

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE PRASUGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMILA RIGOBELLO

PORTO ALEGRE, 2013

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE PRASUGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

Dissertação apresentada por **CAMILA RIGOBELLO**
para a obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Patrícia Gomes

Centro Universitário Franciscano - UNIFRA

Profa. Dr. Cássia Virginia Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Rigobello, Camila
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA DETERMINAÇÃO DE PRASUGREL EM COMPRIMIDOS
REVESTIDOS / Camila Rigobello. -- 2013.
171 f.

Orientador: Martin Steppe.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. cloridrato de prasugrel. 2. cromatografia
líquida. 3. eletroforese capilar. 4. teste de
dissolução. 5. produtos de degradação. I. Steppe,
Martin, orient. II. Título.

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 Universidade Federal do Rio Grande do Sul com bolsa de estudos financiada pelo CNPq.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida para a conclusão de mais uma etapa importante;

Ao Prof. Dr. Martin Steppe, pelo exemplo pessoal e profissional, orientação, incentivo, apoio, acolhimento, amizade e dedicação;

À minha família, em especial aos meus pais Adalberto e Elenice, meu irmão João Victor pelo inestimável amor e incentivo;

Às Irmãs do Imaculado Coração de Maria pela hospitalidade e acolhimento;

Às minhas amigas Francyne, Lorena, Ana Carolina e Larissa pelos momentos de partilha, amizade e solidariedade nestes anos em Porto Alegre;

Ao meu namorado Alan, pelo amor, companheirismo e compreensão tão importantes neste momento;

Aos professores do Departamento de Controle de Qualidade, Elfrides E. S. Schapoval, Nádia M. Volpato, Tércio P. Oppe e Cássia V. Garcia pelo auxílio, receptividade e exemplos de profissionalismo;

Aos colegas do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ): Nathalie, Rita, Vítor, Maximiliano, Alini, Letícia, Diogo, Alianise, Jaison, Fábio, Magda e Mariana pela amizade, companheirismo, convivência e transferência de conhecimentos, em especial as amigas Amanda e Márcia pela motivação, acolhimento e contribuições na realização deste trabalho;

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LACQFar) por disponibilizar a infra-estrutura, em especial à colega Lorena, pela colaboração;

À UFRGS pela oportunidade de aprimoramento;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pelas condições de trabalho oferecidas que contribuíram para a execução deste trabalho;

À Central Analítica- FACFAR/UFRGS por propiciar os estudos de espectrometria de massas;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de estudos;

E a todos que de alguma maneira contribuíram para execução deste trabalho.

RESUMO

A ativação e agregação plaquetária desempenham papel central na fisiopatologia das síndromes coronarianas agudas (SCA) e complicações após intervenções coronárias percutâneas (ICP). O tratamento padrão indicado para a prevenção de eventos trombóticos é constituído de uma terapia antiplaquetária dupla, sendo a associação de ácido acetilsalicílico (AAS) e clopidogrel a mais comum. O cloridrato de prasugrel, um fármaco tienopiridínico de terceira geração, foi aprovado em 2009 pelo Food and Drugs Administration (FDA) e pelo European Medicine Agency (EMA) e liberado para uso clínico com o nome comercial de Effient[®] como alternativa para pacientes inadequadamente protegidos pelo clopidogrel. Poucos relatos sobre a determinação quantitativa e estudos de estabilidade deste fármaco encontram-se disponíveis na literatura. Neste estudo, a caracterização da substância química de referência (SQR) de prasugrel foi realizada previamente por espectrometria no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono (RMN ¹³C), análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e determinação da faixa de fusão pelo método capilar. Em seguida, métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação qualitativa e quantitativa de prasugrel em comprimidos revestidos, tais como espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC). Os parâmetros especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez foram avaliados conforme os guias disponíveis. Além disso, desenvolveu-se e validou-se um método de dissolução de prasugrel em comprimidos. A identificação dos principais produtos de degradação formados em condições alcalinas e térmicas foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM), onde as possíveis estruturas moleculares foram propostas. Desse modo, os métodos desenvolvidos e validados contribuem para assegurar eficácia, segurança e qualidade de produtos farmacêuticos contendo este fármaco.

Palavras-chaves: cloridrato de prasugrel, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, espectrofotometria ultravioleta- visível, teste de dissolução, produtos de degradação.

ABSTRACT

The platelet activation and aggregation play a central role in the pathophysiology of acute coronary syndromes (ACS) and complications after percutaneous coronary interventions (PCI). The standard therapy for the prevention of new thrombotic events is constituted of dual antiplatelet therapy, and the most common association is acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel. Prasugrel hydrochloride, a third-generation thienopyridine, was approved in 2009 by the Food and Drug Administration (FDA) and European Medicine Agency (EMA) and approved for clinical use with the commercial name Effient® as alternative for patients inadequately protected by clopidogrel. Few reports of quantitative determination and stability studies of this drug are available in the literature. In this study, the characterization of the reference substance of prasugrel was performed by infrared spectrometry (IR), nuclear magnetic resonance of hydrogen (NMR ¹H) and carbon (NMR ¹³C), thermal analysis by differential scanning calorimetry (DSC) and determination of the melting range by capillary method. Posteriorly, analytical methods were developed for the qualitative and quantitative determination of prasugrel in coated tablets, such as, spectrophotometry in the ultraviolet region (UV), high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). The parameters specificity, linearity, precision, accuracy and robustness were evaluated according to the guidelines available. Besides, a dissolution method for prasugrel in tablets was developed and validated. The identification of the main products of degradation formed under alkaline and thermal conditions were performed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS), where the possible structures were proposed. Then, the methods developed and validated contribute to assure the efficacy, safety and quality of pharmaceutical products containing this drug.

Keywords: prasugrel hydrochloride, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, ultraviolet- visible spectrophotometry, dissolution testing, degradation products.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Representação estrutural de prasugrel 15
- Figura 3.2. Processo de ativação e agregação plaquetária (ADP = Adenosina Difosfato, ATP= Adenosina Trifosfato e TX A₂ = tromboxano A₂) 15
- Figura 3.3. Processo de biotransformação do pró-fármaco a seu metabólito ativo (CE2= carboxil esterases 2) 16
- Figura 4.1. Curva de aquecimento de prasugrel SQR obtida pela DSC..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.2. Espectro na região do infravermelho para a substância química de referência de prasugrel. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.3. Espectro de infravermelho obtido na análise de cloridrato de prasugrel. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.4. Espectro de RMN ¹H em DMSO_{d6} de prasugrel SQR. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.5. Espectro de RMN ¹³C obtida na análise de prasugrel SQR. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.6. Cromatogramas obtidos na análise das soluções de SQR (prasugrel SQR), A (amostra) e C (cafeína), com revelação por luz ultravioleta a 254 nm **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.7. Espectros sobrepostos obtidos na região UV na análise de prasugrel SQR em diferentes diluentes (A= metanol, B= acetonitrila, C= etanol, D= água) na concentração de 12 µg/mL. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.8. Espectros sobrepostos obtido na análise de prasugrel SQR (A) e amostra (B) na região UV na concentração 12 µg/mL. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.9. Cromatogramas sobrepostos obtidos pela análise de prasugrel SQR (A) e amostra (B) na concentração de 40 µg/mL. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.10. Sobreposição dos eletroferogramas obtidos na análise das soluções contendo prasugrel SQR (A) e amostra (B). PI= padrão interno. .. **Erro! Indicador não definido.**
- Figure 5.1. Structural representation of prasugrel. **Erro! Indicador não definido.**
- Figure 5.2. HPLC chromatograms of prasugrel (40 µg/ mL). (A) Prasugrel reference substance solution (B) Prasugrel after acid hydrolysis: (C) Prasugrel after oxidation: (D) Prasugrel after alkaline hydrolysis: (E) Prasugrel after

thermic degradation: (F) Prasugrel after photolytic degradation in UVA: (G) Prasugrel after photolytic degradation in UVC. Peak 1: prasugrel and 2 degradation products..... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 5.3. Pareto Chart of the Standardized Effects for the quantitative aspect at a significance level of 0.05. **Erro! Indicador não definido.**

Figure 5.4. Three-dimensional (3D) graphs of the concentration of prasugrel (%) for the axis Y plotted against the variables studied: pH, T (temperature), F (flow rate) and % ACN (% acetonitrile). (a) Variation of the response Y in relation pH and T, fixed the factor F in 1 mL/min and ACN in 50% mixture of mobile phase. (b) Variation of the response Y in relation pH and F, fixed T in 25 °C and ACN in 50% of acetonitrile. (c) Variation of the response Y in relation pH and ACN, fixed T in 25 °C and F in 1 mL/min. (d) Variation of the response Y in relation T and F, fixed factor pH in 3.0 and ACN in 50% of acetonitrile. (e) Variation of response Y in relation F and ACN, fixed pH in 3.0 and T in 25 °C. (f) Variation of the response Y in relation T and ACN, fixed pH in 3.0 and factor F in 1 mL/min. **Erro! Indicador não definido.**

Figure 5. 5. The 2D contour plots used to evaluate the peak symmetry (tailing factor) in relation to the variance of pH value and the others factors changed. (a) Acetonitrile concentration vs. pH: (b) temperature vs. pH: (c) flow rate vs. pH..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 5.6. Eletroferograma referente à análise de prasugrel SQR (A) e mistura placebo (B), PI= padrão interno. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 5.7. Eletroferograma de prasugrel após degradação ácida (HCl 0,01 M) por 7 horas. PI= padrão interno, 1 = produtos de degradação.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 5.8. Eletroferograma de prasugrel após degradação básica (NaOH 0,01 M) por 15 minutos. PI= padrão interno, 1 = produtos de degradação. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 5.9. Eletroferograma de prasugrel após degradação oxidativa (H₂O₂ 0,3%) por 5 horas. PI= padrão interno, 1 = produtos de degradação..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 5.10. Eletroferograma de prasugrel após degradação térmica (60 °C) por 48 horas. PI= padrão interno, 1 = produtos de degradação.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 5.11. Eletroferogramas de prasugrel após fotodegradação em (A) radiação UV- C por 15 minutos e (B) radiação UV- A por 72 horas. PI= padrão interno, 1 = produtos de degradação..... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 6.1. Chemical structure of prasugrel..... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 6.2. Dissolution profile of prasugrel in different media (900 mL) at 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes using apparatus 2 (paddle) at the stirring speed of 50 rpm. **Erro! Indicador não definido.**

Figure 6.3. The prasugrel release in 900 mL of 0.01 M HCl using apparatus 1 (basket) in rotational speed at 50 rpm. **Erro! Indicador não definido.**

Figure 6.4. UV spectrum of standard reference substance of prasugrel (A) and the placebo (B) solutions in 0.01 M HCl before filtration with Vankel filters and 0.45 µm nylon membrane in the final concentration of 12.0 µg/mL. **Erro! Indicador não definido.**

Figure 7.1. Chemical structure of prasugrel (C₂₀H₂₀FNO₃). **Erro! Indicador não definido.**

Figure 7.2. LC chromatograms of prasugrel: (A) detected by UV at 263 nm; (B) detected by ESI-MS: m/z 374.11 in 1.65 minutes and (C) the fragment pattern of the drug. **Erro! Indicador não definido.**

Figure 7.3. LC- MS analysis for: (A) alkaline study where were detected prasugrel (m/z= 374), DP1 and DP2 (m/z= 332); (B) thermal condition where were detected prasugrel (m/z = 374), DP1 and DP2 (m/z= 332). **Erro! Indicador não definido.**

Figure 7.4. Fragmentation pattern obtained for DP1 and DP2 in alkaline and thermal stress conditions. The data suggest tautomerism among the structures. **Erro! Indicador não definido.**

Figure 7.5. The degradation pathways proposed for prasugrel. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Métodos utilizados para a determinação quantitativa de prasugrel por CLAE.....	18
Tabela 4.1. Atribuição das principais bandas obtidas na análise espectrofotométrica da região do infravermelho para a SQR de prasugrel..	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4.2. Atribuições do espectro de RMN ^1H obtido pela análise de prasugrel SQR em DMSO_{d6}	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4.3. Atribuições do espectro de RMN ^{13}C em DMSO_{d6} .	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4.0.4. Valores de Rf obtidos através da análise cromatográfica das soluções de SQR (substância química de referencia de prasugrel), A (amostra) e C (cafeína).....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4.5. Condições cromatográficas utilizadas na análise da solução prasugrel SQR e amostra.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4.6. Condições eletroforéticas utilizadas para análise qualitativa de prasugrel por EC.	Erro! Indicador não definido.
Table 5.1. Two- level Plackett-Burman design for robustness test. Quantitative aspect, tailing factor and theoretical plates.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5.2. Condições eletroforéticas empregadas para a determinação de prasugrel em comprimidos revestidos.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5.3. Proporções utilizadas para a elaboração da amostra simulada de excipientes.	Erro! Indicador não definido.
Table 7.1. Degradation behavior of prasugrel under differents stress conditions.	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada;
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência;
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência;
CZE	<i>Capillary zone electrophoresis</i> – eletroforese capilar de zona;
DMSO _{d6}	Dimetilsulfóxido deuterado;
DSC	Calorimetria exploratória diferencial;
E IV	Espectrometria na região do infravermelho;
E UV/VIS	Espectrofotometria no ultravioleta/ visível;
EC	Eletroforese capilar;
EMA	<i>European Medicines Agency</i> ;
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> ;
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> ;
ICP	Intervenção coronária percutânea;
LC-MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> ;
LOD	<i>Limit of detection</i> ;
LOQ	<i>Limit of quantitation</i> ;
PDA	<i>Photo diode array</i>
PI	Padrão interno;
R _f	Fator de retenção;
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono;
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio;
RSD	<i>Relative standard deviation</i> – desvio padrão relativo;
SCA	Síndromes coronarianas agudas;
SQR	Substância química de referência;
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> – Farmacopéia Americana.

APRESENTAÇÃO

Segundo as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o presente trabalho de dissertação foi redigido na forma de capítulos, com encarte de publicações. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- Introdução;
- Objetivos;
- Revisão Bibliográfica;
- Capítulo I- Caracterização da Substância Química de Referência (SQR) e análise qualitativa de prasugrel;
- Capítulo II- Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação quantitativa de cloridrato de prasugrel em comprimidos revestidos - encarte de publicação;
- Capítulo III- Desenvolvimento e validação do teste de dissolução para comprimidos revestidos de cloridrato de prasugrel- encarte de publicação;
- Capítulo IV- Identificação dos produtos de degradação formados em condições alcalinas e térmicas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM) – encarte de publicação;
- Discussão e Conclusões Gerais;
- Referências Bibliográficas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	5
2.1	OBJETIVO GERAL	7
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1	ASPECTOS GERAIS	11
3.2	TIENOPIRIDINAS	13
3.2.1	Prasugrel	14
3.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDOS DE ESTABILIDADE	19
3.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	20
3.3.2	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	21
3.3.3	Eletroforese capilar (EC)	23
3.3.4	Espectrofotometria do ultravioleta/visível (E UV/VIS)	24
3.4	Dissolução	24
4	CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA SQR E ANÁLISE QUALITATIVA DE PRASUGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS	27
4.1	INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
4.2	SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	Erro! Indicador não definido.
4.3	CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PRASUGREL	Erro! Indicador não definido.
4.3.1	Faixa de fusão pelo método de capilar .	Erro! Indicador não definido.
4.3.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	Erro! Indicador não definido.
4.3.3	Espectrofotometria na região do infravermelho (E IV)	Erro! Indicador não definido.
4.3.4	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H) e carbono (RMN ¹³ C)	Erro! Indicador não definido.
4.4	ANÁLISE QUALITATIVA DE PRASUGREL NA FORMA FARMACÊUTICA	Erro! Indicador não definido.
4.5	PRODUTO FARMACÊUTICO	Erro! Indicador não definido.
4.5.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	Erro! Indicador não definido.
4.5.2	Espectrofotometria na região do ultravioleta (E UV)	Erro! Indicador não definido.
4.5.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	Erro! Indicador não definido.
4.5.4	Eletroforese capilar (EC)	Erro! Indicador não definido.
4.6	DISCUSSÃO GERAL	Erro! Indicador não definido.

5	CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CLORIDRATO DE PRASUGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS	46
5.1	INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
5.2	ARTIGO CIENTÍFICO- VALIDATION OF LC METHOD FOR DETERMINATION OF PRASUGREL IN TABLETS APPLYING PLACKETT-BURMAN DESIGN FOR ROBUSTNESS TEST	Erro! Indicador não definido.
	SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
5.2.1	ABSTRACT	Erro! Indicador não definido.
5.2.2	INTRODUCTION	Erro! Indicador não definido.
5.2.3	MATERIALS AND METHODS	Erro! Indicador não definido.
5.2.4	RESULTS	Erro! Indicador não definido.
5.2.5	DISCUSSION.....	Erro! Indicador não definido.
5.2.6	CONCLUSION	Erro! Indicador não definido.
5.2.7	ACKNOWLEDGEMENT.....	Erro! Indicador não definido.
5.2.8	REFERENCES	Erro! Indicador não definido.
5.3	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CLORIDRATO DE PRASUGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS	71
5.3.1	INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
5.3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
5.3.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	Erro! Indicador não definido.
5.3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
5.3.5	CONCLUSÃO	Erro! Indicador não definido.
6	CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO TESTE DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE CLORIDRATO DE PRASUGREL.....	87
6.1	INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
6.2	ARTIGO CIENTÍFICO- DEVELOPMENT AND VALIDATION OF DISCRIMINATING METHOD OF PRASUGREL DISSOLUTION IN TABLETS USING AN ULTRAVIOLET DETECTION	91
6.2.1	ABSTRACT	Erro! Indicador não definido.
6.2.2	INTRODUCTION	Erro! Indicador não definido.
6.2.3	MATERIALS AND METHODS	Erro! Indicador não definido.
6.2.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	Erro! Indicador não definido.
6.2.5	CONCLUSION	Erro! Indicador não definido.
6.2.6	REFERENCES	Erro! Indicador não definido.
7	CAPÍTULO IV – IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM CONDIÇÕES ALCALINAS E TÉRMICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CL-EM)	107
7.1	INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.

7.2	ARTIGO CIENTÍFICO- PRASUGREL DEGRADATION BEHAVIOR BY LC-UV AND IDENTIFICATION OF THERMAL AND ALKALINE DEGRADATION PRODUCTS USING LC-ESI-MS	111
7.2.1	ABSTRACT	Erro! Indicador não definido.
7.2.2	INTRODUCTION.....	Erro! Indicador não definido.
7.2.3	MATERIALS AND METHODS	Erro! Indicador não definido.
7.2.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	Erro! Indicador não definido.
7.2.5	CONCLUSION	Erro! Indicador não definido.
7.2.6	ACKNOWLEDGEMENTS	Erro! Indicador não definido.
7.2.7	REFERENCES	Erro! Indicador não definido.
8	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS	126
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

1 INTRODUÇÃO

As síndromes coronarianas agudas (SCA) apresentam altas taxas de mortalidade no mundo desenvolvido, movendo um gigantesco custo anual para os países (FRANCHINI & MANNUCCI, 2009).

A trombose plaquetária tem papel fundamental na fisiopatologia das SCA e complicações após intervenções coronárias percutâneas (ICP). Por essa razão, a terapia antiplaquetária dupla constitui o tratamento padrão das SCA pois confere maior eficácia e proteção para a redução de eventos trombóticos recorrentes (DAMMAN *et al.*, 2012).

A associação mais comum indicada é o uso de ácido acetilsalicílico (AAS) e clopidogrel, este um antiplaquetário tienopiridínico de segunda geração. No entanto, estudos comprovam que alguns pacientes que fazem uso de clopidogrel apresentam resposta inadequada à terapia com maior incidência de eventos trombóticos. Diante disso, houve a necessidade de estudos para o desenvolvimento de substâncias alternativas (UCHIYAMA, 2011).

Prasugrel, um composto tienopiridínico de terceira geração, constitui em uma alternativa relevante para pacientes inadequadamente protegidos pela terapia padrão. O novo antiplaquetário é um pró- fármaco comercializado sob a forma de sal de cloridrato disponível no mercado na forma de comprimidos revestidos (KIM *et al.*, 2012).

Estudos pré-clínicos demonstram que prasugrel é cerca de 10 vezes mais potente que clopidogrel, refletindo em uma maior inibição da agregação plaquetária. O novo tienopiridínico apresentou significativa redução da variabilidade interindividual durante a terapia medicamentosa, devido à eficiência da via metabólica para bioconversão do respectivo pró-fármaco (VEVERKA & HAMMER, 2009).

Por tratar-se de um medicamento novo e de recente inclusão no mercado, o prasugrel não possui monografia em farmacopéia nacional e internacional, tampouco registros oficiais disponíveis para sua determinação qualitativa e quantitativa.

Desta forma, objetiva-se desenvolver e validar diferentes métodos analíticos que possam colaborar com a qualidade de prasugrel na forma farmacêutica disponível, servindo de auxílio para assegurar segurança e eficácia dos produtos aos usuários.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa de prasugrel em comprimidos revestidos, bem como teste de dissolução e identificação do(s) produto(s) de degradação majoritário(s) formado(s) nos estudos indicativos de estabilidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

↪ Caracterizar a substância química de referência (SQR) de prasugrel pelo método de espectrofotometria na região do infravermelho (E IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN- ^1H e ^{13}C), análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC) e determinação da faixa de fusão pelo método capilar;

↪ Identificar o fármaco nos comprimidos revestidos pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta (E UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC);

↪ Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do ultravioleta/ visível (E UV/VIS) para determinação quantitativa de prasugrel em comprimidos revestidos;

↪ Desenvolver e validar método por eletroforese capilar (EC) para determinação quantitativa de prasugrel na forma farmacêutica comprimidos;

↪ Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação quantitativa de prasugrel na forma farmacêutica comprimidos;

↪ Desenvolver e validar método de dissolução para determinação quantitativa de prasugrel na forma farmacêutica comprimidos;

↪ Identificar por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL- EM) os produtos de degradação majoritários formados nos estudos prévios de degradação forçada realizadas por CLAE, propondo a(s) possíveis estruturas moleculares.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS

As síndromes coronarianas agudas (SCA) englobam um conjunto de patologias classificadas de acordo com as alterações detectadas no exame de eletrocardiograma e nos níveis de enzimas cardíacas. A representação clínica inclui três formas: angina instável, infarto do miocárdio com e sem supradesnivelamento do segmento ST (DIPIRO *et al.*, 2008; RENY *et al.*, 2012).

Um quadro de isquemia aguda decorrente do desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio exigida no tecido miocárdico é responsável pelas manifestações clínicas. Isso se deve ao baixo fluxo sanguíneo em consequência de uma oclusão total ou parcial provocada por um trombo ou placa aterosclerótica presente nas artérias coronárias ou em um de seus ramos (DIPIRO *et al.*, 2008).

As doenças cardíacas coronarianas foram responsáveis por aproximadamente uma a cada seis mortes ocorridas nos Estados Unidos em 2008, totalizando 405.309 óbitos nesse período. Estima-se que a cada 25 segundos um americano apresente um evento coronário e a cada minuto uma morte devido a essa causa seja relatada (ROGER *et al.*, 2012). No Brasil, as doenças isquêmicas do coração foram responsáveis por aproximadamente 100 mil óbitos no ano de 2010, sendo os estados de maior incidência São Paulo (27,24%), Rio de Janeiro (11,55%) e Minas Gerais (8,20%) (BRASIL, 2012).

A fisiopatologia é caracterizada pela ativação plaquetária resultante de uma atividade inflamatória desencadeada pela erosão ou ruptura de placas ateroscleróticas (MEUWISSEN *et al.*, 2004). O processo é susceptível em placas que apresentam forma excêntrica, capa fibrosa fina, grande núcleo lipídico, elevado teor de células inflamatórias e quantidade limitada de células do músculo liso. Quando há o rompimento da capa fibrosa no ponto de enfraquecimento, pode haver trombose local desencadeada por vários mecanismos (DIPIRO *et al.*, 2008).

O processo inicia-se com a adesão das plaquetas através de constituintes do subendotélio expostos, como colágeno, fator Von Willebrand e fibronectina. A liberação de substâncias vasoativas derivadas das plaquetas

como adenosina difosfato (ADP) e tromboxano A_2 (TXA₂), promovem vasoconstrição e ativação plaquetária (DIPIRO *et al.*, 2008; NUSCA & PATTI, 2012).

As moléculas de ADP atuam como agonistas endógenos dos receptores P2Y₁₂ localizados na superfície das plaquetas. A interação dessa substância com os respectivos receptores promovem maior expressão de moléculas pró-inflamatórias e ativação dos receptores glicoproteínas (GP) IIb/ IIIa. Estes, localizados na superfície das plaquetas, alteram sua conformação de modo a permitir ligação entre as plaquetas através do fibrinogênio, promovendo a agregação plaquetária. Serotonina, trombina e epinefrina também induzem o processo de formação do trombo branco, rico em plaquetas (DAMMAN *et al.*, 2012; DIPIRO *et al.*, 2008; NUSCA & PATTI, 2012).

O tratamento de doenças arteriais coronarianas inclui terapia fibrinolítica, revascularização miocárdica cirúrgica ou percutânea, de acordo com a evolução do quadro, além de controle dos fatores de risco e terapia medicamentosa que visa rápido controle do processo patológico e prevenção de novos eventos trombóticos (ABELIN *et al.*, 2009; LIBBY *et al.*, 2005).

Como a adesão, ativação e agregação plaquetária desempenham papéis importantes na patogênese de eventos isquêmicos cardíacos, benefícios clínicos são obtidos com terapia antiplaquetária tendo como alvo terapêutico a inibição de uma das etapas (DAMMAN *et al.*, 2012; NUSCA & PATTI, 2012).

Os inibidores da adesão plaquetária encontram-se em desenvolvimento e não tem uso clínico aprovado. Os inibidores da agregação plaquetária são utilizados no tratamento da fase aguda de pacientes de alto risco submetidos à intervenção coronária percutânea (ICP). Portanto, a principal alternativa para prevenção aguda e de longo prazo de eventos isquêmicos recorrentes em pacientes com ACS e ICP, constituem na inibição da sinalização interna desencadeadora da ativação plaquetária (ANGIOLILLO *et al.* 2010).

Várias vias estão envolvidas na atividade plaquetária, havendo inúmeras substâncias ativas que atuam em diferentes alvos. O ácido acetilsalicílico (AAS), é um inibidor irreversível da ciclooxigenase, usado amplamente em pacientes com SCA. No entanto, devido sua inibição específica poucos efeitos

sobre os demais mecanismos de ativação plaquetária são exercidos (FLETCHER & THALINGER, 2010). Assim, a terapia antiplaquetária dupla é recomendada para uma maior proteção. A combinação mais utilizada é constituída de AAS em associação com compostos tienopiridínicos, sendo clopidogrel o fármaco comumente prescrito (DAMMAN *et al.*, 2012; FLETCHER & THALINGER, 2010).

3.2 TIENOPIRIDINAS

Os fármacos tienopiridínicos são agentes antiplaquetários utilizados em terapia dupla com o AAS no tratamento de pacientes com ACS e submetidos a ICP (ANGIOLILLO *et al.* 2010, RENY *et al.*, 2012).

A ticlopidina foi o primeiro composto dessa classe, aprovada para uso clínico em 1979 com o nome comercial de Ticlid[®]. Devido seus efeitos terapêuticos limitados e altos índices de efeitos colaterais (neutropenia, trombocitopenia, *rash* cutâneo e efeitos gastrointestinais adversos) seu uso foi substituído (ANGIOLILLO *et al.*, 2008; FARID *et al.*,2010; RENY *et al.*, 2012).

Clopidogrel, um tienopiridínico de segunda geração, é um composto amplamente prescrito em associação com AAS na abordagem inicial ao paciente com SCA e submetidos a ICP (FARID *et al.*,2010).

No entanto, estudos clínicos associam o risco recorrente de novos eventos trombóticos com a variabilidade interindividual na resposta terapêutica observada em pacientes submetidos à administração de clopidogrel. Isso porque, aproximadamente um quarto dos pacientes que fazem uso do composto apresentam um polimorfismo no gene que codifica as isoenzimas do citocromo hepático P450 envolvidas no processo de biotransformação do pró-fármaco. Com atividade reduzida das enzimas há a diminuição ou ausência da formação do metabólito ativo responsável pelo efeito terapêutico (MANNUCCI & FRANCHINI, 2009).

Evidências como absorção intestinal limitada, interações medicamentosas envolvendo CYP3A4, elevado índice de massa corpórea, entre outros fatores clínicos, celulares e genéticos, também podem explicar a baixa eficácia desse fármaco em alguns indivíduos (CAYLA *et al.*; 2012; MANNUCCI & FRANCHINI, 2009).

Devido a estas limitações, novos fármacos foram desenvolvidos na tentativa de contornar esses problemas. Prasugrel demonstrou ser mais potente e ter um rápido início de ação quando comparado ao clopidogrel (RENY *et al.*, 2012; SUGIDACHI *et al.*, 2007). Além disso, diversos estudos indicam menor variabilidade interindividual devido diferenças nas vias metabólicas responsáveis pela biotransformação desses pró-fármacos (TAN *et al.*, 2012; VARENHORST *et al.*, 2009).

3.2.1 Prasugrel

Prasugrel (Figura 3.1) é um composto tienopiridínico de terceira geração, aprovado em 2009 pelo Food and Drug Administration (FDA), para a redução de eventos cardiovasculares trombóticos em pacientes com SCA ou submetidos a ICP (GUERRA & TCHENG, 2009; NUSCA & PATTI, 2012; TAN *et al.*, 2012).

Obtido como uma mistura racêmica, é comercializado na forma de cloridrato por apresentar melhor estabilidade hidrolítica e solubilidade relevante nos pHs fisiológicos. O cloridrato de prasugrel é um sólido cristalino de cor branca a marrom claro e levemente higroscópico. Sua solubilidade é influenciada pelo pH sendo solúvel ou levemente solúvel na faixa de pH 1,0 - 4,0, muito pouco solúvel no pH 5,0 e praticamente insolúvel na faixa de pH 6,0 - 7,0. O valor de pka de cloridrato de prasugrel é de 5,1. Estudos indicam que o composto apresenta polimorfismo (EMEA, 2009).

Apresenta as seguintes características: (CHEMBLINK, 2011; PUBCHEM, 2012)

- Registro no *Chemical Abstracts* (CAS): 150322-43-3
- Fórmula molecular: $C_{20}H_{20}FNO_3S$
- Massa molecular da base: 373,44
- Massa molecular do sal de cloridrato: 409,90 (EMEA)
- Densidade: 1,347
- Log P: $2,718 \pm 0,904$
- Nomenclatura IUPAC: [5- [2- ciclopropil – 1- (2- fluorofenil) – 2- oxoetil] – 6, 7 – dihidro- 4H- tieno [3,2- c] piridin – 2- il] acetato

- Forma farmacêutica: comprimidos revestidos

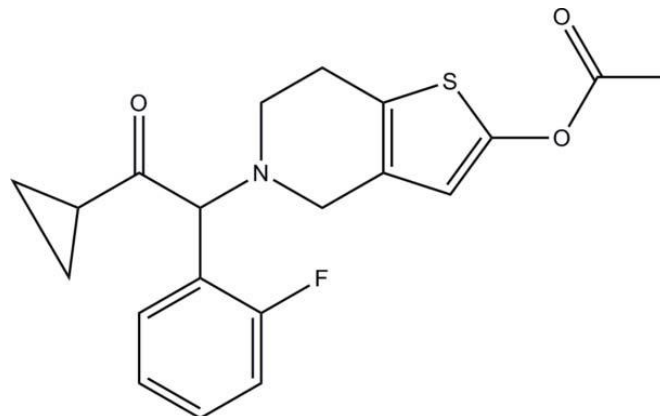


Figura 3.1. Representação estrutural de prasugrel (CHEMBLINK, 2011; PUBCHEM, 2012).

3.2.1.1 Mecanismo de ação

Prasugrel, uma vez convertido a seu metabólito ativo, inibe a agregação plaquetária mediada pelo agonista endógeno ADP através do antagonismo irreversível dos receptores purinérgicos P2Y₁₂ localizados na superfície das plaquetas. A inibição dos receptores evita uma série de reações intracelulares, como observado na Figura 3.2, que desencadeariam na agregação plaquetária e estabilização do trombo gerado (ANGIOLILLO, *et al.*, 2010; DAMMAN *et al.*, 2012).

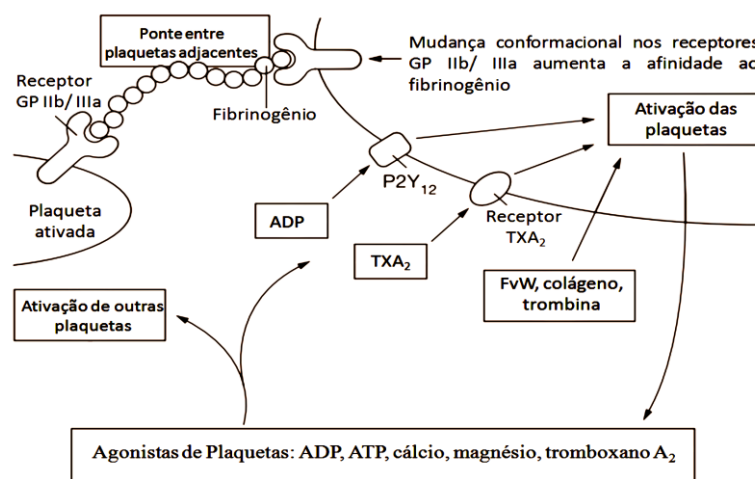


Figura 3.2. Processo de ativação e agregação plaquetária (ADP = Adenosina Difosfato, ATP= Adenosina Trifosfato e TX A₂ = tromboxano A₂) - Adaptado de RAJU *et al.*, 2008.

3.2.1.2 Aspectos farmacológicos

Prasugrel é um pró-fármaco que necessita de bioconversão ao metabólito ativo. Apresenta rápido início de ação comparado aos outros fármacos de sua classe terapêutica, visto que seu metabólito ativo apresenta níveis plasmáticos detectáveis em 15 minutos após sua administração (VEVERKA & HAMMER, 2009).

Após ser absorvido pela mucosa intestinal, o pró- fármaco é hidrolizado de forma rápida e eficiente por carboxil estearases intestinais e plasmáticas a uma tiolactona precursora (R-95913), como representado na Figura 3.3. Esse metabólito intermediário é em seguida oxidado por enzimas hepáticas do complexo P450 convertendo-se no metabólito ativo (R-138727), cuja meia vida é de aproximadamente 7,4 horas. Vários citocromos estão envolvidas no metabolismo do prasugrel, no entanto, a CYP 3A4 parece desempenhar o papel mais importante seguido pela CYP 2B6. A excreção se dá 70% pela urina e 30% pelas fezes (DAMMAN *et al.*, 2012; SCHRÖR *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2012).

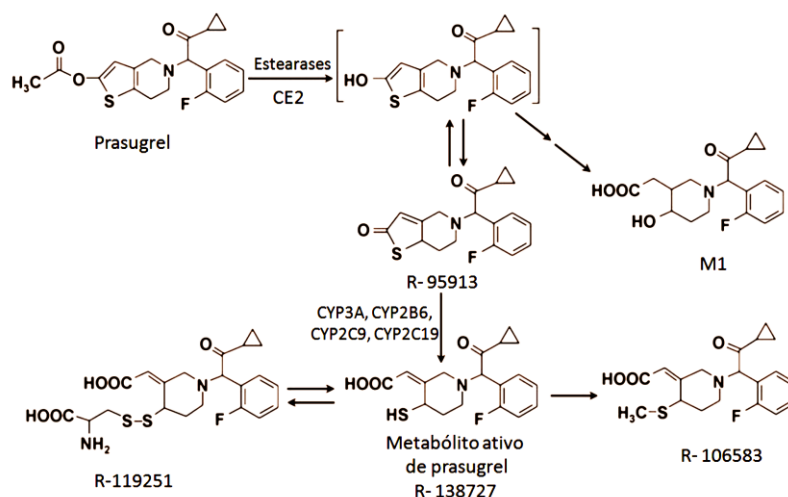


Figura 3.3. Processo de biotransformação do pró-fármaco a seu metabólito ativo (CE2= carboxil esterases 2)- Adaptado de FARID *et al.*, 2010.

Prasugrel apresenta poucas interações clinicamente significativas, devido sua bioconversão ao metabólito ativo apresentar baixa dependência em uma enzima CYP específica (SAUCEDO, 2012). Fármacos que alteram a

atividade do citocromo P450 ou que alteram o pH gástrico podem ser administrados concomitantemente com prasugrel de acordo com os guias do FDA e da União Européia (WIVIOTT *et al.*, 2010).

Deve ser administrado com cautela em associação com fármacos que inibem a coagulação sanguínea, como por exemplo, heparina, varfarina, agentes fibrinolíticos e antagonistas dos receptores glicoproteínas IIb/IIIa, devido o alto risco de hemorragia nesses casos (JOHN *et al.*, 2012).

As reações adversas mais comuns relatadas com o uso de prasugrel são eventos hemorrágicos como epistaxe, hemorragia gastrointestinal, hemoptise, hematoma subcutâneos, hemorragia pós- procedimental e hemorragia retroperitoneal. Também são relatados eventos de reações alérgicas a algum componente da formulação, anemia, alterações na função hepática, trombocitopenia severa e angioedema (SEARS & BOOKS, 2010).

Pacientes idosos com idade acima de 70 anos e aqueles com peso corporal inferior a 60 Kg apresentam restrições no uso de agentes antiplaquetários. Estudos revelam que nesses casos, esses pacientes podem apresentar níveis elevados do metabólito ativo do prasugrel, devido a alterações na metabolização do fármaco ou ao baixo peso corporal, o que acarretaria em maior risco de hemorragia. Em situações que necessitem o uso desse antiplaquetário, este deve ser utilizado em menores doses (DAMMAN *et al.*, 2012; VEVERKA & HAMMER, 2009; WILSON *et al.*, 2009).

Quando administrado em pacientes com histórico de eventos cerebrovasculares taxas consideráveis de hemorragias fatais, inclusive intracranianas, foram observadas (WIVIOTT *et al.*, 2007). O uso de prasugrel também é contra-indicado em pacientes com cirurgia de revascularização do miocárdio prévia ou com aumento do risco de hemorragia (SAUCEDO, 2012).

3.2.1.3 Determinação qualitativa e quantitativa

Tendo em vista a necessidade de se adotar metodologia analítica adequada para quantificação do fármaco em questão, alguns estudos foram publicados na literatura científica.

Diversos trabalhos descrevem a determinação quantitativa de prasugrel em fluídos biológicos. Foram desenvolvidas técnicas por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CL- EM/EM) (FARID *et al.*, 2007; LUKRAM *et al.*, 2011) para a quantificação dos metabólitos ativo e/ou inativo de prasugrel em plasma. Wickremsinhe e colaboradores utilizaram a mesma técnica analítica para a separação dos quatro isômeros de prasugrel em plasma.

Estudos realizados para a determinação quantitativa de prasugrel SQR e prasugrel presente em comprimidos revestidos utilizam CLAE como técnica analítica. Os métodos citados pouco diferem na composição da fase móvel, no tipo de detecção e tipo de coluna. A Tabela 3.1 apresenta as condições cromatográficas disponíveis em literatura.

Tabela 3.1. Métodos utilizados para a determinação quantitativa de prasugrel por CLAE.

Coluna	Fase móvel	Detecção	Autores
Zorbax XDB [®] C8	Acetato de amônio (0,05 M; pH 4,5): acetonitrila (40:60 v/v)	PDA a 254 nm	AHIRRAO <i>et al.</i> , 2012
C18	Metanol: acetonitrila (90:10 v/v)	E UV a 240 nm	DESAI <i>et al.</i> , 2012
Kromasil [®] C18	Fosfato de potássio (0,01 M; pH 2,2): metanol (30:70 v/v)	E UV a 257 nm	PARMAR <i>et al.</i> , 2012
Inersitil [®] ODS- 3V	Fosfato monopotássico (0,02 M): fosfato dipotássico (0,02 M): acetonitrila (30:70 v/v)	E UV a 210 nm	PRAKASH <i>et al.</i> , 2011
Inersitil [®] C18	Fosfato de potássio (pH 3,1): acetonitrila (15:85 v/v)	E UV a 230 nm	PRABAHAR <i>et al.</i> , 2011
Xterra [®] C18	Fosfato de potássio (0,03 M; pH 3,2): acetonitrila (25:75 v/v)	E UV a 210 nm	PULLA <i>et al.</i> , 2011
Grace Smart [®] C18	Fosfato monossódico (0,02 M; pH 3,0): metanol: acetonitrila (45: 20: 35 v/v)	E UV a 220 nm	SRIKANTH <i>et al.</i> , 2011

Outras técnicas cromatográficas foram desenvolvidas para determinação de prasugrel. DAMLE e colaboradores (2010) desenvolveram um método indicador de estabilidade por cromatografia em camada delgada de alta performance para identificação dos produtos de degradação do prasugrel

matéria-prima. SAHU e colaboradores (2011) propuseram um estudo comparativo do comportamento de prasugrel depois de submetido a condições de estresse e avaliado através das técnicas de CLUE e CLAE. Foram encontradas degradações significativas em condições ácidas, básicas, neutras e oxidativas. Prasugrel foi estável apenas em condições térmicas e fotolíticas.

Métodos de espectrofotometria na região do UV/VIS para a quantificação de prasugrel em especialidades farmacêuticas também foram descritas (JENA *et al*, 2011; KUMAR *et al.*, 2011).

Em relação ao método de dissolução, o FDA (2013) descreve as condições para a realização do ensaio: 900 mL de tampão citrato-fosfato pH 4,0, utilizando pás a 75 rpm e coletas em 10, 20, 30 e 45 minutos. No entanto, não foram relatadas as condições espectrofotométricas ou cromatográficas para a quantificação do fármaco dissolvido.

Compêndios oficiais, nas suas últimas edições, ainda não contêm metodologia recomendada para análise quantitativa do prasugrel.

3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Dados analíticos auxiliam na descoberta, desenvolvimento e produção de novos fármacos e produtos farmacêuticos. Através das informações obtidas conduzem a tomada de decisões com consequências diretas na economia e saúde pública. Por isso, é de extrema importância dados confiáveis e reprodutíveis (BRANCH, 2005; ROZET *et al.*, 2007).

Visando a garantia do desempenho e reprodutibilidade do método analítico um conjunto de normas e orientações elaboradas por órgãos regulatórios estão disponíveis. Os documentos sugerem o processo de validação do método antes de sua implementação na rotina laboratorial. O procedimento consiste em uma investigação detalhada que evidencia, de maneira objetiva, a adequabilidade e confiabilidade da metodologia analítica (ARAUJO, 2009; ROZET *et al.*, 2007).

Os parâmetros a serem avaliados estão relacionados com o tipo e uso pretendido da metodologia analítica. De acordo com os guias, os métodos são classificados nas seguintes categorias: testes quantitativos para a

determinação de substâncias ativas em preparações farmacêuticas ou matéria-prima (categoria I), testes quantitativos para a determinação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos (categoria II), testes quantitativos para a determinação do desempenho de medicamentos (categoria III) e testes de identificação (categoria IV) (BRASIL, 2003; USP, 2012).

Incluído no processo de validação, condições de estresse auxiliam no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade. Essa característica é uma vantagem analítica adicional, pois confere ao método capacidade de quantificar compostos ativos na presença de possíveis produtos de degradação, excipientes ou aditivos presentes na formulação que possam ser co-eluentes. Para isso, estudos indicativos de estabilidade fornecem evidências sobre a influência de fatores como temperatura, umidade, luz e hidrólise (em diferentes valores de pH) na estabilidade de substâncias ativas ou produtos farmacêuticos (ICH, 2003; SEHRAMAT *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009).

Métodos analíticos são importantes para assegurar segurança, eficácia e qualidade de produtos farmacêuticos. Uma variedade de metodologias analíticas está disponível para a avaliação de compostos farmacêuticos, sendo as mais empregadas técnicas cromatográficas, eletroforéticas e espectrofotométricas.

3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

É uma técnica separativa que consiste na migração diferencial de compostos eluídos em uma fase móvel. O processo de retenção do analito envolve diferentes interações e comportamentos moleculares do composto com a fase estacionária (AHUJA & DONG, 2005; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007; WATSON, 2005).

A CLAE é uma técnica que permite combinação com diferentes tipos de detectores. Como a maioria dos compostos farmacêuticos apresenta absorção na região do UV/VIS, esse sistema de detecção é prevalente (AHUJA & DONG, 2005).

Aplicações da CLAE incluem análises de rotina para a determinação qualitativa e quantitativa de compostos ativos presentes em formas farmacêuticas, e monitoramento da estabilidade de fármacos e medicamentos,

com a possibilidade de detecção dos produtos de degradação e impurezas (AHUJA & DONG, 2005; WATSON, 2005).

Desde o início, a técnica está em constante aprimoramento tecnológico, para melhorias dos parâmetros do sistema, como resolução e eficiência. Com esse intuito, estudos voltados para o desenvolvimento de novas partículas de fase estacionária e inovações na instrumentação, permitem análises mais rápidas sem prejuízos aos parâmetros cromatográficos (MALDANER & JARDIM, 2009).

Portanto, a CLAE é uma importante técnica analítica empregada na rotina laboratorial para a separação e quantificação de substâncias ativas e impurezas, constituindo uma importante ferramenta para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

3.3.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida (CL) é uma técnica versátil que pode ser acoplada a diferentes tipos de detectores, dentre eles a espectrometria de massas (EM) (CHIARADIA *et al.*, 2008).

A associação CL- EM une uma técnica de separação sofisticada, que utiliza fases estacionárias compostas por partículas de tamanho reduzido, a um detector específico e sensível (CHIARADIA *et al.*, 2008; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007). Com isso, é possível a separação de compostos presentes em misturas complexas, incluindo matrizes biológicas, em pouco tempo e com alto poder de resolução e sensibilidade (LI *et al.*, 2009).

Com ampla aplicabilidade em análises farmacêuticas, a técnica possui mecanismo de separação similar ao CLAE. No entanto, inovações instrumentais foram necessárias para que fosse possível o acoplamento CL-EM. Isso porque, o sistema cromatográfico possui alta vazão do sistema eluente o que é incompatível com a pressão sob vácuo utilizada pelo sistema detector. Assim, o desenvolvimento de interfaces foi necessário com o intuito de que toda, ou parte da fase móvel fosse retirada antes de sua entrada no sistema de detecção (CHIARADIA *et al.*, 2008)

Para a ionização do analito também foi necessário o desenvolvimento de métodos alternativos, pois geralmente os compostos analisados por LC são

poucos voláteis e/ ou termolábeis, o que não permitiria que as técnicas convencionais de ionização utilizadas em EM fossem empregadas (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007). As fontes de ionização alternativas mais utilizadas para o acoplamento são ionização por eletronebulização (*electrospray ionization – ESI*) e ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization – APCI*) que utilizam alta voltagem e temperatura como mecanismo. Através da ionização dos compostos é possível adquirir informações sobre o peso molecular e características estruturais da amostra (KORFMACHER, 2005).

A seletividade e sensibilidade conferida à técnica analítica permitem a identificação de compostos encontrados em baixos níveis. Por isso CL- EM é uma ferramenta importante na determinação de impurezas e de produtos de degradação presentes em preparações farmacêuticas (GILLESPIE & WINGER, 2011; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Os produtos de degradação podem ser identificados com a realização de estudos de estresse, que submetem o produto farmacêutico a fatores de degradação que fornecem características físico- químicas da substância ativa (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Na literatura, há a descrição de vários estudos que propuseram vias de degradação de fármacos e estruturas moleculares de produtos de degradação com o auxílio de CL-MS. Alguns exemplos podem ser relatados como trabalhos de BARDEN e colaboradores (2012) para a identificação do principal produto de degradação de vildagliptina, SHAH e colaboradores (2010) para identificação e caracterização de produtos de degradação de irbesartana, PAULINO e colaboradores (2012) para identificação do produto de degradação de deflazacorte, MURAKAMI e colaboradores (2008) para identificação de produtos de degradação de maleato de amlodipino, SFAIR e colaboradores (2012) para a identificação do principal produto de degradação de cloridrato de miaserina e SANGOI e colaboradores (2011) para a identificação do principal produto de degradação de fesoteridina.

A LC-MS é uma técnica sofisticada para análises de controle de qualidade de produtos farmacêuticos e substâncias ativas, sendo a metodologia de escolha para a identificação de impurezas e produtos de degradação. No

entanto, é importante ressaltar o alto custo do equipamento o que dificulta sua implementação na rotina laboratorial.

3.3.3 Eletroforese capilar (EC)

A EC é uma técnica separativa bem estabelecida utilizada para fins qualitativos e quantitativos de compostos ativos presentes em preparações farmacêuticas ou matrizes biológicas. A EC realiza análises com moléculas que possuem distintas características de polaridade e peso moleculares, separando desde moléculas inorgânicas a biopolímeros (SUNTORNSUK, 2010; TIMERBAEV, 2013).

É uma técnica complementar a CLAE devido sua versatilidade e eficiência de separação. Quando comparada a outras metodologias, possui baixa complexidade de automação (SUNTORNSUK, 2010; TIMERBAEV, 2013).

O mecanismo de separação ocorre em capilar de sílica fundida e consiste na migração diferencial de compostos solubilizados em eletrólito na presença de um campo elétrico (SUNTORNSUK, 2010; TIMERBAEV, 2013).

O reduzido diâmetro interno do capilar confere à técnica rapidez e eficiência de separação, porém é responsável pela baixa sensibilidade de detecção. Isso porque, o pequeno diâmetro dos capilares de sílica apresenta estreito caminho óptico que, associado ao baixo volume e imprecisão da amostra injetada são responsáveis pela principal limitação da técnica (MORAES *et al.*, 2010).

Uma alternativa para esse problema é a utilização de um sistema de detecção por espectrometria de massas que confere maior sensibilidade à análise (SUNTORNSUK, 2010).

A EC apresenta vários modos de aplicação que são classificados de acordo com o mecanismo de separação empregado, sendo a eletroforese capilar de zona (*capillary zone electrophoresis– CZE*) e cromatografia eletrocinética micelar (*micellar electrokinetic chromatography – MEKC*) as mais empregadas em análises farmacêuticas (SUNTORNSUK, 2010).

EC é uma técnica simples e sofisticada que vem sofrendo inovações para o aumento de sua aplicabilidade em análises de rotina e não somente para fins

de pesquisa. É uma metodologia versátil que pode ser utilizada como alternativa a CLAE devido sua rapidez e eficiência de separação.

3.3.4 Espectrofotometria do ultravioleta/visível (E UV/VIS)

A E UV/VIS é uma técnica rápida, simples e de baixo custo. Esta metodologia analítica permite a quantificação de substâncias ativas que absorvem radiação na faixa de 200- 700 nm, intervalo pertencente à região UV/VIS. O princípio está baseado na determinação da absorvância, resultado de transições eletrônicas que são geradas através das interações de elétrons com a energia eletromagnética (PAVIA, *et al.*, 2001; WATSON, 2008). A E UV/VIS apresenta baixa seletividade devido à possibilidade de diferentes compostos presentes na amostra, tais como impurezas ou produtos de degradação, exibirem similar comportamento de absorção ao da substância ativa em quantificação (GÖRÖG, 2008).

3.4 Dissolução

O teste de dissolução é uma importante ferramenta empregada na avaliação do desempenho de produtos farmacêuticos. Fornece o perfil de liberação de substâncias ativas em formas farmacêuticas sólidas e semi-sólidas, auxiliando nos estudos de pré-formulações e controle de qualidade (AZARMI *et al.*, 2007; DOKOUMETZIDIS & MACHERAS, 2007; DRESSMAN & KRÄMER, 2005; MADDINENI *et al.*, 2012).

O estudo avalia as influências das características físico- químicas de substância ativa, tais como polimorfismo, tamanho de partícula, e de alterações no processo de fabricação do produto que possam interferir no perfil de liberação do fármaco (DRESSMAN & KRÄMER, 2005)

Atualmente, é vasta sua utilização para a identificação de formulações candidatas a estudos *in vivo* para verificação da biodisponibilidade. Para que o teste de dissolução seja uma ferramenta preditiva de absorção oral, o método deve ser discriminativo, ou seja, ser capaz de detectar diferenças no perfil de dissolução decorrentes de alterações do processo de produção ou estabilidade,

que possam causar possíveis problemas nos estudos de biodisponibilidade (ANAND *et al*,2011; DRESSMAN & KRÄMER, 2005; KLEIN, 2010).

AMIDON e colaboradores propuseram, em 1995, o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), que fornece informações dos parâmetros que influenciam sobremaneira no processo de absorção gastrointestinal de fármacos e auxiliam no desenvolvimento de testes de dissolução discriminativos (ANAND *et al*, 2011; DOKOUMETZIDIS & MACHERAS, 2007; DRESSMAN & KRÄMER, 2005; KLEIN, 2010; MADDINENI *et al.*, 2012).

O SCB classifica as substâncias de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade em (ANAND *et al*, 2011; DAHAN *et al.*,2009; DRESSMAN & KRÄMER, 2005; PHILLIPS *et al.*, 2012):

- classe I: alta solubilidade e alta permeabilidade
- classe II: baixa solubilidade e alta permeabilidade
- classe III: alta solubilidade e baixa permeabilidade
- classe IV: baixa solubilidade e baixa permeabilidade

Dessa forma, é importante ressaltar a necessidade da investigação do perfil de dissolução em meios biorrelevantes, ou seja, aqueles que contemplem a faixa de pH fisiológica (DRESSMAN & KRÄMER, 2005; KLEIN, 2010; MADDINENI *et al.*,2012).

**4 CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA SQR E ANÁLISE QUALITATIVA
DE PRASUGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

**5 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CLORIDRATO DE
PRASUGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

5.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CLORIDRATO DE PRASUGREL EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS

6 CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO TESTE DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS REVESTIDOS DE CLORIDRATO DE PRASUGREL

**6.1 ARTIGO CIENTÍFICO- DEVELOPMENT AND VALIDATION OF
DISCRIMINATING METHOD OF PRASUGREL DISSOLUTION IN TABLETS
USING AN ULTRAVIOLET DETECTION**

7 CAPÍTULO IV – IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS EM CONDIÇÕES ALCALINAS E TÉRMICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CL-EM)

7.1 ARTIGO CIENTÍFICO- PRASUGREL DEGRADATION BEHAVIOR BY LC-UV AND IDENTIFICATION OF THERMAL AND ALKALINE DEGRADATION PRODUCTS USING LC-ESI-MS

8 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELIN, A. P.; QUADROS, A. S.; ZANETTINI, M. T.; LEBOUTE, F. C.; YORDI, L. M.; CARDOSO, C. R.; MORAIS, C. A. R.; RODRIGUES, L. H. C.; MOURA, M. R. S., SARMENTO-LEITO, R.; GOTTSCHALL, C. A. M. Doze Anos de Experiência com Implante de Stents Coronários em 5.284 pacientes. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 17, n. 3, p. 346-351, 2009.

AHIRRAO, V.K.; PATIL, C.S.; BEMBALKAR, S.B.; UBALE, S.B.; MARATHE, R.P.; NAWALE, R.B. LANDGE, M.G.; PAWAR, R.P. Stability-indicating LC method for the determination of prasugrel hydrochloride in pharmaceutical dosage form. **Scientia Pharmaceutica**, v. 80, p. 379- 391, 2012.

AHUJA, S.; DONG, M.W. **Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC**. *Waltham*: Elsevier Academic Press, 2005.

ANAND, O.; YU, L. X.; CONNER, D. P.; DAVIT, B. M. Dissolution testing for generic drugs: An FDA perspective. **The AAPS Journal**, v. 13, n. 3, p. 325-335, 2011.

ANGIOLILLO, D. J.; FERREIRO, J. L. Platelet Adenosine Diphosphate P2Y12 Receptor Antagonism: Benefits and Limitations of Current Treatment Strategies and Future Directions. **Revista Española de Cardiología**, v. 63, n. 1, p. 60- 76, 2010.

ANGIOLILLO, D. J.; GUZMAN, L. A.; BASS, T. A. Current antiplatelet therapies: benefits and limitations. **American Heart Journal**, v. 156, p. S3- S9, 2008.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, n. 877, p. 2224- 2234, 2009.

AULTON, M. E. **Pharmaceutics- The science of dosage form design**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002.

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. L. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 12- 21, 2007.

BAHGA, S. S.; SANTIAGO, J. G. Coupling isotachopheresis and capillary electrophoresis: a review and comparison of methods. **Analyst**, v. 138, p. 735-754, 2013.

BARDEN, A. T.; SALAMON, B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; STEPPE, M. Stability-Indicating RP-LC Method for the Determination of Vildagliptin and Mass Spectrometry Detection for a Main Degradation Product. **Journal of Chromatography Science**, v. 50, p. 426- 432, 2012.

BOULANGER, B.; HUBERTI, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111- 125, 2007.

BRANCH, S. Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 798-805, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Indicadores e Dados Básicos (IDB), 2011. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c08.def>>. Acesso em 02 dezembro 2012.

BROWNE, D. Reference- Standard Material Qualification. **Pharmaceutical Technology**, v. 33, n. 4, p. 66- 73, 2009.

CAYLA, G.; SILVAIN, J.; O'CONNOR, S. A.; COLLET, J. P.; MONTALESCOT, G. An evidence-based review of current anti-platelet options for STEMI patients, **International Journal of Cardiology**, doi:10.1016/j.ijcard.2012.04.160, 2012.

CHEMBLINK. Online Database of Chemicals from Around the World. Disponível em: <<http://www.chemblink.com/products/150322-43-3.htm>>. Acesso em 06 dezembro 2012.

CHEN, Y.; LÜ, W.; CHEN, X.; TENG, M. Review of recent developments of on-line sample stacking techniques and their application in capillary electrophoresis. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 611-638, 2012.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. o estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 623- 636, 2008.

DAHAN, A.; MILLER, J. M.; AMIDON, G. L. Prediction of solubility and permeability class membership: Provisional BCS classification of the world's top oral drugs. **The AAPS Journal**, v. 11, n. 4, 2009.

DAMLE, M.C.; BOROLE, T.C.R.; MEHENDRE, R.; BOTHARA, K.G. Development and validation of stability indicating HPTLC for determination of Prasugrel. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 4, p. 907- 913, 2010.

DAMMAN, P.; WOULDSTRA, P.; KUIJT, W. J.; DE WINTER, R. J.; JAMES, S. K. P2Y12 platelet inhibition in clinical practice. **The Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 33, p. 143- 153, 2012.

DESAI, D.S.; BARMECHA, B.S.; WALODE, S.G. Stability indicating method for quantitation of prasugrel hydrochloride in presence of its degradation products. **International Journal of Pharmacy and Technology**, v. 4, n. 3, p. 4711-4720, 2012.

DIPIRO, J. T.; TALBERT, R. L.; YEE, G. C.; MATZKE, G. R.; WELLS, B. G.; POSEY, L. M. **Pharmacotherapy – A Pathophysiology approach**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Companies, Inc., 2008.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, p. 1- 11, 2006.

DRESSMAN, J. B.; KRÄMER, J. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. London: Taylor & Francis Group, 2005.

Eli Lilly & Company. Effient® Bula, 2009.

EMA. European Medicines Agency. Assessment report for Eflint, 2009. Disponível http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000984/WC500021975.pdf. Acesso em 07 dezembro 2012.

ESPADA, A.; MOLINA- MARTIN, M. Capillary electrophoresis and small molecule drug discovery: a perfect match? **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 7/8, 2012.

FARID, N. A.; KURIHARA, A.; WRIGHTON, S. A. Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. **The Journal of Clinical Pharmacology**, n. 50, p. 126- 142, 2010.

FARID, N.A.; MCINTOSH, M.; GAROFOLO, F.; WONG, E.; SHWAJCH, A.; KENNEDY, M.; YOUNG, M.; SARKAR, P.; KAWABATA, K.; TAKAHASHI, M.; PANG, H. Determination of the active and inactive metabolites of prasugrel in human plasma by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 169- 179, 2007.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_searchresults_dissolutions.cfm?printall=1>. Acesso em 15 fevereiro 2013.

FLETCHER, B.; THALINGER, K. K. Prasugrel as Antiplatelet Therapy in Patients With Acute Coronary Syndromes or Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. **Critical Care Nurse**, v. 30, n. 5, p. 45- 54, 2010.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. New antiplatelet agents: Why they are needed. **European Journal of Internal Medicine**, v. 20, p. 733- 738, 2009.

GILLESPIE, T. A.; WINGER, B. E. Mass spectrometry for small molecule pharmaceutical product development: A review. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 479- 490, 2011.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 247–253, 2008.

GUERRA, D. R.; TCHENG, J. E. Prasugrel: Clinical Development and Therapeutic Application. **Advances in Therapy**, v. 26, n. 11, p. 999-1011, 2009.

HOLZGRABE, U.; BRINZ, D.; KOPEC, S.; WEBER, C.; BITAR, Y. Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? **Electrophoresis**, v. 27, p. 2283- 2292, 2006.

ICH- **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Stability testing of new drug substances and products- Q1A (R2)**. ICH Steering Committee, Geneva, 2003.

ICH. **International Conference on the Harmonization of technical requirements for the registration for human use**. Guideline on validation of analytical procedures: Text and methodology. Commission of the European Communities, Geneva, 2005.

JENA, F.M.; KUMAR, B.V.V.R.; VIRIYALA, R.K.; ANNAPURNA, M.M.; BISHT, S.P.S. Validated new spectrophotometric methods for the estimation of prasugrel in bulk and pharmaceutical dosage forms. **Pharmacie Globale**, v. 2, n. 6, p. 01-03, 2011.

JOHN, J.; KOSHY, S. K. G. Current oral antiplatelets: Focus update on prasugrel. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 25, n. 3, p. 343- 349, 2012.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007.

KIBBE, A. H. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 3.ed. Washington: Pharmaceutical Press, 2000.

KIM, L.; CHARITAKIS, K.; SWAMINATHAN, R. V.; FELDMAN, D. N. Novel Antiplatelet Therapies. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 14, p. 78- 84, 2012.

KLEIN, S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 397- 406, 2010.

KORFMACHER, W. A. Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drugs Discoveries & Therapeutics**, v. 10, n. 20, p. 1357 – 1367, 2005.

KUMAR, A. A.; KUMAR, A.A.; SANKAR, D.G. Development, estimation and validation of prasugrel in bulk and in it's pharmaceutical formulation by UV-VIS spectroscopic method. **Pharmanest**, v. 2, n. 1, p. 37- 39, 2011.

LI, M.; WANG, X.; CHEN, B.; LIN, M. BUEVICH, A. V.; CHAN, T. M.; RUSTUM, A. M. Use of liquid chromatography/ tandem mass spectrometric molecular fingerprinting for the rapid structural identification of pharmaceutical impurities. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 22, p. 3533- 3542, 2009.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v. 111, p. 3481-3488, 2005.

LUKRAM, O.; ZARAPKAR, M.; JHA, C.K.; PARMAR, S.; TOMAR, K.S. HANDE, A. Electrospray ionization LC-MS/ MS validated method for the determination of the active metabolite (R-138727) of prasugrel in human plasma and its application to a bioequivalence study. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, n. 2, p. 156- 166, 2011.

MADDINENI, S.; CHANDU, B.; RAVILLA, S.; NAMA, S. Dissolution research- a predictive tool for conventional and novel dosage forms. **Asian Journal of Pharmacy and Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 119 – 134, 2012.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214- 222, 2009.

MANNUCCI, P.; FRANCHINI, M. New antiplatelet agents: Why they are needed. **European Journal of Internal Medicine**, v. 20, p. 733- 738, 2009.

MATHKAR, S.; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, K.; MIN, D.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 627- 631, 2009.

MEERMANN, B.; SPERLING, M. Hyphenated techniques as tools for speciation analysis of metal-based pharmaceuticals: developments and applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 1501- 1522, 2012.

MEUWISSEN, M.; VAN DER WAL, A. C.; SIEBES, M.; KOCH, K. T.; CHAMULEAU, S. A. J.; VAN DER LOOS, C. M.; TEELING, P.; DE WINTER, R.J.; NIESSEN, H. W. M.; TIJSSEN, J. G. P.; BECKER, A. E.; PIEK, J. J. Role of plaque inflammation in acute and recurrent coronary syndromes. **Netherlands Heart Journal**, v. 12, n. 3, 2004.

MORAES, M. L. L.; MORAIS, S. L.; PEREIRA, E. A; TAVARES, M. F. M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1: Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1041- 1046, 2009.

MORAES, M. L. L.; TAVARES, M. F. M.; PEREIRA, E. A. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar. Parte 2. Manipulação da velocidade da fase dispersa/ secundária. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 466- 470, 2010.

MORZUNOVA, T. G. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control: Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (A review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, n. 3, p. 99 – 52, 2006.

MURAKAMI, T.; FUKUTSU, N.; KONDO, J.; KAWASAKI, T.; KUSU, F. Application of liquid chromatography-two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy using pre-concentration column trapping and liquid chromatography–mass spectrometry for the identification of degradation products in stressed commercial amlodipine maleate tablets. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, n. 1- 2, p. 67- 76, 2008.

NUSCA, A.; PATTI, G. Platelet function and inhibition in ischemic heart disease. **Current Cardiology Reports**, v. 14, p. 457- 467, 2012.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M .I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224- 1230, 2011.

OPEKAR, F.; COUFAL, P.; STULÍK, K. Rapid capillary zone electrophoresis along short separation pathways and its use in some hyphenated systems: a critical review. **Chemicals Reviews**, v. 109, p. 4487- 4499, 2009.

PARMAR, S.J.; PATEL, B.A., JAIN, A.P. Development and validation of RP-HPLC method for Prasugrel. **Journal of chemical and Pharmaceutical research**, v. 4, n. 7, p. 3373- 3376, 2012.

PAULINO, A. S.; RAUBER, G.; DEOBALD, A. M.; PAULINO, N.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; CARDOSO, S. G. Isolation and characterization of a degradation product of deflazacort. **Pharmazie**, v. 67, n. 6, 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. In:____. **Introduction to Spectroscopy – A guide for students of organic chemistry**. 3. Ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001. cap. 3, p. 138-156.

PHILLIPS, D. J.; PYGALL, S. R.; COOPER, V. B.; MANN, J. C. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 1549 – 1559, 2012.

PRABAHAR, A.E.; RAO, N.R.; SAMBASIVA, K.R.S.; KUMAR, P.V. Method development and validation for the HPLC potency assay of prasugrel tablets. **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 4, p. 980- 982, 2011.

PRAKASH, K.V.; ISHAQ, B.M.; MOHAN, G.K. Development and validation of HPLC method for determination of prasugrel in bulk and its pharmaceutical formulation. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 404- 409, 2011.

PRETSCH, E.; CLERC, T., SEIBL, J.; SIMON, W. **Tablas para la elucidacion structural de compuestos organicos por metodos espectroscópicos**, 2.ed. Madrid: Alhambra, 1985.

PUBCHEM COMPOUNDS. Compound Summary. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6918456&loc=ec_rcs> Acesso em 06 dezembro 2012.

PULLA, R.P.; SASTRY, B.S.; PRASAD, Y.R.; RAJU, N.A. Estimation of prasugrel in tablet dosage form by RP-HPLC. **International Journal of Chemical Research**, v. 2, n. 3, p. 34- 36, 2011.

RAJU, N. C.; EIKELBOOM, J. W.; HIRSH, J. Platelet ADP- receptor antagonists for cardiovascular disease: past, present and future. **Nature Clinical Practice**, v. 5, n. 12, p. 766- 780, 2008.

RENY, J. L.; BONVINI, R. F.; BONVINI, J. M.; ROFFI, M.; FONTANA, P. Poor responsiveness to antiplatelet drugs in acute coronary syndromes: clinical relevance and management. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 30, p. e41- e50, 2012.

ROGER, V. L.; GO, A. S.; LLOYD-JONES, D. M.; BENJAMIN, E. J.; BERRY, J. D.; BORDEN, W. B.; BRAVADA, D. M.; DAI, S.; FORD, E. S.; FOX, C. S.; FULLERTON, H. J.; GILLESPIE, C.; HAILPERN, S. M.; HEIT, J. A.; HOWARD, V. J.; KISSELA, B. M.; KITTNER, S. J.; LACKLAND, D. T.; LICHTMAN, D. H.; LISABETH, L. D.; MAKUC, D. M.; MARCUS, G. M.; MARELLI, A.; MATCHAR, D. B.; MOY, C. S.; MOZAFFARIAN, D.; MUSSOLINO, M. E.; NICHOL, G.; PAYNTER, N. P.; SOLIMAN, E. Z.; SORLIE, P. D.; SOTOODEHNIA, N.; TURAN, T. N.; VIRANI, S. S.; WONG, N. D.; WOO, D.; TURNER, M. B. Heart disease and stroke statistics—2012 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 125, p. e2 – e220, 2012.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERTI, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111- 125, 2007.

SAHU, K.; KARTHIKEYAN, C.; MOORTHY, N.S.H.N.; TRIVEDI, P. Comparative study of forced degradation behavior of prasugrel by UPLC and HPLC and the development of validated stability indicating assay method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 34, p. 1870-1884, 2011.

SANDOZ AG. **New method for salt preparation**. European Patent Specification n. EP 2 032 521 B1, 28 out. 2009.

SANGOI, M. S.; TODESCHINI, V.; STEPPE, M. Fesoterodine stress degradation behavior by liquid chromatography coupled to ultraviolet detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Talanta**, v. 84, n. 4, p. 1068-1079, 2011.

SAUCEDO, J. F. Antiplatelet therapy for patients with diabetes mellitus and acute coronary syndrome. **Primary Care Diabetes**, v. 6, p. 167 – 177, 2012.

SCHRÖR, K.; SILLER- MATULA, J. M.; HUBER, K. Pharmacokinetic basis of the antiplatelet action of prasugrel. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 26, p. 39-46, 2012.

SEARS, E.; BOOKS, D. New drugs approved in 2009. **Proceedings (Baylor University Medical Center)** v. 23, n. 2, p. 175- 183, 2010.

SEHRAMAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Regulatory aspects in development of stability- indicating methods: a review. **Chromatographia**, v. 72, p. 1- 6, 2010.

SFAIR, L. L.; GOBETTI, C.; SANGOI, M. S.; LANGE, A. D. C.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Micellar Electrokinetic Chromatographic Method for Mianserin Hydrochloride and Analysis of Degradation Products by Mass Spectrometry. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. 11, p. 1387-1394, 2012.

SHAH, R. P.; SAHU, A.; SINGH, S. Identification and characterization of degradation products of irbesartan using LC–MS/TOF, MSⁿ, on-line H/D exchange and LC–NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 5, p. 1037- 1046, 2010.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129- 135, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**, 7.ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; SAHU, A.; JUNWAL, M.; SHAH, R. P. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 148- 173, 2012.

SRIKANTH, I.; SHARMILA, P.; BHARATHI, K.V.; RAJU, M. NAIK, M.L. NAGARJUNA, K. A validated reverse phase HPLC method for the estimation of prasugrel hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Innovative trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 5, p. 140- 148, 2011.

SUGIDACHI, A.; OGAWA, A.K.; HAGIHARA, K.; JAKUBOWSKI, J.A.; HASHIMOTO, M.; NIITSU, Y.; ASAI, F. The greater in vivo antiplatelet effects of prasugrel as compared to clopidogrel reflect more efficient generation of its active metabolite with similar antiplatelet activity to that of clopidogrel's active metabolite. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, p. 1545-1551, 2007.

SUNTORNUSUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 29- 52, 2010.

TAN, G. M.; LAM, Y. Y.; YAN, B. P. Novel Platelet ADP P2Y₁₂ Inhibitors in the Treatment of Acute Coronary Syndrome. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 30, p. e167- e173, 2012.

TIMERBAEV, A. R. Element speciation analysis using capillary electrophoresis: Twenty years of development and applications. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 1, p. 778- 812, 2013.

UCHIYAMA, S. Clopidogrel resistance: identifying and overcoming a barrier to effective antiplatelet treatment. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. e100- e111, 2011.

USP 35. The United States Pharmacopeia. 35. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2012.

VARENHORST, C.; JAMES, S.; ERLINGE, D.; BRANDT, J.T.; BRAUN, O.; MAN, M.; SIEGBAHN, A.; WALKER, J.; WALLETIN, L.; WINTERS, K.J.; CLOSE, S.L. Genetic variation of CYP2C19 affects both pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel but not prasugrel in aspirin-treated patients with coronary artery disease. **European Heart Journal**, v. 30, p. 1744-1752, 2009.

VEVERKA, A.; HAMMER, J.M. Prasugrel: A New Thienopyridine Inhibitor. **Journal of Pharmacy Practice**, v.22, n.2, p.158-165, 2009.

WATSON, G. D. **Pharmaceutical analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 2. ed. London: Churchill Livingstone, 2005.

WICKREMSINHE, E.R.; TIAN, Y.; RUTERBORIES, K.J.; VERBURG, E.M.; WEERAKKODY, G.J.; KURIHARA, A.; FARID, N.A. Stereoselective metabolism of prasugrel in humans using a novel chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 6, p. 917- 921, 2007.

WILSON, W.; GURVITCH, R.; AJANI, A. E. Prasugrel: A novel platelet ADP P2Y₁₂ receptor antagonist. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 27, p. 194 – 198, 2009.

WIVIOTT, S. D.; ANTMAN, E. M.; BRAUNWALD, E. Prasugrel. **Circulation**, v. 122, p. 394- 403, 2010.

WIVIOTT, S. D.; BRAUNWALD, E.; MCCABE, C. H.; MONTALESCOT, G.; RUZYLLO, W.; GOTTLIEB, S.; NEUMANN, F. J.; ARDISSINO, D.; SERVI, S.; MURPHY, S. A.; RIESMEYER, J.; WEERAKKODY, G.; GIBSON, C. M.; ANTMAN, E. M. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. **The new england journal of medicine**, v. 357, n. 20, p. 2001-2015, 2007.