêuticas, para monitorar o surgimento de produtos indesejados não só no produto acabado, mas também nas diversas etapas de produção do medicamento, permitindo assim o monitoramento de seu processo como um todo e garantindo a qualidade e eficácia de seus medicamentos.