



ANÁLISE DO CLONAZEPAM EM AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS REFERÊNCIA E GENÉRICOS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR-UATR)

Silva, F. M. A., Sakane, K. K.

Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi nº 2911, Urbanova, São José dos Campos, São Paulo, fab.masilva@gmail.com, kumiko@univap.br

Resumo-O Clonazepam é um benzodiazepínico de ação antiansiolítica, anticonvulsiva, relaxante muscular, sedativa e possui propriedades hipnóticas. Seu uso deve ser somente a critério médico. O Clonazepam como qualquer outro benzodiazepínico podem causar dependência e tolerância. Para este estudo propôs-se a analisar qualitativamente por espectroscopia no infravermelho, amostras de medicamentos de referência e genéricos que contenham o princípio ativo clonazepam. Nas amostras avaliadas foram verificadas que a espectroscopia no infravermelho é viável mesmo para amostras com uma concentração pequena de princípio ativo e que os espectros seguem os padrões exigidos pela ANVISA.

Palavras-chave: Clonazepam, Espectroscopia no Infravermelho, Benzodiazepínico, Transtornos

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Introdução

O Clonazepam é um fármaco pertencente ao grupo dos benzodiazepínicos que exerce ação antiansiolítica, anticonvulsiva, relaxante muscular, sedativa e possui propriedades hipnóticas. Este benzodiazepínico é uma droga que potencializa a ação do neurotransmissor GABA. De todos os psicofármacos disponíveis no mercado, o clonazepam é atualmente um dos mais vendidos. Suas vantagens terapêuticas são o início de ação rápida, a meia-vida de eliminação prolongada, a boa tolerabilidade e a ausência de cardiotoxicidade. Suas desvantagens são a síndrome de dependência/abstinência, os efeitos colaterais como sedação, ataxia e problemas de memória e a interação com álcool (INDIAN; 2014 JAGAWAT; 2011). Clonazepam (CLZ) é rápido e completamente absorvido após administração oral e extensivamente metabolizado no fígado, principalmente pelo citocromo P450 (CYP) 3A4 isoenzimas, no seu principal metabólito 7-aminoclonazepam anticonvulsivo que tem fraca atividade e é excretado principalmente na urina (STEENTOFT, 2009). CYP3A4 é uma enzima conhecida por ser envolvida no metabolismo de uma vasta variedade de xenobióticos e tem um grande potencial para interações medicamentosas (STORHAUG; ENGER; HJELMEIAND; 2012).

Na União Européia, o CLZ é aprovado para todas as formas de epilepsia e para ataques de pânico em adultos e nos Estados Unidos para o transtorno do pânico e, como mono ou terapia adjuvante em uma ampla gama de distúrbios convulsivos (NG et al., 2011). Várias indústrias farmacêuticas comercializam este medicamento com este princípio ativo, apresentando-se em dosagens de comprimidos de 0,5 mg e 2 mg, comprimidos sublinguais de 0,25 mg e gotas de 2,5 mg/ml (LIMA et al., 2004). Sua necessidade e dosagem são avaliadas somente a critério médico.

O mercado farmacêutico fornece vários produtos com este princípio ativo seguindo as normas estabelecidas pela ANVISA de medicamentos referência e genérico. De acordo com a Lei nº 9.787 de 1999 da ANVISA os conceitos para esta definição são:

-Medicamento de referência: é aquele inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro;

-Medicamento genérico: é aquele similar a um produto de referência, que se pretende comercializar, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção da patente ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade.

Usualmente, as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) e espectroscopia UV- visível são utilizadas na identificação de compostos químicos

(SIMÕES, 2008). Contudo, estes métodos são caros e trabalhosos, pois requerem grande manuseio analítico e produtos onerosos. A espectroscopia vibracional no infravermelho é utilizada como uma escolha satisfatória nas amostras de diferentes estados da matéria: líquidos, soluções, sólidos, filmes e gases. A radiação no infravermelho (IR) refere-se aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Devido à prescrição e ao grande e aumento do uso deste benzodiazepínico, podendo acarretar malefícios ao paciente, objetiva-se estudar através da Espectroscopia Vibracional no Infravermelho, amostras de medicamentos de referência e genéricos e fazer atribuição das principais bandas.

Metodologia

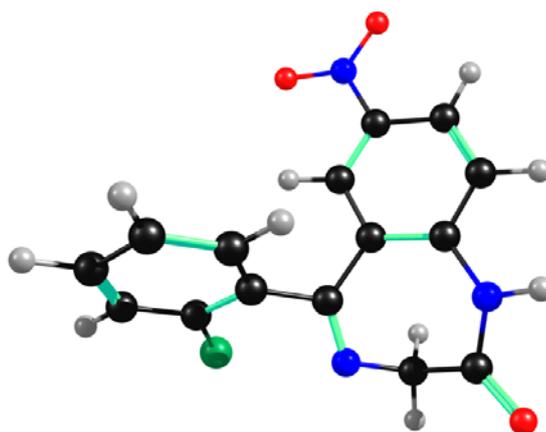
Para este estudo foram utilizados: um medicamento de referência e dois medicamentos genéricos disponíveis no mercado (adquiridos com prescrição médica indicando caráter de pesquisa) e uma amostra pura do Clonazepam (concedido em uma farmácia de manipulação sob receita médica explicando caráter de pesquisa). Os espectros infravermelhos com transformada de Fourier (FT-IR) se registraram num espectrofotômetro infravermelho Spectrum SP 400 FT-IR da Perkin-Elmer do IP&D, UNIVAP.

A determinação do espectro IV teórico foi realizado utilizando um artigo principal como base (SYLAJA; SRINIVASAN; 2012) que utiliza o programa Gaussian 09 tendo conjunto de base as funções 3-21G fornecidas pelo mesmo. De acordo com SYLAJA e SRINIVASAN os resultados obtidos no espectro infravermelho calculado, foram corrigido pelo fator de escala 0,965 (TOMOE, 2010) para a análise das bandas espectrais.

Resultados

A estrutura geométrica do clonazepam determinada é apresentada na Figura 1. A molécula pertence ao grupo de ponto de simetria C_1 , o que indica que todos os $3N-6 = 90$ modos normais são ativos tanto no espectro infravermelho quanto no espectro Raman. A fórmula do clonazepam é $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$.

Figura 1-Estrutura geométrica do clonazepam



cinza (H), azul (N), vermelho (O), preto (C), verde (Cl).

Na estrutura geométrica do clonazepam distinguimos: ligações do tipo C-H dos anéis benzênicos substituídos que apresentam bandas dos modos de estiramento $\nu(\text{CH})$ no infravermelho acima dos 3000 cm^{-1} ; as bandas das ligações $-\text{C}=\text{C}-$ eletronicamente deslocalizadas apresentando números de onda inferiores as encontradas para absorção de uma ligação $-\text{C}=\text{C}-$ olefínica. A ligação $-\text{C}=\text{N}-$ também se considera característica, e se encontra em números de onda inferiores às absorções das ligações $-\text{C}=\text{C}-$. A ligação $-\text{C}=\text{O}$, carboxílica é característica; o grupo funcional $-\text{NH}_2$ têm estiramentos $-\text{N}-\text{H}$ em regiões

espectrais acima das bandas do grupo $-CH_2$. As ligações $-CH$ dos anéis benzênicos apresentam movimentos fora do plano do anel com bandas de intensidades elevadas.

Figura 2- Espectro do clonazepam (princípio ativo) no FT-IR

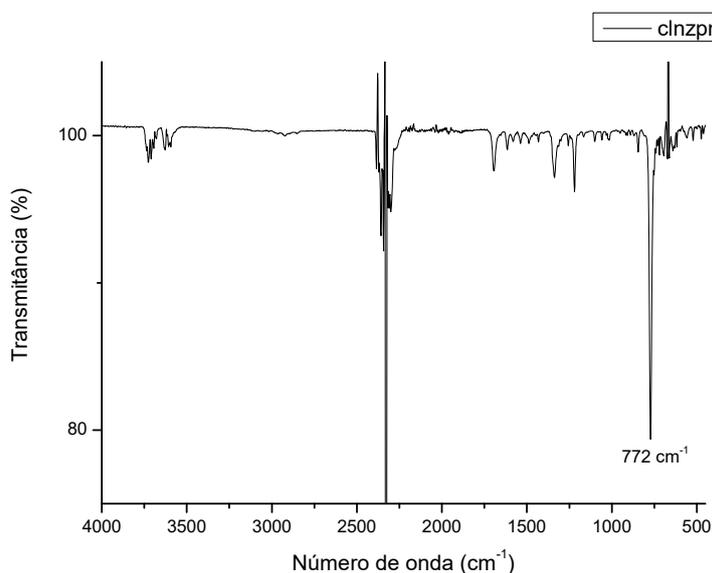
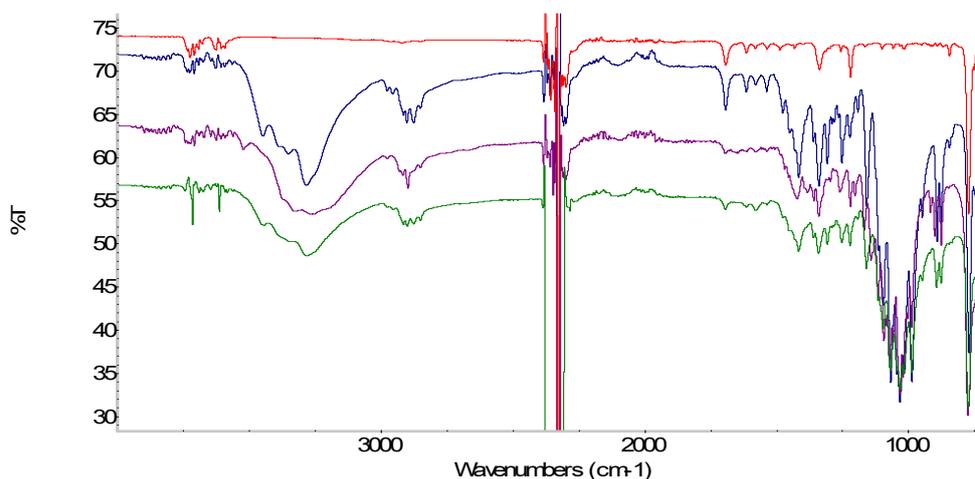


Figura 3- Espectro infravermelho com transformada de Fourier do clonazepam (princípio ativo) e do clonazepam (referência) e dos genéricos.



clonazepam princípio ativo (vermelho), medicamento referência (azul), genérico A (roxo) e genérico B (verde) .

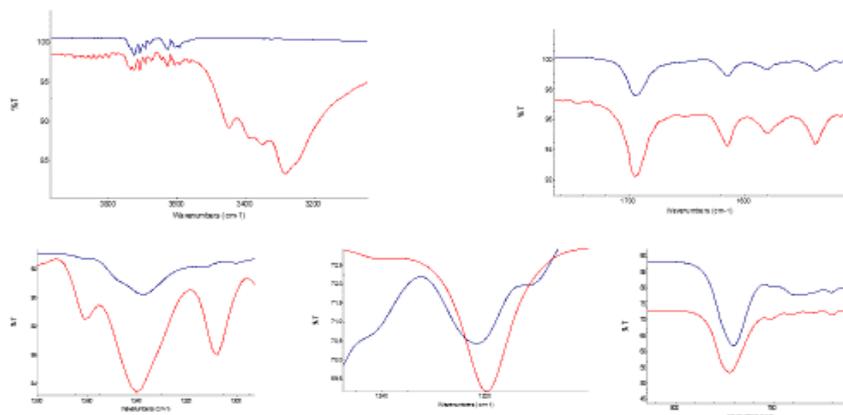
Para cálculo do espectro IV (SYLAJA; SRINIVASAN; 2012) utilizou-se do programa computacional Gaussian-09. O método do cálculo se baseia na Teoria funcional da densidade (DFT) utilizando o procedimento B3LYP com conjunto de base 3-21G. Os resultados fornecem o espectro calculado e a descrição dos modos normais de forma visual conforme consta na Tabela 1 (SYLAJA; SRINIVASAN; 2012).

Tabela 1. Clonazepam: espectro infravermelho com transformada de Fourier experimental e calculado pelo procedimento DFT:B3LYP/3-212G.

B3LYP /3-21G	Experimental [cm ⁻¹]	2d. deriv.	Atribuição (modos de vibração)
3379	3583	3583	v NH
3151	3113	3113	v CH
3148	3097	3097	v CH
3127	3070	3070	v CH + v CH
3113	3057	3057	v CH + v CH + v CH + v CH
3101	3033	3033	v CH + v CH
3097	3016	3016	v CH
3092	2980	2980	v CH + v CH + v CH
3063	2968	2968	v CH
2928	2922	2922	v CH
1704	1695	1695	v C=O
1596	1589	1589	v N=C
1576	1581	1581	v C=C + v C=C + v C=C + v C=C
1568	1561	1561	v C=C + v C=C
1545	1549	1549	v(C=C)
1539	1537	1537	v C=C + v C=C + v C=C + δ HCC + δ CCC + δ CCC
1485	1589	1537	δ CCC
1476	1489	1489	δ HNC + δ HCC + δ HCC
1469	1469	1469	v C=C + δ HCC + δ HCC + δ HCC + δ HCC
1445	1444	1444	v NC + δ HNC
1440	1440	1433	δ HCC + δ HCC + δ HCC
1377	1349	1402	v C=C + v C=C + δ HNC + δ HCC + δ HCC
1320	1339	1349	v C=C + v C=C + v C=C + v N=C
1299	1339	1339	τ HCNC + τ HCNC
1280	1313	1313	v ON + v ON
1270	1300	1300	v C=C + δ HCC
1255	1257	1257	v NC
1233	1242	1242	δ HCC + δ HCC
1221	1219	1219	v C=C + v C=C
876	873	875	τ HCCC + τ HCCC + τ HCCC
873	843	840	τ HCCC + τ HCCN + ρ NCCC
807	812	811	v NC
777	774	721	ρ CH ϕ + torção anel

Para identificar a presença do princípio ativo clonazepam no fármaco tomado como referência comparativa dos medicamentos genéricos, propôs-se analisar as regiões espectrais entre 3790 – 3500 cm⁻¹ e 1780 – 1512 cm⁻¹, como também identificar nos espectros das amostras as bandas características do clonazepam encontradas em: 1342, 1221, 881 e 772 cm⁻¹, sendo esta última a mais intensa. Na figura 4 apresenta-se os espectros do clonazepam e do medicamento referência.

Figura 4- Regiões espectrais e bandas sugeridas para identificação do princípio ativo presente no medicamento referência.



azul: clonazepam; em vermelho medicamento referência

O excipiente utilizado nos diferentes medicamentos podem mascarar as bandas do princípio ativo, como é o caso da croscarmelosa sódica (JOSÉ; LUZ; 2014) e pode notar-se nos espectros comparativos na região entre $1800 - 1500\text{cm}^{-1}$ e entre $1000 - 800\text{cm}^{-1}$.

Discussão

O Clonazepam foi selecionado entre os demais benzodiazepínicos por ser altamente usado e prescrito de forma indiscriminada, encontrando-se produzido por diversos laboratórios. Os comprimidos de clonazepam exibem uma pequena concentração de princípio ativo e grande concentração de excipiente, que pode ser um obstáculo no controle de qualidade de medicamentos.

A espectroscopia no infravermelho apresentou-se muito eficiente na análise, classificação e identificação dos medicamentos em estudo. Analisando amostras de medicamentos de referência e genéricos, verifica-se que os espectros de ambos são semelhantes, constatando-se deste modo que os medicamentos genéricos pesquisados seguem os padrões estabelecidos pela ANVISA. Porém através da espectroscopia no infravermelho evidenciamos que os excipientes utilizados nos medicamentos genéricos podem diferir-se com relação de um para o outro, por isto a pequena alteração da bandas espectrais, contudo a banda marcadora do princípio ativo permaneceu igual em suas leituras para os três medicamentos em questão.

Conclusões

O presente estudo teve a finalidade de interpretar o espectro do clonazepam puro (100%. Lab. Manipulação) para localizar suas bandas mais características com o propósito delas servirem como marcadores da qualidade do medicamento. Comumente, a banda mais intensa do espectro infravermelho localizada aos 772 cm^{-1} é utilizada como marcador, porém, dependendo do suporte do princípio ativo a região espectral onde absorve a banda de maior intensidade pode constituir uma interferência. Propusemos então neste trabalho as regiões entre $3790 - 3500\text{ cm}^{-1}$ e $1780 - 1512\text{ cm}^{-1}$ e as bandas encontradas em 1342 , 1221 e 881 cm^{-1} como outros possíveis marcadores para o controle da concentração do princípio ativo em diferentes medicamentos que o contêm.



Referências

INDIAN, P. Ministry of Health and Family Welfare, vol. 2, **Indian Pharmacopoeial Commission, Ghaziabad**, 2014, pp.1434, 2439.

JAGAWAT, T. **A Comparative Study to Assess the Efficacy and Safety of Combination Capsules of Paroxetine and Clonazepam in comparison to Paroxetine in patients suffering from Co-morbid Depression and Anxiety**. 2011.

JOSÉ E. H. T, LUZ M. M. C. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.**, Vol. 43(2), 234-247, 2014.

NG, Y., CONRY, J. A., DRUMMOND R., STOLLE J, WEINBERG M,A. **Randomized, phase III study results of clobazam in Lennox-Gastaut syndrome. Neurology**, 2011 Oct 11;77(15):1473-81

ROBERT, G. P. **Ann. Rev. Phys. Chern.** 1983. 34: 631-56.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 e.d. Livros Técnicos e Científicos, 2005.

SIMÕES, S. S. Desenvolvimento de métodos validos para a determinação de captopril usado espectrometria NIRR e calibração multivariada. 2008. 83f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – UFPB/CCEN, 2008.

STEENTOFT, A., LINNET K. Blood concentrations of clonazepam and 7-aminoclonazepam in forensic cases in Denmark for the period 2002-2007. **Forensic Sci Int**. 2009;184:74–79

STORHAUG, L. W., ENGER A., HJELMEIAND K, et al. Prolonged excretion of 7-aminoclonazepam in urine after repeated ingestion of clonazepam: a case report. **Forensic Sci Int**. 2012;222:33–35

SYLAJA, B.; SRINIVASAN, S.; **Ab Initio and Density Functional Theory (DFT) Study on Clonazepam**. Open Journal of Biophysics, v. 2, n. 03, p. 80, 2012.

TOMOE O. **Res. Bull. Fukuoka Inst. Tech**, 42 (2) (2010) 129-134.

Agradecimentos

