

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO PRELIMINAR DE
ESTABILIDADE PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE
CLOPIDOGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS.**

Dissertação de Mestrado

Juliana Sippel

Porto Alegre, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO PRELIMINAR DE
ESTABILIDADE PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE
CLOPIDOGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS.**

Dissertação apresentada por Juliana
Sippel para a obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2007.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado – Produção e Controle de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 10.08.2007, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Cássia Virgínia Garcia

Universidade de Passo Fundo

Profa. Dr. Nádia Maria Volpato

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo A. Fröhlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S618d Sippel, Juliana

Validação de métodos analíticos e estudo preliminar de estabilidade para o controle de qualidade de clopidogrel em comprimidos revestidos – Porto Alegre : UFRGS, 2007. – 125, xxiv p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Clopidogrel. 2. Validação: Método de análise de fármacos. 3. Estabilidade. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Espectrofotometria Ultravioleta. 6. Eletroforese capilar. 7. Controle de qualidade de medicamentos. I. Steppe, Martin. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Martin Steppe pela orientação, pela dedicação e amizade;

Aos professores do Departamento de Controle de Qualidade, Elfrides, Tércio, Nádia e Célia pelo exemplo profissional e auxílio;

Aos amigos do LEPCQ Ana Rita, Cássia, Lauren, Magda, Vanessa, Cristiane, Patrícia, Clésio, Marcelo, Andréas, Alini, Heloísa, Mariana, e especialmente a Júlia pela amizade, companheirismo e experiências compartilhadas;

A Letícia Sfair pelo auxílio nos experimentos, dedicação e amizade;

Aos colegas do LCQFar – Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, Leila, Lorena, Ana Carolina e Daniela pelo auxílio em diversos momentos;

Ao Prof. Dr. André Jablonski do Laboratório de Geoquímica Ambiental por permitir a utilização do Equipamento de Eletroforese Capilar para a realização dos experimentos;

Aos meus amigos Marceli e Daniel Ludwig pelo carinho, amizade e incentivo;

Aos meus familiares que sempre torceram por mim e me apoiaram em especial, a Vó Laura, João Roberto e Bruna;

A Diego, pelo carinho, amor e compreensão durante esta importante etapa de minha vida;

E, principalmente, a Claudio e Marly, meus pais, que sempre incentivaram meus estudos, pelo amor e dedicação ao longo dos anos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XVII
ABREVIATURAS.....	XIX
RESUMO.....	XXI
ABSTRACT.....	XXIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1 ASPECTOS GERAIS	11
3.1.1 MECANISMO DE FORMAÇÃO DE TROMBOS.....	11
3.1.2 DOENÇAS RELACIONADAS À TROMBOGÊNESE	12
3.1.3 TIENOPIRIDINAS	15
3.2 CLOPIDOGREL	16
3.2.1 CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS	16
3.2.2 MECANISMO DE AÇÃO.....	17
3.2.3 DESCRIÇÃO GERAL.....	18
3.2.4 DOSAGEM E ADMINISTRAÇÃO.....	20
3.2.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS.....	27
4.1.1 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	27
4.1.2 PRODUTO FARMACÊUTICO	27
4.1.3 MISTURA PLACEBO	27
4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA SQR	28
4.2.1 DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO	28
4.2.1.1 Material	28
4.2.1.2 Método Koffler	28
4.2.1.3 Método de Calorimetria Exploratória Diferencial	29
4.2.2 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	29

4.2.2.1	Material	29
4.2.2.2	Método	29
4.2.3	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	29
4.2.3.1	Material e método	30
4.3	ANÁLISE QUALITATIVA DO CLOPIDOGREL EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS	30
4.3.1	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	30
4.3.1.1	Material	30
4.3.1.2	Método	30
4.3.2	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA	31
4.3.2.1	Material	31
4.3.2.2	Método	31
4.3.3	CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	32
4.3.3.1	Material	32
4.3.3.2	Método	32
4.3.4	ELETROFORESE CAPILAR	33
4.3.4.1	Material	33
4.3.4.2	Método	34
4.4	ANÁLISE QUANTITATIVA	36
4.4.1	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA (UV)	36
4.4.1.1	Material	36
4.4.1.2	Método	36
4.4.1.2.1	Especificidade	36
4.4.1.2.2	Curva padrão	36
4.4.1.2.2.1	Cálculos para a curva padrão	37
4.4.1.2.3	Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos.....	37
4.4.1.2.3.1	Cálculos para a determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos.....	38
4.4.1.2.4	Teste de recuperação	38
4.4.1.2.4.1	Cálculo para o teste de recuperação	39
4.4.2	CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	40
4.4.2.1	Material	40
4.4.2.2	Método	40
4.4.2.2.1	Especificidade	40
4.4.2.2.2	Curva padrão	41
4.4.2.2.2.1	Cálculos para a curva padrão	41
4.4.2.2.3	Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos.....	41
4.4.2.2.3.1	Cálculos para a determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos.....	42

4.4.2.2.4	Teste de recuperação.....	43
4.4.2.2.4.1	Cálculo para o teste de recuperação.....	43
4.4.2.2.5	Avaliação da robustez.....	44
4.4.2.2.6	Limites de Detecção e de Quantificação.....	44
4.4.3	ELETROFORESE CAPILAR.....	45
4.4.3.1	Material.....	45
4.4.3.2	Método.....	45
4.4.3.2.1	Especificidade.....	45
4.4.3.2.2	Curva padrão.....	45
4.4.3.2.2.1	Cálculos para a curva padrão.....	46
4.4.3.2.3	Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos.....	46
4.4.3.2.3.1	Cálculos para a determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos.....	47
4.4.3.2.4	Exatidão.....	48
4.4.3.2.5	Limite de Detecção.....	48
4.4.3.2.6	Limite de Quantificação.....	49
4.5	ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE.....	49
4.5.1	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO.....	49
4.5.1.1	Materiais.....	49
4.5.1.2	Método.....	50
4.5.1.3	Cálculos para a determinação do clopidogrel nas amostras degradadas.....	50
4.5.1.4	Determinação da ordem de reação.....	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	ANÁLISE QUALITATIVA DA SQR.....	55
5.1.1	DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO.....	55
5.1.1.1	Resultados.....	55
5.1.1.2	Discussão.....	56
5.1.2	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	57
5.1.2.1	Resultado.....	57
5.1.2.2	Discussão.....	58
5.1.3	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	59
5.1.3.1	Resultados e discussão.....	59
5.2	ANÁLISE QUALITATIVA DO CLOPIDOGREL EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS.....	64
5.2.1	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	64
5.2.1.1	Resultados.....	64
5.2.1.2	Discussão.....	65

5.2.2	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA.....	67
5.2.2.1	Resultados	67
5.2.2.2	Discussão	67
5.2.3	CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	68
5.2.3.1	Resultados	68
5.2.3.2	Discussão	70
5.2.4	ELETROFORESE CAPILAR	70
5.2.4.1.1	Resultados	70
5.2.4.1.2	Discussão	71
5.3	ANÁLISE QUANTITATIVA	72
5.3.1	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA.....	72
5.3.1.1	Resultados	72
5.3.1.1.1	Especificidade	72
5.3.1.1.2	Curva padrão	73
5.3.1.1.3	Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos.....	75
5.3.1.1.4	Teste de Recuperação.....	75
5.3.1.2	Discussão	76
5.3.2	CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	79
5.3.2.1	Resultados	79
5.3.2.1.1	Especificidade	79
5.3.2.1.2	Curva padrão	82
5.3.2.1.3	Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos.....	84
5.3.2.1.4	Teste de Recuperação.....	85
5.3.2.1.5	Robustez.....	86
5.3.2.1.6	Limites de Detecção e de Quantificação.....	87
5.3.2.2	Discussão	88
5.3.3	ELETROFORESE CAPILAR	91
5.3.3.1	Resultados	91
5.3.3.1.1	Especificidade	92
5.3.3.1.2	Curva Padrão.....	93
5.3.3.1.3	Precisão	96
5.3.3.1.4	Exatidão	96
5.3.3.2	Discussão	97
5.3.4	ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS	103
5.3.5	ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE	104
5.3.5.1	Determinação da cinética de degradação	104

5.3.5.1.1	Resultados.....	104
5.3.5.1.2	Discussão	106
6.	CONCLUSÕES.....	109
7.	REFERÊNCIAS.....	113
8.	ANEXO	123
8.1	ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do clopidogrel	4
Figura 2 – Estrutura química da ticlopidina.....	15
Figura 3 – Metabolização do clopidogrel em humanos.....	17
Figura 4 – Representação esquemática das etapas de agregação plaquetária e das intervenções farmacológicas na prevenção da formação de trombos	18
Figura 5 – Calorimetria exploratória diferencial da SQR do clopidogrel.	55
Figura 6 - Espectro de Infravermelho obtido para a SQR de clopidogrel.	58
Figura 7 – Estrutura química do bissulfato de clopidogrel.....	59
Figura 8 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono da SQR de clopidogrel.....	60
Figura 9 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio da SQR de clopidogrel.....	63
Figura 10 – CCD para identificação do clopidogrel em comprimidos revestidos.....	65
Figura 11 – Espectros das soluções de clopidogrel em HCl 0,01 M (18µg/ml) do produto farmacêutico (A) e SQR (B) obtidos por espectrofotometria na região UV. .	67
Figura 12 - Cromatograma referente à solução de clopidogrel SQR (45,0 µg/ml).....	68
Figura 13 - Cromatograma referente à solução de clopidogrel (45,0 µg/ml) do produto farmacêutico.	69
Figura 14 – Sobreposição dos espectros na região UV, obtidos com detector de arranjo de diodos para clopidogrel SQR (A) e produto farmacêutico (B).....	69
Figura 15 – Eletroferogramas obtidos pelo método de EC para soluções de SQR (A) e produto farmacêutico (B) de clopidogrel (2), contendo o padrão interno tiabendazol (1).....	70
Figura 16 – Espectro na região do UV obtido para o clopidogrel SQR com detector de arranjo de diodos.....	71

Figura 17 – Espectro na região do UV obtido com detector de arranjo de diodos para o clopidogrel da amostra de comprimidos.	71
Figura 18 – Sobreposição dos espectros de absorção na região UV da solução de clopidogrel no produto farmacêutico (18,0 µg/ml) e da solução placebo.	72
Figura 19 – Representação gráfica da curva padrão de clopidogrel obtida pelo método de espectrofotometria UV.	74
Figura 20 – Espectros na Região do UV obtidos para solução de clopidogrel 18,0 µg/ml (A) e solução placebo (B) nos solventes 1- metanol; 2- metanol e água (80:20); 3- água pH 3,0; 4- acetonitrila.	77
Figura 21 – Sobreposição dos cromatogramas das soluções de clopidogrel produto farmacêutico (A) e de placebo (B) na concentração de 45,0 µg/ml.	80
Figura 22 – Sobreposição dos cromatogramas da solução de clopidogrel no produto farmacêutico 45 µg/ml (A) e da solução de clopidogrel degradada com NaOH 1,0 M, durante duas horas (B).	80
Figura 23 - Sobreposição dos cromatogramas da solução de clopidogrel no produto farmacêutico 45 µg/ml (A) e da solução de clopidogrel submetida a condições ácidas - HCl 1,0 M, durante duas horas (B).	81
Figura 24 – Sobreposição dos cromatogramas da solução de clopidogrel no produto farmacêutico 45 µg/ml (A) e solução de clopidogrel degradada sob luz UV 254 nm durante duas horas (B).	81
Figura 25 - Sobreposição dos cromatogramas da solução de clopidogrel submetida à degradação com H ₂ O ₂ 30% por duas horas (A) e da solução de clopidogrel no produto farmacêutico 45 µg/ml (B).	82
Figura 26 – Representação gráfica da curva padrão de clopidogrel obtida pelo método de CLAE.	84

Figura 27 – Cromatograma da solução 0,15 µg/ml, obtido na determinação do limite de detecção, pelo método de CLAE.87

Figura 28 – Cromatograma da solução 0,5 µg/ml, obtido na determinação do limite de quantificação pelo método de CLAE.....87

Figura 29– Eletroferogramas obtidos na análise da solução placebo de clopidogrel (A) e solução amostra de clopidogrel contendo padrão interno tiabendazol (B).92

Figura 30 – Eletroferogramas obtidos na análise da especificidade para solução amostra de clopidogrel degradada sob luz UV 254nm (A) e solução amostra de clopidogrel não degradada contendo padrão interno tiabendazol (B).93

Figura 31 – Representação esquemática da curva padrão de clopidogrel obtida pelo método de EC.95

Figura 32 – Representação esquemática do sistema de EC. (1) reservatório do eletrólito de lavagem para o capilar; (2 e 4) reservatório do eletrólito de corrida eletroforética; (3) reservatório da amostra; (5) reservatório para o resíduo.98

Figura 33 – Gráfico de concentração *versus* tempo na determinação da ordem de reação do clopidogrel em HCl 0,01 M. 105

Figura 34 – Gráfico de log de concentração *versus* tempo na determinação da ordem de reação do clopidogrel em HCl 0,01 M. 105

Figura 35 – Gráfico da recíproca de concentração *versus* tempo na determinação da ordem de reação do clopidogrel em HCl 0,01 M. 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Artigos publicados para a determinação do metabólito ácido carboxílico do clopidogrel por CLAE em fluidos biológicos.	21
Tabela 2 – Quantidades de excipientes adicionados à mistura placebo referente a 1 comprimido revestido.	28
Tabela 3 – Condições eletroforéticas empregadas para a análise do clopidogrel em comprimidos revestidos.	35
Tabela 4 – Preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação pelo método de espectrofotometria UV a 220 nm.....	39
Tabela 5 – Preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação por CLAE na determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos.....	43
Tabela 6 – Frequências do espectro IV obtidas na análise de SQR de clopidogrel.....	57
Tabela 7 – Deslocamentos químicos observados para a molécula de clopidogrel por Espectroscopia de RMN ¹³ C.....	61
Tabela 8 – Deslocamentos químicos observados para a molécula de clopidogrel por Espectroscopia de RMN ¹ H.....	62
Tabela 9: Valores de Rf obtidos na análise de clopidogrel por CCD.....	65
Tabela 10 – Valores de absorvância obtidos para a curva padrão de clopidogrel por espectrofotometria UV no comprimento de onda de 220 nm.	73
Tabela 11 – Análise de Variância das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão de clopidogrel por espectrofotometria UV.	74
Tabela 12 – Valores experimentais obtidos na determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos por espectrofotometria UV para a avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária ($\lambda=220$ nm).	75
Tabela 13 - Percentuais de recuperação determinados na avaliação da exatidão do método de espectrofotometria UV ($\lambda=220$ nm)	76

Tabela 14 – Valores de área obtidos para a curva padrão de clopidogrel por CLAE. .83

Tabela 15 – Análise de Variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de clopidogrel por CLAE.84

Tabela 16 – Determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos em três dias diferentes por CLAE, para a avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.85

Tabela 17 – Resultados experimentais do teste de recuperação na avaliação da exatidão do método de CLAE para o clopidogrel em comprimidos revestidos.85

Tabela 18 – Resultados experimentais para a avaliação da robustez do método de CLAE na determinação quantitativa do clopidogrel.86

Tabela 19 – Valores da razão das áreas (Clopidogrel/ Tiabendazol) obtidas na determinação da curva padrão de clopidogrel pelo método de EC.94

Tabela 20 – Análise de Variância para a Curva Padrão de Clopidogrel pelo método de EC95

Tabela 21 – Avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária do método de EC para determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos.96

Tabela 22 – Resultados da ANOVA na comparação dos métodos de CLAE e EC.....97

Tabela 23 – Análise de variância para comparação dos três métodos validados..... 103

Tabela 24 – Avaliação das diferenças das médias entre os métodos. 103

Tabela 25 – Valores de concentração residual de clopidogrel obtidos por CLAE, após a exposição das soluções à luz ultravioleta. 104

ABREVIATURAS

AAS – ácido acetilsalicílico

CAPRIE – clopidogrel *versus* Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

CV – Cérebro-vascular

CYP – Citocromo P₄₅₀

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

EC – Eletroforese Capilar

FEO – Fluxo Eletrosmótico

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SCA – Síndromes Coronarianas Agudas

SQR – Substância Química de Referência

UV – Ultravioleta

RESUMO

“Validação de métodos analíticos e estudo preliminar de estabilidade para o controle de qualidade de clopidogrel em comprimidos revestidos.”

Palavras-chave: clopidogrel, validação, estabilidade, CLAE, espectrofotometria ultravioleta, eletroforese capilar.

O clopidogrel é um fármaco antiplaquetário, pertencente à classe das tienopiridinas. A literatura relata poucos trabalhos para a determinação deste fármaco em preparações farmacêuticas. Este trabalho teve como objetivos desenvolver métodos para a análise quali e quantitativa do bissulfato de clopidogrel, bem como, avaliar de forma preliminar a estabilidade da substância. A caracterização da substância química de referência (SQR) foi realizada por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Espectrofotometria Infravermelho, e Espectroscopia de RMN ^{13}C e ^1H . Os métodos desenvolvidos para a identificação do clopidogrel nos comprimidos revestidos foram a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Espectrofotometria Ultravioleta (UV), CLAE e Eletroforese Capilar (EC). Para a quantificação do clopidogrel nos comprimidos revestidos foram validados os métodos de UV, CLAE e EC de acordo com os parâmetros preconizados pelas Guias Oficiais. Todos os métodos atenderam aos requisitos de validação avaliados, sendo, portanto, adequados para a determinação do clopidogrel em comprimidos revestidos. Os estudos de degradação forçada demonstraram que a substância sofre degradação em condições alcalinas e quando exposta à luz ultravioleta a 254 nm. Na determinação da cinética de degradação foi possível verificar que o clopidogrel, em solução ácida, quando exposto à luz ultravioleta, apresenta $T_{90\%}$ de 12,25 min, e possui cinética de reação de segunda ordem.

ABSTRACT

“Validation of analytical methods and a preliminary stability study for the quality control of clopidogrel in coated tablets.”

Keywords: clopidogrel, validation, stability, HPLC, UV spectrophotometry, capillary electrophoresis

Clopidogrel is an antiplatelet drug that belongs to the class of thienopyridines. There are few reports in the literature about the determination of this drug in formulations. The aim of this work was to develop methods for qualitative and quantitative analysis of clopidogrel hydrogensulphate, and a preliminary evaluation of the stability of the substance. The characterization of the reference standard was made by Infrared Spectroscopy, Differential Scanning Calorimetry and ^{13}C and ^1H Nuclear Magnetic Resonance. The developed methods for the identification of clopidogrel in coated tablets were Thin-layer Chromatography, Ultraviolet Spectrophotometry, HPLC and Capillary Electrophoresis. For the quantification of clopidogrel UV Spectrophotometry, HPLC and Capillary Electrophoresis methods were validated according to the parameters of the Official Guidelines. All the methods attended to the validation specifications, and so they are adequate to the determination of clopidogrel in coated tablets. Accelerated degradation studies demonstrated that the drug suffers degradation in alkaline conditions and when exposed at UV light at 254 nm. In the study of degradation kinetics it was possible to verify that clopidogrel, in acid solution, exposed to UV radiation, presents $T_{90\%}$ of 12.25 minutes and has a second order degradation kinetics.

1. INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de produtos farmacêuticos deve estar inserido em todas as etapas produtivas desde as análises de matérias-primas e insumos até o produto acabado visando garantir a obtenção de medicamentos que satisfaçam às normas de identidade, pureza e atividade. Testar produtos farmacêuticos envolve análises químicas, físicas e microbiológicas.

Dessa forma, é imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de medicamentos. As análises a serem efetuadas devem partir de um bom planejamento, contemplando aspectos como identificação e quantificação da substância ativa, identificação e determinação dos níveis de impurezas, produtos de degradação e, finalmente, a verificação da estabilidade da substância ativa na formulação, garantindo a análise completa do produto (WATSON, 2003).

Para assegurar que os métodos serão adequados para a aplicação pretendida faz-se necessária sua validação. As guias oficiais estabelecem as definições e especificações dos parâmetros analíticos que devem ser avaliados durante a validação de acordo com o tipo de amostra a ser analisada (ICH, 2005; BRASIL, 2003; USP 29, 2006).

Considerando-se o aumento expressivo do número de fármacos em comercialização nos últimos anos, torna-se necessário o estudo dos mesmos visando garantir a qualidade, eficácia e segurança destes medicamentos ao usuário. Entre os fármacos lançados recentemente encontra-se o clopidogrel, uma substância antiplaquetária, da classe das tienopiridinas.

Este trabalho contempla o desenvolvimento e validação de métodos para a análise do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos, avaliando também, preliminarmente, a estabilidade da substância e sua cinética de degradação em solução.

O clopidogrel (Figura 1) foi aprovado pelo FDA em 1998, para prevenção de eventos trombóticos em pacientes com infarto do miocárdio recente, doenças arteriais periféricas e acidente vascular cerebral. Trata-se de um fármaco com eficácia igual ou superior ao ácido acetilsalicílico (AAS) na terapia antiplaquetária e também com

menor incidência de efeitos adversos relacionados a seu uso, quando comparado com seu análogo, a ticlopidina (JACOBSON, 2004).

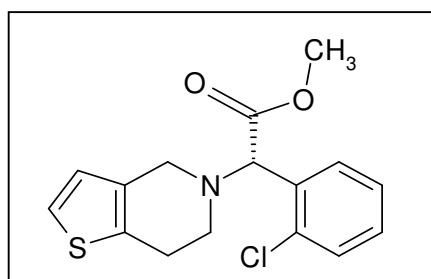


Figura 1 – Estrutura química do clopidogrel (BUDAVARI, 2001).

No Brasil o bissulfato de clopidogrel é comercializado pelos Laboratórios Sanofi-Synthelabo (PLAVIX[®]) e Bristol-Myers-Squibb (ISCOVER[®]), na forma farmacêutica comprimido revestido, contendo 75 mg de clopidogrel em embalagens de 14 ou 28 unidades (DEF, 2004).

Apesar da utilização e importância terapêutica do clopidogrel, é escassa a literatura para a análise do fármaco em preparações farmacêuticas e até o momento os códigos oficiais brasileiros não descrevem métodos de análise para o referido produto.

Considerando o exposto acima, este trabalho tem como objetivo contribuir para o controle de qualidade do clopidogrel através do desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o fármaco em comprimidos revestidos. Objetivou-se, também, avaliar de forma preliminar a estabilidade da molécula frente a diferentes condições de estresse.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar métodos analíticos para análise qualitativa e quantitativa do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a identificação da SQR através da espectrofotometria de infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H e pela técnica termoanalítica de calorimetria exploratória diferencial (DSC).
- Desenvolver método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para identificação do clopidogrel em comprimidos revestidos.
- Realizar a identificação do clopidogrel em comprimidos revestidos pelos métodos de Espectrofotometria Ultravioleta (UV), Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) e Eletroforese Capilar (EC).
- Validar os métodos de Espectrofotometria Ultravioleta, Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar para determinação quantitativa de clopidogrel em comprimidos revestidos.
- Realizar estudo preliminar de estabilidade, determinando a cinética de degradação do fármaco em solução frente à exposição à luz ultravioleta.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais

3.1.1 Mecanismo de formação de trombos

Em condições normais, as plaquetas circulam livremente pelos vasos sanguíneos e as células do endotélio vascular secretam prostaciclina e óxido nítrico, que inibem localmente as funções plaquetárias em decorrência do aumento intracelular dos níveis de AMPc e GMPc (SCHAFER, 1996).

Quando ocorre lesão vascular, erosão do endotélio, fissura ou ruptura de placa aterosclerótica, as plaquetas são expostas à matriz extracelular da parede vascular e determinam o início da cascata hemostática. Primeiramente, as plaquetas sofrem o processo de ativação que consiste em três etapas: (1) adesão e alteração de formato, (2) secreção dos conteúdos granulares e (3) agregação (ROBBINS, 1996).

No local da lesão vascular o colágeno fibrilar - constituinte altamente trombogênico do sub-endotélio - fica exposto. As plaquetas circulantes aderem ao local da lesão formando um “tapete” no vaso sanguíneo. Esse processo é denominado adesão plaquetária e é mediado primariamente pelo fator de von Willebrand, secretado pelo endotélio, que se liga especificamente aos receptores GP Ib/IX presentes na superfície das plaquetas. Outras substâncias estimulantes da adesão plaquetária como colágeno, epinefrina, trombina e serotonina podem também se ligar a seus receptores plaquetários desencadeando uma cascata de reações intracelulares que levam à ativação e subsequente agregação das plaquetas (ROBBINS, 1996).

As plaquetas ativadas passam da forma discóide para a conformação esférica com pseudópodos onde se localizam os receptores glicoprotéicos IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) (STEFANINI, 2001).

Após a ativação, as plaquetas secretam as substâncias de seu conteúdo granular, entre elas, o cálcio e o ADP. O cálcio se liga a fatores de coagulação ativando a via intrínseca desse processo e o ADP é um importante mediador da agregação plaquetária (ROBBINS, 1996).

O cálcio ativa também a enzima fosfolipase A_2 formando ácido araquidônico. Este, sob a ação da ciclooxygenase, origina as prostaglandinas (PG) G_2 e H_2 . A PGH_2 , sob a ação da tromboxano sintase, forma o tromboxano A_2 (TxA_2). O TxA_2 e o ADP ligam-se a seus receptores específicos na membrana das plaquetas ativando os receptores GP IIb/IIIa (SCHAFER, 1996). Os ligantes do processo de agregação são o fibrinogênio e o fator de von Willebrand, que se ligam ao receptor glicoprotéico formando um complexo heterodimérico GP IIb/IIIa (ROBBINS, 1996).

Outro agonista plaquetário importante gerado com a ativação da seqüência de coagulação é a trombina. Inicia-se, então, uma reação autocatalítica com crescente indução da agregação plaquetária formando o tampão hemostático primário ou temporário que após a contração plaquetária torna-se uma massa fundida de plaquetas e constitui o tampão hemostático definitivo ou secundário. No final, a trombina, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel, levando à estabilização do trombo (ROBBINS, 1996).

À medida em que ocorre a cicatrização da lesão, o agregado plaquetário e o coágulo de fibrina são degradados. Quando o agregado plaquetário ou o coágulo de fibrina causam oclusão de um vaso sanguíneo, ocorre o processo patológico denominado trombose (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2003).

3.1.2 Doenças relacionadas à trombogênese

As doenças cardiovasculares foram responsáveis, no ano de 2002, por 29,3% das mortes, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Destas, 12,6% foram causadas devido às doenças coronarianas isquêmicas. A incidência de doenças coronarianas tem diminuído em países desenvolvidos; entretanto, estas doenças têm incidência aumentada em países em desenvolvimento, como resultado do aumento da longevidade, de mudanças no estilo de vida e da urbanização. No Brasil ocorrem até 100.000 mortes por ano em decorrência de doenças cardiovasculares (WHO, 2002).

As síndromes coronarianas agudas (SCA) referem-se a condições associadas à isquemia miocárdica, incluindo angina instável e infarto do miocárdio (MÔNACO *et al.*, 2005; WODLINGER, PIEPER, 2003). Em nível mundial, o número de infartos eleva-se a cerca de 10 milhões por ano. Destes, 3 milhões correspondem ao tipo mais grave, o infarto do miocárdio com elevação do segmento-ST. (SANOFI-AVENTIS, 2006)

Outra causa importante na mortalidade da população mundial são as doenças cerebrovasculares (CV), que correspondem a 9,7% do total das mortes conforme a estimativa da OMS. O principal representante das doenças CV é o acidente vascular cerebral (AVC), que pode ser de origem hemorrágica (20%) ou, na maioria das vezes, de origem isquêmica (80%) (CAPLAN, 1998).

Os fenômenos tromboembólicos têm papel central no desencadeamento dessas doenças. Os trombos geram obstrução das artérias e veias, assim como são possíveis fontes de êmbolos. Por esse motivo, é de fundamental importância o entendimento de sua formação para o desenvolvimento de tratamento farmacológico dessas patologias. Nos casos de SCA e doenças CV, especial atenção deve ser dada aos trombos arteriais, pois estes têm papel obstrutivo no infarto do miocárdio e no infarto cerebral (ROHDE, 2004).

A trombose refere-se à formação patológica de um tampão hemostático decorrente da ativação das plaquetas em um vaso sanguíneo lesado, não havendo sangramento. Lesões na parede dos vasos, alterações no fluxo sanguíneo e coagulação anormal do sangue são fatores desencadeantes da formação de trombos (RANG, 2001).

A doença trombótica e tromboembólica é comum e possui graves conseqüências, incluindo infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose venosa profunda e embolia pulmonar.

Um dos principais desafios na terapia antitrombótica é o desenvolvimento de fármacos que impeçam a formação de trombos de maneira específica sem afetar a coagulação sanguínea normal.

Agentes trombolíticos, antiplaquetários e anticoagulantes estão envolvidos na terapêutica. O uso de trombolíticos é a primeira consideração, pois fornece meios de remover o trombo estabelecido (BENNET, 1997).

Os fármacos antiplaquetários suprimem a adesão e agregação das plaquetas diminuindo direta ou indiretamente a disponibilidade de agonistas derivados das mesmas. Desta forma, diminuem o risco de trombo-oclusão e tromboembolia nos principais ramos vasculares, independente de sua localização (CALLAHAN, 2000).

O uso do AAS na prevenção da formação de trombos é amplamente difundido, no entanto, seu uso está associado a alguns efeitos colaterais (náuseas, vômitos, dor epigástrica, hemorragias gastrintestinais e úlceras pépticas) e a casos de hipersensibilidade à substância (STEFANINI, 2001). Também foram relatados casos de resistência ao AAS que levaram à recorrência dos eventos trombóticos (JACOBSON, 2004).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos potentes inibidores da função plaquetária, entre eles, o dipiridamol, a ticlopidina, o clopidogrel, o abciximab, a eptifibatida e a tirofibana. Esses fármacos atuam por mecanismos distintos e, portanto, quando utilizados em combinação, seus efeitos são aditivos ou até mesmo sinérgicos. A disponibilidade destes medicamentos provocou uma revolução na medicina cardiovascular, visto que, hoje em dia, a angioplastia e o *stenting* vascular são efetuados com baixa taxa de reaparecimento de estenose e trombose quando é empregado um inibidor plaquetário eficaz (MAJERUS, 2003).

3.1.3 Tienopiridinas

As tienopiridinas, a ticlopidina, o clopidogrel e, mais recentemente, o prasugrel, foram aprovadas pelo FDA nos anos 90 como alternativa ao uso do AAS em pacientes intolerantes, alérgicos, com história de hemorragias ou resistentes ao fármaco.

A ticlopidina (Figura 2) foi o primeiro fármaco da classe, demonstrando eficácia na prevenção de infarto do miocárdio em pacientes com angina instável, oclusão das artérias coronárias e no tratamento da claudicação intermitente. No entanto, o uso deste fármaco está associado à ocorrência de neutropenia e trombocitopenia, o que restringe seu uso a pacientes que não toleram o AAS (SCHRÖR, 1995).

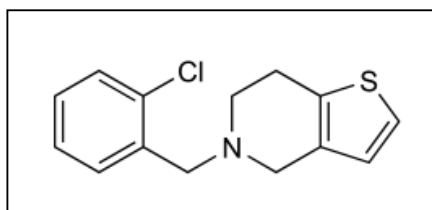


Figura 2 – Estrutura química da ticlopidina.

Devido aos riscos do uso da ticlopidina, o clopidogrel surgiu como um composto promissor, por ter estrutura similar e poucos efeitos adversos. Este fármaco é o mais seguro das tienopiridinas, pois apresenta baixo índice de ocorrência de neutropenia grave (JACOBSON, 2004). Além disso, é, no mínimo, tão eficaz quanto o AAS na terapia antiplaquetária (HIRSH; BHATT, 2004).

O clopidogrel é indicado a pacientes hipersensíveis ao AAS, com problemas de acidez estomacal e sangramento, pacientes com infarto do miocárdio sem elevação do segmento-ST e após intervenções percutâneas coronárias, combinado ao AAS (DRUG UPDATE, 2004). Segundo o estudo CAPRIE (Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events), o clopidogrel é o único antiplaquetário aprovado pelo FDA para a redução de eventos aterotrombóticos em pacientes com doenças arteriais periféricas (WATSON *et al*, 2006). Em 2006, o FDA aprovou o uso do clopidogrel

para a forma mais grave de infarto do miocárdio, o infarto do miocárdio com elevação do segmento-ST (SANOFI-AVENTIS, 2006).

3.2 Clopidogrel

3.2.1 Características farmacocinéticas

O fármaco é rapidamente absorvido via oral (50% da dose). Trata-se de um pró-fármaco que sofre extensa metabolização hepática pelo citocromo P 450 (CYP 450), formando principalmente o derivado inativo ácido carboxílico (SR26334), cujas características farmacocinéticas servem de base para estabelecer informações sobre absorção e eliminação do clopidogrel.

O CYP 450 3A ativa o clopidogrel em dois estágios. Primeiramente, ocorre a oxidação a 2-oxo-clopidogrel, seguida de uma espontânea e rápida hidrólise do tioéster cíclico para um derivado tiol altamente reativo, responsável pela ação antiplaquetária (Figura 3). O metabólito ativo identificado é o ácido (2-{1-[1-82 clorofenil)2-oxoetil]-4 sulfanil-3 piperidinilideno} acético (BERKELS *et al.*, 2004).

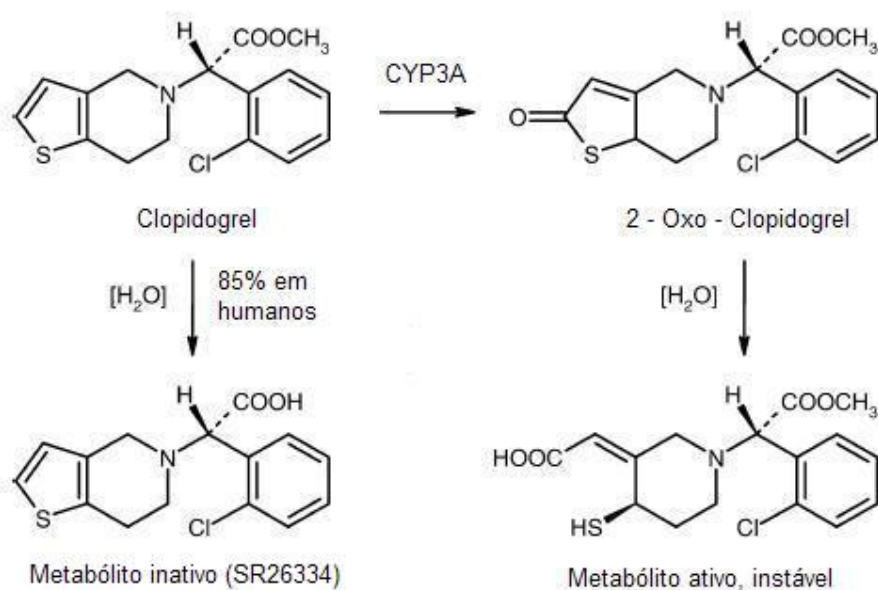


Figura 3 – Metabolização do clopidogrel em humanos (TESTA, 2004).

A absorção do clopidogrel não é afetada pela presença de alimentos, o metabólito inativo atinge a concentração plasmática máxima 1 hora após a ingestão. O tempo de meia-vida é de aproximadamente oito horas (JACOBSON, 2004). A taxa de eliminação renal é de 50% e 46% são eliminados via gastrintestinal. Cerca de 98% do clopidogrel e de seu metabólito inativo ligam-se às proteínas plasmáticas. A duração da ação se estende por cinco dias (KOROLKOVAS, 2004).

3.2.2 Mecanismo de ação

O clopidogrel impede irreversivelmente a ligação do ADP ao seu receptor plaquetário (P2Y₁₂). O receptor purinérgico (P2Y₁₂) possui estrutura oligomérica transmembrana à qual o metabólito ativo do clopidogrel se acopla. A ligação se dá através de ponte dissulfeto ao resíduo de cisteína do primeiro “loop” do receptor. Isso resulta na dissociação dos oligômeros em receptores diméricos, que perdem a habilidade de ligação às moléculas endógenas, neste caso, o ADP (SAVI *et al.*, 2006).

Na falta de ligação do ADP ao receptor, não ocorre a ativação do receptor GP IIb/IIIa. Isso bloqueia o estágio final da formação do trombo que consiste na agregação plaquetária (SCHAFER, 1996; HIRSH; BHATT, 2004; MAJERUS, 2003).

A Figura 4 apresenta os estágios da formação do agregado plaquetário e as possíveis intervenções farmacológicas nas diferentes etapas do processo.

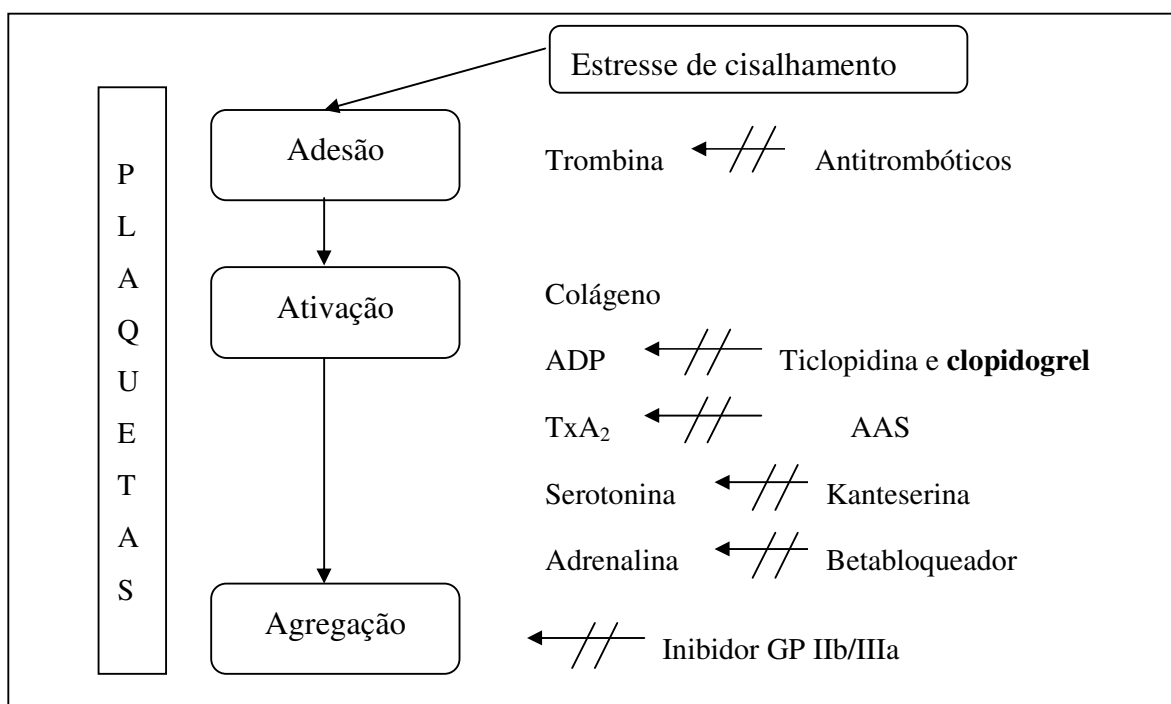


Figura 4 – Representação esquemática das etapas de agregação plaquetária e das intervenções farmacológicas na prevenção da formação de trombos (Adaptado de STEFANINI, 2001).

3.2.3 Descrição geral

O bissulfato de clopidogrel é um sólido cristalino branco, solúvel em soluções aquosas ácidas e em metanol, praticamente insolúvel em água em pH neutro e em éter etílico, fracamente solúvel em cloreto de metileno (MOFFAT, 2004).

- **Fórmula molecular:** (BUDAVARI, 2001)

Clopidogrel: $C_{16}H_{16}ClNO_2S$

Bissulfato de clopidogrel: $C_{16}H_{16}ClNO_2S, H_2SO_4$

- **Massa molecular:**

Clopidogrel: 321,8

Bissulfato de clopidogrel: 419,9

- **Registro no Chemical Abstracts:**

Clopidogrel: 113665-84-2

Bissulfato de clopidogrel: 135046-48-9

- **Sigla:**

Clopidogrel: SR-25990

Bissulfato de clopidogrel: SR 25990C

- **Composição elementar:**

Clopidogrel: C 59,71%, H 5,01%, Cl 11,02%, N 4,35%, O 9,94, S 9,96%

- **Nomes químicos:**

Clopidogrel: (*S*)- α -(2-Clorofenil)-6,7-diidroteno[3,2-*c*]piridina-5-(4*H*)-metiléster do ácido acético; metil (+) - (*S*) - α - (o-clorofenil)-6-7-diidroteno [3,2-*c*]piridina-5-(4*H*)-acetato; (+) – metil- α - 5-[4,5,6,7 – tetraidro [3,2-*c*] tienopiridil]-(2-clorofenil) acetato.

A molécula de clopidogrel possui um centro assimétrico, o que leva a existência de dois isômeros, *R* e *S*. Estudos demonstraram que o enantiômero *S* é ativo enquanto o *R* é inativo e pode causar convulsões em animais quando administrado em altas doses (REIST, *et al.*, 2000)

O bissulfato de clopidogrel apresenta seis formas polimórficas, além de uma forma amorfa; entretanto somente as formas I e II são utilizadas em preparações farmacêuticas. A forma I é composta de dois cátions de clopidogrel independentes e de dois ânions bissulfato (BOUSQUET, 2002). A forma assimétrica do polimorfo II é composta de um cátion de clopidogrel e de um ânion bissulfato ligados por fortes pontes de hidrogênio. Da mesma forma, pontes de hidrogênio ligam os ânions bissulfato entre si (RENOU, 2007).

A disposição dos ânions é diferente nas duas estruturas cristalinas. A estrutura cristalina da forma II (ortorrômbica) é menos densa que a estrutura monoclinica da forma I. Os cristais da forma I são irregulares e os da forma II são aglomerados. A forma II, por ser menos eletrostática, é utilizada preferencialmente em preparações farmacêuticas (BOUSQUET, 2002).

3.2.4 Dosagem e administração

A dose diária é de um comprimido revestido, contendo 75 mg de clopidogrel, com ou sem dose de ataque de 300 mg (REYNOLDS, 1993; MAJERUS, 2003).

3.2.5 Determinação Quantitativa

Devido a sua extensa metabolização hepática, o clopidogrel é detectado em baixos níveis em fluidos biológicos, o que levou ao desenvolvimento de métodos de quantificação do seu principal metabólito (SR26334) em plasma e soro. Há na literatura diversos trabalhos que relatam a determinação do metabólito ácido carboxílico (SR26334) utilizando espectrometria de massas para a detecção. Entre eles a técnica de cromatografia gasosa desenvolvida por LAGORCE e colaboradores (1998). Os trabalhos de CLAE para a determinação do metabólito estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Artigos publicados para a determinação do metabólito ácido carboxílico do clopidogrel por CLAE em fluidos biológicos.

Coluna	Fase Móvel	Deteção	Referência
Hipercarb PGC (porus graphitized carbon) 5µm (50,0 x 3,0 mm),	metanol:solução de ácido trifluoracético 0,1% (70:30)	E. Massas	MITAKOS <i>et. al.</i> , 2004
Kromasil ODS (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm)	solução de trietilamina 0,05% e acetonitrila em gradiente de concentração	UV – 220nm.	Singh <i>et.al.</i> , 2005
C18 3 µm (75 x 4,6 mm)	acetonitrila:água:ácido fórmico (60:40:0,1, v/v/v)	E. Massas	KSYCINSKA <i>et. al.</i> , 2006.

Um método de alta sensibilidade para a deteção de clopidogrel não metabolizado em plasma utilizou coluna Luna C8 (50 mm x 2,0 mm, 5 µm), fase móvel em gradiente, composta de acetonitrila e água contendo 0,1% de ácido fórmico em cada componente da fase móvel e deteção por espectrometria de massas (ROBINSON, *et al.*, 2007). NIROGI e colaboradores (2006) desenvolveram método de CLAE com deteção por espectrometria de massas utilizando coluna de fase reversa, fase móvel isocrática, monitorando o íon m/z de 322/212 para o clopidogrel. Este método mostrou sensibilidade na ordem de picogramas.

No estudo de REIST e cols. (2000) foi investigada a inversão quiral enzimática e não-enzimática do clopidogrel, monitorando-se esta inversão por CLAE enantiosseletiva e por RMN ^1H . A inversão quiral não-enzimática monitorada por CLAE utilizou coluna Nucleodex β -PM 150 x 4,6mm, fase móvel composta metanol:tampão acetato de trietilamônio pH 4,0, 0,1% (65:35 (v/v)), fluxo de 0,7 ml/min e deteção ultravioleta a 230nm.

Para preparações farmacêuticas contendo clopidogrel existem três publicações. Um método indicador de estabilidade por HPTLC foi desenvolvido por AGRAWAL e colaboradores (2003), para avaliar a pureza do clopidogrel matéria-prima e em preparações farmacêuticas.

MITAKOS e colaboradores (2002) desenvolveram método por CLAE para a quantificação do fármaco utilizando fase móvel composta de tampão dihidrogenofosfato de sódio 0,01 M (pH 3,0) e acetonitrila (35:65, v/v), detector UV a 235 nm e coluna semi-micro BDS C8 (250 x 2,1 mm, 5 µm), tendo como padrão interno o naproxeno.

No estudo desenvolvido por GOMEZ e colaboradores (2004), foram comparados 19 produtos contendo clopidogrel, sendo 18 genéricos *versus* o medicamento referência. Na análise da pureza das preparações foi utilizada a CLAE quiral com coluna ES-OVM 5 µm (4,6 x 150 mm), fase móvel composta de acetonitrila:tampão dihidrogeno fosfato de potássio 0,01M (25:75, v/v) e detecção a 220 nm. As impurezas avaliadas foram o produto de hidrólise e o enantiômero R do clopidogrel. O trabalho também compara os perfis de dissolução dos diferentes produtos.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho no ano de 2006, foi publicada a monografia do clopidogrel em comprimidos na Farmacopéia Americana (USP 29, 2006). A publicação descreve a identificação da substância nos comprimidos pelo método de espectrofotometria UV, utilizando solução de 150 µg/ml em HCl 0,1 N, e comprimento de onda do clopidogrel em 270 nm. Para o doseamento do fármaco em comprimidos é aplicado o método de CLAE. O método proposto é semelhante ao desenvolvido por GOMEZ e colaboradores (2004). A coluna utilizada é uma coluna quiral, com proteína ovomucóide de 4,6 mm x 15 mm, a fase móvel é composta de acetonitrila:tampão fosfato de potássio (25:75, v/v) e detecção a 220 nm. De forma semelhante ao referido artigo, a dissolução dos comprimidos utiliza solução tampão em HCl (pH 2,0), equipamento 2 (pás), velocidade de 50 rpm e tempo de dissolução de 30 minutos. No entanto, visando maior rapidez na determinação do perfil de

dissolução, a quantificação na monografia, é realizada por espectrofotometria UV a 240 nm.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição dos Materiais

4.1.1 Substância Química de Referência (SQR)

Utilizou-se como SQR o bissulfato de clopidogrel com teor declarado de 99,6%, forma II, identificado pelo lote RDS 8514, cedido pelo Laboratório Bristol-Myers-Squibb.

4.1.2 Produto Farmacêutico

Para a realização deste estudo foram adquiridas amostras comerciais do produto farmacêutico Iscover[®] comprimidos revestidos produzido pelo Laboratório Bristol-Myers-Squibb, lote 1244-8.

Cada comprimido revestido contém:

- 97,875 mg de bissulfato clopidogrel, que corresponde a 75 mg de clopidogrel base;

- lactose, óleo de rícino hidrogenado, celulose microcristalina, macrogol, amido, óxido de ferro vermelho, hipromelose, dióxido de titânio e cera de carnaúba como excipientes.

4.1.3 Mistura Placebo

A partir do peso médio dos comprimidos revestidos e de acordo com os teores percentuais médios usuais descritos para cada componente na literatura (KIBBE, 2003), foram determinadas as quantidades dos excipientes presentes na mistura placebo, que podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Quantidades de excipientes adicionados à mistura placebo referente a 1 comprimido revestido.

Excipiente	Quantidade (mg)
Lactose	76,75
Óleo de rícino hidrogenado	3,57
Celulose microcristalina	35,7
Macrogol	17,85
Amido	25,0
Óxido de ferro vermelho	0,895
Hipromelose	8,92
Dióxido de titânio	0,895
Cera de carnaúba	8,92

Pesou-se a quantidade de excipientes equivalente a 20 comprimidos e procedeu-se a mistura em gral a fim de obter-se uma mistura homogênea.

4.2 Análise Qualitativa da SQR

4.2.1 Determinação da Faixa de Fusão

4.2.1.1 Material

Analisaram-se amostras da SQR de bissulfato de clopidogrel descrito no item 4.1.1. As análises foram realizadas em aparelho Koffler e em equipamento de calorimetria exploratória diferencial SHIMADZU, modelo DSC-60, controlador de fluxo FC-60A, intergrador TA 60WS, Software TA 60 versão 2.0.

4.2.1.2 Método Koffler

Uma quantidade de SQR foi colocada entre a lâmina de vidro e a lamínula e aquecida sobre chapa metálica. Observou-se a fusão dos cristais através de

microscópio e registrou-se a temperatura inicial e final da fusão. Este procedimento foi realizado em triplicata.

4.2.1.3 Método de Calorimetria Exploratória Diferencial

Pesou-se 1,0 mg de SQR de bissulfato de clopidogrel em porta amostra de alumínio com capacidade para 4 µl. Selou-se o porta-amostra e procedeu-se à análise em calorímetro exploratório diferencial. A análise foi efetuada sob atmosfera inerte de nitrogênio mantido sob fluxo de 50 ml/min e velocidade de aquecimento de 10 °C/min até 220 °C.

4.2.2 Espectrofotometria na região do infravermelho

4.2.2.1 Material

Analisaram-se amostras SQR de bissulfato de clopidogrel descrito no item 4.1.1. Na obtenção das pastilhas para análise utilizou-se brometo de potássio. As análises foram realizadas em espectrofotômetro FTIR SHIMADZU DR – 8001.

4.2.2.2 Método

Pesou-se 1,5 mg de SQR e misturou-se em gral de ágata com 150 mg de brometo de potássio, ambos previamente dessecados por duas horas a 105 °C. A mistura foi transferida para pastilhador e a pastilha obtida foi destinada à análise espectrofotométrica.

4.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

4.2.3.1 Material e método

Pesou-se 15 mg de SQR e dissolveu-se em água deuterada para análise. A análise foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em equipamento VARIAN 300 MHz, obtendo-se os espectros de ^{13}C e ^1H .

4.3 Análise Qualitativa do Clopidogrel em preparações farmacêuticas

4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

4.3.1.1 Material

Prepararam-se soluções da SQR e dos comprimidos revestidos de clopidogrel em metanol grau analítico (MERCK). Também foi preparada solução de ticlopidina SQR em metanol.

Na composição do sistema eluente foram empregados hexano (MERCK), etanol (MERCK) e clorofórmio (SYNTH). Todos os solventes utilizados na análise possuíam grau analítico.

Como fase estacionária, utilizou-se cromatoplasas aluminizadas (MERCK) de gel-sílica 60 F₂₅₄, dimensões de 12 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura de camada adsorvente. Revelaram-se as placas em vapores de iodo (SYNTH) e lâmpada ultravioleta a 254 nm (ECOLUME).

4.3.1.2 Método

As soluções de SQR de clopidogrel e de ticlopidina foram preparadas em metanol na concentração de 1,0 mg/ml. A solução amostra dos comprimidos revestidos foi obtida a partir da trituração de dois comprimidos, pesando-se o equivalente a 50 mg de clopidogrel e dissolvendo-se em metanol em balão volumétrico

de 50 ml. Submeteu-se a solução à agitação em banho de ultrassom por 20 minutos. Após, completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrou-se através de papel-filtro, obtendo-se solução de 1 mg/ml.

O sistema eluente utilizado na análise consiste na mistura de hexano:etanol:clorofórmio nas proporções 80:15:5 (v/v/v), respectivamente.

A aplicação foi realizada utilizando-se tubos capilares, à distância de 1 cm da borda inferior da cromatoplaca. A migração estendeu-se até 10 cm após o ponto de aplicação. Procedeu-se a leitura sob exposição à lâmpada ultravioleta a 254 nm e a revelação em vapores de iodo, calculando-se os valores dos fatores de retenção (R_f) das amostras.

4.3.2 Espectrofotometria na região ultravioleta

4.3.2.1 Material

Analisaram-se soluções da SQR de clopidogrel e das amostras comerciais de clopidogrel descritas anteriormente nos itens 4.1.1 e 4.1.2, respectivamente. As soluções foram preparadas em HCl 0,01 *M*.

Utilizou-se o espectrofotômetro UV/VIS SHIMADZU, modelo UV 160A, equipado com cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico para a análise.

4.3.2.2 Método

Preparou-se as soluções de SQR e das amostras dos comprimidos na concentração de 18,0 µg/ml em HCl 0,01 *M*. A leitura das soluções foi efetuada na faixa de comprimento de onda de 200-350 nm. Os espectros obtidos foram comparados para fins de identificação.

4.3.3 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

4.3.3.1 Material

Analisaram-se soluções da SQR de clopidogrel e das amostras comerciais de clopidogrel descritas anteriormente nos itens 4.1.1 e 4.1.2, respectivamente.

No preparo da fase móvel utilizou-se metanol grau CLAE (TEDIA), água ultrapura (MILLIPORE), trietilamina grau CLAE (MERCK) e ácido fosfórico 10% para o ajuste do pH da água. Ácido clorídrico 0,01 *M*, preparado no dia da análise, foi empregado no preparo das soluções-estoque. As amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm de diâmetro de poro (MILLIPORE).

Utilizou-se a coluna ACE 5 C18 (15 cm x 4,6 mm d.i.) protegida e cromatógrafo a líquido Shimadzu equipado com duas bombas modelo LC 10 AD VP, controlador SCL-10A VP, auto injetor SIL-10AD VP, forno para coluna CTO-10AC VP, detector de arranjo de diodos SPD-M10A a 220 nm e software CLASS VP versão 6.2.

4.3.3.2 Método

Preparou-se uma solução estoque da SQR de clopidogrel na concentração de 200 µg/ml em HCl 0,01 *M*. A partir desta solução retirou-se, com auxílio de bureta, alíquota de 4,5 ml para balão volumétrico de 20 ml, resultando em solução de concentração de 45,0 µg/ml.

No preparo da solução amostra dos comprimidos revestidos foram dissolvidos seis comprimidos em balão volumétrico de 1000 ml utilizando HCl 0,01 *M* como solvente. A solução foi submetida durante 20 minutos a banho de ultrassom, obtendo-se solução de 450,0 µg/ml. Filtrou-se a solução obtida e retirou-se alíquota de 5 ml para balão volumétrico de 50 ml, resultando em solução de concentração de 45,0

µg/ml. Estas diluições finais foram preparadas em fase móvel e filtradas através de membrana de nylon com diâmetro de poro de 0,45 µm.

A fase móvel foi preparada pela mistura de metanol e solução de trietilamina 0,1% na proporção de 75:25 (v/v). O pH da fase aquosa foi ajustado para 5,3 com ácido fosfórico 10%. A mistura foi homogeneizada e filtrada através de membrana de nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro. Para a desaeração utilizou-se fluxo constante de gás hélio durante a análise.

As condições cromatográficas empregadas na identificação do clopidogrel foram as seguintes:

- Fase móvel: metanol:solução de trietilamina 0,1% (75:25, v/v)
- Coluna: ACE 5 C18 (15 cm x 4,6 mm d.i.)
- Fluxo: 1,2 ml/min
- Comprimento de onda: 220 nm
- Volume de injeção: 20 µl
- Temperatura de análise: 25 ± 1 °C

Compararam-se os tempos de retenção dos cromatogramas obtidos para fins de identificação do clopidogrel nas amostras comerciais.

4.3.4 Eletroforese Capilar

4.3.4.1 Material

Analísaram-se soluções da SQR de clopidogrel e dos comprimidos revestidos de clopidogrel descritas anteriormente nos itens 4.1.1 e 4.1.2, respectivamente. Como padrão interno foi utilizado tiabendazol SQR, grau de pureza de 98,0%.

Para a solubilização das amostras de comprimidos e da SQR de clopidogrel foi utilizado HCl 0,01 M, preparado no dia de análise.

No preparo do eletrólito de corrida utilizou-se fosfato de potássio monobásico (SYNTH), água ultrapura (MILLIPORE). Para o ajuste do pH foi utilizado ácido fosfórico 10%, empregando-se o potenciômetro DIGIMED modelo DM-20 para sua determinação.

As soluções contendo clopidogrel e tiabendazol, solução de hidróxido de sódio e tampão fosfato de potássio pH 2,5 foram filtradas através de membranas de nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro (MILLIPORE).

As análises foram realizadas utilizando capilar de sílica fundida (AGILENT) de 75 µm de diâmetro interno, 50 cm de comprimento total e 40,5 cm de comprimento efetivo. O sistema de EC utilizado consiste em equipamento HP 3D-CE, equipado com detector de arranjo de diodos e software HP Chemstation – CE.

4.3.4.2 Método

A partir da solução de 150,0 µg/ml de SQR de clopidogrel retirou-se alíquota de 5 ml para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se também alíquota de 2,5 ml de solução de tiabendazol (200 µg/ml em HCl 0,01M), obtendo-se solução de 30,0 µg/ml de clopidogrel e 20,0 µg/ml de tiabendazol em HCl 0,01 M, respectivamente.

Em um balão volumétrico de 1000 ml foram colocados 4 comprimidos de clopidogrel, dissolvendo-se em HCl 0,01 M. Para completa dissolução dos comprimidos a solução foi submetida a banho de ultrassom durante 20 minutos. Após a filtração da solução, retirou-se alíquota de 5,0 ml para balão volumétrico de 50 ml, adicionando-se também solução de tiabendazol, resultando em concentração de 30,0 µg/ml de clopidogrel e 20,0 µg/ml de tiabendazol, respectivamente.

Para preparo da solução tampão fosfato, pesou-se 1,3747 g de fosfato de potássio monobásico e dissolveu-se em água, completando-se o volume para 100 ml, obtendo-se concentração de 100 mM. Transferiu-se 20 ml desta solução para balão volumétrico de 100 ml resultando em solução de 20 mM. Ajustou-se o pH 2,5 com solução de ácido fosfórico 10%.

A ativação do capilar foi realizada com lavagens de solução de hidróxido de sódio 1 M, água ultrapura e eletrólito de corrida por 30, 30 e 15 minutos, respectivamente. Este procedimento precedeu a primeira utilização do capilar de sílica. Nas corridas eletroforéticas posteriores, a etapa de pré-condicionamento consistiu na lavagem do capilar com hidróxido de sódio 0,1 M, água ultrapura e eletrólito de corrida por 1, 1 e 2 minutos.

As condições de análise empregadas no método estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições eletroforéticas empregadas para a análise do clopidogrel em comprimidos revestidos.

Parâmetro	Condição empregada
Eletrólito de corrida	Tampão fosfato 20 mM pH 2,5
Tensão aplicada	25 kV em rampa (1 mV/seg)
Injeção modo hidrodinâmico	50 mBar
Tempo de injeção	5 segundos
Comprimento de onda de detecção	220 nm
Temperatura de análise	25 °C ± 1 °C

Com a finalidade de realizar a identificação do clopidogrel nos comprimidos, comparou-se o tempo de migração do eletroferograma do clopidogrel no produto farmacêutico, com o eletroferograma obtido da SQR.

4.4 Análise Quantitativa

4.4.1 Espectrofotometria na região ultravioleta (UV)

4.4.1.1 Material

Empregou-se nas análises o espectrofotômetro Shimadzu modelo UV/VIS 160 A, equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura.

Clopidogrel SQR e comprimidos revestidos contendo clopidogrel foram submetidos à análise. Os excipientes utilizados no teste de especificidade estão descritos no item 4.1.3. No preparo das soluções foi utilizado HCl 0,01 *M*.

4.4.1.2 Método

4.4.1.2.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da preparação de soluções de clopidogrel SQR e placebo, em HCl 0,01 *M*, na concentração final de 18,0 µg/ml.

A partir da mistura placebo, pesou-se quantidade de excipientes referente a seis comprimidos. A mistura foi dissolvida em HCl 0,01 *M* utilizando-se balão volumétrico de 1000 ml, obtendo-se solução de concentração teórica de 450,0 µg/ml. Após a filtração da preparação, retirou-se alíquota de 4,0 ml para balão volumétrico de 100 ml obtendo-se uma concentração final de 18,0 µg/ml em HCl 0,01 *M*.

4.4.1.2.2 Curva padrão

Preparou-se solução estoque de SQR de clopidogrel na concentração de 60,0 µg/ml em HCl 0,01 *M* e, a partir desta, alíquotas de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 ml foram transferidas, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 20 ml.

Completou-se o volume com HCl 0,01 M, obtendo-se concentrações de 6,0; 12,0; 18,0; 24,0; 30,0 e 36,0 µg/ml. Cada solução foi preparada em triplicata e foram realizadas três determinações para cada concentração no comprimento de onda de 220 nm.

4.4.1.2.2.1 Cálculos para a curva padrão

O gráfico da curva padrão foi obtido plotando-se os dados de concentração *versus* absorvância. Determinou-se a equação da reta através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para a verificação da linearidade do método.

4.4.1.2.3 Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos

Preparou-se a solução estoque com seis comprimidos revestidos em HCl 0,01 M. A preparação foi submetida à dissolução durante 20 minutos em banho de ultrassom. Completou-se o volume para 1000 ml, obtendo-se a concentração de 450,0 µg/ml. A solução resultante foi filtrada e alíquotas de 4 ml foram transferidas para seis balões volumétricos de 100 ml, completando-se o volume com HCl 0,01 M. A concentração final das soluções foi de 18,0 µg/ml. As soluções foram analisadas em triplicata.

A solução de SQR de clopidogrel foi preparada dissolvendo-se este em HCl 0,01 M a fim de obter-se concentração final de 18,0 µg/ml.

As soluções foram analisadas em triplicata no comprimento de onda de 220 nm utilizando-se HCl 0,01 M como branco.

Para a avaliação da precisão intermediária repetiu-se o procedimento durante três dias de análise.

4.4.1.2.3.1 Cálculos para a determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos

Calculou-se a quantidade de clopidogrel nas soluções obtidas da preparação farmacêutica através da equação abaixo:

$$C_A = \frac{A_A.C_{SQR}}{A_{SQR}}$$

Onde:

C_{SQR} = concentração da solução da SQR de clopidogrel

A_A = absorvância da solução de clopidogrel a 220 nm

A_{SQR} = absorvância da solução da SQR de clopidogrel a 220 nm

A determinação da porcentagem de clopidogrel nos comprimidos revestidos foi calculada pela equação:

$$C_A\% = \frac{C_A.100}{C_T}$$

Onde:

C_A = concentração calculada da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$.

C_T = concentração teórica da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$.

4.4.1.2.4 Teste de recuperação

Prepararam-se soluções denominadas de R1, R2 e R3 a partir das soluções estoque de clopidogrel SQR de 60,0 $\mu\text{g/ml}$ e de amostra de clopidogrel de 450,0 $\mu\text{g/ml}$. O preparo das soluções R1, R2 e R3 está representado na Tabela 4.

Tabela 4 – Preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação pelo método de espectrofotometria UV a 220 nm.

	Solução amostra de clopidogrel 450,0 µg/ml*	Solução SQR de clopidogrel 60,0 µg/ml *	Concentração final
R1	4,0 ml	5,0 ml	21,0 µg/ml
R2	4,0 ml	10,0 ml	24,0 µg/ml
R3	4,0 ml	20,0 ml	30,0 µg/ml

* balões volumétricos de 100 ml.

Todas as soluções foram preparadas em triplicata. Também preparou-se solução amostra de clopidogrel e de SQR na concentração de 18,0 µg/ml. As soluções foram analisadas em triplicata.

4.4.1.2.4.1 Cálculo para o teste de recuperação

Utilizou-se a equação abaixo para o cálculo do percentual de recuperação de clopidogrel.

$$R\% = \left(\frac{C_B - C_A}{C_P} \right) \cdot 100$$

Onde:

C_B = concentração da solução R contendo SQR e amostra de clopidogrel em µg/ml.

C_A = concentração da solução amostra de clopidogrel em comprimidos revestidos em µg/ml.

C_P = quantidade, em µg/ml, de SQR de clopidogrel adicionada à solução R.

4.4.2 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

4.4.2.1 Material

Os materiais e equipamentos utilizados encontram-se descritos no item 4.3.3.1. Os excipientes utilizados no teste de especificidade estão descritos no item 4.1.3. No preparo das soluções estoque utilizou-se HCl 0,01 *M*. As soluções finais foram diluídas na fase móvel.

4.4.2.2 Método

4.4.2.2.1 Especificidade

Prepararam-se soluções de clopidogrel SQR e de placebo, na concentração final de 45 µg/ml. A solução obtida a partir dos comprimidos revestidos foi submetida à degradação por quatro diferentes fatores para a análise da especificidade.

- degradação alcalina: adicionou-se 2 ml de NaOH 1,0 *M* a uma alíquota de 5 ml da solução estoque (450,0 µg/ml) mantendo-se a reação por duas horas. Neutralizou-se a solução com HCl 1,0 *M* e completou-se o volume para 50 ml com a fase móvel. A solução foi filtrada e submetida à análise cromatográfica.

- degradação ácida: adicionou-se 2 ml de HCl 1,0 *M* a uma alíquota de 5 ml da solução estoque (450,0 µg/ml) e mantendo-se a reação por duas horas. Neutralizou-se a solução com NaOH 1,0 *M* e completou-se o volume para 50 ml com a fase móvel. Após a filtração, a solução foi submetida à análise cromatográfica.

- luz ultravioleta (254 nm): a solução de amostra (45,0 µg/ml) foi exposta à luz ultravioleta em câmara de vidro espelhada internamente durante duas horas. Após a degradação, a solução foi filtrada e submetida à análise cromatográfica.

- oxidação: adicionou-se solução de H₂O₂ 3% (V/V) à 5 ml da solução estoque (450,0 µg/ml), completando-se o volume para 50 ml, com a fase móvel, ao final de duas horas. A solução resultante foi filtrada e submetida à análise.

A partir da mistura placebo, pesou-se quantidade de excipientes referente a seis comprimidos dissolvendo-se em balão volumétrico de 1000 ml em HCl 0,01 M, obtendo-se solução de concentração teórica de 450,0 µg/ml. Após a filtração da solução, retirou-se alíquota de 5,0 ml para balão volumétrico de 50 ml, obtendo-se uma concentração final de 45,0 µg/ml.

4.4.2.2.2 Curva padrão

Preparou-se solução estoque de SQR de clopidogrel na concentração de 200 µg/ml em HCl 0,01 M. A partir desta solução foram retiradas alíquotas, com auxílio de bureta, obtendo-se concentrações de 10,0; 15,0; 30,0; 45,0; 60,0; 75,0 e 90,0 µg/ml. Diluíram-se as soluções na fase móvel. As soluções foram preparadas em triplicata e foram realizadas três determinações para cada concentração.

4.4.2.2.2.1 Cálculos para a curva padrão

O gráfico da curva padrão foi obtido plotando-se os dados de concentração *versus* áreas absolutas. Determinou-se a equação da reta pelo estudo de regressão linear através do método dos mínimos quadrados e utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para a verificação da linearidade do método.

4.4.2.2.3 Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos

Preparou-se a solução estoque com seis comprimidos revestidos em HCl 0,01 M. A dissolução dos comprimidos foi realizada em banho de ultrassom durante 20 minutos. Após, completou-se o volume a 1000 ml, obtendo-se concentração de 450,0 µg/ml. A solução resultante foi filtrada e foram retiradas alíquotas de 5,0 ml para seis

balões volumétricos de 50 ml, completando-se com HCl 0,01 M, obtendo-se concentração final de 45,0 µg/ml. As soluções foram analisadas em triplicata.

A partir da solução de 200,0 µg/ml de SQR de clopidogrel foi transferida alíquota de 4,5 ml, com auxílio de bureta, para balão volumétrico de 20 ml, obtendo-se solução de 45,0 µg/ml.

Para a avaliação da precisão intermediária repetiu-se o procedimento durante três dias de análise.

4.4.2.2.3.1 Cálculos para a determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos

Calculou-se a quantidade de clopidogrel na solução obtida dos comprimidos revestidos através da equação abaixo:

$$C_A = \frac{A_A.C_{SQR}}{A_{SQR}}$$

Onde:

C_{SQR} = concentração da solução da SQR de clopidogrel (µg/ml)

A_A = área absoluta da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos

A_{SQR} = área absoluta da solução da SQR de clopidogrel

Utilizou-se a equação abaixo para o cálculo do percentual de clopidogrel nos comprimidos revestidos.

$$C_A\% = \frac{C_A.100}{C_T}$$

Onde:

CA = concentração calculada da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$.

CT = concentração teórica da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$.

4.4.2.2.4 Teste de recuperação

Prepararam-se soluções denominadas de R1, R2 e R3 a partir das soluções estoque de clopidogrel SQR de $200,0 \mu\text{g/ml}$ e de amostra de clopidogrel de $450,0 \mu\text{g/ml}$. O preparo das soluções R1, R2 e R3 está representado na Tabela 5.

Tabela 5 – Preparo das soluções utilizadas no teste de recuperação por CLAE na determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos.

	Solução amostra de clopidogrel $450,0 \mu\text{g/ml}$ *	Solução SQR de clopidogrel $200,0 \mu\text{g/ml}$ *	Concentração final
R1	5,0 ml	2,5 ml	$55,0 \mu\text{g/ml}$
R2	5,0 ml	5,0 ml	$65,0 \mu\text{g/ml}$
R3	5,0 ml	10,0 ml	$85,0 \mu\text{g/ml}$

* utilizou-se balões volumétricos de 50 ml.

Todas as soluções foram preparadas em triplicata. Soluções amostra de clopidogrel e de SQR na concentração de $45,0 \mu\text{g/ml}$ também foram preparadas e analisadas em triplicata.

4.4.2.2.4.1 Cálculo para o teste de recuperação

Utilizou-se a equação abaixo para o cálculo do percentual de recuperação de clopidogrel.

$$R\% = \left(\frac{C_B - C_A}{C_P} \right) \cdot 100$$

Onde:

C_B = concentração da solução R contendo SQR e amostra de clopidogrel em $\mu\text{g/ml}$.

C_A = concentração da solução amostra de clopidogrel em comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$.

C_P = quantidade, em $\mu\text{g/ml}$, de SQR de clopidogrel adicionada à solução R.

4.4.2.2.5 Avaliação da robustez

A robustez do método foi avaliada através de pequenas alterações na composição da fase móvel e no pH.

O preparo das soluções de clopidogrel SQR e amostra está descrito no item 4.4.2.2.3.

A fase móvel foi preparada conforme descrito no 4.3.3.2, no entanto, variou-se a quantidade de solvente orgânico de 75% para 73% e 77% e, o pH da fase móvel, de 5,3 para 5,5 e 5,1.

Calculou-se a quantidade de clopidogrel nos comprimidos revestidos conforme equação do item 4.4.2.2.3.1, e compararam-se parâmetros como assimetria e número de pratos teóricos frente às pequenas variações propostas.

4.4.2.2.6 Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram definidos a partir da relação sinal-ruído fornecida pelo equipamento. Para sua determinação foram preparadas soluções em concentrações decrescentes até obter-se a resposta desejada.

Para a determinação do LD foi utilizada a relação sinal ruído de 3:1 e para o LQ a relação sinal ruído é de 10:1. As determinações foram realizadas em triplicata.

4.4.3 Eletroforese Capilar

4.4.3.1 Material

Os materiais e equipamentos utilizados encontram-se descritos no item 4.3.4.1.

Os excipientes, presentes na formulação dos comprimidos revestidos e utilizados no teste de especificidade, estão descritos no item 4.1.3.

4.4.3.2 Método

4.4.3.2.1 Especificidade

A partir da mistura placebo, pesou-se quantidade de excipientes referente à 30 mg de clopidogrel na forma farmacêutica. Transferiu-se a mistura para balão volumétrico de 100 ml e dissolveu-se em HCl 0,01 M, obtendo-se solução com quantidade de excipientes equivalente à solução de 300,0 µg/ml. Após a filtração da solução retirou-se alíquota de 5,0 ml para balão volumétrico de 50 ml obtendo-se uma concentração final de 30,0 µg/ml.

Preparou-se solução de clopidogrel SQR na concentração de 100,0 µg/ml em HCl 0,01 M. Submeteu-se a solução à degradação sob lâmpada ultravioleta a 254 nm por um período de 90 minutos. Retirou-se alíquota de 3 ml para balão volumétrico de 10 ml resultando em solução de 30,0 µg/ml.

4.4.3.2.2 Curva padrão

Pesou-se 20 mg da SQR de clopidogrel e transferiu-se para balão volumétrico de 200 ml, completando-se o volume com solução de HCl 0,01 M e obtendo-se solução de 100,0 µg/ml.

A partir desta solução retiraram-se alíquotas, com auxílio de bureta, obtendo-se concentrações de 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 µg/ml. A cada balão volumétrico adicionou-se 2 ml de solução de SQR de tiabendazol (200,0 µg/ml), resultando em concentração de 20,0 µg/ml de padrão interno. As soluções foram diluídas em HCl 0,01 M. Prepararam-se as soluções em triplicata e realizaram-se três determinações para cada concentração.

4.4.3.2.1 Cálculos para a curva padrão

Devido ao uso de padronização interna todos os cálculos foram realizados utilizando-se a razão das áreas absolutas (RA), calculada da seguinte maneira:

$$RA = \frac{A_{CLOPIDOGREL}}{A_{TIABENDAZOL}}$$

O gráfico da curva padrão foi obtido plotando-se os dados de concentração de clopidogrel *versus* relação das áreas (clopidogrel/tiabendazol). Determinou-se a equação da reta pelo estudo de regressão linear através do método dos mínimos quadrados e utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para a verificação da linearidade do método.

4.4.3.2.3 Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos

Preparou-se a solução estoque com quatro comprimidos revestidos em HCl 0,01 M. Submeteu-se a preparação à dissolução durante 20 minutos em banho de ultrassom,

após, completou-se o volume, obtendo-se a concentração de 300,0 µg/ml. A solução resultante foi filtrada e alíquotas de 5 ml foram retiradas para seis balões volumétricos de 50 ml. Adicionou-se, também, alíquotas de 5 ml da solução de tiabendazol (200,0 µg/ml) completando-se com HCl 0,01 M obtendo-se concentração final de 30,0 µg/ml para o clopidogrel e de 20,0 µg/ml de tiabendazol, respectivamente. As soluções foram analisadas em triplicata.

A partir da solução de 150,0 µg/ml de SQR de clopidogrel em HCl 0,01 M retirou-se alíquota de 5 ml em balão volumétrico de 25 ml, obtendo-se solução de 30,0 µg/ml. Adicionou-se alíquota de 2,5 ml de solução de tiabendazol (200,0 µg/ml), com auxílio de bureta, obtendo-se concentração de 20,0 µg/ml. Todas as soluções foram filtradas por membrana de 0,45 µm (MILLIPORE).

Para a avaliação da precisão intermediária repetiu-se o procedimento durante três dias de análise.

4.4.3.2.3.1 Cálculos para a determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos

Calculou-se a quantidade de clopidogrel na solução obtida dos comprimidos revestidos através da equação abaixo:

$$CA = \frac{RA_A.C_{SQR}}{RA_{SQR}}$$

Onde:

C_{SQR} = concentração da solução da SQR de clopidogrel (µg/ml)

RA_A = razão das áreas absolutas da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos e do padrão interno tiabendazol

RA_{SQR} = razão das áreas absolutas da solução da SQR de clopidogrel e do padrão interno tiabendazol.

Utilizou-se a equação abaixo para o cálculo do percentual de clopidogrel nos comprimidos revestidos.

$$C_A\% = \frac{C_A \cdot 100}{C_T}$$

Onde:

C_A = concentração calculada da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$.

C_T = concentração teórica da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$.

4.4.3.2.4 Exatidão

O ICH preconiza que caso a especificidade, a linearidade e a precisão do método tenham sido estabelecidas, pode-se inferir a exatidão do mesmo por testes estatísticos. É possível inferir a exatidão pela análise estatística dos resultados obtidos com os de um método validado e bem estabelecido.

A exatidão do método de EC foi inferida através da análise de variância (ANOVA), comparando-se dados do presente método com dados do método de CLAE validado.

4.4.3.2.5 Limite de Detecção

A estimativa do Limite de Detecção (LD) foi realizada com base na relação de três vezes a linha de base, sendo determinado pela equação:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Onde:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas padrão;

IC = inclinação média das curvas padrão.

4.4.3.2.6 Limite de Quantificação

A estimativa do Limite de quantificação (LQ) foi realizada com base na relação de dez vezes a linha de base, sendo determinado pela equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas padrão;

IC = inclinação média das curvas padrão.

4.5 Estudo Preliminar de Estabilidade

4.5.1 Determinação da cinética de degradação

4.5.1.1 Materiais

Os materiais e equipamentos utilizados encontram-se descritos no item 4.3.3.

Os excipientes, presentes na formulação dos comprimidos revestidos e utilizados no teste de especificidade, estão descritos no item 4.1.3.

Utilizou-se lâmpada fluorescente de ultravioleta modelo ECOLUMÉ 30 W, emitindo radiação a 254 nm, disposta horizontalmente em uma câmara espelhada internamente, proporcionando distribuição homogênea de radiação.

4.5.1.2 Método

A partir do pó dos comprimidos revestidos, preparou-se solução de clopidogrel na concentração de 900,0 µg/ml em HCl 0,01 M. Desta solução foram colocados 2 ml em cubetas descartáveis, as quais foram acondicionadas na câmara espelhada internamente, sob exposição à luz ultravioleta a 254 nm.

Os tempos de coleta das amostras foram 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos. Após a degradação, retirou-se alíquota de 1,0 ml para balão volumétrico de 20,0 ml, completando-se o volume com fase móvel, obtendo-se as soluções para a análise cromatográfica.

Paralelamente, preparou-se solução de SQR na concentração de 45 µg/ml e solução placebo para a análise da especificidade. A solução placebo também foi submetida à degradação durante 210 minutos.

Com a finalidade de avaliar a possível interferência da temperatura do interior da câmara na degradação do clopidogrel preparou-se solução denominada “branco”. A solução branco consiste na solução de comprimidos de clopidogrel (900,0 µg/ml), acondicionada em cubeta descartável, na câmara espelhada, porém recoberta com papel alumínio, que anula o efeito da radiação.

As amostras foram analisadas pelo método de CLAE, previamente validado. As condições de análise encontram-se descritas no item 4.3.3.2.

4.5.1.3 Cálculos para a determinação do clopidogrel nas amostras degradadas

A concentração de clopidogrel nas soluções degradadas foi calculada conforme a equação que segue:

$$C_A = \frac{A_A \cdot C_{SQR}}{A_{SQR}}$$

Onde:

C_{SQR} = concentração da solução da SQR de clopidogrel ($\mu\text{g/ml}$)

A_A = área absoluta da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos

A_{SQR} = área absoluta da solução da SQR de clopidogrel

Utilizou-se a equação abaixo para o cálculo do percentual de clopidogrel na solução degradada.

$$C_A\% = \frac{C_A \cdot 100}{C_P}$$

Onde:

C_A = concentração calculada da solução de clopidogrel em comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$.

C_P = concentração inicial da solução de clopidogrel SQR.

4.5.1.4 Determinação da ordem de reação

Os dados de concentração do fármaco remanescente em função do tempo de exposição das amostras foram utilizados para a determinação da ordem de reação. Para tanto, foram plotados os gráficos de concentração *versus* tempo; *log* de concentração *versus* tempo e $1/\text{concentração}$ *versus* tempo.

Após a determinação da ordem de reação, calcularam-se os valores de k (constante específica de reação) e o tempo necessário para que 10% do fármaco sejam degradados ($t_{90\%}$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise Qualitativa da SQR

5.1.1 Determinação da Faixa de Fusão

5.1.1.1 Resultados

A faixa de fusão encontrada para o clopidogrel SQR pelo método Koffler foi de 180-181 °C. Estes valores representam a média de três determinações. Pelo método de DSC a fusão inicia em 176,63 e finaliza em 183,94 °C, com pico em 180,77 °C. A entalpia de fusão (ΔH) foi de 91,34 J/g, conforme pode ser visualizado na Figura 5. Após a temperatura de 210 °C ocorreu a decomposição da amostra analisada.

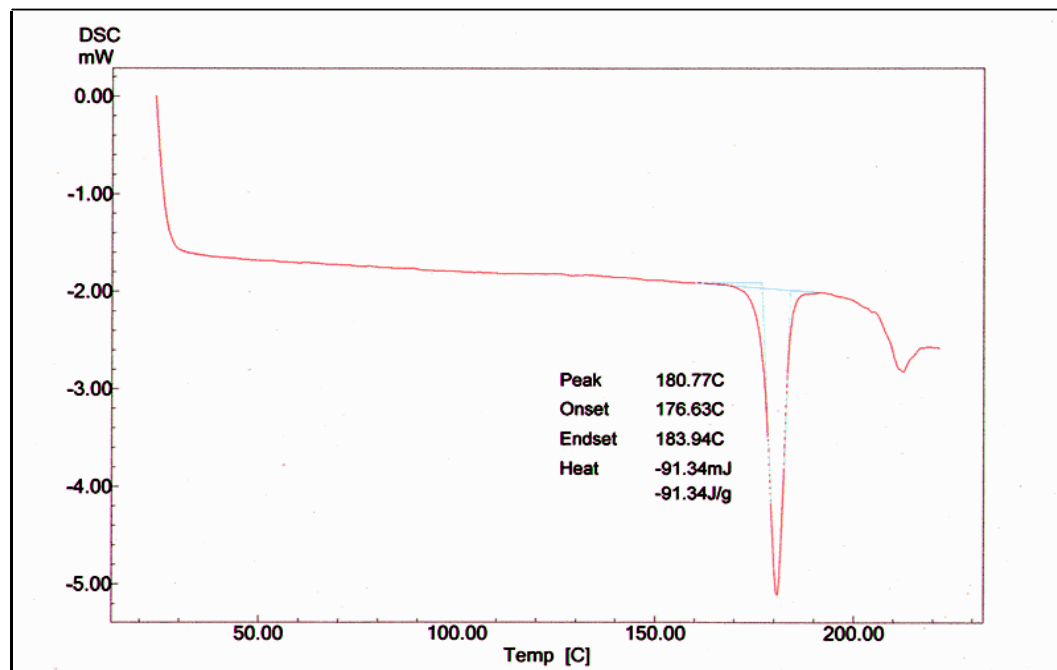


Figura 5 – Calorimetria exploratória diferencial da SQR do clopidogrel.

5.1.1.2 Discussão

A faixa de fusão de um composto permite avaliar a identidade da substância como também determinar a pureza da mesma, pois impurezas ou modificações na estrutura cristalina do analito alargam a faixa de fusão e diminuem a temperatura do ponto de fusão (FORD, 1989).

A calorimetria exploratória diferencial fornece informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância. Informações que, ocasionalmente, não são fornecidas com rapidez e exatidão adequadas por métodos clássicos. Além disso, esta técnica fornece valores de entalpia de fusão, indica a pureza da amostra, permite verificar se a substância sofreu degradação, decomposição ou conversão polimórfica durante o processo de fusão (CLAS, 1999).

Uma endoterma de fusão é composta por uma temperatura inicial (T_{onset}), onde há o início do desvio da linha de base; pela temperatura de fusão inicial extrapolada (T_e), que consiste no encontro da extrapolação da linha de base e da linha de transição; e da temperatura de fusão que corresponde ao pico da endoterma.

O bissulfato de clopidogrel apresenta seis formas polimórficas e uma forma amorfa; no entanto, apenas as formas I e II são utilizadas em preparações farmacêuticas. A forma I apresenta ponto de fusão de 181,2 °C e entalpia de fusão de 77 J/g enquanto a forma II tem faixa de fusão de 176-178 °C e entalpia de fusão de 87 J/g (BOUSQUET, 2002). A literatura indica, ainda, o ponto de fusão de 184 °C, porém não diferencia as formas polimórficas (MOFFAT, 2004).

No trabalho de KORADIA e colaboradores (2004) a forma I apresentou endoterma de fusão em 181-186-190 ± 1 °C (T_{onset} -pico- T_{endset}), e, para a forma II, foi de 177-179-182 ± 0,5 °C.

Com base nos resultados obtidos foi possível verificar que a faixa de fusão do clopidogrel SQR encontra-se dentro dos limites preconizados pela literatura. Além disso, verifica-se que os dados obtidos na determinação do ponto de fusão por DSC

estão de acordo com os valores obtidos por KORADIA e colaboradores para a forma polimórfica II.

5.1.2 Espectrofotometria na Região do Infravermelho

5.1.2.1 Resultado

As principais bandas de absorção do clopidogrel SQR na região do infravermelho estão representadas na Tabela 6. O espectro obtido na análise por espectrofotometria na região do infravermelho está representado na Figura 6.

Tabela 6 – Frequências do espectro IV obtidas na análise de SQR de clopidogrel.

Frequência (cm⁻¹)	Atribuição
Acima de 3000	Deformação axial C-H de anel aromático
2500 - 2550	Deformação axial N ⁺ - H
1750	Deformação axial C=O de éster
1600	Deformação axial C-C de anel aromático
1460	Deformação (de vibração) de N ⁺ -H
1189-1155	Deformação axial C-O (metil éster)
1100-1029	Deformação axial C-Cl
770-735	Anel aromático orto-substituído

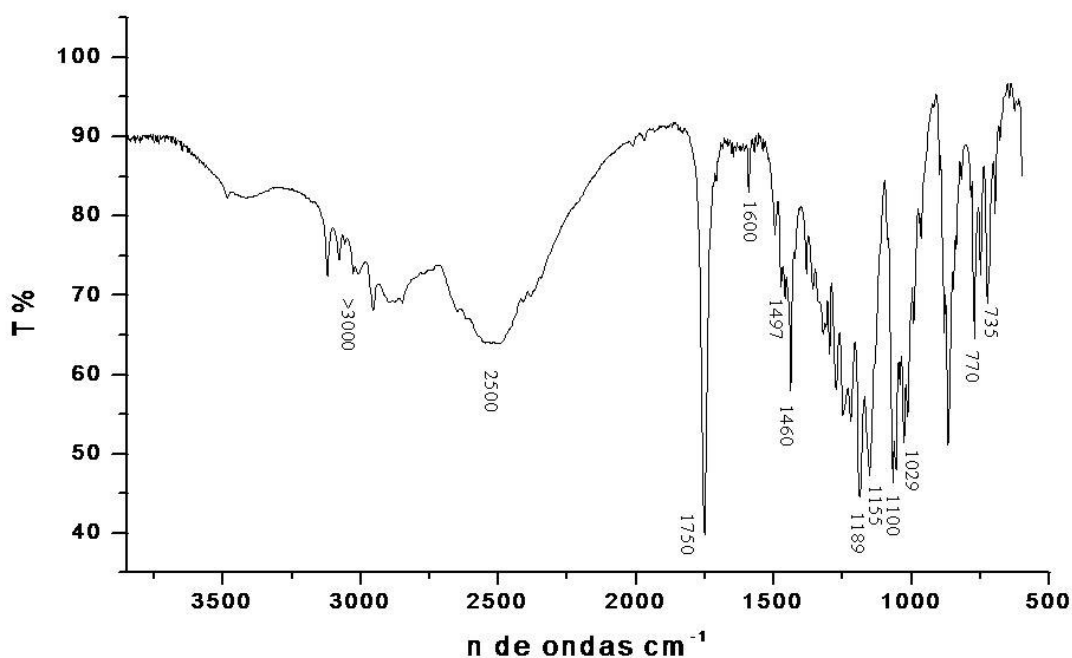


Figura 6 - Espectro de Infravermelho obtido para a SQR de clopidogrel.

5.1.2.2 Discussão

A espectrofotometria IV é útil na identificação de substâncias pois fornece a “impressão digital” do composto analisado, permitindo a interpretação do espectro que é único para cada substância. As frequências de grupos funcionais, localizadas em regiões específicas, são muito úteis para a interpretação do espectro (WATSON, 2003).

BOUSQUET e colaboradores (2002) basearam-se nas diferenças entre os espectros de infravermelho, entre outros ensaios, para diferenciar as duas formas polimórficas de clopidogrel. De acordo com os autores, as diferenças entre os espectros encontram-se nas seguintes regiões:

- Forma I – 2987 cm^{-1} ; 1753 cm^{-1} ; 1222 cm^{-1} ; 1175 cm^{-1} ; 841 cm^{-1} .
- Forma II – 2551 cm^{-1} ; 1753 cm^{-1} ; 1497 cm^{-1} ; 1189 cm^{-1} ; 1029 cm^{-1} .

De forma semelhante, KORADIA e colaboradores (2004), utilizaram a espectrofotometria infravermelho para diferenciar as duas formas polimórficas. A diferenciação das formas I e II, segundo os autores, é caracterizada principalmente pela existência de absorção em 2987, 1175 e 841 cm^{-1} para a forma I, e das bandas 1497, 1189 e em 1029 cm^{-1} para a forma II.

A análise do espectro da SQR de clopidogrel permite a interpretação das principais bandas de absorção dos grupos funcionais e estruturas presentes na molécula. Verificam-se também as bandas características apresentadas pela forma II que estão indicadas na Figura 6 em 1497, 1189 e 1029 cm^{-1} . Dessa forma pode-se afirmar que a SQR de clopidogrel teve sua identidade confirmada através do presente método. Adicionalmente, pode-se concluir que se trata da forma polimórfica II.

5.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

5.1.3.1 Resultados e discussão

A Figura 8 representa o espectro de ^{13}C obtido na análise da SQR de clopidogrel por Espectroscopia RMN. Os principais deslocamentos químicos encontram-se na Tabela 7. A numeração dos carbonos no espectro corresponde à da molécula de clopidogrel, representada na Figura 7.

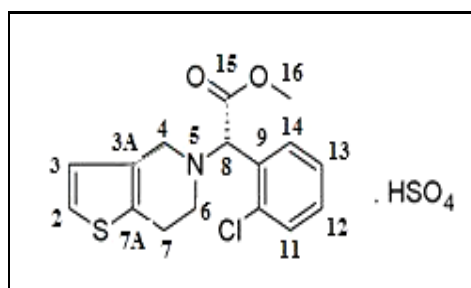


Figura 7 – Estrutura química do bissulfato de clopidogrel.

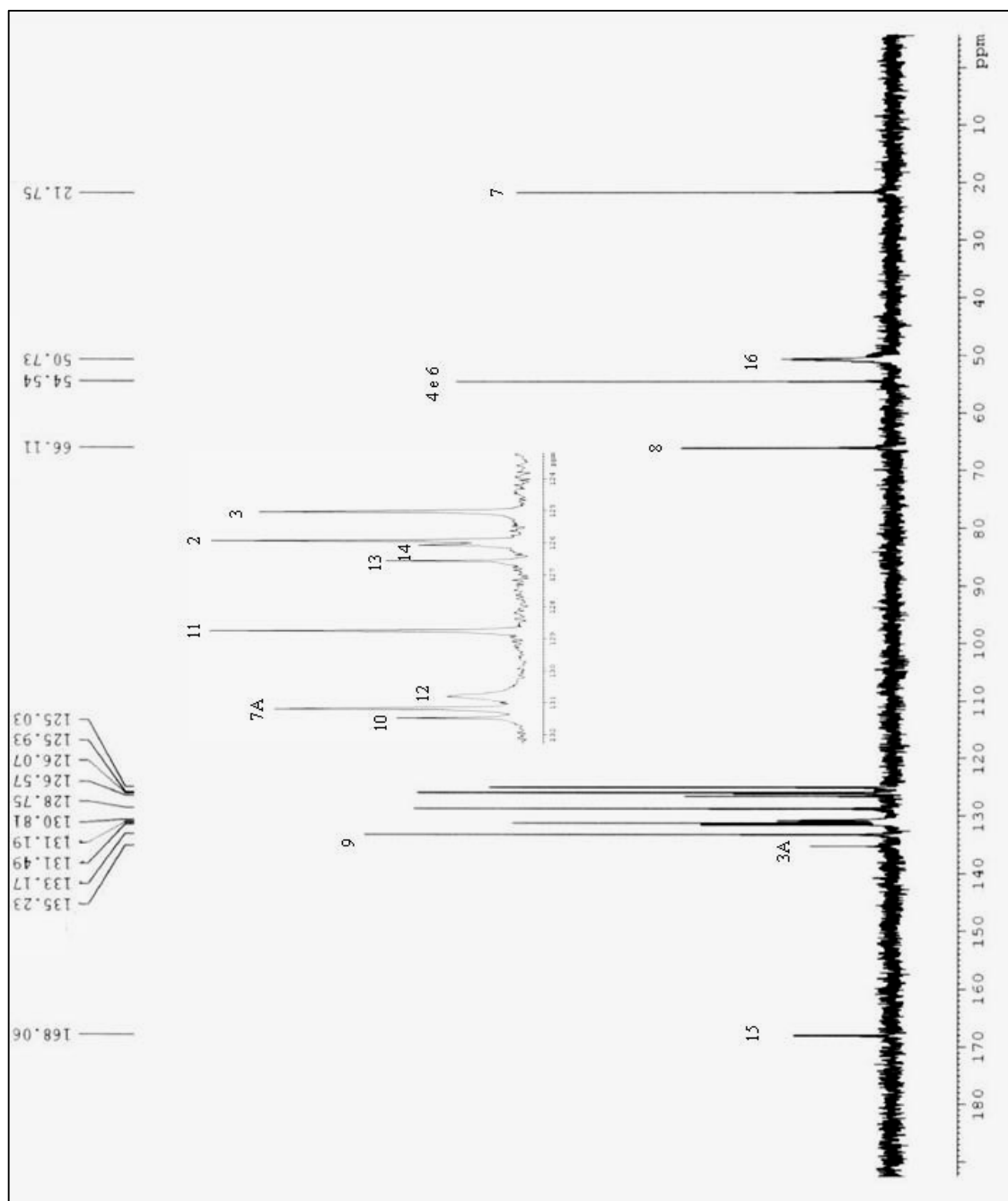


Figura 8 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono da SQR de clopidogrel.

Tabela 7 – Deslocamentos químicos observados para a molécula de clopidogrel por Espectroscopia de RMN ^{13}C .

Deslocamento (ppm)	Atribuição
168,06	C 15
135,23	C 3A
133,17	C 9
131,49	C 10
131,19	C 7A
130,81	C 12
128,75	C 11
126,57	C 13
126,07	C 14
125,93	C 2
125,03	C 3
66,11	C 8
54,54	C 4 e C 6
50,73	C 16
21,75	C 7

A partir da análise do espectro de ^{13}C da SQR de clopidogrel foi possível atribuir todos os carbonos presentes na molécula. Observa-se o deslocamento característico de carbonila em 168,06 ppm; também há os deslocamentos referentes a carbonos quaternários (3A, 7A, 9 e 10) que absorvem em regiões mais desblindadas, entre 131,19 e 135,23 ppm.

Os carbonos referentes ao anel aromático *orto*-substituído apresentaram deslocamentos em região característica, entre 126,07 e 130,81 ppm. Outro

deslocamento característico da molécula ocorre em 50,73 que corresponde à metoxila (C16). O anel piridínico apresentou deslocamentos em 54,54 e 21,75 ppm, o que está de acordo com a literatura pesquisada (PRETSCH *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2001).

O espectro obtido na análise de clopidogrel por Espectroscopia de RMN ^1H está representado na Figura 9, na qual as letras representam os principais deslocamentos químicos da molécula. Na Tabela 8 está indicada a região que cada letra representa e a sua respectiva atribuição na molécula (Figura 7).

Tabela 8 – Deslocamentos químicos observados para a molécula de clopidogrel por Espectroscopia de RMN ^1H .

Região	Deslocamento (ppm)	Multiplicidade	nº. H	Atribuição
A	3,15	singleto	3H	O-CH ₃ (16)
B	3,62 – 3,74	multipleteo	6H	CH ₂ do anel piperidina (4, 6 e 7)
C	5,76	singleto	1H	CH (8)
D	6,62	dubleto	1H	CH (3)
E	7,25	dubleto	1 H	CH (2)
F	7,38 – 7,50	multipleteo	4 H	CH aromático (11 – 14)

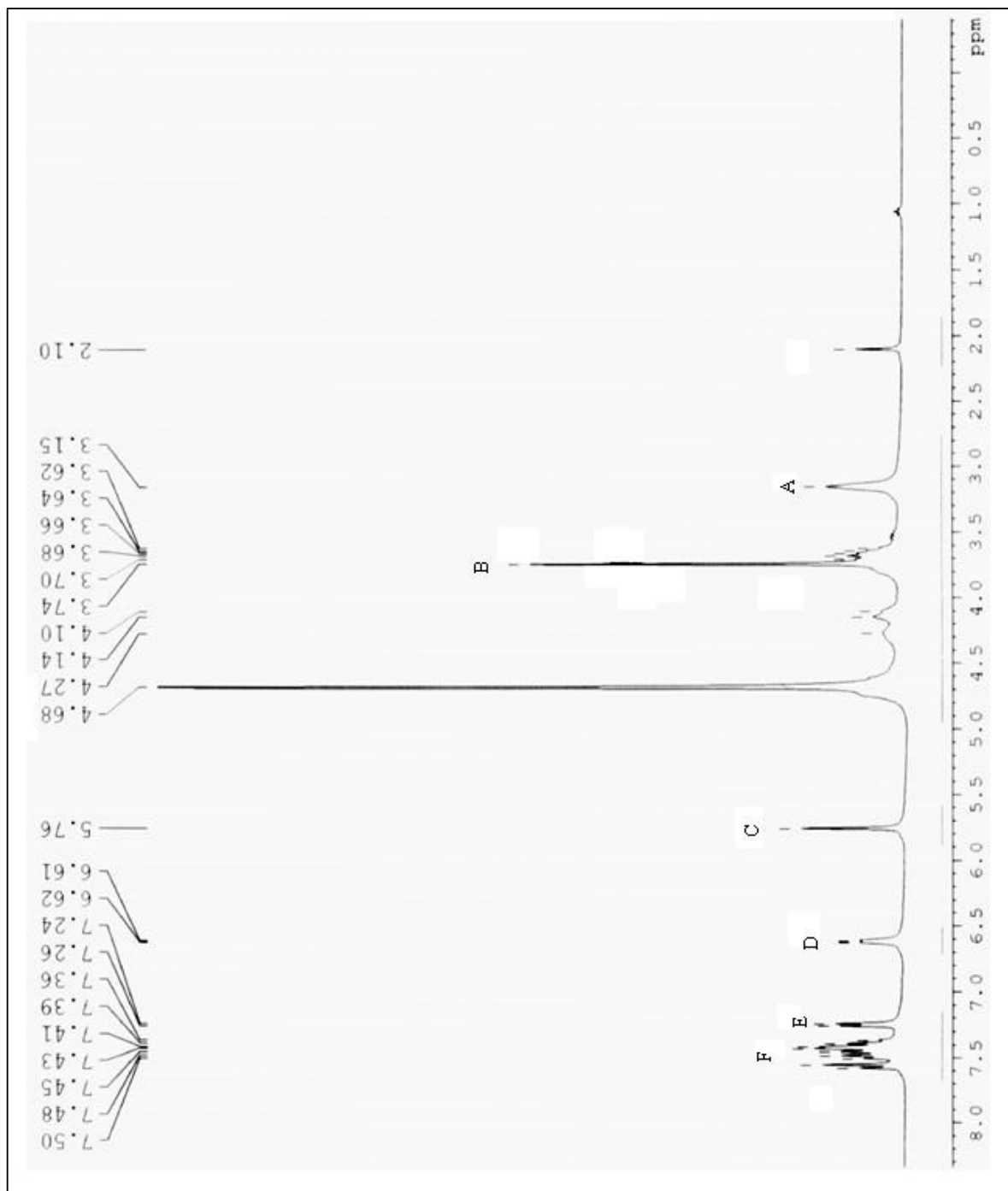


Figura 9 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio da SQR de clopidogrel.

O espectro de RMN ^1H obtido para a identificação da SQR de clopidogrel apresentou os principais deslocamentos químicos referentes à molécula. Em 3,15 ppm observa-se deslocamento característico de metila, presente na posição 16 da molécula. Os hidrogênios do anel piperidina, de acordo com a literatura, apresentam deslocamento químico na região de 3,2 ppm – 3,8 ppm. Analisando-se a região B do espectro, verifica-se a presença do respectivo deslocamento referente aos 6 hidrogênios do anel.

O singlete em 5,76 ppm (Região C), cuja integral é referente a 1 hidrogênio, representa o deslocamento químico do hidrogênio da posição 8. Os dubletos em 6,62 e em 7,25 ppm apresentam integral para 2 hidrogênios e correspondem as posições de número 2 e 3 da molécula de clopidogrel. Todos os valores estão de acordo com a literatura. (RENOU *et al.*, 2007; PAVIA *et al.*, 2001; PRETSCH *et al.*, 2000)

A região F corresponde à região de absorção de anéis aromáticos, que, na molécula está representado nas posições 11 a 14.

Assim, o método de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio, permitiu a identificação da SQR de clopidogrel pela interpretação dos principais deslocamentos químicos da molécula.

5.2 Análise Qualitativa do Clopidogrel em preparações farmacêuticas

5.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

5.2.1.1 Resultados

Os valores médios de Rf calculados para a migração cromatográfica estão representados na Tabela 9. O perfil cromatográfico com revelação em vapores de iodo pode ser visualizado na Figura 10.

Tabela 9: Valores de Rf obtidos na análise de clopidogrel por CCD.

Substância	Rf
Clopidogrel SQR	0,55
Clopidogrel amostra (A)	0,56
Ticlopidina (T)	0,64

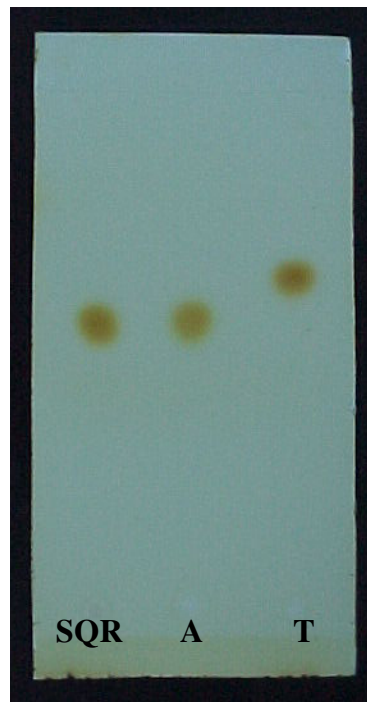


Figura 10 – CCD para identificação do clopidogrel em comprimidos revestidos. Condições de análise: sistema eluente: hexano:etanol:clorofórmio 80:15:5 (v/v/v), fase estacionária placa de gel-sílica 60 F₂₅₄, (12 cm x 5 cm x 0,25 mm), revelação com vapores de iodo.

5.2.1.2 Discussão

A identificação de substâncias por CCD é feita pela comparação dos fatores de retenção da substância com o de um padrão de identidade conhecida. Trata-se de uma técnica que necessita poucos recursos e permite analisar diversas substâncias

simultaneamente. Além disso, oferece grande flexibilidade na escolha das fases móvel e estacionária aliada à utilização de versáteis sistemas de detecção.

No desenvolvimento do método testaram-se diferentes eluentes levando em consideração a polaridade da molécula. Alguns sistemas eluentes testados como clorofórmio:etanol (60:40 e 80:20) resultaram em valores de Rf muito altos, 0,86 e 0,93, respectivamente.

Na literatura, foi encontrado um trabalho de cromatografia em camada delgada de alta eficiência para o clopidogrel (AGRAWAL *et al.*, 2003) que utilizou fase móvel constituída de tetracloreto de carbono: clorofórmio: acetona (6:4:1,5). Esses dados forneceram a base para o desenvolvimento do sistema cromatográfico adequado para a identificação da amostra.

Visando diminuir a toxicidade do sistema eluente utilizado no trabalho de AGRAWAL e colaboradores (2003), procurou-se evitar o uso de tetracloreto de carbono, substituindo-o por um solvente de características apolares semelhantes como, por exemplo, o hexano. Foram necessários ajustes nas proporções do eluente, além de substituir a acetona por etanol cuja polaridade é semelhante.

A fim de demonstrar a seletividade do método proposto, submeteu-se à análise cromatográfica a SQR de ticlopidina. Este fármaco diferencia-se estruturalmente do clopidogrel por não apresentar os carbonos 15 e 16 que compõem o grupamento metil-éster do clopidogrel.

O método desenvolvido mostrou-se adequado para a identificação do clopidogrel em comprimidos revestidos, além de mostrar-se capaz de diferenciar o clopidogrel de seu análogo, a ticlopidina.

A comparação dos valores de Rf permite afirmar que a SQR e o produto farmacêutico de clopidogrel possuem a mesma identidade.

5.2.2 Espectrofotometria na região Ultravioleta

5.2.2.1 Resultados

Os espectros de UV do clopidogrel SQR e produto farmacêutico estão representados na Figura 11.

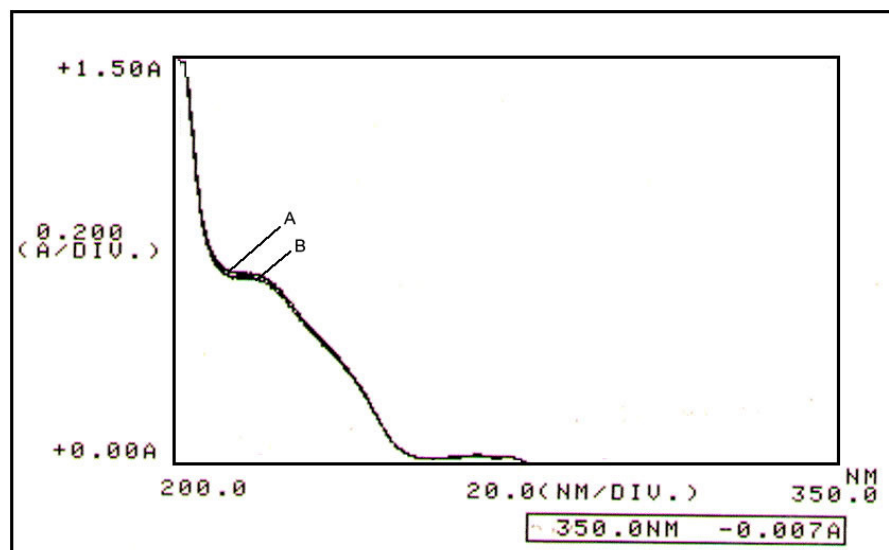


Figura 11 – Espectros das soluções de clopidogrel em HCl 0,01 M (18µg/ml) do produto farmacêutico (A) e SQR (B) obtidos por espectrofotometria na região UV.

5.2.2.2 Discussão

O espectro UV é freqüentemente utilizado na identificação de substâncias por ser de fácil execução, rápido e de baixo custo (WATSON, 2003). Na presença da SQR torna-se um método bastante útil para a verificação da identidade da amostra, pois a substância em análise apresenta perfil de absorção igual ao do padrão de referência.

Na identificação do clopidogrel em comprimidos revestidos obteve-se o mesmo perfil de absorção para a SQR e amostra de comprimidos. Portanto, é possível

caracterizar a presença do fármaco na formulação farmacêutica através da similaridade dos perfis de absorção.

5.2.3 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

5.2.3.1 Resultados

As Figuras 12 e 13 representam os cromatogramas obtidos para a identificação do clopidogrel no produto farmacêutico por CLAE.

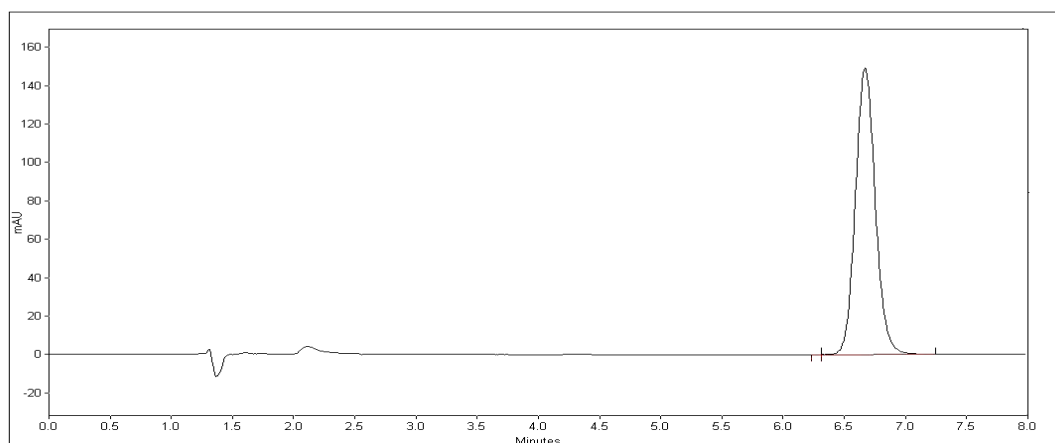


Figura 12 - Cromatograma referente à solução de clopidogrel SQR (45,0 µg/ml).

Condições cromatográficas: fase móvel constituída de metanol e solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 (75:25 v/v); fluxo de 1,2 ml/min; coluna ACE 5 C18 *end capped* (150 mm x 4,6 mm, 5 µ); detecção em λ de 220 nm; volume de injeção de 20 µl; temperatura de análise de 25 °C)

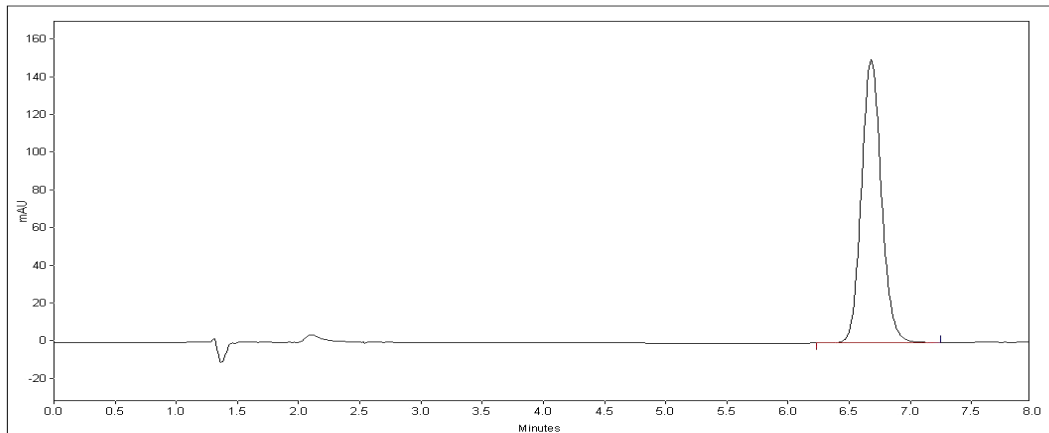


Figura 13 - Cromatograma referente à solução de clopidogrel (45,0 $\mu\text{g/ml}$) do produto farmacêutico.

Condições cromatográficas: fase móvel constituída de metanol e solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 (75:25 v/v); fluxo de 1,2 ml/min; coluna ACE 5 C18 *end capped* (150 mm x 4,6 mm, 5 μ); detecção em λ de 220 nm; volume de injeção de 20 μl ; temperatura de análise de 25 $^{\circ}\text{C}$

Com o auxílio do detector de arranjo de diodos foi possível traçar os espectros na região UV dos picos correspondentes a SQR e amostra comercial de clopidogrel. A Figura 14 apresenta os respectivos espectros.

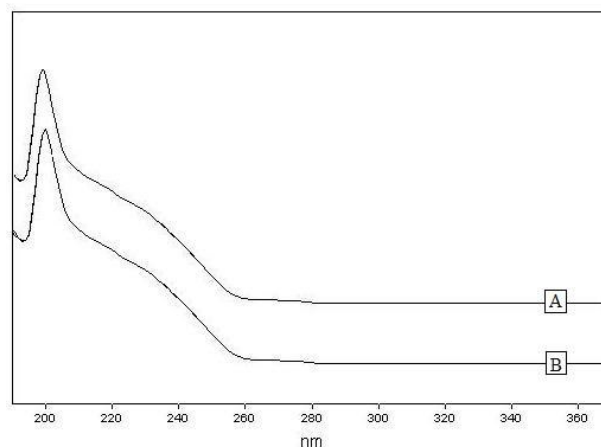


Figura 14 – Sobreposição dos espectros na região UV, obtidos com detector de arranjo de diodos para clopidogrel SQR (A) e produto farmacêutico (B).

5.2.3.2 Discussão

O método de CLAE, por ser um método de separação, fornece elevada seletividade na identificação de componentes de uma amostra, garantindo a identidade de substâncias desde que haja um padrão de referência de identidade conhecida.

A identificação do clopidogrel foi realizada pela comparação dos tempos de retenção. Ambos os cromatogramas apresentaram pico no tempo de 6,6 minutos. Além disso, os perfis dos espectros de absorção do clopidogrel na forma farmacêutica e SQR se sobrepõem perfeitamente. Estes resultados confirmam a mesma identidade da SQR e do produto farmacêutico.

5.2.4 Eletroforese Capilar

5.2.4.1.1 Resultados

A Figura 15 apresenta os eletroferogramas do clopidogrel SQR e amostra dos comprimidos revestidos.

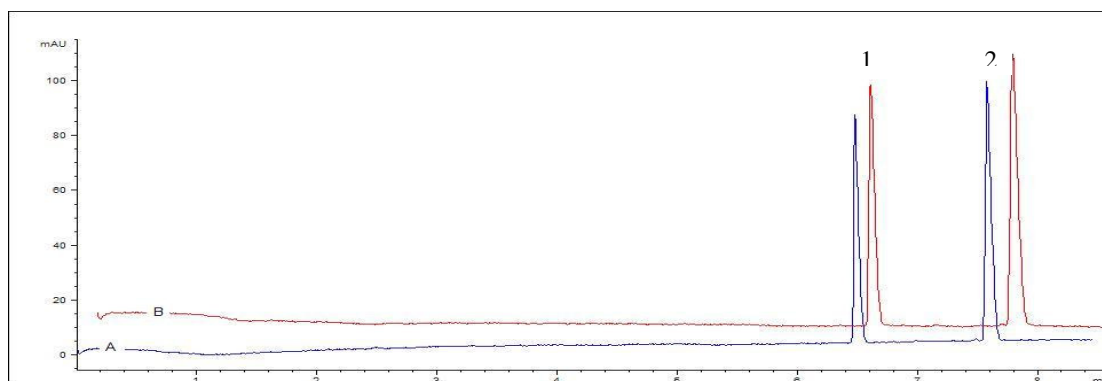


Figura 15 – Eletroferogramas obtidos pelo método de EC para soluções de SQR (A) e produto farmacêutico (B) de clopidogrel (2), contendo o padrão interno tiabendazol (1).

Condições de análise: Capilar de sílica fundida (75 μm d.i., 50 cm comprimento total, 40,5 cm comprimento efetivo); eletrólito de corrida tampão fosfato 20 mM , pH 2,5; tensão aplicada 25 kV em rampa; temperatura de análise 25 $^{\circ}\text{C}$; $\lambda = 220$ nm.

As Figuras 16 e 17 representam os espectros de absorção na região UV dos picos correspondentes ao clopidogrel SQR e nas amostras comerciais, obtidos com o auxílio de detector de arranjo de diodos.

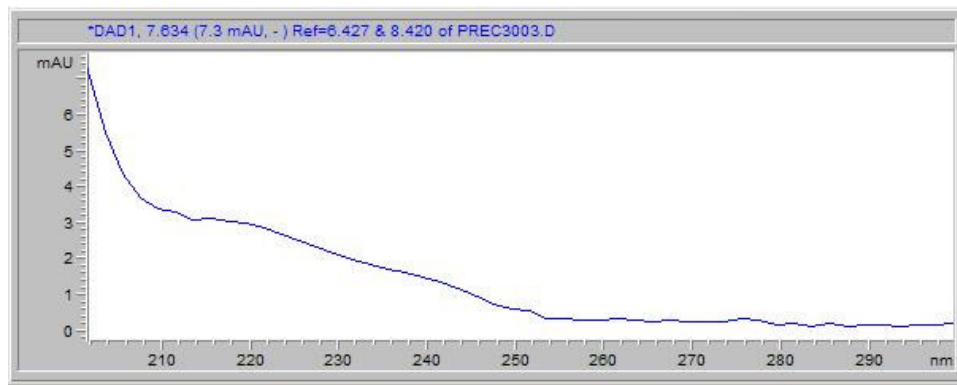


Figura 16 – Espectro na região do UV obtido para o clopidogrel SQR com detector de arranjo de diodos.

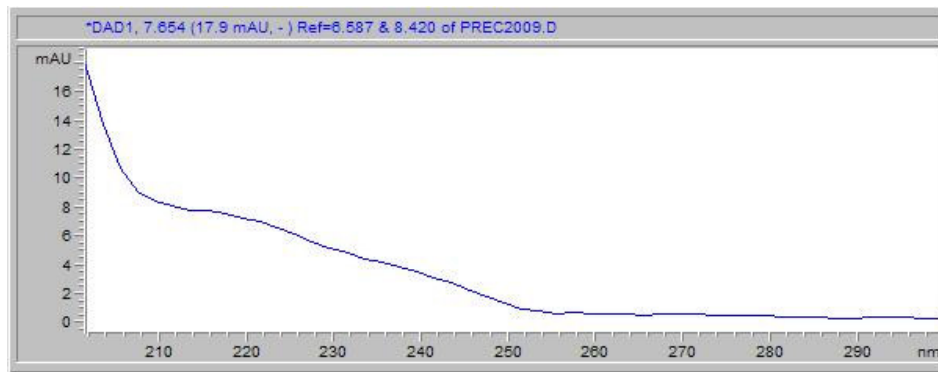


Figura 17 – Espectro na região do UV obtido com detector de arranjo de diodos para o clopidogrel da amostra de comprimidos.

5.2.4.1.2 Discussão

A identificação de substâncias através do método de EC é possível a partir da comparação dos tempos de migração dos compostos. A Figura 15 apresenta os eletroferogramas das soluções de SQR e amostra dos comprimidos de clopidogrel. Em ambas as soluções foi adicionado o padrão interno tiabendazol que apresentou tempo

de migração de 6,5 minutos. O segundo pico do eletroferograma corresponde ao clopidogrel, cujo tempo de migração foi de 7,6 minutos nos dois eletroferogramas. A identidade da substância na preparação farmacêutica é confirmada pela comparação dos tempos de migração e dos espectros de UV (Figuras 16 e 17), obtidos com o auxílio do detector de arranjo de diodos.

5.3 Análise Quantitativa

5.3.1 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta

5.3.1.1 Resultados

5.3.1.1.1 Especificidade

Na Figura 18 está representado o espectro de absorção da solução de clopidogrel no produto farmacêutico e da solução placebo, ambas em HCl 0,01 M.

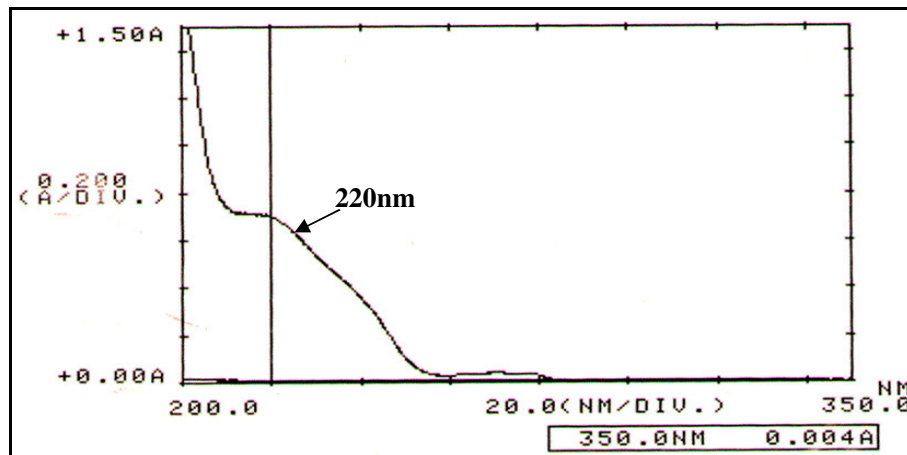


Figura 18 – Sobreposição dos espectros de absorção na região UV da solução de clopidogrel no produto farmacêutico (18,0 µg/ml) e da solução placebo.

5.3.1.1.2 Curva padrão

A Tabela 10 apresenta os valores de absorvância obtidos para as respectivas concentrações analisadas na curva padrão. Também estão representados os valores de erro padrão da média (e.p.m.) e de desvio padrão relativo (DPR).

Tabela 10 – Valores de absorvância obtidos para a curva padrão de clopidogrel por espectrofotometria UV no comprimento de onda de 220 nm.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorvância *	Absorvância média \pm e.p.m.	DPR
6,0	0,232	0,234 \pm 0,001	1,58
	0,232		
	0,239		
12,0	0,475	0,474 \pm 0,002	1,10
	0,478		
	0,467		
18,0	0,697	0,699 \pm 0,002	0,94
	0,705		
	0,693		
24,0	0,920	0,925 \pm 0,001	0,50
	0,928		
	0,927		
30,0	1,154	1,152 \pm 0,0005	0,15
	1,151		
	1,151		
36,0	1,379	1,378 \pm 0,0006	0,14
	1,376		
	1,380		

* Cada valor é média de três determinações.

A curva padrão de clopidogrel está representada na Figura 19, onde também se encontram a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r) obtidos na determinação da linearidade do método.

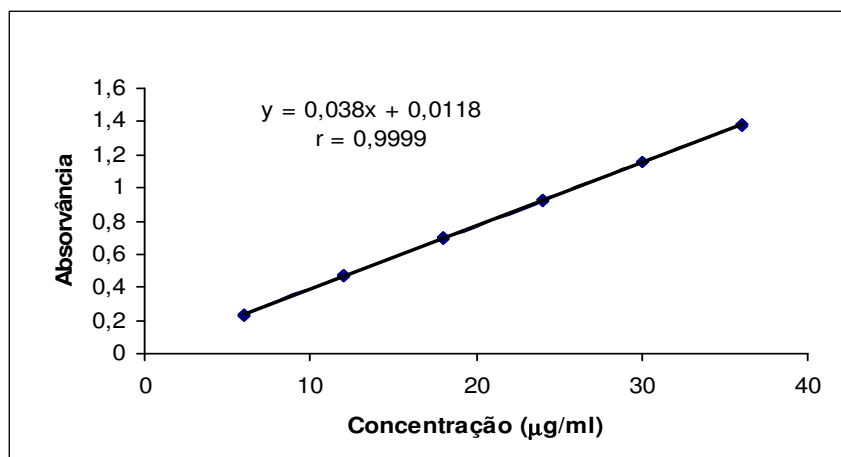


Figura 19 – Representação gráfica da curva padrão de clopidogrel obtida pelo método de espectrofotometria UV.

Na Tabela 11 constam os valores da Análise de Variância (ANOVA) utilizada para a avaliação da linearidade do método.

Tabela 11 – Análise de Variância das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão de clopidogrel por espectrofotometria UV.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	5	4,41923	0,88385	47208,42*
- regressão linear	1	4,41902	4,41902	236030,92*
- desvio de linearidade	4	0,00021	$5,229 \cdot 10^{-5}$	2,79
Resíduo	12	0,00022	$1,872 \cdot 10^{-5}$	
Total	17			

* significativo para $p=0,05$.

5.3.1.1.3 Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos

Os resultados da determinação de clopidogrel na forma farmacêutica para a avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores experimentais obtidos na determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos por espectrofotometria UV para a avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária ($\lambda=220$ nm).

Precisão Intradia (n=6)				
	Teor (%)		Média	DPR
Dia 1	99,14	100,48	99,88	0,46
	99,76	100,19		
	100,0	99,71		
Dia 2	99,66	100,10	99,39	0,43
	99,04	98,99		
	99,38	99,18		
Dia 3	98,97	98,66	99,48	0,63
	99,90	99,19		
	100,14	100,05		
Precisão intermediária (n=18)				
Média (%)			99,54	
DPR			0,59	

5.3.1.1.4 Teste de Recuperação

Os resultados obtidos na avaliação da exatidão através do teste de recuperação estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 - Percentuais de recuperação determinados na avaliação da exatidão do método de espectrofotometria UV ($\lambda=220$ nm)

	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada	Recuperada *		
R1	3,0	3,14	104,84	102,34
R2	6,0	6,19	103,10	
R3	12,0	11,62	99,08	

* cada valor equivale à média de três determinações.

5.3.1.2 Discussão

A espectrofotometria UV é um método de ampla aplicação em análises farmacêuticas, podendo ser aplicada como uma técnica alternativa na ausência de equipamentos mais sofisticados tais como o cromatógrafo a líquido.

No desenvolvimento do método foram testados diferentes solventes, com base na solubilidade da molécula. Primeiramente, para a extração do clopidogrel dos comprimidos, testou-se metanol, água, a mistura de metanol e água (80:20) e acetonitrila. Os espectros obtidos com o uso destes solventes foram semelhantes, no entanto, foi constatada a interferência de excipientes da formulação o que comprometia a especificidade do método. A Figura 20 apresenta os espectros obtidos na região UV com os diferentes solventes.

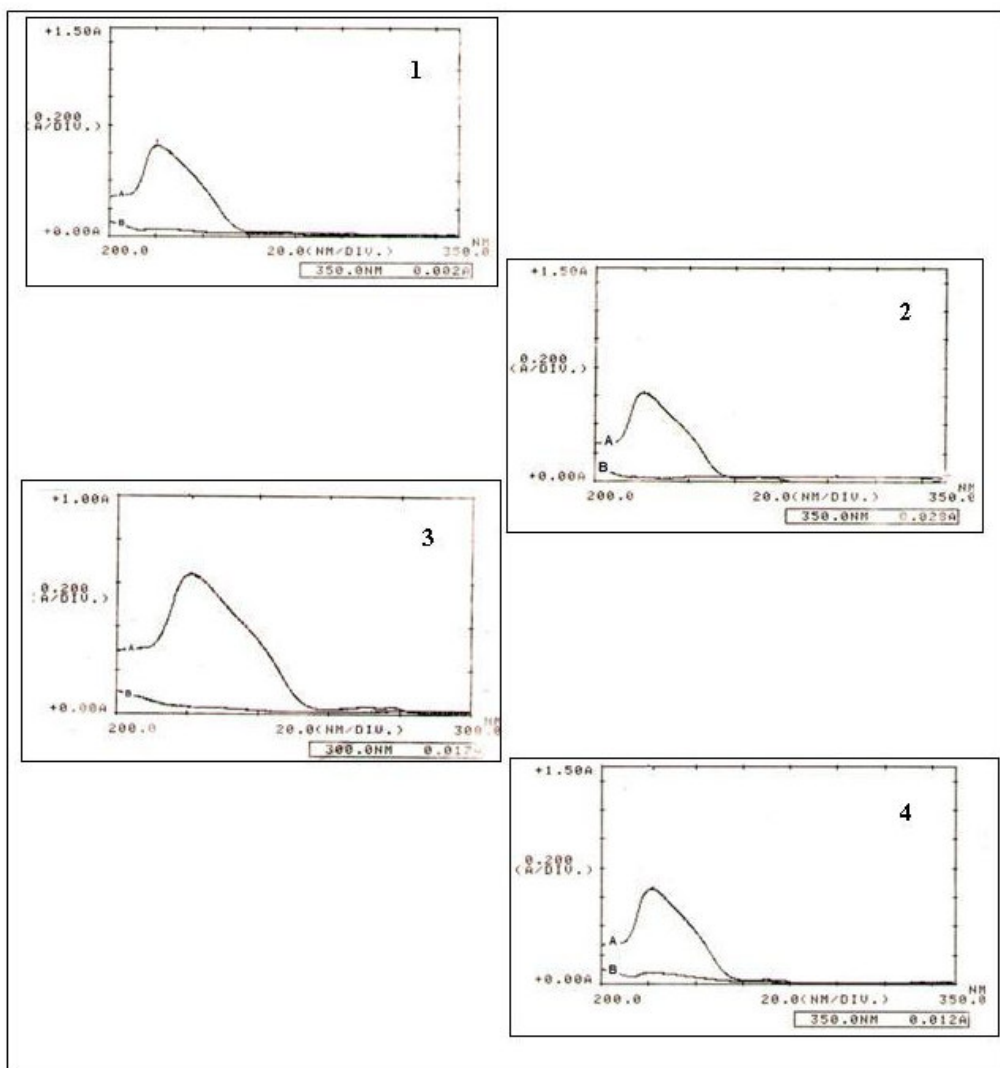


Figura 20 – Espectros na Região do UV obtidos para solução de clopidogrel 18,0 $\mu\text{g/ml}$ (A) e solução placebo (B) nos solventes 1- metanol; 2- metanol e água (80:20); 3- água pH 3,0; 4- acetonitrila.

Testou-se, então, como solvente para extração a solução de HCl 0,01 M. O perfil do espectro obtido para o clopidogrel nessa solução não sofreu variações significativas quando comparado aos demais perfis obtidos em outros solventes. Adicionalmente, a interferência dos excipientes foi anulada completamente, o que favoreceu a utilização do HCl 0,01 M para a extração e posterior solubilização das amostras para análise.

Selecionou-se como comprimento de onda de análise o valor de 220 nm, pois trata-se da região em que o clopidogrel apresenta absorção adequada para sua determinação. Além disso, nesse comprimento de onda não existem interferências oriundas dos excipientes presentes na formulação, que foi demonstrado pela análise da solução placebo (Figura 18).

A linearidade do método foi avaliada na faixa de 6,0 a 36,0 µg/ml. O gráfico construído plotando-se os dados de concentração (µg/ml) *versus* absorvância demonstrou proporcionalidade entre os dois fatores. A equação da reta obtida a partir do estudo de regressão linear foi $y = 0,038x + 0,0118$. O coeficiente de correlação linear calculado foi de 0,9999, indicando a elevada correlação entre os valores de concentração e as respectivas absorvâncias. Com a finalidade de comprovar estatisticamente a linearidade do método, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA), que confirmou regressão linear significativa, e desvio de linearidade não significativo para o intervalo de confiança de 95%.

Em um primeiro momento, na determinação da precisão, pesou-se o pó obtido na trituração dos comprimidos revestidos, porém, este procedimento resultou em valores de DPR elevados. A trituração de comprimidos revestidos gera uma mistura não homogênea, acarretando em pesagens de conteúdos não equivalentes. Optou-se, portanto, pela dissolução dos comprimidos inteiros no solvente de escolha, procedimento já adotado por GARCIA e colaboradores (2006), na determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos.

Na avaliação da precisão determinou-se o clopidogrel em comprimidos revestidos em um mesmo dia (repetibilidade) e em três dias diferentes (precisão intermediária). Pode-se afirmar que o método tem adequada precisão pelos baixos valores de DPR obtidos para a repetibilidade (0,46%) e para a precisão intermediária (0,59%). O teor médio de clopidogrel nos comprimidos revestidos foi de 99,54%.

O teste de recuperação apresentou faixa de recuperação de 99,08% a 104,84% com percentual médio de recuperação de 102,34%. Estes valores estão de acordo com

a faixa preconizada pela literatura que é de 95,0 a 105,0%, o que indica que o método de UV para a determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos é exato.

O limite de detecção calculado a partir dos dados das curvas padrão apresentou valor de 0,35 µg/ml e o limite de quantificação foi de 1,08 µg/ml. Estes valores demonstram a sensibilidade do método proposto.

Considerando-se os resultados obtidos para todos os parâmetros analíticos avaliados, pode-se afirmar que o método de espectrofotometria no UV está validado para a quantificação do clopidogrel na forma farmacêutica comprimidos revestidos. Adicionalmente, pode-se afirmar que o método de UV validado pode ser útil para a avaliação futura do perfil de dissolução do clopidogrel em preparações farmacêuticas, pois utiliza HCl 0,01 M como solvente e apresenta especificidade adequada.

5.3.2 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

5.3.2.1 Resultados

5.3.2.1.1 Especificidade

As Figuras 21 a 25 representam os cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do método de CLAE. Estão apresentados os cromatogramas referentes à solução placebo e às soluções de clopidogrel degradadas sob diferentes condições.

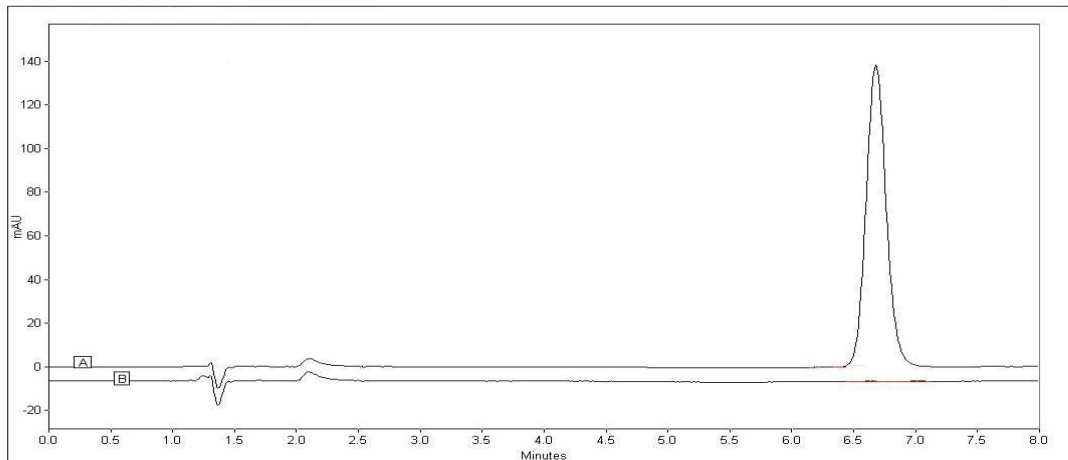


Figura 21 – Sobreposição dos cromatogramas das soluções de clopidogrel produto farmacêutico (A) e de placebo (B) na concentração de 45,0 $\mu\text{g/ml}$.

Condições cromatográficas: fase móvel constituída de metanol e solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 (75:25 v/v); fluxo de 1,2 ml/min; coluna ACE 5 C18 *end capped* (150 mm x 4,6 mm, 5 μ); detecção em λ de 220 nm; volume de injeção de 20 μl ; temperatura de análise de 25 $^{\circ}\text{C}$

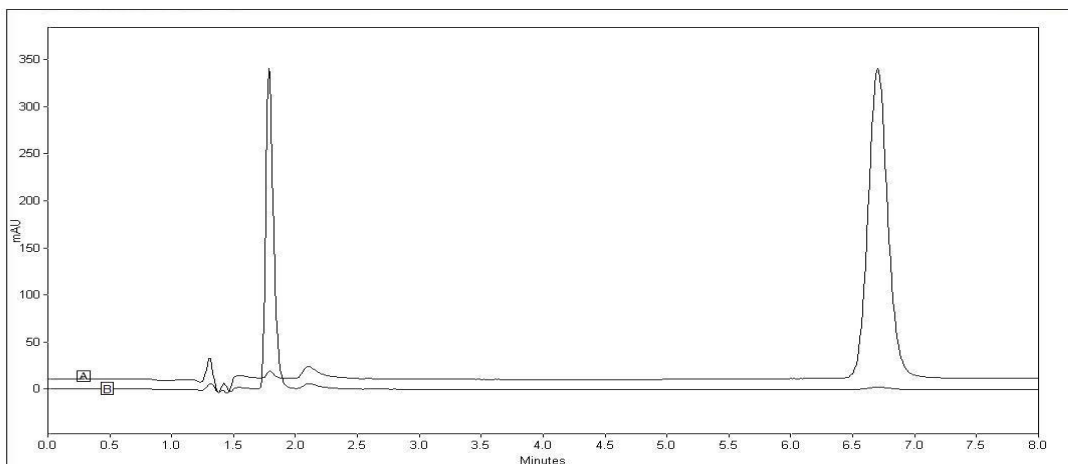


Figura 22 – Sobreposição dos cromatogramas da solução de clopidogrel no produto farmacêutico 45 $\mu\text{g/ml}$ (A) e da solução de clopidogrel degradada com NaOH 1,0 M, durante duas horas (B).

Condições cromatográficas: fase móvel composta de metanol e solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 (75:25 v/v); fluxo 1,2 ml/min; coluna ACE 5 C18 protegida (150 mm x 4,6 mm, 5 μ); detecção em λ de 220 nm; volume de injeção de 20 μl ; temperatura de análise de 25 $^{\circ}\text{C}$.

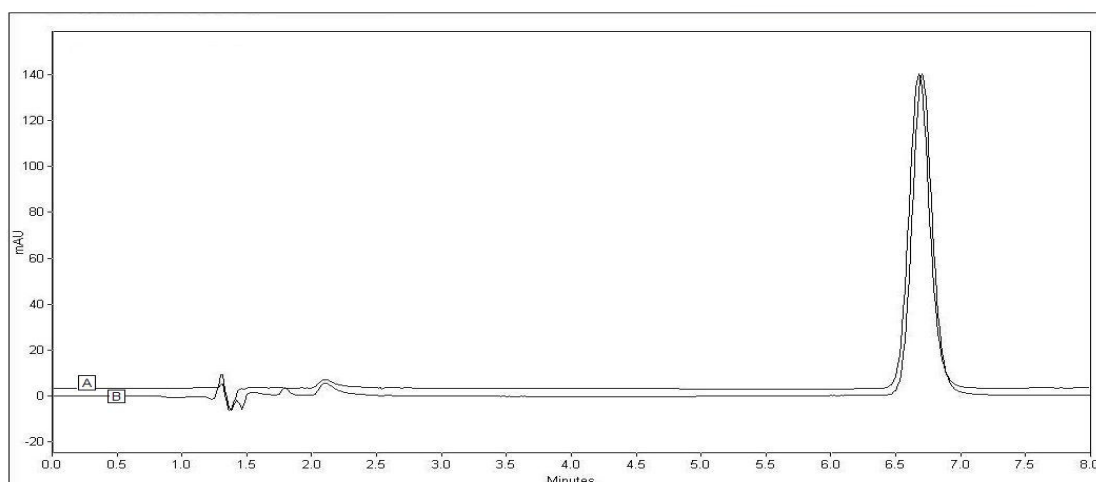


Figura 23 - Sobreposição dos cromatogramas da solução de clopidogrel no produto farmacêutico 45 µg/ml (A) e da solução de clopidogrel submetida a condições ácidas - HCl 1,0 M, durante duas horas (B).

Condições cromatográficas: fase móvel composta de metanol e solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 (75:25 v/v); fluxo 1,2 ml/min; coluna ACE 5 C18 protegida (150 mm x 4,6 mm, 5 µ); detecção em λ de 220 nm; volume de injeção de 20 µl; temperatura de análise de 25 °C.

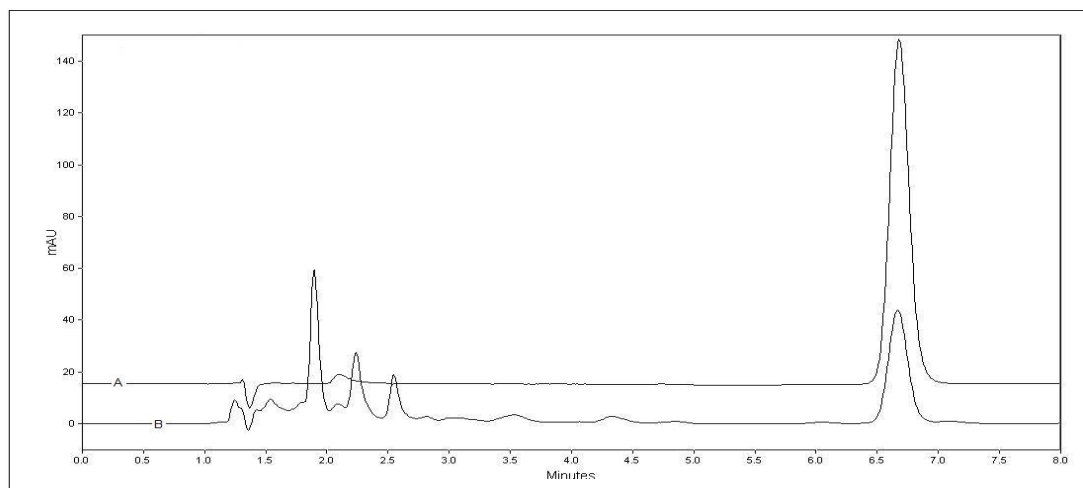


Figura 24 – Sobreposição dos cromatogramas da solução de clopidogrel no produto farmacêutico 45 µg/ml (A) e solução de clopidogrel degradada sob luz UV 254 nm durante duas horas (B).

Condições cromatográficas: fase móvel composta de metanol e solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 (75:25 v/v); fluxo 1,2 ml/min; coluna ACE 5 C18 protegida (150 mm x

4,6 mm, 5 μ); detecção em λ de 220 nm; volume de injeção de 20 μ l; temperatura de análise de 25 °C.

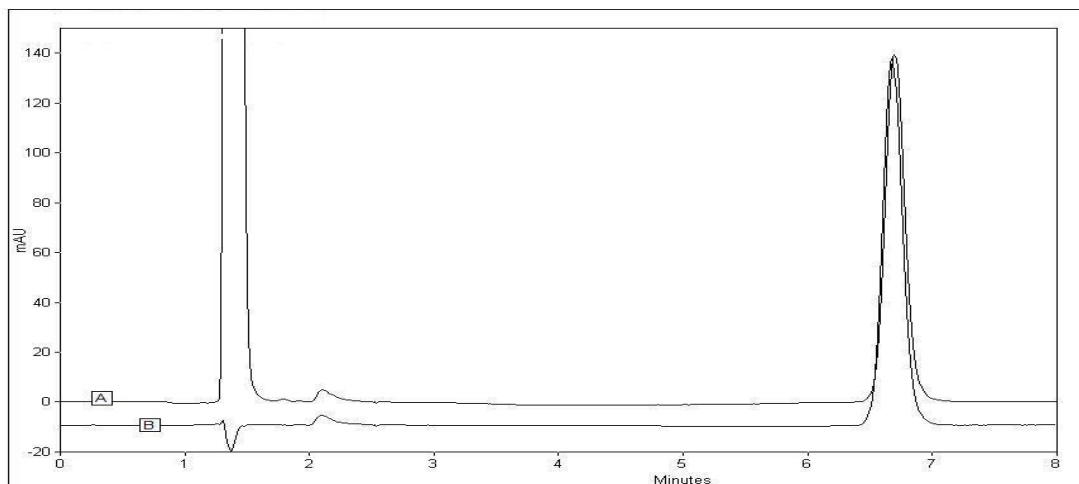


Figura 25 - Sobreposição dos cromatogramas da solução de clopidogrel submetida à degradação com H₂O₂ 30% por duas horas (A) e da solução de clopidogrel no produto farmacêutico 45 μ g/ml (B).

Condições cromatográficas: fase móvel composta de metanol e solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 (75:25 v/v); fluxo 1,2 ml/min; coluna ACE 5 C18 protegida (150 mm x 4,6 mm, 5 μ); detecção em λ de 220 nm; volume de injeção de 20 μ l; temperatura de análise de 25 °C.

5.3.2.1.2 Curva padrão

A Tabela 14 apresenta os valores das áreas absolutas obtidas para as respectivas concentrações analisadas na curva padrão pelo método de CLAE. Também estão representados os valores de erro padrão da média (e.p.m.) e de desvio padrão relativo (DPR).

Tabela 14 – Valores de área obtidos para a curva padrão de clopidogrel por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Área (mAU) *	Área média \pm e.p.m.	DPR
10,0	363724	368829,7 \pm 2777,40	1,30
	369502		
	373263		
15,0	566496	562642,7 \pm 2413,68	0,74
	563226		
	558206		
30,0	1154787	1146241,0 \pm 4966,10	0,75
	1146331		
	1137605		
45,0	1728020	1696470,7 \pm 17579,5	1,79
	1667339		
	1694053		
60,0	2253416	2260311,7 \pm 4524,6	0,34
	2258699		
	2268820		
75,0	2786433	2789782,7 \pm 4180,2	0,26
	2784833		
	2798082		
90,0	3343745	3368227 \pm 17207,7	0,89
	3359571		
	3401365		

* Cada valor é média de três determinações.

A curva padrão de clopidogrel está representada na Figura 26, onde também se encontram a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r) obtidos na determinação da linearidade do método.

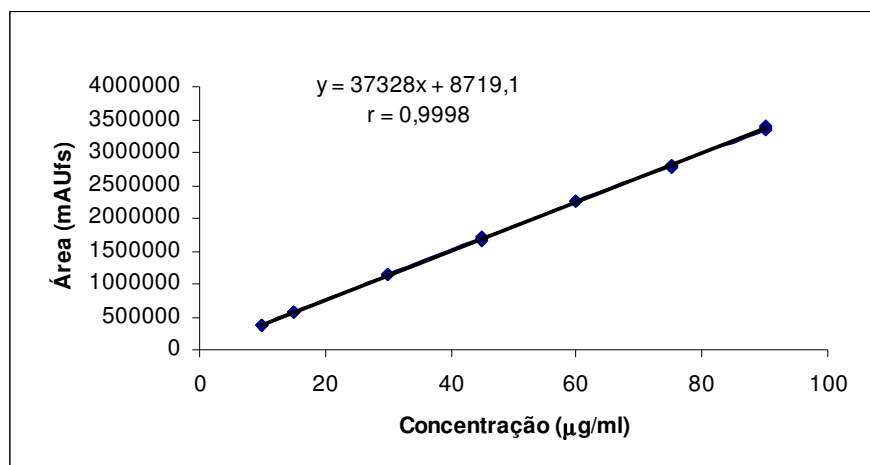


Figura 26 – Representação gráfica da curva padrão de clopidogrel obtida pelo método de CLAE.

Na Tabela 15, constam os valores da Análise de Variância (ANOVA) utilizada para a avaliação da linearidade do método.

Tabela 15 – Análise de Variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de clopidogrel por CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	6	$29337,74 \times 10^8$	$38222,95 \times 10^8$	13121,86 *
- regressão linear	1	$22930,56 \times 10^9$	$22930,56 \times 10^9$	78720,11*
- desvio de linearidade	5	$32142,34 \times 10^5$	$64284,68 \times 10^4$	2,21
Resíduo	14	$40780,91 \times 10^5$	$29129,22 \times 10^4$	
Total	20			

* Significativo para $p < 0,05$.

5.3.2.1.3 Determinação do bissulfato de clopidogrel em comprimidos revestidos

Os resultados da determinação de clopidogrel na forma farmacêutica para a avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos em três dias diferentes por CLAE, para a avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.

Precisão Intradia (n=6)				
	Teor (%)		Média	DPR
Dia 1	99,17	98,84	98,98	0,36
	99,57	98,66		
	98,63	99,04		
Dia 2	97,84	97,63	98,93	1,17
	100,30	99,50		
	98,29	100,05		
Dia 3	99,19	97,81	98,69	0,83
	99,63	98,63		
	99,25	97,84		
Precisão intermediária (n=18)				
Média (%)	98,87			
DPR	0,16			

5.3.2.1.4 Teste de Recuperação

Os resultados obtidos na avaliação da exatidão através do teste de recuperação estão representados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados experimentais do teste de recuperação na avaliação da exatidão do método de CLAE para o clopidogrel em comprimidos revestidos.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperada ($\mu\text{g/ml}$)*		
R1	10,0	10,00	100,00	
R2	20,0	20,05	100,25	99,16
R3	40,0	38,90	97,23	

5.3.2.1.5 Robustez

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos na avaliação da robustez do método realizada frente a pequenas modificações na composição da fase móvel.

Tabela 18 – Resultados experimentais para a avaliação da robustez do método de CLAE na determinação quantitativa do clopidogrel.

Fase móvel	Teor (%)	Pratos teóricos	Assimetria
Metanol:ST 0,1% (75:25) pH 5,3	98,87	8038,60	1,12
Metanol:ST 0,1% (77:23) pH=5,3	99,10	7854,79	1,12
Metanol:ST 0,1% (73:27) pH=5,3	99,83	8061,05	1,10
Metanol:ST 0,1% (75:25) pH=5,1	100,66	8067,56	1,12
Metanol:ST 0,1% (75:25) pH=5,5	100,90	8091,61	1,11

* ST = Solução de trietilamina 0,1%

5.3.2.1.6 Limites de Detecção e de Quantificação

A Figura 27 representa o cromatograma da solução de 0,15 $\mu\text{g/ml}$, que forneceu uma relação de sinal ruído de 3:1. O cromatograma obtido para solução de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, apresentou a relação de sinal ruído de 10:1 (Figura 27).

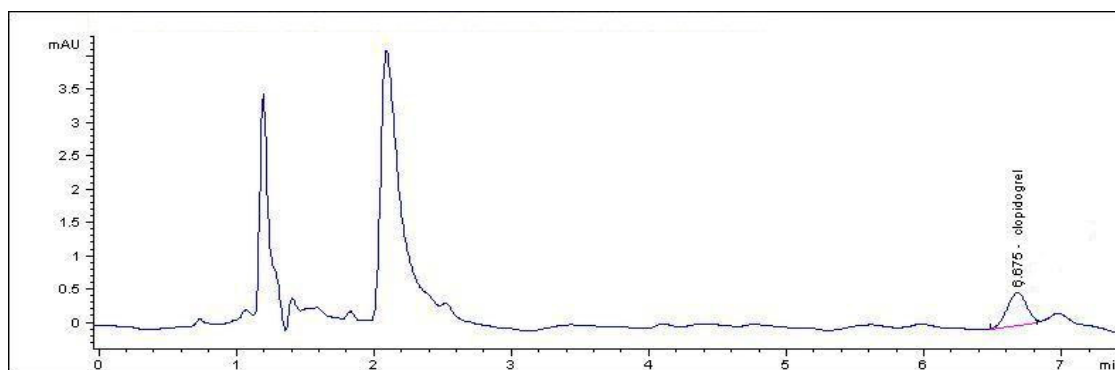


Figura 27 – Cromatograma da solução 0,15 $\mu\text{g/ml}$, obtido na determinação do limite de detecção, pelo método de CLAE.

Condições cromatográficas: fase móvel composta de metanol e solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 (75:25 v/v); fluxo 1,2 ml/min; coluna ACE 5 C18 protegida (150 mm x 4,6 mm, 5 μ); detecção em λ de 220 nm; volume de injeção de 20 μl ; temperatura de análise de 25 $^{\circ}\text{C}$.

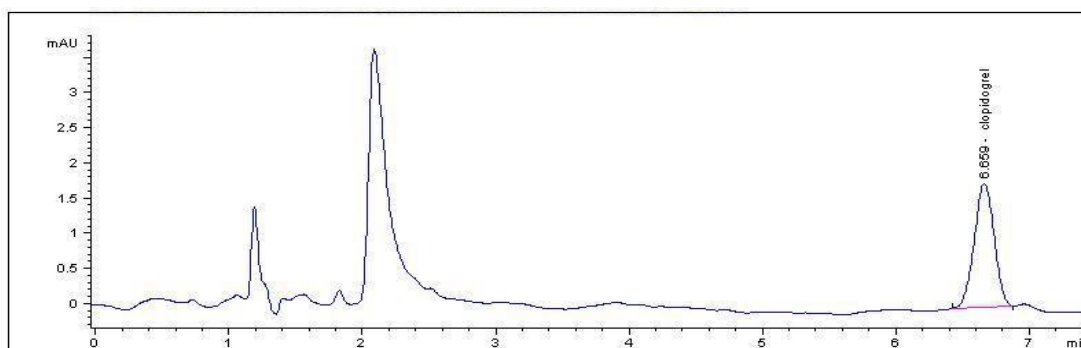


Figura 28 – Cromatograma da solução 0,5 $\mu\text{g/ml}$, obtido na determinação do limite de quantificação pelo método de CLAE.

Condições cromatográficas: fase móvel composta de metanol e solução de trietilamina 0,1% pH 5,3 (75:25 v/v); fluxo 1,2 ml/min; coluna ACE 5 C18 protegida (150 mm x

4,6 mm, 5 μ); detecção em λ de 220 nm; volume de injeção de 20 μ l; temperatura de análise de 25 °C.

5.3.2.2 Discussão

Os métodos cromatográficos são amplamente utilizados em laboratórios de análise para a determinação quali e quantitativa de fármacos, produtos acabados, matérias-primas e amostras biológicas em todas as fases do desenvolvimento do fármaco desde a pesquisa até o controle de qualidade (SWARTZ; KRULL, 1998).

A CLAE, combinada com detectores de UV/visível, fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa de produtos farmacêuticos. Além disso, é uma técnica versátil possibilitando o monitoramento da estabilidade de substâncias e a quantificação de produtos de degradação em formulações farmacêuticas. (WATSON, 2003)

Nos ensaios preliminares testaram-se diversas composições de fase móvel variando-se a proporção e a polaridade da mesma. Entre elas, avaliou-se a mistura acetonitrila:água e acetonitrila:solução de trietilamina 0,1%, acetonitrila:tampão fosfato pH 6,6, metanol:solução de trietilamina 0,1%, em diferentes proporções. Num primeiro momento, optou-se pelo uso de acetonitrila:solução de trietilamina 0,1%, que forneceu tempo de retenção adequado e excelentes parâmetros de performance analítica. No entanto, testes com a solução degradada de clopidogrel revelaram a existência de interferentes no tempo de retenção do clopidogrel.

Testou-se, então, fase móvel composta de metanol:solução de trietilamina 0,1%. (70:30), que resultou em tempo de retenção acima de 9 minutos. Modificou-se a proporção de fase móvel para 75:25 e aumentou-se o fluxo para 1,2 ml/min, o que reduziu o tempo de análise para 6,6 minutos. O aumento do fluxo e da proporção de fase orgânica na fase móvel possibilitou a diminuição do tempo de retenção do clopidogrel.

A obtenção de picos mais simétricos foi possível devido à adição de trietilamina à fase móvel. O clopidogrel é uma base fraca que apresenta pKa 4,5. Bases fracas,

como o clopidogrel, quando ionizadas interagem com os grupamentos silanóis ácidos da coluna causando um aumento no tempo de retenção e alargamento dos picos (SNYDER, 1997). Tais eventos podem ocorrer mesmo quando se faz uso de colunas protegidas; entretanto, esse problema pode ser resolvido com o acréscimo de uma base competitiva na fase móvel (LINDSAY, 1987).

A escolha do pH acima do pKa, permitiu que a molécula de clopidogrel estivesse na forma não ionizada, impedindo sua interação com os grupamentos silanóis ionizados. A adição de aminas à fase móvel afeta a separação de compostos básicos resultando em um aumento na simetria dos picos, diminuindo também o tempo de retenção. Isso ocorre porque a amina bloqueia os grupamentos silanóis ionizados, diminuindo, assim, a interação de compostos básicos ionizados com a coluna (SNYDER, 1997).

A análise da solução placebo (Figura 21) demonstrou não haver interferência dos excipientes no tempo de retenção do clopidogrel. Adicionalmente, amostras de comprimidos revestidos foram submetidas a condições de estresse para a avaliação de possíveis produtos de degradação interferentes.

Na hidrólise alcalina não foi observado pico correspondente ao clopidogrel, podendo-se concluir que todo o clopidogrel presente na solução sofreu degradação. Observa-se no cromatograma (Figura 22), que ocorre a formação de um produto de degradação majoritário com tempo de retenção de 1,8 minutos e outro produto de degradação em 1,4 minutos. No trabalho de GOMEZ e colaboradores (2004) foi avaliada a presença de impurezas após a exposição dos comprimidos de clopidogrel a 40 °C e umidade relativa de 75%. Neste estudo foi verificado que as principais vias de degradação do clopidogrel são a hidrólise e a racemização da molécula. É provável que, quando em meio alcalino, o clopidogrel sofra a quebra do grupamento éster. Esta reação envolve a ruptura da ligação covalente entre um átomo de carbono e um átomo de oxigênio catalizada por prótons ou íons hidroxila. A hidrólise alcalina de um éster não difere da hidrólise ácida, exceto pelo fato de ser irreversível, e conseqüentemente,

quantitativa, uma vez que o ácido resultante é neutralizado imediatamente. (LACHMAN, 2001). Os produtos de degradação formados, neste caso, seriam o derivado ácido carboxílico do clopidogrel e um álcool, o metanol. Nas condições de hidrólise ácida, não houve diminuição do teor de clopidogrel, conforme pode ser observado na Figura 23. Esse resultado indica também que o clopidogrel permanece estável nas soluções estoque por, no mínimo, duas horas.

A degradação sob luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm) apresentou maior formação de produtos de degradação. Observam-se picos adicionais no cromatograma (Figura 24) em 1,8 min, 2,3 min e em 2,55 min. O cromatograma da solução submetida à oxidação não apresentou degradação (Figura 25). Verifica-se somente a presença do pico em 1,5 minutos relativo ao estabilizante adicionado à solução de peróxido de hidrogênio, que absorve na região do ultravioleta.

Portanto, considera-se que o método de CLAE para a determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos é específico, pois não apresenta interferência da solução placebo, nem dos produtos de degradação no tempo de retenção do clopidogrel. Além disso, em todas as condições testadas o pico do analito se manteve puro, conforme verificado pelo índice de pureza do pico.

A curva padrão foi construída plotando-se os dados de concentração (10,0 a 90,0 $\mu\text{g/ml}$) versus as respectivas áreas dos cromatogramas, obtendo-se equação da reta $y=37328x + 8719,1$ e coeficiente de correlação $r = 0,9998$. O valor de r próximo à unidade indica a correlação linear entre as concentrações e as áreas dos cromatogramas. A análise estatística dos dados (ANOVA) demonstrou não haver desvio da linearidade significativo e que há regressão linear significativa para nível de 95% de significância.

Os valores de DPR calculados para a repetibilidade e precisão intermediária foram de 0,36% e 0,16% o que demonstra a elevada precisão do método. Foi encontrado teor médio de 98,87% de clopidogrel nos comprimidos revestidos.

Na análise da exatidão foram encontrados percentuais de recuperação entre 97,23% e 100,25% e o teor percentual médio foi de 99,16%, o que indica a exatidão do método proposto.

Na Tabela 18 estão representados os resultados da avaliação da robustez do método. Conforme pode ser observado, pequenas variações na composição e no pH da fase móvel não afetam a quantificação do fármaco. Além disso, não há alterações significativas nos parâmetros de performance como eficiência e assimetria do pico. O único fator que sofreu alteração foi o tempo de retenção; porém, não houve prejuízo para as análises.

Para determinar os limites de detecção e de quantificação foram avaliadas as relações sinal/ruído dos cromatogramas de amostras em baixas concentrações. A concentração de 0,15 µg/ml forneceu valor de relação sinal/ruído de 3:1, valor que estima o limite de detecção. Para o limite de quantificação foi encontrado o valor de concentração de 0,5 µg/ml cuja relação sinal/ruído no cromatograma foi de 10:1.

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que o método de CLAE para a determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos está validado, pois todos os parâmetros avaliados apresentaram resultados condizentes com o estabelecido nas guias oficiais.

5.3.3 Eletroforese Capilar

5.3.3.1 Resultados

5.3.3.1.1 Especificidade

Na verificação da especificidade do método analisou-se solução placebo e solução de clopidogrel degradada sob luz ultravioleta 254 nm, cujos eletroferogramas estão representados nas Figuras 29 e 30.

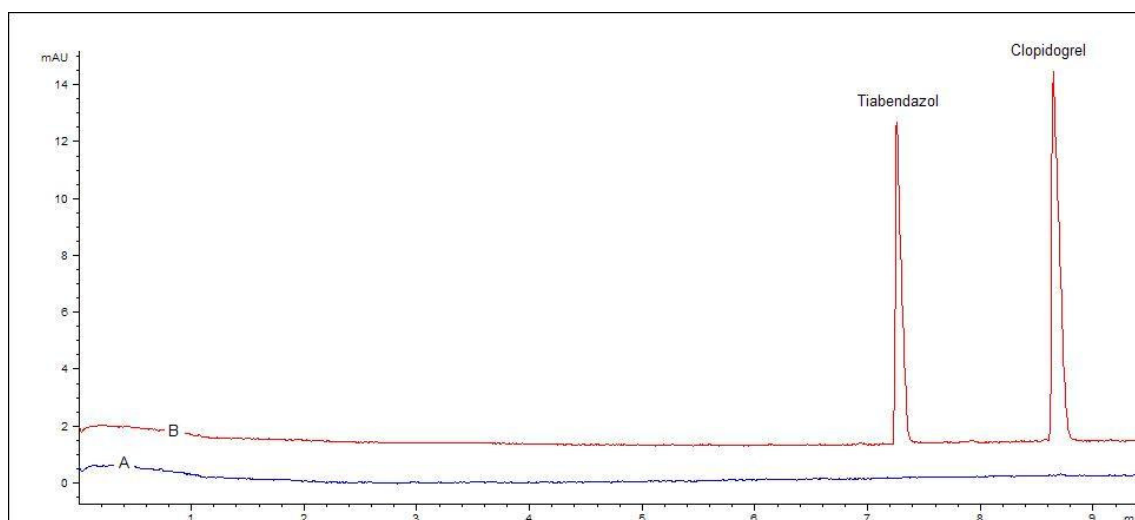


Figura 29– Eletroferogramas obtidos na análise da solução placebo de clopidogrel (A) e solução amostra de clopidogrel contendo padrão interno tiabendazol (B).

Condições de análise: Capilar de sílica fundida (75 μm d.i., 50 cm comprimento total, 40,5 cm comprimento efetivo); eletrólito de corrida tampão fosfato 20 mM, pH 2,5; tensão aplicada 25 kV em rampa; temperatura de análise 25 °C; $\lambda = 220$ nm.

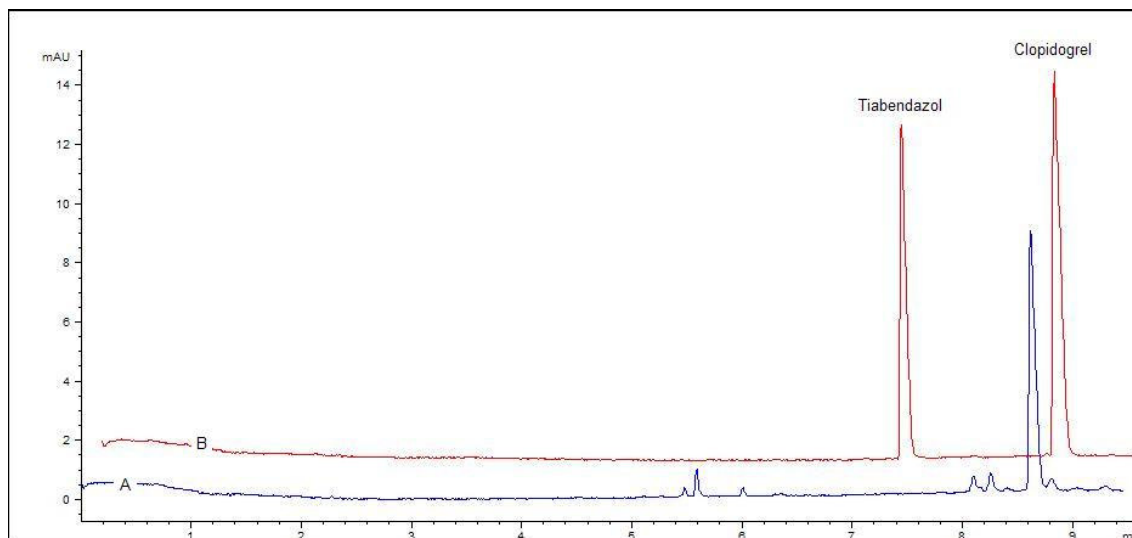


Figura 30 – Eletroferogramas obtidos na análise da especificidade para solução amostra de clopidogrel degradada sob luz UV 254nm (A) e solução amostra de clopidogrel não degradada contendo padrão interno tiabendazol (B).

Condições de análise: Capilar de sílica fundida (75 μm d.i., 50 cm comprimento total, 40,5 cm comprimento efetivo); eletrólito de corrida tampão fosfato 20 mM, pH 2,5; tensão aplicada 25 kV em rampa; temperatura de análise 25 °C; $\lambda = 220$ nm.

5.3.3.1.2 Curva Padrão

A Tabela 19 apresenta os valores da razão das áreas dos eletroferogramas obtidas pelo método de EC na avaliação da linearidade do método.

A curva padrão de clopidogrel obtida para o intervalo de 10,0 a 50,0 $\mu\text{g/ml}$ está representada na Figura 31, onde também pode ser visualizada a equação da reta e o coeficiente de correlação r .

Tabela 19 – Valores da razão das áreas (Clopidogrel/ Tiabendazol) obtidas na determinação da curva padrão de clopidogrel pelo método de EC.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Razão das áreas*	Razão média das áreas \pm e.p.m.	DPR
	0,458		
10,0	0,486	$0,477 \pm 0,0095$	3,45
	0,487		
	0,906		
20,0	0,916	$0,916 \pm 0,0063$	1,20
	0,928		
	1,385		
30,0	1,456	$1,413 \pm 0,0216$	2,64
	1,400		
	1,816		
40,0	1,99	$1,916 \pm 0,0519$	4,69
	1,942		
	2,23		
50,0	2,386	$2,307 \pm 0,045$	3,38
	2,307		

* Cada valor é média de três determinações.

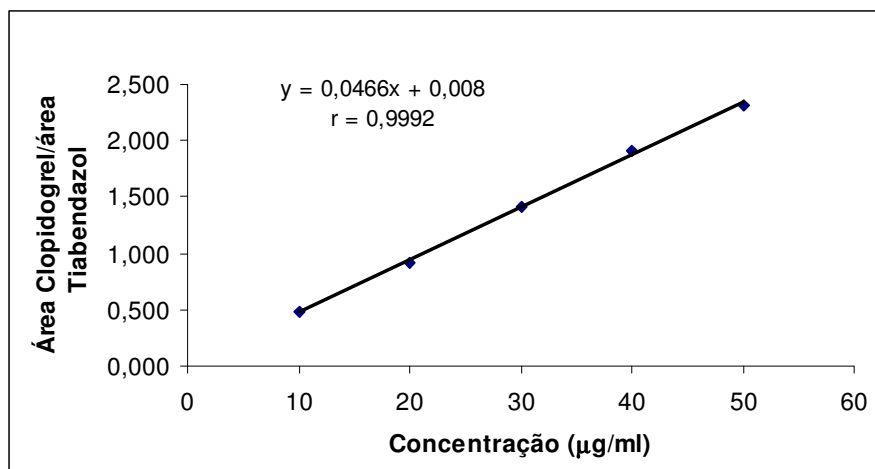


Figura 31 – Representação esquemática da curva padrão de clopidogrel obtida pelo método de EC.

A Tabela 20 apresenta os resultados da Análise de Variância aplicada aos dados obtidos da curva padrão

Tabela 20 – Análise de Variância para a Curva Padrão de Clopidogrel pelo método de EC.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	4	6,527	1,6317	511,4 *
- regressão linear	1	6,517	6,5165	2042,4*
- desvio de linearidade	3	0,010	0,0035	1,09
Resíduo	10	0,032	0,0032	
Total	14			

* significativo para $p < 0,05$.

5.3.3.1.3 Precisão

A Tabela 21 apresenta os teores percentuais médios de clopidogrel nos comprimidos revestidos, obtidos na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária do método de EC.

Tabela 21 – Avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária do método de EC para determinação de clopidogrel em comprimidos revestidos.

Precisão Intradia (n=6)				
	Teor (%)		Média (%)	DPR (%)
Dia 1	96,45	97,60	97,56	0,75
	98,56	97,55		
	97,14	98,04		
Dia 2	97,69	96,47	98,34	1,08
	98,80	99,0		
	99,30	98,75		
Dia 3	97,84	99,59	99,72	1,74
	98,15	102,23		
	99,21	101,27		
Precisão intermediária (n=18)				
Média (%)			98,53	
DPR			1,51	

5.3.3.1.4 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi realizada por Análise de Variância, comparando-se os resultados obtidos pelo método de EC com os resultados do método

de CLAE, previamente validado. A Tabela 22 apresenta os resultados ANOVA para a comparação dos métodos de CLAE e EC.

Tabela 22 – Resultados da ANOVA na comparação dos métodos de CLAE e EC.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	1	1,013	1,013	0,708 *
Dentro	34	48,653	1,430	
Total	35	49,666		

* Não significativo para $\alpha=0,05$

5.3.3.2 Discussão

A EC é um método de separação relativamente recente, descrita na literatura a partir de 1981, tendo se desenvolvido rapidamente desde sua introdução e com ampla utilização em análises farmacêuticas. Este método permite a análise de compostos polares iônicos e não-iônicos, biomoléculas de elevada massa molecular e compostos quirais (SANTORO *et al.*, 2000).

Conforme pode ser observado na Figura 32 os principais componentes de um sistema de EC correspondem uma fonte de alta voltagem (A), um capilar (B) que passa através do centro óptico de um sistema de detecção (C), conectado a um centro de aquisição de dados, além de um sistema de introdução da amostra e um auto-injetor (ALTRIA, 1996).

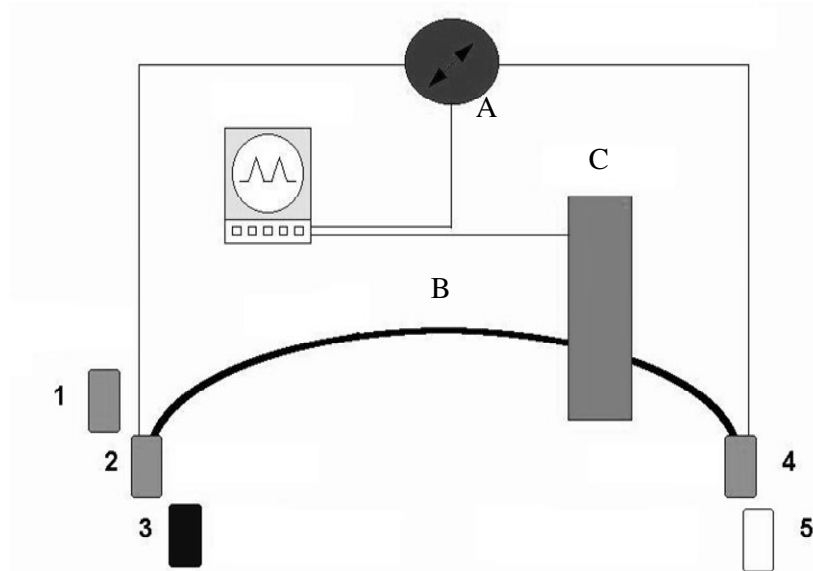


Figura 32 – Representação esquemática do sistema de EC. (1) reservatório do eletrólito de lavagem para o capilar; (2 e 4) reservatório do eletrólito de corrida eletroforética; (3) reservatório da amostra; (5) reservatório para o resíduo.

Os modos de introdução da amostra contemplam a injeção hidrodinâmica, na qual é aplicada pressão ou vácuo nos reservatórios de amostra presentes nas extremidades do capilar; a injeção por gravidade ou sifonamento, onde o reservatório de amostra é elevado mecanicamente, durante 10 segundos, a 5 cm acima do nível de outro reservatório contendo eletrólito, permitindo a introdução da amostra no capilar. Outro modo de injeção é o eletrocínético, no qual a tensão aplicada na amostra provoca a migração dos íons para o interior do capilar (SANTORO *et al.*, 2000).

Após a introdução da amostra, as extremidades do capilar são imersas em soluções do eletrólito de corrida, normalmente soluções tampão, e, sob a aplicação de um campo elétrico, ocorre a migração e separação dos componentes da amostra através do capilar.

A EC permite também a análise de compostos neutros. Isso é possível devido à presença do fluxo eletrosmótico (FEO). O FEO é gerado a partir dos grupamentos ácidos da sílica. Em contato com o meio aquoso, alguns desses grupamentos são

ionizados, tornando a superfície do capilar negativamente carregada. As cargas presentes na solução distribuem-se então de forma não homogênea na superfície do capilar, formando uma dupla camada elétrica. Esta, por sua vez, é constituída pela camada compacta, adjacente à superfície, e pela camada difusa na qual a concentração de íons de carga oposta à superfície decresce com o aumento da distância, e, em dado um momento aproxima-se do valor da concentração de íons na solução. Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa causando um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo o fluxo da solução como um todo, conhecido como FEO (TAVARES, 1995).

As aplicações da EC e da técnica de CLAE são bastante similares e incluem áreas como determinação de impurezas, análises quantitativas e separações quirais. Ambas as técnicas geram métodos capazes de serem implementados na rotina laboratorial. A EC possibilita a redução significativa nos custos de análise em termos de consumo de solventes e necessidade de colunas analíticas. O eletrólito é de base aquosa e são utilizados aproximadamente 20 ml por dia de análise, o que evita o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos.

Quando se utiliza o método de CLAE, a análise de compostos básicos pode ser prejudicada, pois ocorre interação forte destes com os grupamentos polares da coluna, gerando baixa simetria e eficiência de separação. Por outro lado, a EC é útil na análise de substâncias básicas na sua forma catiônica com a utilização de eletrólitos de corrida de pH baixo (ALTRIA, 1998).

O clopidogrel possui pKa de 4,5, trata-se de uma base fraca. Em pH abaixo de 4,5 apresenta-se na forma ionizada, permitindo a utilização do método de EC em solução livre. Nesta técnica, a tensão é aplicada sobre o capilar contendo solução tampão em um determinado pH que favoreça a ionização das moléculas. Por este

método as moléculas são separadas de acordo com o tamanho e o número de grupamentos ionizados (SANTORO *et al.*, 2000).

Para a otimização do método de determinação do clopidogrel em comprimidos revestidos foram testados diferentes eletrólitos de corrida, entre eles as soluções tampão fosfato, acetato e citrato, todas em pH ácidos. Os resultados obtidos para todos os eletrólitos testados foram similares. Selecionou-se o tampão fosfato como eletrólito de corrida devido ao seu amplo uso nas análises eletroforéticas.

Além disso, é importante a escolha do pH do eletrólito de corrida. De forma geral, os sistemas tampão são eficientes em um intervalo de pH correspondente ao pKa, mais ou menos uma unidade (TAVARES, 1997). O pKa do tampão fosfato é 2,12; por isso, foram testados os valores pH de 2,1; 2,5 e 3,0. Em pH 2,1 a ionização do tampão é maior gerando valores altos de corrente. O pH 2,5 permite a ionização do tampão e fornece condições de análise favoráveis tais como a obtenção de tempo de migração satisfatório para o clopidogrel e a geração de corrente adequada quando aplicada voltagem que reduz a produção de calor durante a corrida eletroforética.

No desenvolvimento do método foram testadas diferentes concentrações de solução tampão fosfato (10 a 50 mM). A concentração de 50 mM gerou valores muito elevados de corrente (aproximadamente 170 mA), o que pode levar a condições de análise instáveis e irreprodutíveis. Altas concentrações podem comprometer a separação pelo excesso de calor decorrente do efeito *Joule*. Diminuindo-se a concentração da solução tampão, obteve-se correntes geradas mais baixas e tempos de retenção menores. A concentração de 20 mM foi a que possibilitou melhores condições eletroforéticas, gerando corrente de aproximadamente 80 mA quando aplicada uma tensão de 25 kV, não havendo a possibilidade de produção de calor excessivo.

O modo de injeção utilizado é o modo hidrodinâmico, aplicando-se pressão de 50 mBar durante cinco segundos. Alterações na viscosidade em função da temperatura causam variações no volume de amostra injetado, afetando a precisão do método. Como o controle da temperatura das amostras durante a análise é difícil, fez-se

necessário o uso de padrão interno para minimizar este erro. O padrão interno apropriado deve ser estável em solução, solúvel no solvente de escolha, apresentar absorção adequada no comprimento de onda utilizado bem como possuir tempo de migração diferente do composto em análise, não interferindo na sua quantificação. ALTRIA e colaboradores (1995) desenvolveram método para análise de substâncias básicas utilizando como padrão interno o imidazol. Buscou-se na literatura, compostos contendo anel imidazol que fossem solúveis no eletrólito de corrida, neste caso, uma solução aquosa ácida. Optou-se pelo uso do tiabendazol, substância com anel benzimidazol, que atendeu aos requisitos de padrão interno, principalmente no que se refere à ausência de interferência no tempo de migração do clopidogrel.

Como pode ser visualizado na Figura 29, o tiabendazol possui tempo de migração de 7,5 minutos e o clopidogrel migra em 8,7 minutos. O parâmetro de resolução entre os picos é de aproximadamente 12 e a seletividade de 1,9, o que demonstra que a separação entre as duas substâncias é adequada. A eficiência do método também mostrou-se satisfatória, obtendo-se número de pratos teóricos na ordem de 90.000.

Na análise da especificidade do método avaliou-se a possível interferência dos excipientes da formulação farmacêutica nos tempos de retenção do clopidogrel e do padrão interno tiabendazol. Como pode ser observado na Figura 29 não há interferência da solução placebo nos respectivos picos do eletroferograma. De forma semelhante, avaliou-se a interferência dos produtos de degradação do clopidogrel. A Figura 30 apresenta o eletroferograma da solução de clopidogrel degradada na luz ultravioleta durante 90 minutos. Através da análise da pureza do pico verificou-se que os produtos de degradação formados não interferem nos tempos de migração do clopidogrel, e do tiabendazol, o que permite concluir que o método possui especificidade para ambas as substâncias.

Na avaliação da linearidade, obteve-se curva padrão de clopidogrel com equação da reta $y=0,0466x + 0,008$ e coeficiente de correlação linear de 0,9992. Este valor

indica a existência de correlação linear entre os valores de concentração e a razão das áreas de clopidogrel/tiabendazol. A análise de variância demonstrou que existem diferenças entre as concentrações avaliadas e que há regressão linear significativa. Verifica-se, também, que não há desvio da linearidade para o nível de significância de 95%.

A repetibilidade do método de EC foi demonstrada pela avaliação do valor de DPR em um dia de análise. Os valores compreendidos entre 0,75% e 1,74% são considerados satisfatórios para a determinação deste parâmetro. A precisão intermediária apresentou valor de DPR interdias de 1,51%. Considera-se, portanto, que o método de EC possui a precisão adequada para a determinação do clopidogrel em preparações farmacêuticas.

Considerando-se os resultados obtidos na análise de variância para os métodos de CLAE e EC, verifica-se que não existem diferenças significativas entre os resultados da quantificação do clopidogrel pelos dois métodos para um nível de significância de 95%. Tendo sido estabelecidos os parâmetros de linearidade, precisão e especificidade e não havendo diferenças estatisticamente significativas entre o método de EC e o método de CLAE, previamente validado, pode-se inferir que o método de EC possui a exatidão adequada para a análise do clopidogrel em comprimidos revestidos.

O Limite de Detecção (LD) calculado a partir das três curvas padrão foi de 0,250 µg/ml e o Limite de Quantificação (LQ) foi de 0,751 µg/ml. Os baixos valores de LD e LQ demonstram a sensibilidade do método.

Com base nos resultados obtidos para o método de EC desenvolvido, pode-se considerar que o mesmo está validado, pois apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros de validação avaliados.

5.3.4 Análise comparativa dos métodos

Os métodos de UV, CLAE e EC foram comparados estatisticamente através da Análise de Variância. Os resultados da ANOVA estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 – Análise de variância para comparação dos três métodos validados.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F calc
ENTRE	2	10,364	5,182	4,951*
DENTRO	51	53,377	1,046	
TOTAL	53	63,742		

* significativo para $p < 0,05$

Devido à diferença significativa encontrada pela ANOVA realizou-se o Teste de Tukey para a avaliação das diferenças entre as médias. A Tabela 24 apresenta o resultado do teste.

Tabela 24 – Avaliação das diferenças das médias entre os métodos.

Método *	Média	DPR		
UV	98,540	0,59	A	
CLAE	98,870	0,16	A	B
EC	98,535	1,51		B

* Valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

O teste de Tukey possibilitou detectar quais métodos diferem entre si. Pela análise da Tabela 24, verifica-se que os métodos de UV e CLAE não diferem significativamente. O teste também confirma que os métodos de CLAE e EC são

equivalentes. A diferença entre os métodos, constatada pela ANOVA, encontra-se entre os métodos de UV e EC. No entanto, este fato não invalida os métodos, apenas demonstra que estes não são intercambiáveis. Ambos podem ser aplicados na rotina, pois atendem aos requisitos de validação.

5.3.5 Estudo Preliminar de Estabilidade

5.3.5.1 Determinação da cinética de degradação

5.3.5.1.1 Resultados

As concentrações residuais de clopidogrel em função do tempo de exposição à luz UV estão apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25 – Valores de concentração residual de clopidogrel obtidos por CLAE, após a exposição das soluções à luz ultravioleta.

Tempo (min)	Conc. residual ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. Residual (%)	DPR
Zero	45,35	100,78	0,06
30	35,29	78,43	1,36
60	30,15	67,01	1,95
90	24,51	54,48	2,15
120	22,64	50,32	0,91
150	19,72	43,83	1,35
180	16,70	37,11	3,64
210	15,42	34,27	1,18

* cada valor é média de três determinações.

Os gráficos obtidos plotando-se os dados de concentração *versus* tempo; log de concentração *versus* tempo e de 1/concentração *versus* tempo estão representados nas Figuras 33 a 35, respectivamente.

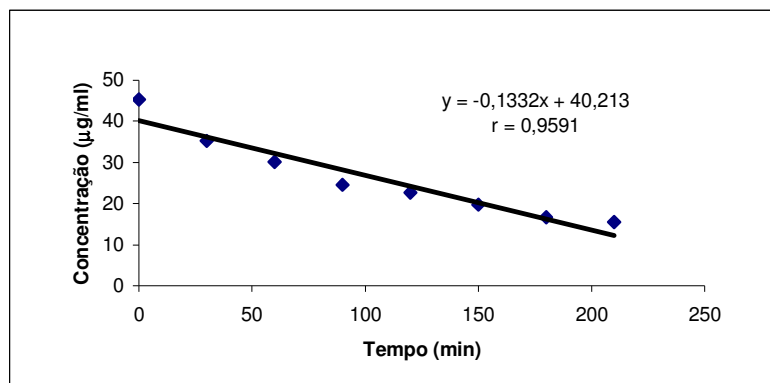


Figura 33 – Gráfico de concentração *versus* tempo na determinação da ordem de reação do clopidogrel em HCl 0,01 M.

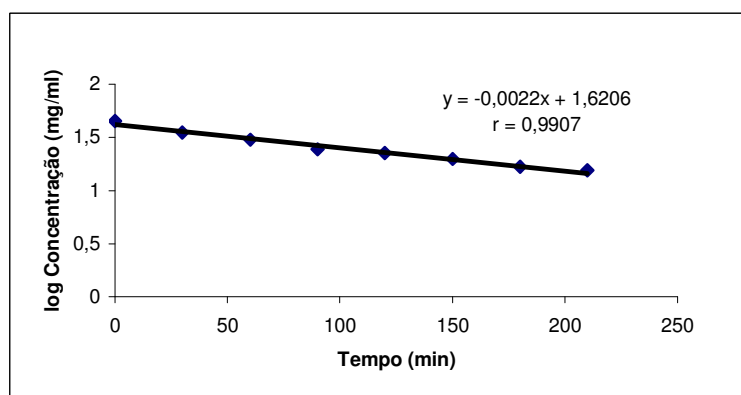


Figura 34 – Gráfico de log de concentração *versus* tempo na determinação da ordem de reação do clopidogrel em HCl 0,01 M.

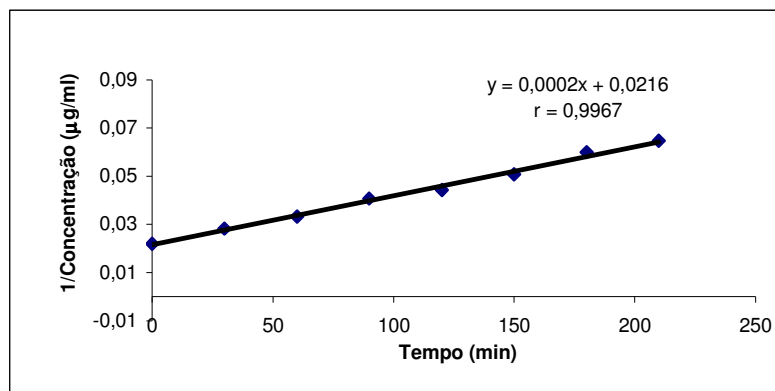


Figura 35 – Gráfico da recíproca de concentração versus tempo na determinação da ordem de reação do clopidogrel em HCl 0,01 M.

5.3.5.1.2 Discussão

Fatores ambientais, tais como temperatura, luz, ar e umidade podem influenciar os parâmetros de estabilidade de um produto farmacêutico (USP 29, 2006). Além destes, fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e composição, tipo e propriedades dos materiais de embalagem acarretam em alterações na sua estabilidade (BRASIL, 2003).

Os estudos de estabilidade de fármacos têm como propósito fornecer evidências sobre a qualidade de uma substância em relação ao tempo, sob a influência destes fatores adversos.

Os testes de degradação forçada fornecem a base para a avaliação da estabilidade de uma substância, podendo ser úteis na identificação de produtos de degradação, estabelecer as vias de degradação e a estabilidade intrínseca da molécula. Estes testes incluem a avaliação da fotossensibilidade da substância. As características intrínsecas de fotoestabilidade de novas substâncias e produtos devem ser avaliadas para demonstrar que a exposição à luz não resulta em modificações inaceitáveis na qualidade do mesmo (ICH, 1996).

As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Estas dependem de condições como concentração de reagentes, temperatura, pH, radiação, entre outros (LACHMAN, 2001).

Na prática, para a determinação da ordem de reação, considera-se que a velocidade de degradação depende da concentração da substância. Um método simples para a avaliação da ordem de reação é a representação de três funções de concentração da substância em função do tempo. Cada uma delas corresponde respectivamente a uma reação de ordem zero (concentração *versus* tempo), primeira ordem (log concentração *versus* tempo) e segunda ordem (1/concentração *versus* tempo). A função que mais se aproximar de uma reta, corresponde à ordem de reação (NUDELMAN, 1975).

Para que uma reação fotoquímica ocorra é necessário que a molécula em estudo apresente máximos de absorção na região de amplitude da fonte de radiação. Compostos contendo grupamentos como o nitrogênio e ligas duplas conjugadas são mais sensíveis à fotólise. Quanto maior for o número desses cromóforos na molécula, especialmente se estão conjugados ou se é possível a interação entre os elétrons móveis de cada grupo, maior a fotossensibilidade (NUDELMAN, 1975).

Conforme discutido no item 5.3.1.2., a trituração dos comprimidos fornece uma mistura não homogênea, o que comprometeria a reprodutibilidade dos resultados, razão pela qual optou-se por avaliar a estabilidade da molécula em solução.

Nos estudos de degradação forçada, foi possível verificar que os fatores mais significativos na degradação do clopidogrel foram a hidrólise alcalina e a exposição à luz ultravioleta, sendo que a exposição da solução à radiação forneceu número maior de produtos de degradação formados.

Na determinação da cinética de degradação do clopidogrel, submeteu-se a amostra à radiação UV em diferentes intervalos. Com o aumento do tempo de exposição, as soluções adquiriam gradativamente coloração amarelada e odor característico a enxofre. O efeito da radiação UV sobre a concentração residual de

clopidogrel está apresentado na Tabela 22. Observa-se que aproximadamente 70% da substância é degradada após 3,5 horas de exposição à luz UV. Conforme discutido no item 5.3.2.2, observam-se picos adicionais no cromatograma em 1,8 min, 2,3 min e em 2,55 minutos. No cromatograma da solução placebo degradada não foi verificada a presença de interferentes que pudessem prejudicar a análise. Além disso, a análise da solução “branco” não demonstrou haver influência da temperatura do interior da câmara na degradação do clopidogrel, uma vez que a concentração do fármaco permaneceu inalterada após a exposição à luz UV.

Os gráficos obtidos para a determinação da ordem de reação do clopidogrel apresentados nas Figuras 33, 34 e 35, demonstram que a reta que apresenta melhor coeficiente de correlação linear, representa a cinética de reação de segunda ordem. Portanto, a molécula de clopidogrel, quando em solução de HCl 0,01 M, apresenta cinética de reação de segunda ordem, ou seja, a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes ou ainda, da concentração de um reagente na segunda potência.

O valor obtido para a constante de velocidade K foi de $0,0002 \text{ min}^{-1}$ e o valor de $T_{90\%}$ foi de 12,25 minutos quando em solução de HCl 0,01 M. Os resultados obtidos no estudo preliminar de estabilidade permitem concluir que a labilidade da molécula frente à exposição à luz ultravioleta justifica o revestimento da forma farmacêutica.

6. CONCLUSÕES

- A caracterização da SQR de clopidogrel foi realizada de maneira satisfatória. A utilização dos métodos de determinação do ponto de fusão, Calorimetria Diferencial Exploratória, espectroscopia IV e RMN ^{13}C E ^1H permitiram a determinação das características relevantes da SQR de clopidogrel;
- O método desenvolvido por CCD demonstrou ser específico para o clopidogrel, e permitiu a identificação da substância na forma farmacêutica de forma adequada;
- Os métodos de CLAE, UV e EC desenvolvidos possibilitaram a identificação do clopidogrel na forma farmacêutica comprimidos revestidos; Os espectros na região do ultravioleta e os tempos de migração obtidos por CLAE e EC para a SQR e clopidogrel no produto farmacêutico, demonstraram ser adequados para a identificação do fármaco;
- O método de espectrofotometria UV, no comprimento de onda de 220 nm, utilizando como solvente HCl 0,01 M, mostrou-se específico, linear, preciso, exato e com sensibilidade adequada para a determinação do clopidogrel em comprimidos revestidos;
- O método de CLAE, desenvolvido nas condições experimentais estabelecidas, apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e robustez na determinação do clopidogrel em comprimidos revestidos;
- O método de EC, desenvolvido para a determinação do clopidogrel em comprimidos revestidos, mostrou-se específico, linear, preciso, exato e com sensibilidade adequada nas condições experimentais estabelecidas;
- A análise comparativa dos métodos demonstrou haver diferença entre os métodos de UV e EC. O método de CLAE não difere significativamente dos métodos de UV e EC;
- Os estudos de degradação forçada demonstraram que o clopidogrel sofre degradação quando exposto a radiação UV e em condições alcalinas;

- O estudo preliminar de fotoestabilidade realizado possibilita inferir que o clopidogrel, nas condições experimentais avaliadas, quando exposto a radiação UV a 254 nm, em solução ácida, apresenta cinética de reação de segunda ordem.

7. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, H.; KAUL, N.; PARADKAR, A.R.; MAHADIK, K.R. Stability indicating HPLTC determination of clopidogrel bissulphate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form. **Talanta**, n.61: p. 581-589, 2003.

ALTRIA, K. D.; FRAKE, P.; GILL, I.; HADGETT, M.A.; KELLY, M.A.; RUDD, D.R. Validated Capillary Electrophoresis Method for the Assay of a Range of Basic Drugs. **Journal of pharmaceutica and Biomedical Analysis**. v. 13, p. 951-957, 1995.

ALTRIA, K. D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: principles, operation and applications. Methods in Molecular Biology**. Totowa, New Jersey. Humana Press, 1996.

ALTRIA, K. D.; KELLI, M.A.; CLARCK, B.J. Current Aplications in the Analysis of Pharmaceutical by Capillary Electrophoresis I. **Trend in Analytical Chemistry**. v. 17, n. 4, p. 204-213, 1998.

BENNET, J.C. PLUM, F. Cecil **Tratado de Medicina Interna**. 20.^a ed. v.1, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997.

BERKELS, R., HARLFINGER, S. TAUBERT, D.; BECKERAT, N.; GORTCHAKOVA, O.; KASTRATI, A.; SCHOMIG, A.; SCHOMIG, E.; Pharmacokinetics of Clopidogrel and Its Active Metabolite in Human Plasma. **Cardiovascular Pharmacology**, 2004, p. 1106.

BOUSQUET, A.; CASTRO, B.; GERMAIN,J.S.; **US Patent 6429210**. 2002. Disponível em <http://www.patentstorm.us/patents/6429210-fulltext.html>. Acesso em 29/05/2007.

BRASIL .Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - 2/2003. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BUDAVARI, S. **The Index Merck**. 13 ed. Rahway: Merck Research Laboratories, 2001.

CALLAHAN, K.S. Blood Fluids, Electrolytes and Haematological Drugs in **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 20th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

CAPLAN, L.R. Doença Cerebrovascular in: FREED M.; GRINES, C. **Fundamentos da Medicina Cardiovascular**. Porto Alegre, Artes Médicas, p.319-335, 1998.

CLAS, S.D.; DALTON, C.R.; HANCOCK, B.C. Differential Scanning Calorimetry: Applications in Drug Development. **Pharmaceutical Technology and Science Today**. v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

DEF 2004/2005. Dicionário de Especialidades Farmacêuticas. 33. ed. Produção Jornal Brasileiro de Medicina, 2004.

DRUG UPDATE – CLOPIDOGREL – Regional Drug and Therapeutics Centre, n. 27, March, 2004.

FORD, J.K.; JIMMIS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis Techniques and Applications**. New York, Halsted Press, 1989. p 109.

GARCIA, C.V; SIPPEL, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Development and Validation of Derivative Spectrophotometric Method for Determination of Rabepazole Sodium in Pharmaceutical Formulation. **Analytical Letters**, v. 39, p. 341-348, 2006.

GOMEZ, Y.; ADAMS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of purity in 19 drug product tablets containing clopidogrel: 18 copies versus the original brand. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, n. 34, p. 341-348, 2004.

HIRSH, J.; BHATT, D.L.; Comparative Benefits of Clopidogrel and Aspirin in High-Risk Patient Populations. **Arch. Intern. Med.** v. 164 p: 2106-2110, 2004.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on Validation of Analytical Procedure: Methodology. p. 1-8, 2005. Commission of the European Communities. IFPMA, Switzerland, 2005.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B. p. 1-12, 1996. Commission of the European Communities. IFPMA, Switzerland, 1996.

JACOBSON A. K. Platelet ADP Receptor Antagonists: Ticlopidine and Clopidogrel. **Best Practice & Research Haematology**, v. 17, n. 1, p. 55-64, 2004.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients.** 4.^a ed. The Pharmaceutical Press, 2003.

KORADIA, V.; CHAWLA, G.; BANSAL, A.K. Qualitative and quantitative analysis of clopidogrel bisulphate polymorphs. **Acta Pharmaceutica.** 54, p. 193 – 204, 2004.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** 11.^a ed, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2004.

KSYCINSKA, H.; RUDZKY, P.; KILISZEK, M.B. Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC- MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 41, p. 533-539, 2006.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica.** Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, cap. 26, p. 1277–1355.

LAGORCE, P.; PEREZ, Y.; ORTIZ, J.; NECCIARI, J.; BRESSOLLE, F. Assay method for the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, n. 720, p. 107 – 117, 1998.

LINDSAY, S. **High Performance Liquid Chromatography: analytical chemistry by open learning.** London: ACOL Thames Polytechnic, 1987. p 100-102.

MAJERUS, P.W.; TOLLEFSEN, D.M. Anticoagulantes, trombolíticos e fármacos antiplaquetários. in: HARDMAN, J.; LIMBIRD, L. (Ed). **Goodman & Gilman. As bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro, McGraw Hill, 2003, p. 1141-1155.

MITAKOS, A.; PANDERI, I. A validated LC method for the determination of clopidogrel in pharmaceutical preparations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, n. 28, p. 431-438, 2002.

MITAKOS, A.; PANDERI, I. Determination of the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, n. 505, p.107-114, 2004.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem material**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, v. 2, 2004, p. 834.

MÔNACO, C.; MATHUR, A.; MARTIN, J.F. What Causes Acute Coronary Syndromes? Applying Koch's Postulates. **Atherosclerosis**, n. 179, p. 1-15, 2005.

NIROGI, R.V.S.; KANDIKERE, V.N.; SHUKLA, M.; MUDIGONDA, K.; MAURYA, S.; BOOSI, R. Quantification of Clopidogrel in Human Plasma by a Sensitive Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**. v. 20, p. 1695, 2006.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneu, 1975. 186p.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy – a guide for students of organic chemistry**. 2. ed. Philadelphia: Saunders College, 2001. 511p.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure Determination of Organic Compounds – tables of spectral data**. 3.^a Ed. Springer Verlag Berlin, 2000, p.71-243.

RANG, H.P.; DALE.M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia** 4.^a Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001, p: 255-269.

REIST, M.; ROY-DE VOS, M.; MONTSENY, J.P.; MAYER, J.M.; CARRUPT, P.A., BERGER, Y.; TESTA, B. Very Slow chiral inversion of clopidogrel in rats: a pharmacokinetic and mechanistic investigation. **Drug metabolism and disposition**, v. 28, n. 12, p. 1405-1410, 2000.

RENOU, L.; COSTE, S.; COQUEREL, G. Synthesis and R-ray Structural studies of the Dextro-rotatory Enantiomer of Methyl α -5(4,5,6,7-tetrahydro(3,2-c)thieno pyridyl) (2-chlorophenyl)-acetate isopropylsulphate. **Journal of Molecular Structure**. v. 827, p. 108-113, 2007.

REYNOLDS, J. E. F. **MARTINDALE: the Extra Pharmacopoeia**. 30th Ed. The Pharmaceutical Press, London, 1993, p. 844.

ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.; COTRAN, R.S. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5.^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996, p. 89-98; 465-477.

ROBINSON, A.; HILLIS, J.; NEAL, C. LEARY, A.C. The validation of a bioanalytical method for the determination of clopidogrel in human plasma. **Journal of Chromatography B**. v. 848, p. 344-354, 2007.

ROHDE, L.E., FUCHS, F.D., PICON, P.D. in: WANNMACHER, L.; FUCHS, F.D.; FERREIRA, M.B.C. **Farmacología Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3.^aed., Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2004, p. 684 -700.

SANOFI-AVENTIS; Comunicado. Paris, janeiro de 2006. Disponível em : <http://www.sanofi-aventis.pt/live/pt/medias/65668C21-6F9B-4232-BB9A-437756C0E1AC.pdf> Acesso em: 19 de maio de 2007.

SANTORO, M. I. R. M.; PRADO M. S. A.; STEPPE M., KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Rev. Bras. de Ciênc. Farmac.**, 36, 97-110, 2000.

SAVI, P.; ZACHAYUS, J. L.; TOUCHARD, N.D.; LABOURET C.; HERVÉ C.; UZABIAGA M.F.; PEREILLO, J.M; CULOUSCOU, J.M; BONO, F.; FERRARA, P.; HERBERT, J.M. The active metabolite of clopidogrel disrupts P2Y12 oligomers and partitions them out of lipids rafts. **PNAS**, v. 103, n. 29, p. 11069-11074, 2006.

SCHAFER, A. I. Antiplatelet Therapy. **American Journal of Medicine**, v. 101, p. 199-209, 1996.

SCHRÖR, K. Antiplatelet Drugs. A Comparative Review. **Drugs**, v. 50, n. 1, p. 7 – 28, 1995.

SINGH, S.S.; SCHARMA, K.; BAROT, D.; MOHAN, P.R.; LOHRAY, V.B. Estimation of Carboxylic Acid Metabolite of clopidogrel in Wistar Rat Plasma by HPLC and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**. v. 821, p. 173-180, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997 p. 293 -321.

STEFANINI, E. Aspirina, ticlopidina ou clopidogrel? **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 4, p. 784-795, 2001.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, p. 12-20, jun., 1998.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**. v. 19, n.2, p. 173-181, 1995.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**. v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TESTA, B. Prodrug Research: futile or fertile? **Biochemical Pharmacology**. v. 68, p. 2097-2106, 2004.

USP 29, THE UNITED STATES Pharmacopeia. 29. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. London: Churchill Livingstone, 2003, 337 p.

WATSON, K.; WATSON, B.D. PATER, K.S. Peripheral Arterial Disease: a Review of Disease Awareness and Management. **The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy**. V. 1, n.4, p. 365-379, 2006.

WODLINGER, A.M.; PIEPER, J. A. The Role of Clopidogrel in the Management of Acute Coronary Syndromes. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 8, p. 2155-2181, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Atlas of Heart Disease and Stroke Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/index.html. Acesso em 24 de junho de 2007.

8.1 Artigo aceito para publicação

O artigo sobre a validação do método de CLAE para determinação do clopidogrel foi aceito e será publicado no *Journal of AOAC International*.

Journal of AOAC INTERNATIONAL - Decision on Manuscript ID 06-0347.R3

"szw@usp.org" to me, jdiatz

10-Mar-2007

Dear Miss Sippel:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "New liquid chromatographic method for determination of clopidogrel in coated tablets" in its current form for publication in the Journal of AOAC INTERNATIONAL.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of AOAC INTERNATIONAL, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Samir Wahab
Section Editor, Journal of AOAC INTERNATIONAL
szw@usp.org

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Mestrado Acadêmico

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATERIAS-PRIMAS
FARMACÊUTICAS

Título: "Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade
de clopidogrel em comprimidos revestidos"

Mestranda: JULIANA SIPPEL

PARECER

O trabalho apresentado pela mestranda teve por objetivo o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos qualitativos e quantitativos, bem como o estudo preliminar da estabilidade de clopidogrel em comprimidos revestidos.

O estudo foi muito bem planejado e executado, e a discussão dos resultados é organizada e coerente. A qualidade do trabalho também é evidenciada pelo artigo escrito para publicação em periódico internacional da área.

Pelo exposto, sou favorável à atribuição do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas à candidata Juliana Sippel.

Cássia V. Garcia

Profa. Dr. Cássia Virginia Garcia
Porto Alegre, 10 de agosto de 2007.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nível: Mestrado Acadêmico

Área de concentração: **PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATERIAS-PRIMAS
FARMACÊUTICAS**

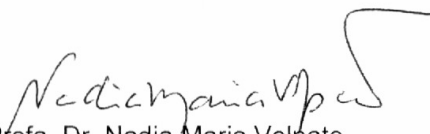
Título: "Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade
de clopidogrel em comprimidos revestidos"

Mestranda: JULIANA SIPPEL

P A R E C E R

A dissertação apresentada pela mestranda possui excelente redação e planejamento, culminando em três métodos validados para análise quantitativa do fármaco clopidogrel em comprimidos revestidos.

Os resultados são apresentados de forma clara e muito bem discutidos, alcançando plenamente os objetivos de uma dissertação de mestrado. Outrossim, a mestranda já apresenta o aceite de uma publicação em revista internacional. Por conseguinte, consideramos APROVADO o trabalho de dissertação de Juliana Sippel.


Prof. Dr. Nadia Maria Volpato
Porto Alegre, 10 de agosto de 2007.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nível: Mestrado Acadêmico

Área de concentração: **PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATERIAS-PRIMAS FARMACÊUTICAS**

Título: **“Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de clopidogrel em comprimidos revestidos”**

Mestranda: JULIANA SIPPEL

P A R E C E R

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento e a validação de vários métodos analíticos para a análise quali e quantitativa do clopidogrel, na forma farmacêutica comprimidos, bem como uma avaliação prévia de sua estabilidade.

O planejamento e o desenvolvimento da parte experimental seguem normas internacionais e foram corretamente realizados, obtendo resultados que estão de acordo com os objetivos propostos.

A mestranda discutiu amplamente os resultados e demonstrou pleno conhecimento das técnicas aplicadas, utilizando sempre bibliografia adequada e atual.

As várias técnicas validadas representam uma importante contribuição para a correta utilização da formulação avaliada.

Assim sendo, somos de parecer favorável pela aprovação da presente dissertação e à concessão do grau acadêmico de Mestre à Juliana Sipple.



Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Porto Alegre, 10 de agosto de 2007.