

Identificación de dos formas polimórficas cristalinas de clopidogrel bisulfato en materia prima farmacéutica

Identification of two polymorphic forms of clopidogrel bisulphate crystal in pharmaceutical raw materials

Dr. German Leonardo Madrigal Redondo, Dr. Rolando Vargas Zúñiga, Dr. Gustavo Carazo Berrocal, Dra. Nils Ramírez Arguedas

Laboratorio Biofarmacia y Farmacocinética (LABIOFAR) del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR), y del Laboratorio de Físicoquímica Farmacéutica de la Facultad de Farmacia Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.

RESUMEN

Introducción: el clopidogrel bisulfato existe en numerosas formas cristalinas, que varían en su estabilidad físicoquímica, por lo que algunas de estas formas, patentadas o no, son útiles en la fabricación de medicamentos.

Objetivo: identificar las formas cristalinas existentes en dos muestras de clopidogrel bisulfato materia prima comercializadas para la fabricación de medicamentos y el estado de pureza de ambas muestras.

Métodos: las muestras de materia prima se obtuvieron de una industria nacional. Se examinaron mediante técnicas analíticas avanzadas como difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido, termogravimetría y espectroscopia infrarroja. Se compararon los valores encontrados con los del estado del arte reconocidos en la literatura revisada para el clopidogrel bisulfato materias primas y tomados como referencia.

Resultados: se obtuvieron los difractogramas, termogramas y espectros de absorción correspondientes a las muestras analizadas. Se utilizó el software TA Universal Analysis para obtener el porcentaje de descomposición, punto de fusión y picos identificadores en las muestras.

Conclusiones: la muestra 1 contiene la forma cristalina I del bisulfato de clopidogrel, que no es pura ya que existe una banda característica de la presencia

de contaminación con la forma cristalina II. La muestra 2 corresponde a la forma cristalina II del producto en forma pura.

Palabras clave: calorimetría diferencial de barrido, clopidogrel bisulfato, difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja, polimorfismo farmacéutico, termogravimetría.

ABSTRACT

Introduction: clopidogrel bisulphate exists in many crystalline forms that vary in their physicochemical stability: some of these forms either patented or not are useful in the drug production.

Objective: to identify the existing crystalline forms in two samples of Clopidogrel bisulfate raw material for the drug and the purity index of both samples.

Methods: the raw material samples were taken from a domestic industry. They were tested through advanced analytical techniques such as differential scanning calorimetry, X-ray scattering pattern, infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis. The final values were then compared with the well-established state-of-the-art values found in the reviewed literature for the clopidogrel bisulfate raw materials and accepted as reference.

Results: the physicochemical parameters were obtained from the absorption spectra, thermograms and diffractograms. The TA Universal Analysis software yielded the percentage of decomposition, the melting points and the peak identifiers in the samples.

Conclusions: it was concluded that the sample 1 contained the crystal form I of the Clopidogrel bisulfate that is not a pure one since there is a characteristic band indicating contamination with the crystalline form II. The sample 2 had the pure crystalline form II of the product.

Key words: differential scanning calorimetry, Clopidogrel bisulfate, X-ray scattering pattern, infrared spectroscopy, pharmaceutical polymorphism, thermogravimetry.

INTRODUCCIÓN

Cada vez más toma importancia el tema de polimorfismo farmacéutico, debido a la protección que llevan algunos países a patentes de medicamentos de diferentes polimorfos. El fenómeno de polimorfismo farmacéutico se refiere a las diferentes fases del estado sólido que sufre una sustancia farmacéutica; estas fases constituyen diferentes formas cristalinas, amorfas, o solvatos de una misma sustancia, que hacen que su ordenamiento tridimensional interno cambie a nivel molecular o atómico.^{1,2}

El clopidogrel (ácido (α S)- α -(2-clorfenil)-6,7-dihidrotieno[3,2-c] piridino-5(4H)-metil ester acético) es un principio activo farmacéutico útil como inhibidor de la agregación plaquetaria, comúnmente se utiliza su sal bisulfato para aumentar su solubilidad, la cual se forma mediante la reacción de ácidos fuertes con el grupo piridina. Es en su forma de bisulfato de clopidogrel que principalmente se formulan

medicamentos. El clopidogrel base es un líquido aceitoso incoloro, mientras su sal bisulfato es un polvo cristalino blanco.³

El clopidogrel bisulfato posee numerosas formas polimórficas, para él estas formas pueden afectar su velocidad de disolución, y otras propiedades fisicoquímicas importantes a nivel farmacotécnico, por ejemplo, a pH 7 su solubilidad en agua es prácticamente nula, mientras a pH 1 es muy soluble; razones estas por las cuales se escoge la sal bisulfato en productos farmacéuticos. Por esto fue necesario identificar y determinar la existencia de la forma polimórfica adecuada en formulación de un medicamento. Igualmente hasta la fecha no existen patrones farmacopéicos que permitan comprobar la forma cristalina de una sustancia, principalmente por la dificultad de asegurarse que no hay una transición de fase en el patrón que afecte su pureza cristalina.³

Adicionalmente el bisulfato de clopidogrel es uno de los principios activos, que necesitan la evaluación de su equivalencia terapéutica *in vivo*; a nivel farmacéutico principalmente se utiliza solo dos formas polimórficas la I y la II, a pesar de existir numerosas formas cristalinas; otra de las principales razones para definir la forma cristalina del bisulfato de clopidogrel, lo constituyen los derechos de propiedad intelectual derivados de patentes de invención, que son concedidos sobre las variantes cristalinas de una sustancia.^{3,4}

Ante esta situación el objetivo de este estudio es identificar las formas cristalinas existentes en dos muestras de clopidogrel bisulfato materia prima comercializadas para la fabricación de medicamentos y el estado de pureza de ambas muestras.

MÉTODOS

Se utilizaron dos muestras de materia prima facilitadas por una industria nacional, las cuales fueron tomadas de forma aleatoria y trasladadas al sitio de ensayo en condiciones controladas de luz, humedad y temperatura.

A cada muestra se les realizó difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido, termogravimetría y espectroscopia infrarroja.

Las condiciones y especificaciones de los equipos utilizados son:

Difracción de rayos X para determinar la forma cristalina

- Equipo: difractómetro marca Bruker modelo D8, fabricado en Alemania.

- Condiciones:

- Temperatura: ambiente 25 °C

- Filtro de níquel

- Fuente ánodo de cobre $K\alpha$ (λ 1,54 Å)

- Porta muestras de polimetacrilato

- Análisis continuo a 0,1° por segundo en un rango de 3° a 40° 2θ

- Detector de gas con fotodiodos

- Peso: 8 a 10 mg muestra

- Tres réplicas

Calorimetría diferencial de barrido para determinar las transiciones de fase

- Equipo: DSC marca TA Instruments modelo Q200, fabricado en EE. UU.

- Condiciones:

- Cápsula aluminio
- Atmósfera 100 % de nitrógeno 10 psi
- Velocidad de flujo: 40 mL/min.
- Serie calentamiento de 10 °C/min
- Rango de temperatura: 25 °C a 250 °C
- Sensibilidad instrumento y registrador: sensibilidad 0,1 µW
- Precisión en temperatura: ± 0,05 °C
- Exactitud en Temperatura ± 0,1°C
- Precisión calorimétrica ± 0,1 %
- Reproducibilidad calorimétrica ± 0,1 %
- Peso: 3 a 4 mg muestra
- Calibración con Indio y agua tridestilada.

- Tres réplicas

Termogravimetría para determinar cambios de peso en las transiciones de fase

-Equipo: TGA marca TA Instruments modelo Q500, fabricado en EE. UU.

-Condiciones:

- Atmósfera de 100 % nitrógeno 10 psi
- Flujo de volumen 40 mL/min
- Velocidad de calentamiento: 10 °C/min
- De ambiente 25 °C a 1 000 °C
- Peso 8 a 10 mg muestra
- Sensibilidad 0,1 µg
- Exactitud de temperatura isotérmica ± 0,1%
- Precisión de temperatura isotérmica ± 0,1%
- Precisión de masa ± 0,1 %

-Tres réplicas

Espectroscopia infrarroja para determinar los grupos funcionales y diferencias entre las estructura de las diferentes fases

- Equipo: FTIR marca Thermo Scientific modelo Nicolet 6700 fabricado en EE. UU.

- Condiciones:

- Rango de 600 a 4 000 cm⁻¹
- Temperatura 25 °C
- Humedad relativa 30 %
- 200 barridos por réplica

-Tres réplicas

Para realizar la determinación e identificación de la forma cristalina en las muestras analizadas, denominadas forma I y II, se compararon los resultados obtenidos en cada muestra, según la técnica utilizada, con los valores del arte encontrados en la literatura disponible, tomados como referencia. Se compararon los parámetros fisicoquímicos: ámbito de fusión, porcentaje de masa perdido, patrón de difracción de rayos X y patrón de la huella digital del espectro infrarrojo. Se utilizó el software TA Universal Analysis para obtener el porcentaje de descomposición, punto de fusión y picos identificadores en las muestras.

RESULTADOS

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS MUESTRAS

En las [figuras 1](#) y [2](#) se muestran los resultados experimentales obtenidos a partir del análisis de las formas I y II de clopidogrel bisulfato mediante difracción de rayos X, espectro de absorción infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido, termogravimetría y respectivamente.

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA COMPARACIÓN CON LOS VALORES TOMADOS COMO REFERENCIA (ESTADO DEL ARTE)

Clopidogrel bisulfato formas I y II con difracción de rayos X

En la comparación de los difractogramas de la forma I con el estado del arte, se encontraron los picos característicos registrados en la literatura a 12, 15 y 20 2θ , no obstante, existió una atenuación de los picos característicos, especialmente a 12 y 27 2θ ([Fig. 1](#) y [3](#)).

En la forma II se encontraron los picos característicos registrados en el estado del arte: una tríada 12,5; un duplete a 18 y un cuadruplete de 22 a 25 2θ ; las bandas características son claras y sin atenuaciones ([Fig. 3](#) y [4](#)).

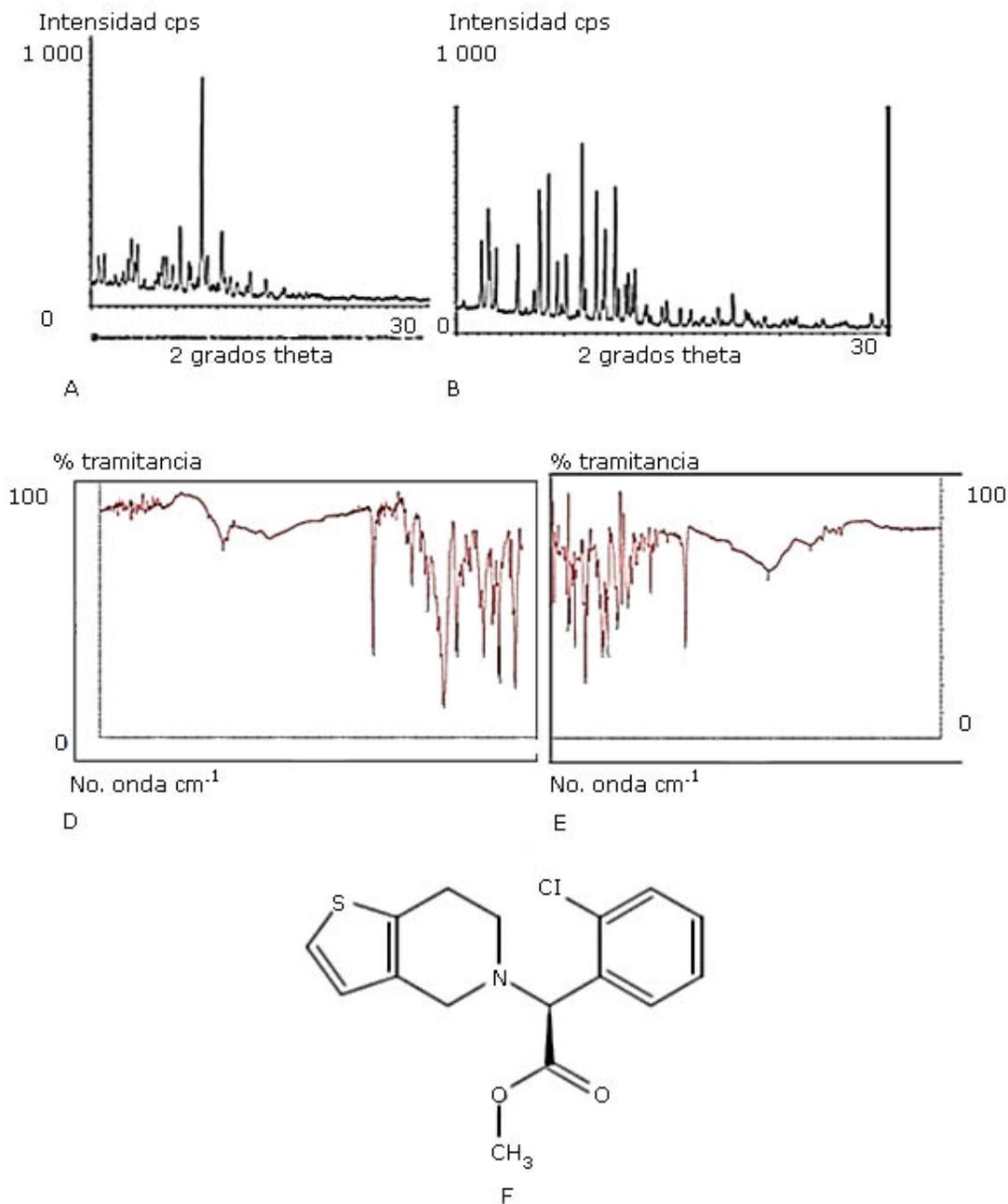


Fig. 1. Difractometría de rayos X para clopidogrel bisulfato A) forma I, B) forma II. Espectro de absorción infrarrojo para clopidogrel bisulfato D) forma I, E) forma II y F) estructura de Lewis del clopidogrel.

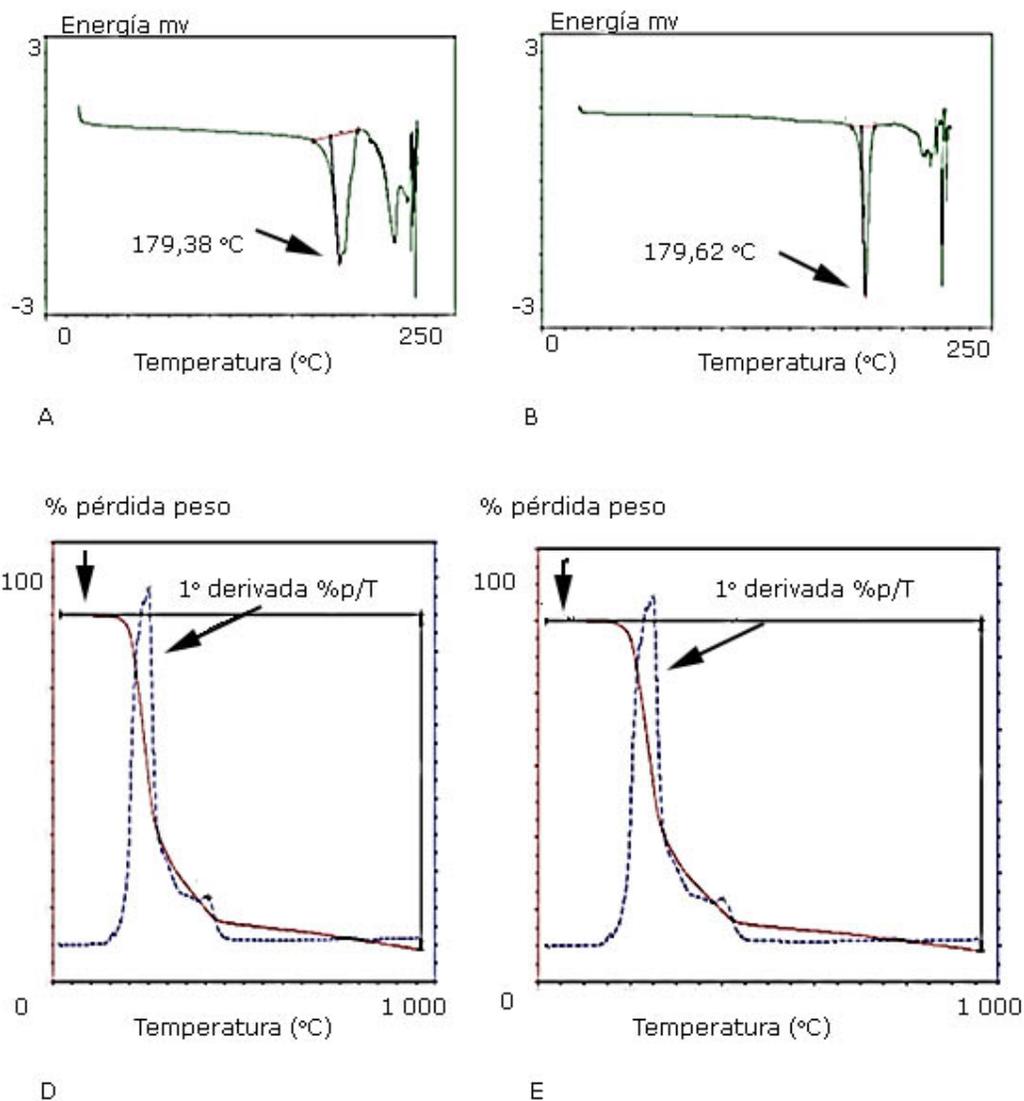


Fig. 2. Calorimetría diferencial de barrido para clopidogrel bisulfato A) forma I y B) forma II. Termogravimetría para clopidogrel bisulfato D) forma I y E) forma II.

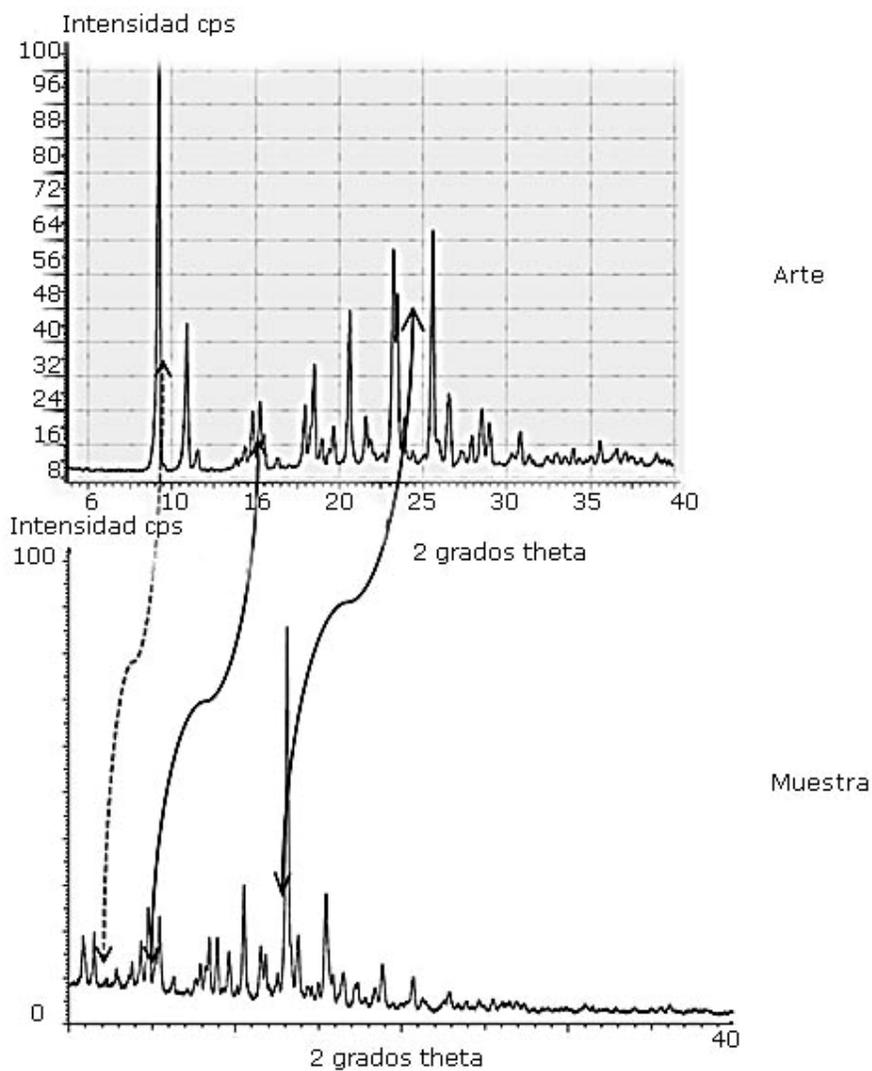


Fig. 3. Comparación de resultado de difractograma de la muestra con el estado del arte para clopidogrel bisulfato forma I mostradas en las referencias.^{5,6}

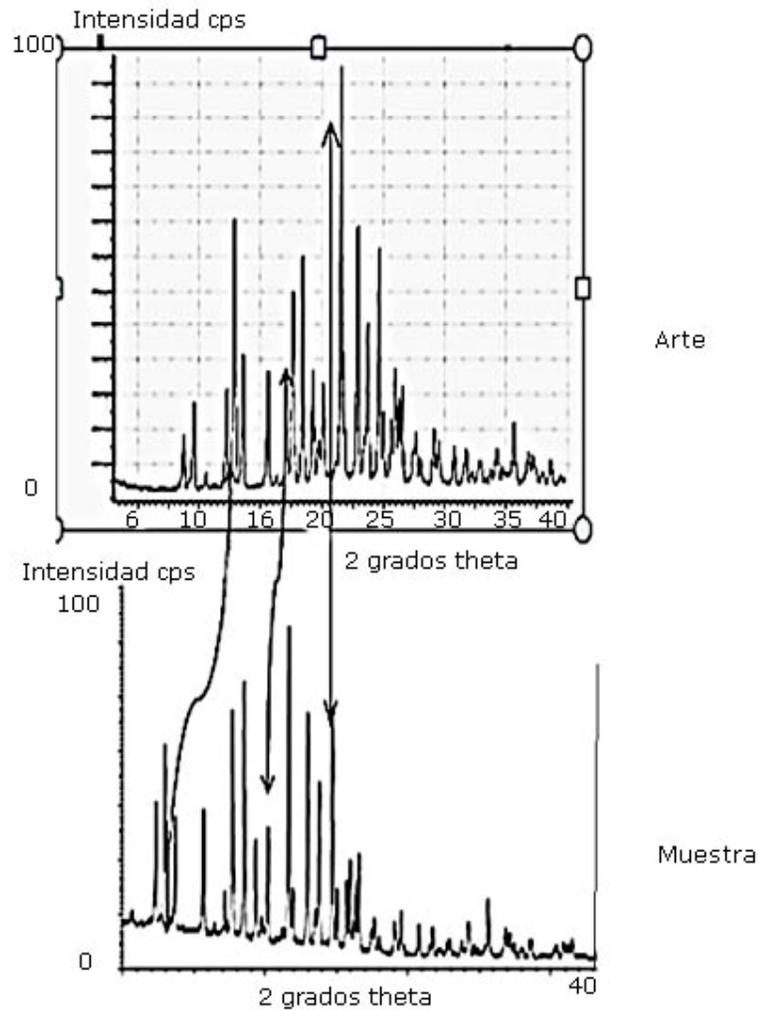


Fig. 4. Comparación de resultados de difractograma de la muestra con el estado del arte para clopidogrel bisulfato forma II mostradas en las referencias.^{2,7}

Clopidogrel bisulfato formas I y II con calorimetría diferencial de barrido

La literatura señala que existe un pico característico a 184,12 °C y en el termograma de la muestra forma I existió un pico a 179,38 °C y otro pico a 184,08 °C que se superponen (Fig. 5).

El termograma de la muestra forma II exhibió un pico definido a 179,62 °C (Fig. 6), al igual que la forma I, una descomposición aproximadamente a 215 °C (Fig. 2, 5 y 6).

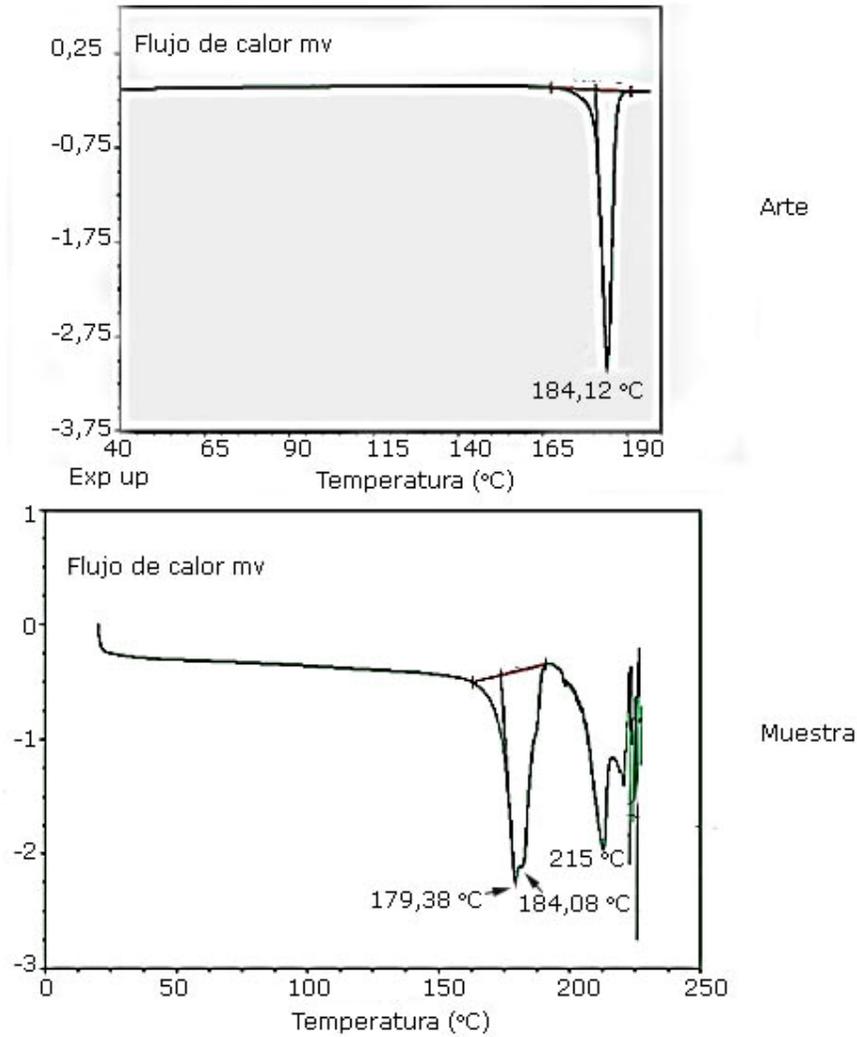


Fig. 5. Comparación de resultado de la calorimetría diferencial de barrido de la muestra de clopidogrel forma I con el estado del arte.^{2,8}

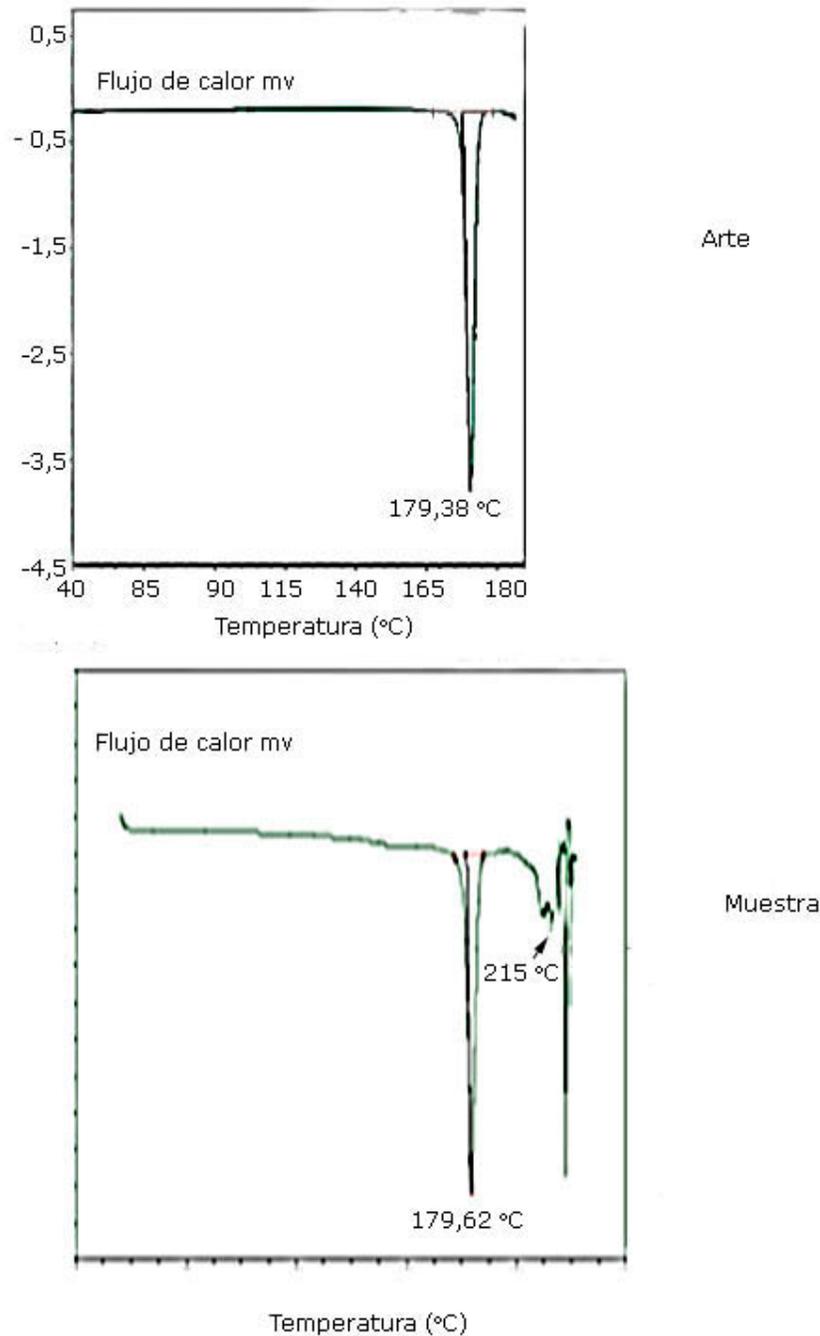


Fig. 6. Comparación de resultado de la calorimetría diferencial de barrido de la muestra de clopidogrel forma II con el estado del arte.^{2,7,8}

Clopidogrel bisulfato formas I y II con termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido

La termogravimetría comprobó para las formas I y II, la descomposición de la muestra posterior a los 225 °C y hasta su aumento a 248 °C (Fig. 7 y 8). Comprobó además, la condición anhidra de la muestra por la inexistencia de pérdida de peso de agua residual de superficie a 100 °C. Se encontró un segundo pico de la primera derivada a 404 °C.

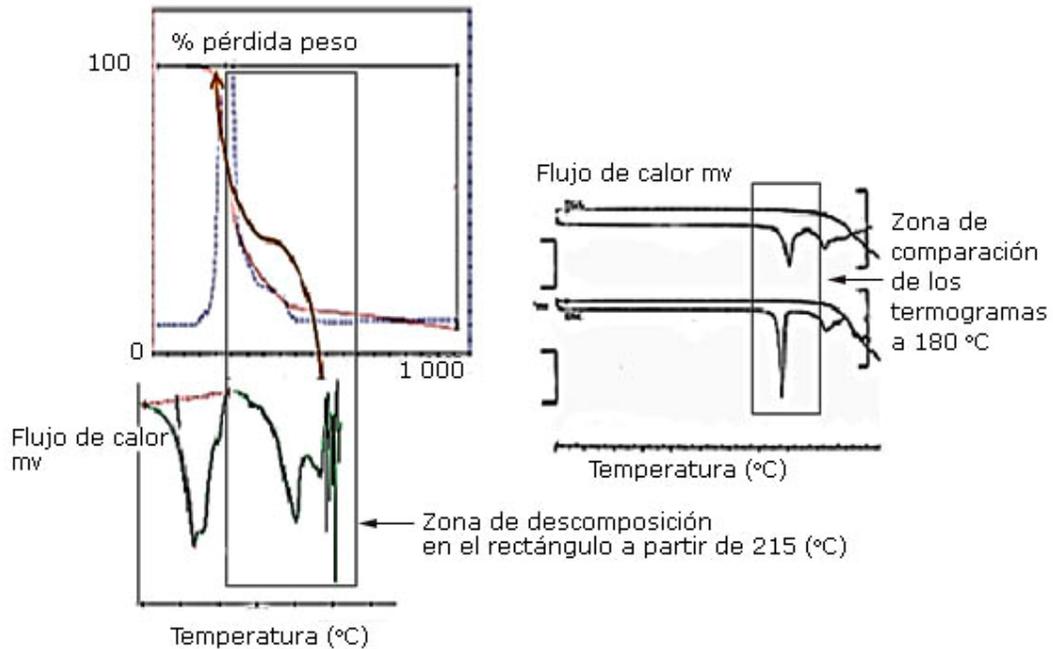


Fig. 7. Comparación de resultado de la termogravimetría y de la calorimetría diferencial de barrido de la muestra de clopidogrel forma I con el estado del arte.^{2,8}

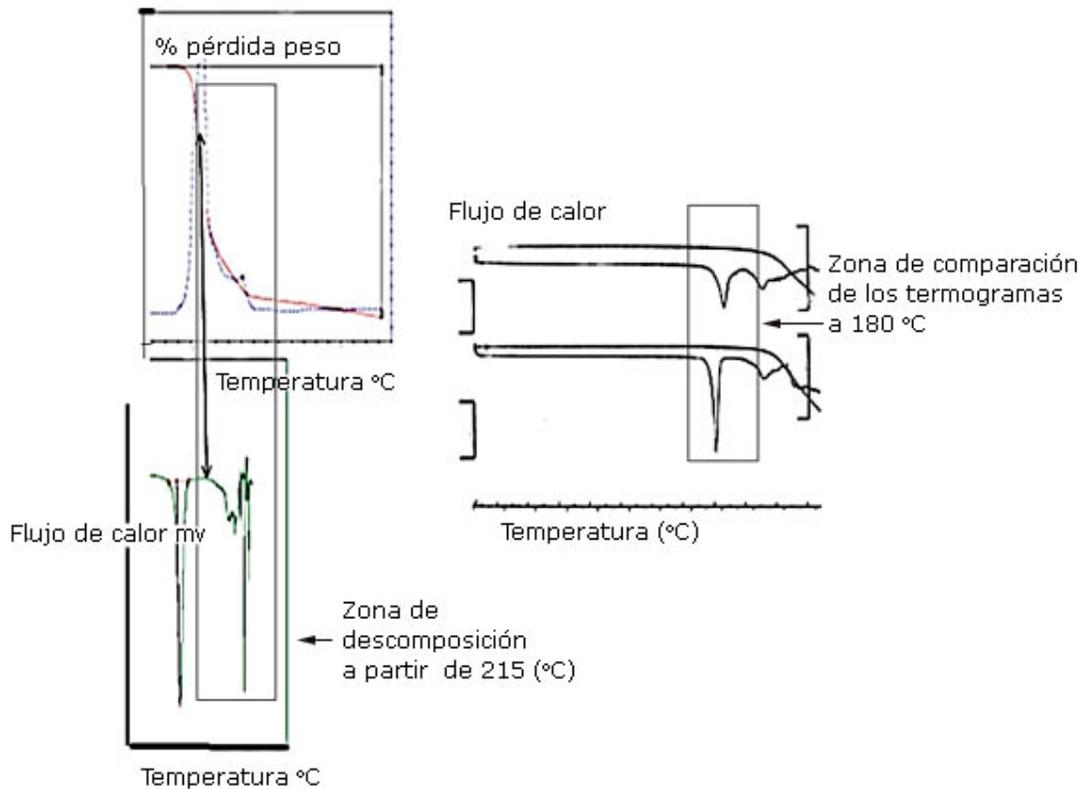


Fig. 8. Comparación de resultado de la termogravimetría y de la calorimetría diferencial de barrido de la muestra de clopidogrel forma II con el estado del arte.⁶⁻⁸

Clopidogrel bisulfato forma I y II con espectroscopia infrarroja

La banda debido a las vibraciones aromáticas del enlace C-H se encontró a $3\,121\text{ cm}^{-1}$ en la forma II, mientras que en la forma de I, estaba a $3\,103\text{ cm}^{-1}$.

Ambas formas mostraron una amplia banda de absorción alrededor de $2\,500\text{--}2\,550\text{ cm}^{-1}$ asociadas a vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H. Además, las dos formas mostraron una banda de absorción fuerte debido a que las vibraciones C-O se extendieron a $1\,752\text{ cm}^{-1}$ y debido a que el enlace O-H de la fracción de bisulfato se extendió en torno a $3\,300\text{ cm}^{-1}$.

La banda asociada con el estiramiento C-O apareció en $1\,175\text{ cm}^{-1}$ en la forma I que se visualiza como un pequeño hombro; en la forma II aparecieron bandas en $1\,187\text{ cm}^{-1}$ y $1\,155\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 1, 9, 10).

Por otra parte, la forma I mostró una banda única de absorción a 841 cm^{-1} (Fig. 9); la forma II exhibió una banda característica de absorción a $2\,551, 1\,497, 1\,189$ y $1\,029\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 10).

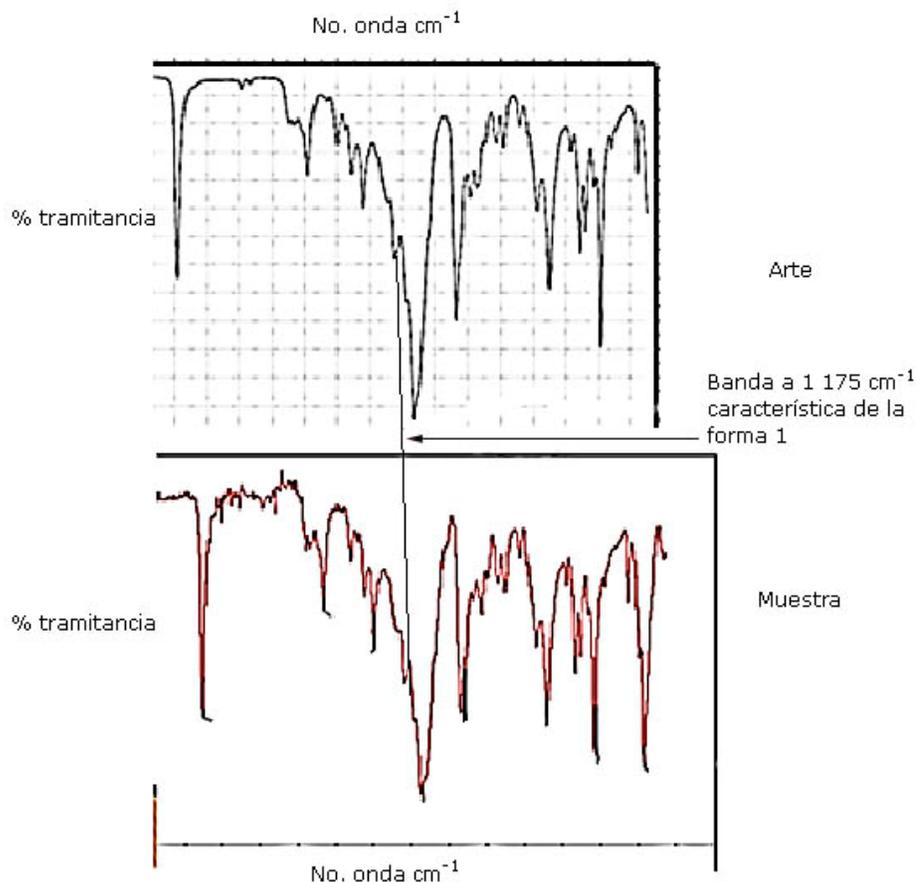


Fig. 9. Comparación de espectro infrarrojo de la muestra de clopidogrel forma I con el estado del arte mostradas en las referencias.^{6,8}

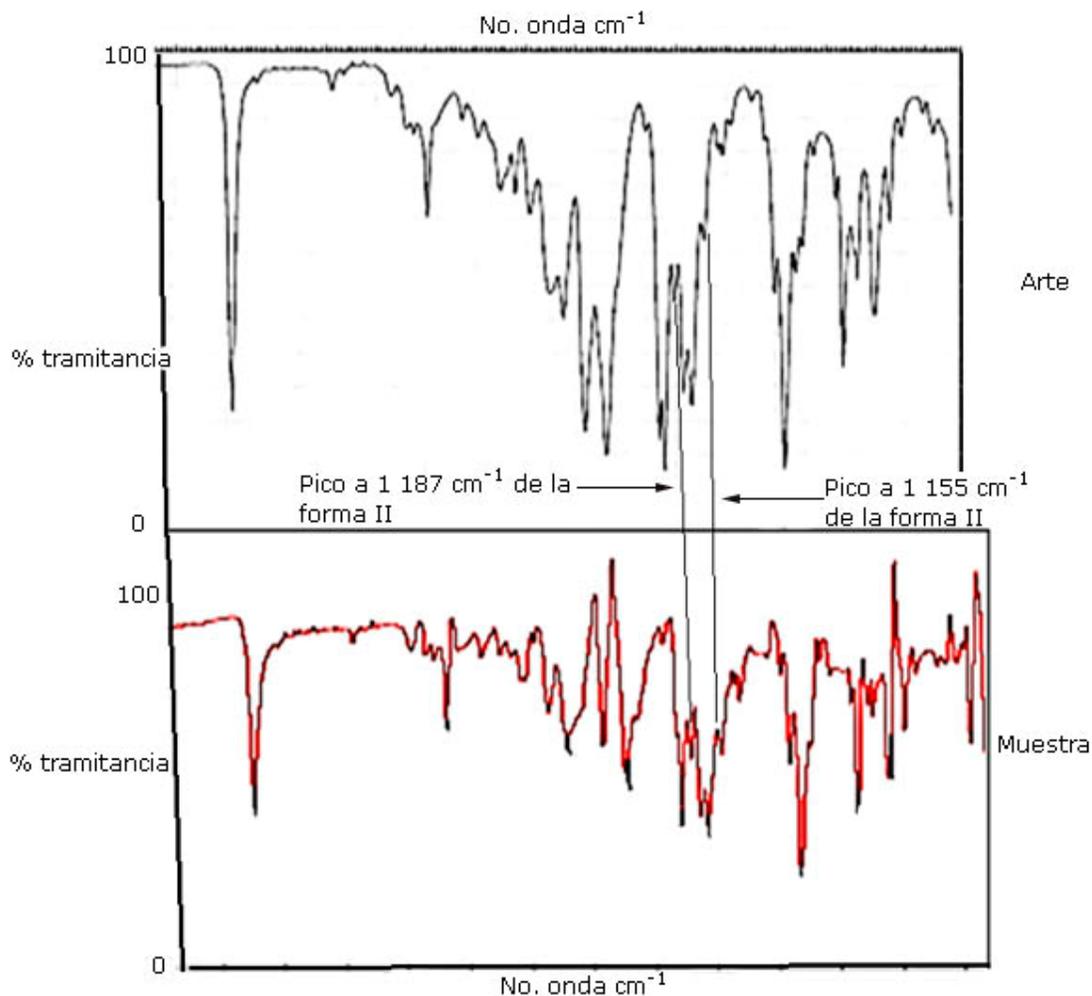


Fig. 10. Comparación de espectro infrarrojo de la muestra de clopidogrel forma II con el estado del arte.⁶⁻⁸

DISCUSIÓN

El bisulfato de clopidogrel se describió inicialmente en 1996 como una nueva categoría de fármacos antitrombóticos,⁹ característica que lo hacen un producto atractivo e interesante de estudio.

Las bandas características en el difractograma de la forma I del producto en comparación con el estado del arte, podrían significar una contaminación o una menor pureza de la muestra dado fundamentalmente por su atenuación, aunque normalmente en las condiciones de ensayo las impurezas menores al 5 % son difícilmente detectables por medio de esta técnica. Estas impurezas pueden ser diferentes formas polimórficas o productos químicos de degradación pero que al parecer, en la forma I existen en cantidades suficientes como para afectar la pureza de la señal del difractograma.^{5,6}

La falta de pureza en la forma I también se detectó en la calorimetría diferencial de barrido con la presencia de los picos superpuestos, que pueden ser señal de la degradación de la forma polimórfica en sustancias relacionadas, o también, de una transición a la forma polimórfica II ya que el pico encontrado en 179,38 °C,⁸ es

clásico para dicha forma. Estos resultados indican que para determinar con certeza la pureza de la muestra, descartar la existencia de productos de degradación de naturaleza ajena al clopidogrel bisulfato y corroborar la transición de fase,^{2,8} es necesario utilizar una técnica más precisa como lo es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En cuanto a la forma II, la coincidencia de las bandas del difractograma con las registradas en la literatura y sus características, podrían significar que la muestra es pura en su forma cristalina.^{2,7,10} El difractograma encontrado es característico para la forma cristalina II del bisulfato de clopidogrel.

El pico bien definido a 179,62 °C de la forma II del producto en la calorimetría diferencial de barrido, habla a favor de su gran pureza ya que no muestra picos secundarios. Ya hemos señalado que la literatura informa que hay un pico característico para esta forma cristalina II a 179,38 °C,⁸ por tanto, puede afirmarse que no existió diferencia experimental entre la temperatura de fusión registrada en la literatura y la de la muestra analizada, y que, por tanto, existe en la muestra la forma cristalina II de bisulfato de clopidogrel en estado de pureza.

Un dato curioso del termograma es que tanto la forma I como la II mostraron una reacción de descomposición a aproximadamente 215 °C, mesofase que podría utilizarse como identificación y como otra forma de determinar si la muestra es pura o no, sobre todo para la forma I, no obstante, una posible segunda transición a 225 °C podría ser otra transición cristalina líquida o el inicio de la disgregación de la muestra, ya que las bandas más allá de esa temperatura mostraron una descomposición endotérmica.^{2,7,8}

Las formas polimórficas I y II son anhidras según la termogravimetría, no presentan humedad residual y su descomposición empieza después de los 215 °C, lo que también comprueba la transición cristalina líquida del clopidogrel bisulfato. El segundo pico a 404 °C se refiere al 15 % del peso de la muestra que corresponde a la descomposición de los sulfatos.⁶⁻⁸

Los resultados del espectro infrarrojo indican que el enlace C-H en el anillo clorofenil es más fuerte en la forma II en comparación con la forma I.⁶⁻⁸

La amplia banda de absorción mostrada por ambas formas polimórficas a

2 500-2 550 cm⁻¹, se produce debido a la formación de la sal entre la condición nitrógeno ternario de clopidogrel y el -OH del bisulfato.^{2,6-8} Las bandas características exhibidas por la forma I y II, respectivamente, pueden ser utilizadas como medio de cuantificación de pureza.

Se ha encontrado que en la estructura de la forma II, el Cl y el O (del grupo de-OCH₃) están muy cerca, lo que crea la repulsión entre los pares electrones solitarios de Cl y del O y con lo del enlace C-O más fuerte en la forma II.

Finalmente, se concluye que la muestra 1 contiene la forma cristalina I del bisulfato de clopidogrel, no obstante esta no es pura ya que existe una banda característica de la presencia de contaminación con la forma cristalina II. La muestra 2 corresponde a la forma cristalina II del producto en forma pura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Madrigal G. Análisis de los criterios de expertos sobre los posibles efectos socioeconómicos del fenómeno de polimorfismo de sustancias medicamentosas en materia de patentes de invención en Costa Rica y su aplicación para la sistematización de la vigilancia tecnológica de la industria farmacéutica local. Revista Ciencias Biológicas CNIC [Internet]. 2010 [citado 5 Feb 2012]; 41 (No. Especial). Disponible en <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/files/CB-2010-4-CB-075.pdf>
2. Brunton L, Lazo J, Keith P. Goodman y Gillman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 16a ed. México, DF: McGraww Hill; 1996.
3. Suciati ML, Indrayanto G, Brittain HG. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology. California: Elsevier; 2010.
4. Ministerio de Salud de Costa Rica. Lista de productos que requieren estudios de bioequivalencia *in vivo*, y perfiles de disolución *in vitro* para comprobar su equivalencia terapéutica. [citado 19 Oct 2004]. Disponible en: <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/bioequivalencia/principiosactivosseccion1.pdf>
5. Koradia V, Chawla G, Bansal AK. Qualitative and quantitative analysis of clopidogrel bisulphate polymorphs. Acta Pharm. 2004; 54: 193-204.
6. Bousquet A, Castro B, Saint-Germain J. Nuevo polimorfo de hidrogenosulfato de clopidogrel. Patente de España No. 2 181 439. 2003.
7. Sisteron AB, Castro B, Bicetre K, Germain JS. Polymorphic clopidogrel hydrogenesulphate form. United States patent US 6 429 210. 2002.
8. Radjakrishnan TV, Govind SD, Digambar SK, Madhukarrao DM, Anil MT. Rapid resolution process for clopidogrel base and a process for preparation of clopidogrel bisulfate polymorph-form. India patent No. WO 2006/087729. 2006.
9. Guy BD, Joseph PD, James OM, James PJ, John PW. Novel prostaglandin synthase inhibitors. Esrados Unid patent No. WO 96/10012. 1996.
10. Lohray BB, Lohray VB, Pandey B, Dave MG. Polymorphs and amorphous form of (s)-(+)-clopidogrel bisulfate. United States patent US 2007/0037842. 2007.

Recibido: 19 de diciembre de 2013.

Aprobado: 20 de enero de 2014.

German L. Madrigal Redondo. Laboratorio Biofarmacia y Farmacocinética (LABIOFAR) del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR), y del Laboratorio de Físicoquímica Farmacéutica de la Facultad de Farmacia Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica, Código Postal 11501-2060. Correo electrónico: generacionlcr96@gmail.com