

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

**ANÁLISE TITULOMÉTRICA E CROMATOGRÁFICA
DE ALENDRONATO DE SÓDIO – MATÉRIA-PRIMA E
PRODUTO ACABADO**

Ana Ferreira Ribeiro

RIO DE JANEIRO

2005

ANA FERREIRA RIBEIRO

**ANÁLISE TITULOMÉTRICA E CROMATOGRÁFICA DE
ALENDRONATO DE SÓDIO – MATÉRIA-PRIMA E
PRODUTO ACABADO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Nadia Maria Volpato

Rio de Janeiro

2005

Ficha Catalográfica

R484a RIBEIRO, Ana Ferreira.

Análise titulométrica e cromatográfica de alendronato de sódio – matéria-prima e produto acabado / Ana Ferreira Ribeiro.

Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2005.

125 p. il. 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – URFJ / Faculdade de Farmácia, 2005.

Bibliografia: p. 104 – 109

Inclui anexos.

1. Cromatografia. 2. Alendronato de sódio. 3. Titulometria. I. Título.

CDD 548.83

Aos meus pais, Beth e Lino pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos. A todo farmacêutico, professor e pesquisador, que ama o que faz e, como bom brasileiro, apesar das dificuldades, “não desiste nunca”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora Nadia, não só por ter me possibilitado esta chance de crescimento profissional, mas também pela competência, conhecimento e dedicação, os quais levarei como inspiração durante minha jornada.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

Ao LabCQ, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e aos meus irmãos, Márcia e Marcos, pelo amor, carinho e apoio nas horas difíceis e por serem exemplos de caráter e sabedoria.

Ao meu amigo e amado Ricardo, homem cuja inteligência e integridade me são fontes de eterna admiração, agradeço pelo carinho, amor e infinita paciência. E à minha sogra, Maria Emília, que tem sido para mim uma segunda mãe.

Aos professores do LabCQ: Sheila, Valéria e Maurício, pelas orientações, ensinamentos e ocasiões descontraídas.

Ao professor Antônio Jorge (NPPN) e ao pesquisador Altivo Pitaluga (FIOCRUZ), pelas análises e valiosas sugestões tão gentilmente cedidas. Ao professor Mauro, à Mônica e aos colegas do LABECOM, pelo auxílio na utilização da centrífuga.

Aos laboratórios MERCK, em nome de João Ricardo, pelo material cedido.

A todos os amigos do LabCQ: à companheira Edilene, com quem dividi as alegrias e angústias da adaptação a uma nova vida; à Bianca Waruar, pela amizade; aos “Márcios”, pelos momentos bem-humorados, auxílio e também pelas caronas; à Eliane, pela ajuda em várias ocasiões, e a todos os companheiros de laboratório e colegas de mestrado: Aline, Daniela, Tatiana, Mariana, Vivian, Laís, Zaida, Carol,

Emeli, Renata, Tailane, Bianca, Raquel, Adriana, Joana e tantos outros, pelos bons momentos compartilhados.

Aos professores e colegas da Farmácia Universitária, pelos materiais e auxílio fornecidos em vários momentos desta dissertação.

Aos professores do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da UFRJ, pelos ensinamentos. À Ilma (Direção da FF) e à Ana Cristina (Secretaria da PG), pelos serviços prestados. À Rosa (Biblioteca da FF), pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas.

À competente professora Silvana (UFJF), pelo incentivo que deu início a esta longa caminhada e ao professor Marcos Brandão (UFJF), pelas oportunidades que me abriram as primeiras portas.

À amiga Daniele, pelo incentivo. À prima e amiga Clarissa e ao seu companheiro Daniel, por me acolherem no início desta jornada. À prima Rita, pelo auxílio e pelas dicas valorosas.

À amiga Íris, pela sabedoria compartilhada e ensinamentos que sempre levarei comigo, e à sua filha Isakelly, pelo apoio.

Às minhas grandes e eternas amigas, Alessandra e Cláudia, e à toda minha família, pelos momentos agradáveis e pelos bons e amorosos conselhos.

RESUMO

RIBEIRO, Ana Ferreira. **Análise titulométrica e cromatográfica de alendronato de sódio – Matéria-prima e Produto acabado**. Rio de Janeiro, 2005. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

O alendronato de sódio é um composto aminodifosfonado capaz de se fixar à matriz óssea e inibir a reabsorção mediada por osteoclastos. A escassez de metodologias oficiais para a determinação quantitativa deste fármaco levou ao desenvolvimento de diversos métodos, os quais empregam, em sua maioria, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), freqüentemente realizando a derivatização do fármaco associada a detectores de ultravioleta (UV), fluorescência e eletroquímico. Também há relatos sobre a cromatografia líquida de troca iônica (CLAE-TI) associada à detecção condutimétrica, índice de refração e UV indireta, bem como metodologias de análise do alendronato por titulometria e detecção espectrofotométrica. Neste trabalho foi avaliado o emprego da volumetria de neutralização na determinação quantitativa do alendronato de sódio em matéria-prima e produto acabado, utilizando NaOH 0,1 mol/L como titulante. O método se mostrou exato, preciso e específico para a análise do fármaco em uma formulação manipulada, mas não apresentou especificidade para a determinação das matérias-primas. Devido à complexidade de execução da metodologia que emprega CLAE com derivatização do fármaco, procurou-se desenvolver método cromatográfico mais simples, utilizando coluna em fase reversa e detecção UV em baixo comprimento de onda, face à fraca absorvidade do alendronato. Tal técnica não apresentou linearidade adequada, resultando em elevada dispersão dos resultados inter-dias. A titulometria de neutralização pode ser utilizada no controle da qualidade de produtos farmacêuticos que contenham alendronato de sódio, desde que os excipientes não se mostrem interferentes, mas o emprego do método à matéria-prima não é recomendado devido à especificidade inadequada.

ABSTRACT

RIBEIRO, Ana Ferreira. **Titrimetric and chromatographic analysis of alendronate sodium in bulk material and dosage form**. Rio de Janeiro, 2005. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

Alendronate sodium is an aminobisphosphonate compound that is able to bind to the bone matrix and inhibit its osteoclastic resorption. The lack of official monographs for the quality control of this drug, lead to the development of many proposals for its quantitative determination, most of them using the high performance liquid chromatography (HPLC) with previous drug derivatization, applying ultraviolet (UV), fluorescence and electrochemical detection. Methods using ion-exchange (HPLC-IE) were also developed and have applied conductivity and refractive index detectors, as well as the indirect UV detection. Methodologies using titrimetry and spectrophotometry were described too. In this work the alcalimetric titration of alendronate with sodium hydroxide was evaluated. The method was accurate, precise and specific for the determination of the drug in a manipulated final product, but it has not showed specificity for the analysis of the bulk item. We tried to develop an HPLC method, simpler than the other one which uses derivatization of the drug, using a reversed-phase column and UV detection in low wavelength, due to the poor absorbance of alendronate. The method was not linear in the range studied and presented high dispersion of the results between days. Neutralization titrimetry can be employed in the quality control of alendronate sodium dosage forms, since the excipients do not interfere in the analysis. However, the method should not be used for bulk material, due to the poor specificity.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Fórmulas estruturais do Ácido alendrônico (a), Pirofosfato (b), Alendronato monossódico triidratado (c) e estrutura geral dos bisfosfonatos (d).	23
Figura 2 – Síntese do ácido alendrônico.	24
Figura 3 – Reação de derivatização do (a) alendronato com (b) 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC), formando (c) derivado cromóforo (composto a ser analisado).	28
Figura 4 – Derivatização do alendronato com NDA-CN ⁻ e com NDA-NAP.	31
Figura 5 – Curva de DSC das matérias-primas ALD-SR (a), ALD-MP1 (b), ALD-MP2 (c) e ALD-MP3 (d).	67
Figura 6 – Curva de TGA da matéria-prima ALD-SR (a), 1 ^a derivada correspondente (b) e DSC da amostra (c).	68
Figura 7 – CCD das amostras de alendronato de sódio triidratado.	69
Figura 8 – Reação entre a ninhidrina e os aminoácidos.	70
Figura 9 – Reação do fosfito (a) com o cloreto de mercúrio II (b), formando precipitado de Hg ₂ Cl ₂ (c).	70
Figura 10 – Espectro de infravermelho da amostra ALD-SR.	71
Figura 11 – Fórmula estrutural do alendronato de sódio, evidenciando os hidrogênios analisados na espectrometria de RMN.	72
Figura 12 – Espectros de RMN das amostras de ALD-SR, ALD-MP1 e ALD-MP3.	73
Figura 13 – Curvas de titulação das matérias-primas ALD-SR e ALD-MP1.	75
Figura 14 – Estrutura química do ácido γ -aminobutírico (GABA).	77
Figura 15 – Curva de titulação de amostras de NaH ₂ PO ₄ , ALD-SR puro e contaminado com 3,7% (p/p) de NaH ₂ PO ₄ .	78
Figura 16 – Perfil de dissolução das cápsulas ALD-CPS (n = 5) em água, empregando cesto a 75 rpm.	82

Figura 17 – Comparação entre as curvas de titulação da amostra ALD-SR, utilizando NaOH 0,1 M e NaOH 0,001 M.	84
Figura 18 – Curva de calibração média obtida para o alendronato de sódio, em dois dias de análise pelo método de referência (CLAE-FR com derivatização por FMOC).	87
Figura 19 – Influência do pH da fase móvel no perfil cromatográfico obtido para a amostra ALD-SR, usando o método de referência (CLAE-FR com derivatização por FMOC).	89
Figura 20 – Análise da amostra ALD-SR, usando o método de referência (CLAE-FR com derivatização por FMOC), com fase móvel de pH = 7,7.	90
Figura 21 – Espectro de absorção no ultravioleta do alendronato de sódio diluído em água nas concentrações de 50, 100, 500 e 1000 µg/mL.	92
Figura 22 – Cromatogramas das amostras ALD-MP1 e ALD-SR, obtidos nos experimentos utilizando CLAE-FR com detecção UV em baixo λ .	92
Figura 23 – Cromatograma da mistura alendronato + GABA. Fase móvel com pH = 2,03.	93
Figura 24 – Cromatograma da mistura alendronato + GABA. Fase móvel com pH = 3,0.	94
Figura 25 – Curva de calibração média obtida para a análise do alendronato de sódio, em dois dias de análise pelo método por CLAE-FR com detecção em baixo λ .	96
Figura 26 – Curvas de calibração obtidas na análise do alendronato pelo método proposto, em cada dia separadamente.	97
Figura 27 – Cromatogramas obtidos nos experimentos utilizando CLAE-TI com detecção indireta.	98
Figura 28 – CCD das alíquotas coletadas na CLAE.	100

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Influência do contra-íon na retenção dos derivados aminobisfosfonados-FTC.	33
Tabela 2 – Composição dos lotes experimentais.	56
Tabela 3 – Quantidade de soluções e reagentes adicionados ao tubo de centrífuga.	60
Tabela 4 – Resultados dos testes para caracterização das amostras de alendronato.	68
Tabela 5 – Resultados dos ensaios de teor obtidos na titulação das matérias-primas.	76
Tabela 6 – Comparação estatística (Teste t não-pareado) entre os resultados obtidos por titulação visual e potenciométrica.	76
Tabela 7 – Influência de diferentes quantidades de fosfito monossódico na titulação alcalimétrica do alendronato de sódio.	80
Tabela 8 – Resultados do ensaio de recuperação e precisão do método titulométrico aplicado a produto acabado.	81
Tabela 9 – Resultados do teste de dissolução para as cápsulas ALD-CPS.	83
Tabela 10 – Resultados de teor encontrados para as matérias-primas, utilizando-se o método volumétrico proposto por Moreno e colaboradores.	83
Tabela 11 – Resultados encontrados na análise das matérias-primas por método cromatográfico e por titulação ácido-base com determinação potenciométrica do ponto de equivalência.	85
Tabela 12 – Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método de referência (CLAE com derivatização).	86
Tabela 13 – Avaliação estatística da regressão linear para o método de referência.	87
Tabela 14 – Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método por CLAE utilizando detecção UV em baixo λ .	95
Tabela 15 – Avaliação estatística da regressão linear para o método por CLAE-FR com detecção em baixo λ .	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ALD-CPS	Alendronato de sódio – Cápsulas contendo 70 mg de ácido alendrônico
ALD-LE	Alendronato de sódio – Lote Experimental de cápsulas
ALD-MP	Alendronato de sódio – Matéria-prima
ALD-SR	Alendronato de sódio – Substância de Referência
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE – FR	Cromatografia Líquida em Fase Reversa
CLAE – TI	Cromatografia Líquida de Troca Iônica
DE	Detecção Eletroquímica
DF	Detecção Fluorimétrica
dp	Desvio padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria de varredura diferencial)
EC	Eletroforese Capilar
EP	Erro padrão da média
FMOC	9-fluorenilmetilcloroformato
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HAc	Ácido acético
ICP	Inductively Coupled Plasma (Plasma de Acoplamento Indutivo)

λ	Comprimento de onda
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
n	número de réplicas
NDA – CN ⁻	2,3-naftaleno dicarboxialdeído – cianeto
NDA – NAP	2,3-naftaleno dicarboxialdeído–N-acetil-D-penicilamina
OPA – MERC	reagentes: o-ftalaldeído e mercaptoetanol
P.A.	Para análise
RMN	Ressonância magnética nuclear
S/N	razão Sinal / Ruído
T	Fator de cauda
TGA	Termogravimetric Analysis (Análise termogravimétrica)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 DESCRIÇÃO DO FÁRMACO	20
1.1.1 Características farmacológicas	20
1.1.2 Características químicas	23
1.2 FORMAS FARMACÊUTICAS DISPONÍVEIS NO MERCADO BRASILEIRO	26
1.3 MÉTODOS DESCRITOS PARA ANÁLISE DO ALENDRONATO	27
1.3.1 Métodos cromatográficos	27
1.3.1.1 CLAE em Fase Reversa	27
1.3.1.2 CLAE de Troca Iônica	34
1.3.2 Métodos espectrofotométricos	38
1.3.3 Métodos titulométricos	41
1.3.4 Outros métodos	43
1.3.4.1 Eletroforese Capilar	43
1.3.4.2 Plasma de Acoplamento Indutivo	44
1.3.4.3 Voltametria de Redissolução Anódica	45
2 OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVOS GERAIS	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 MATERIAIS	48
3.1.1 Substâncias e produtos farmacêuticos	48

3.1.2	Reagentes	49
3.1.3	Equipamentos e acessórios	50
3.2	MÉTODOS	51
3.2.1	Caracterização das amostras de matéria-prima	51
3.2.1.1	Faixa de fusão	51
3.2.1.2	Perda por dessecação	51
3.2.1.3	Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura (DSC)	51
3.2.1.4	Cromatografia em camada delgada (CCD)	52
3.2.1.5	Determinação de fosfito	52
3.2.1.6	Espectrometria no infravermelho	53
3.2.1.7	Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)	54
3.2.2	Método Titulométrico	54
3.2.2.1	Preparo da solução titulante	54
3.2.2.2	Análise titulométrica das matérias-primas	54
3.2.2.3	Análise titulométrica de produto acabado – Validação do método	55
3.2.2.4	Análise titulométrica aplicada ao teste de dissolução das cápsulas	57
3.2.3	CLAE em Fase Reversa com derivatização por FMOC e detecção por ultravioleta	58
3.2.3.1	Preparo e análise das amostras	58
3.2.3.2	Condições do sistema cromatográfico	61
3.2.3.3	Verificação da precisão e linearidade	61
3.2.4	CLAE em Fase Reversa com detecção por ultravioleta em baixo comprimento de onda	62
3.2.4.1	Preparo e análise das amostras	62
3.2.4.2	Condições do sistema cromatográfico	63

3.2.4.3	Validação do método para análise das matérias-primas	63
3.2.5	CLAE de Troca Iônica com detecção indireta por ultravioleta	64
3.2.5.1	Preparo e análise das amostras	64
3.2.5.2	Condições do sistema cromatográfico	65
3.2.5.3	Coleta de alíquotas da CLAE e análise por CCD	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MATÉRIA-PRIMA	66
4.1.1	Faixa de fusão	66
4.1.2	Perda por dessecação	66
4.1.3	Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura	66
4.1.4	Cromatografia em camada delgada	69
4.1.5	Determinação de fosfito	70
4.1.6	Espectrometria no infravermelho	71
4.1.7	Espectrometria da ressonância magnética nuclear	72
4.2	MÉTODO TITULOMÉTRICO	74
4.2.1	Análise titulométrica das matérias-primas	74
4.2.2	Análise titulométrica de produto acabado – Validação do método	80
4.3	CLAE EM FASE REVERSA COM DERIVATIZAÇÃO POR FMOC E DETECÇÃO POR ULTRAVIOLETA	85
4.3.1	Análise das matérias-primas e avaliação da precisão e linearidade do método	85
4.3.2	Influência do pH da fase móvel no perfil cromatográfico	88
4.4	CLAE EM FASE REVERSA COM DETECÇÃO POR ULTRAVIOLETA EM BAIXO COMPRIMENTO DE ONDA	91

4.4.1	Comportamento do perfil cromatográfico nas condições empregadas	91
4.4.2	Avaliação da precisão e linearidade do método	94
4.5	CLAE DE TROCA IÔNICA COM DETECÇÃO INDIRETA POR ULTRAVIOLETA	98
5	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	104
	APÊNDICE – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA E DAS AMOSTRAS DE MATÉRIA-PRIMA	110
	ANEXO I – TRABALHO EM CONGRESSO	115
	ANEXO II – ARTIGO PUBLICADO	118

1 INTRODUÇÃO

O alendronato de sódio é um fármaco pertencente a um grupo de compostos denominados de *bisfosfonados*. Estas substâncias apresentam em comum dois grupos fosfóricos em sua estrutura molecular, possuindo grande afinidade pela matriz óssea humana e a capacidade de inibir sua reabsorção. Por esta razão, são amplamente utilizados no tratamento de desordens relacionadas ao tecido ósseo, como é o caso da osteoporose.

Apesar da crescente produção industrial do fármaco, apenas recentemente foi lançada monografia analítica do alendronato de sódio em compêndios oficiais (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002; UNITED States Pharmacopeia, 2005). A necessidade de se adotar uma adequada metodologia analítica para o controle da qualidade do fármaco em questão, levou à publicação de diferentes propostas para sua determinação quantitativa. Grande parte das metodologias utiliza, para a determinação do alendronato e de outros bisfosfonados semelhantes, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seja em fase reversa (empregando a derivatização da substância) ou por troca iônica, associada a diversos métodos de detecção. Além destes estão descritos, em menor número, métodos mais simples para a determinação do alendronato, tais como a espectrofotometria e a titulometria.

Embora apresente pouca especificidade, a volumetria de neutralização tem sido bastante utilizada por laboratórios nacionais para determinação do alendronato de sódio. No entanto, tal técnica freqüentemente apresenta resultados anômalos, os

quais foram avaliados neste trabalho, objetivando-se definir a correta aplicabilidade do método.

A ausência de grupos cromóforos na estrutura do alendronato, somada à característica iônica da molécula, dificulta sua análise por técnicas cromatográficas convencionais, as quais normalmente necessitam de procedimentos complexos e demorados para adequada determinação do fármaco. Assim, procurou-se desenvolver, neste estudo, uma metodologia cromatográfica de execução mais simples, mas que ao mesmo tempo pudesse fornecer resultados confiáveis.

1.1 DESCRIÇÃO DO FÁRMACO

1.1.1 Características Farmacológicas

O osso é o principal órgão envolvido na sustentação do organismo e é constituído por uma matriz formada de vários componentes (entre eles cálcio, fosfato e fibras colágenas) que conferem rigidez e uma certa maleabilidade a este tecido. Assim como outros tecidos do corpo, o osso se mantém em constante renovação, possuindo células como os osteoblastos, responsáveis pela síntese e deposição de material protéico à matriz, e os osteoclastos, os quais secretam enzimas e substâncias ácidas, que digerem a matriz e determinam sua reabsorção. Quando o equilíbrio do processo de renovação óssea é afetado, a estrutura dos ossos pode ser prejudicada, resultando no aparecimento de doenças como a osteoporose e a doença de Paget (GUYTON, 1988).

Vários fármacos vêm sendo utilizados na prevenção e no tratamento das desordens relacionadas ao processo de remodelagem óssea, destacando-se entre estes um grupo de compostos denominados de *bisfosfonados*.

Um dos primeiros bisfosfonados a ser sintetizado foi o ácido etano-1-hidroxi-1,1-bisfosfônico (etidronato), cujo principal objetivo era ser utilizado como aditivo em detergentes. Mas logo foram observados seus efeitos fisiológicos, como a capacidade de inibir a reabsorção óssea. A partir desta observação, iniciaram-se pesquisas para a síntese de diversos outros bisfosfonados e avaliação de seus

efeitos fisiológicos (FLEISCH, RUSSELL & FRANCIS, 1968 apud LOVDAHL & PIETRZYK, 1999).

O alendronato de sódio é um potente inibidor específico da reabsorção óssea mediada por osteoclastos. O mecanismo de ação dos bisfosfonados pode estar relacionado à capacidade de se fixarem na matriz óssea, sendo assimilados pelos osteoclastos e em seguida inibindo sua ação. Sabe-se que, em soluções de fosfato de cálcio, são capazes de retardar a formação e a dissolução dos cristais de hidroxiapatita ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$), os quais, no organismo, incorporam-se à matriz óssea, conferindo ao osso a dureza necessária para sua resistência compressional (MARCUS, 1996; GUYTON, 1988).

Desta forma o fármaco é indicado para a prevenção e tratamento da osteoporose (doença caracterizada por uma taxa de reabsorção óssea maior que a de formação e associada à pós-menopausa nas mulheres), no controle da hipercalcemia associada ao neoplasma maligno do osso e no controle da remodelagem óssea desordenada que ocorre na doença de Paget (MARCUS, 1996; PARFITT, 1999).

Em relação ao etidronato, o alendronato possui a vantagem de não inibir acentuadamente a mineralização óssea, embora possua a capacidade de inibir sua reabsorção. Sendo assim, o alendronato não apresenta o mesmo risco de desenvolvimento de osteomalácia, como é o caso de tratamento prolongado com o etidronato (MARCUS, 1996). Por outro lado, pode gerar algumas reações adversas tais como hipocalcemia e irritação do trato digestivo superior (esofagiana), a qual pode ser minimizada pela administração concomitante de água, mantendo-se o

paciente em posição ereta (PARFITT, 1999; DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas, 2000).

Da mesma maneira que os outros bisfosfonatos, o alendronato é pouco absorvido pelo intestino após administração oral, possuindo biodisponibilidade de apenas 0,4 a 0,7 %. Além disto, sua absorção é prejudicada quando administrado concomitantemente a alimentos, sendo reduzida especialmente por produtos que contenham cátions polivalentes como o cálcio, magnésio e alumínio, geralmente presentes em complementos alimentares, repositores e antiácidos (PARFITT, 1999; VADE - MECUM, 2002).

Por possuir grande afinidade pela matriz óssea, aproximadamente 50% da dose absorvida permanece fixa ao osso, sendo lentamente eliminada e possuindo uma meia vida de eliminação de até 10 anos no homem. O alendronato é excretado na urina na sua forma inalterada, não sofrendo qualquer metabolização aparente (PARFITT, 1999; DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas, 2000).

Além disto, a elevada afinidade dos bisfosfonados pelo tecido ósseo possibilita sua utilização na vetorização de fármacos. Existem relatos do uso de compostos bisfosfônicos como transportadores de várias substâncias direcionadas ao tecido ósseo, tais como radioisótopos utilizados no diagnóstico de tumor osteolítico, agentes antineoplásicos e antiinflamatórios (CASTRO *et al.*, 2004).

1.1.2 Características químicas

O alendronato de sódio, fármaco cujo nome químico é 4-amino-1-hidroxitributano bisfosfonato de sódio (CAS: 121268-17-5), é derivado do ácido alendrônico (ácido 4-amino-1-hidroxitributano bisfosfônico). Trata-se de um composto aminodifosfonado (Figura 1) que possui estrutura análoga ao pirofosfato, o qual é uma substância endógena com grande afinidade pela matriz óssea, sendo capaz de inibir a mineralização da mesma (PARFITT, 1999).

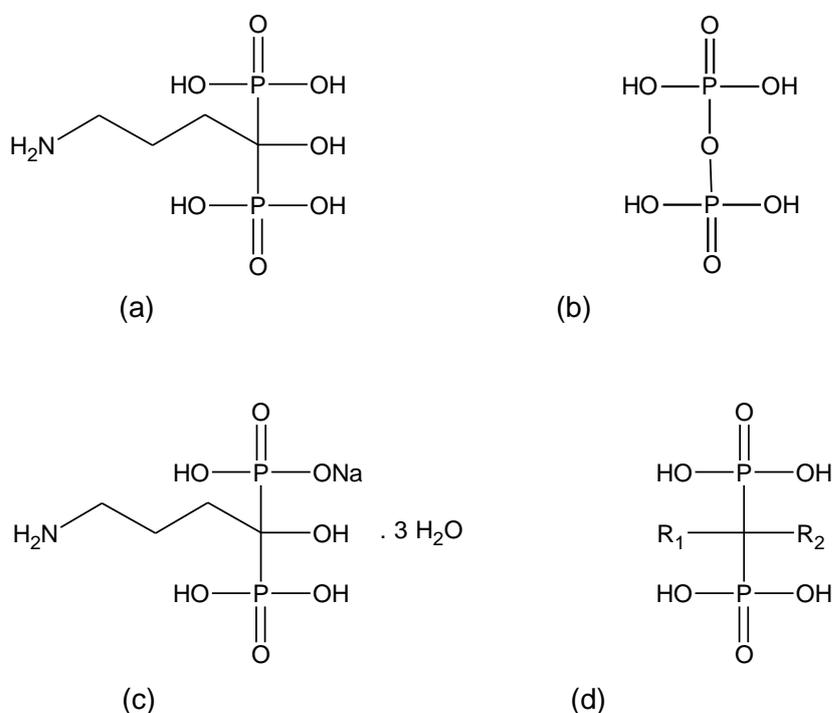


Figura 1 – Fórmulas estruturais do Ácido alendrônico (a), Pirofosfato (b), Alendronato monossódico triidratado (c) e estrutura geral dos bisfosfonatos (d). Fonte: MARCUS, 1996; PARFITT, 1999.

Fabricado como sal monossódico do ácido alendrônico (C₄H₁₃NO₇P₂), o alendronato de sódio encontra-se freqüentemente na forma triidratada (C₄H₁₂NNaO₇P₂ · 3H₂O) e possui faixa de fusão de 257 a 262 °C (KIECZYKOWSKI

et al., 1995). Uma massa de 1 mg do ácido alendrônico, cujo peso molecular é de 249,10, corresponde a aproximadamente 1,306 mg de alendronato de sódio triidratado, de peso molecular igual 325,12 (PARFITT, 1999 ; DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas, 2000).

Constituído por um pó fino e branco, o ácido alendrônico possui faixa de fusão que vai de 233 a 235 °C, decompondo-se a esta temperatura. Apresenta comportamento anfótero, visto que sua estrutura possui característica ácida (dois grupos fosfóricos) e básica (grupo amina). Possui quatro constantes de dissociação, cujos valores são: $pK_{a1} = 2,72 \pm 0,05$; $pK_{a2} = 8,73 \pm 0,05$; $pK_{a3} = 10,5 \pm 0,1$; $pK_{a4} = 11,6 \pm 0,1$ (MERCK Index, 2001).

O método mais comum para síntese do ácido alendrônico envolve a reação do ácido 4-aminobutírico (GABA) com ácido fosforoso e tricloreto de fósforo (Figura 2). A utilização do ácido metassulfônico durante o processo permite um maior rendimento e maior pureza do produto obtido. A obtenção do alendronato de sódio segue-se pela neutralização do ácido alendrônico com solução de hidróxido de sódio 50%, ao pH 4,3 (KIECZYKOWSKI *et al.*, 1995).

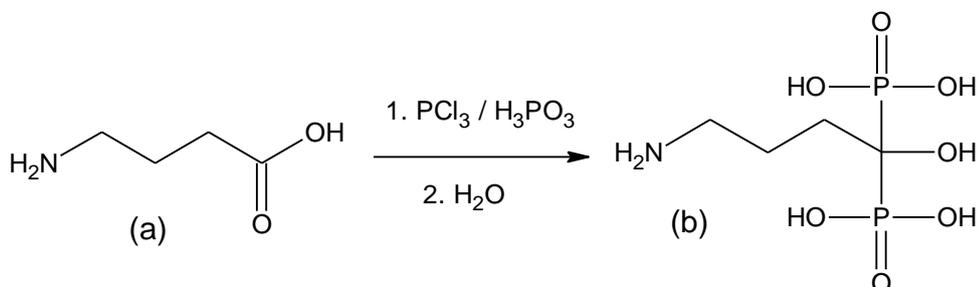


Figura 2 – Síntese do ácido alendrônico (b), onde (a) é o ácido 4-aminobutírico (GABA).
Fonte: KIECZYKOWSKI *et al.*, 1995.

O alendronato de sódio é solúvel em água, muito pouco solúvel em dimetilsulfóxido, metanol e propilenoglicol e é praticamente insolúvel em diclorometano, acetona, acetonitrila, clorofórmio, álcool isopropílico e ácido acético glacial (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002; PROCINT, 1997; CIPLA, 1999).

1.2 FORMAS FARMACÊUTICAS DISPONÍVEIS NO MERCADO BRASILEIRO

O primeiro medicamento contendo alendronato de sódio foi lançado pela Merck Sharp & Dohme (Fosamax[®] - comprimidos de 10 e 70 mg) e recebeu a aprovação do FDA para comercialização e uso em 1995 (McCARTHY, 1995). No Brasil, o fármaco se encontra disponível para administração oral, em comprimidos de alendronato monossódico, na forma triidratada ou não, apresentando doses de 5, 10 e 70 mg de ácido alendrônico por comprimido. Apenas uma formulação comercial encontra-se sob a forma de comprimidos revestidos entre as mais de 10 marcas no mercado (DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas, 2000; VADE – MECUM, 2002). Em fevereiro de 2004 foi registrado, no país, o primeiro medicamento genérico fabricado pela empresa Biossintética (comprimidos de alendronato de sódio 10 mg) (ANVISA, 2004). Há também uma formulação registrada sob forma de solução oral e outra sob forma de cápsulas de gelatina mole (CONSULTA remédios, 2004). Farmácias magistrais têm manipulado alendronato de sódio em cápsulas de gelatina dura.

1.3 MÉTODOS DESCRITOS PARA ANÁLISE DO ALENDRONATO

1.3.1 Métodos Cromatográficos

A grande maioria das propostas para a determinação quantitativa do alendronato de sódio, descritas na literatura, envolve o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). São utilizados principalmente dois tipos de análise cromatográfica: a cromatografia líquida de troca iônica (CLAE-TI) e a cromatografia líquida em fase reversa (CLAE-FR).

1.3.1.1 CLAE em Fase Reversa

Os métodos propostos para a determinação do alendronato de sódio através da CLAE em fase reversa empregam em sua maioria a detecção por ultravioleta ou fluorescência. No entanto, com exceção de alguns compostos como o tiludronato (que possui anel aromático em sua estrutura), a maioria dos bisfosfonados não apresenta absorvidade apreciável (SPARIDANS *et al.*, 2000). Sendo assim, o alendronato precisa ser submetido previamente a uma reação de derivatização. Esta tem como objetivo conferir ao composto a capacidade de absorver radiação ultravioleta ou de emitir fluorescência.

Um dos primeiros métodos desenvolvidos para a determinação do alendronato em formulações farmacêuticas faz uso da CLAE-FR, utilizando derivatização pré-coluna com 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC) para detecção do fármaco (DE MARCO *et al.*, 1989). Em 2002, uma proposta de monografia analítica empregando

esta metodologia para análise quantitativa de matéria-prima foi encaminhada ao Pharmacopeial Forum (MEDJEDOVIC, 2002), objetivando publicação oficial no primeiro suplemento da USP 26, compêndio oficial americano de 2003. Entretanto, a mesma foi lançada apenas recentemente, na edição de 2005 (UNITED States Pharmacopeia, 2005).

De Marco e colaboradores (1989) realizaram a derivatização acrescentando ao fármaco (diluído em solução de ácido cítrico) quantidade apropriada de uma solução recém-preparada de FMOC em acetonitrila. A concentração de ácido cítrico é importante, pois o citrato atua como um quelante de íons metálicos, evitando a complexação do alendronato com metais e permitindo a reação com FMOC. Também foi observada a relação entre o tempo de reação e a quantidade de produto obtido, sendo necessário um tempo mínimo de 20 minutos para que a reação seja completa. A reação de derivatização ocorre conforme apresentado na Figura 3, onde o FMOC reage com o nitrogênio da amina primária do alendronato.

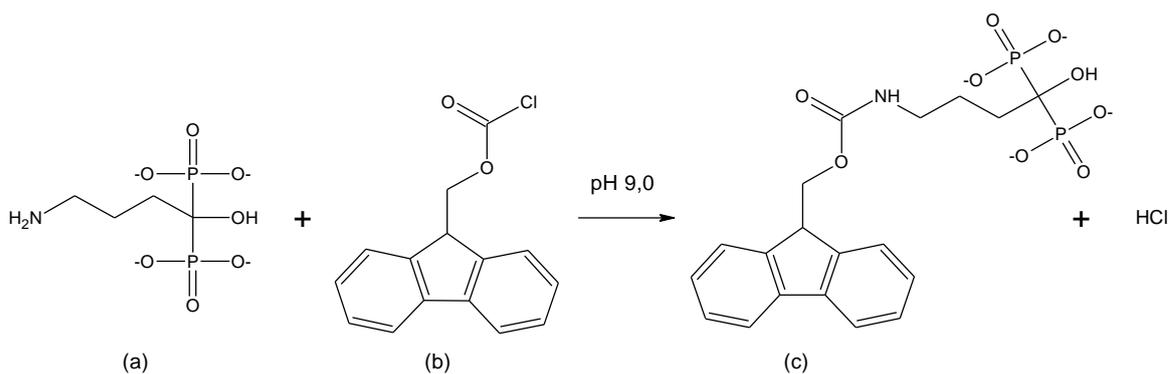


Figura 3 – Reação de derivatização do (a) alendronato com (b) 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC), formando (c) derivado cromóforo (composto a ser analisado). Fonte: DE MARCO *et al.*, 1989.

Após a reação de derivatização, faz-se necessário extrair com diclorometano o excesso de reagente (FMOC), o qual, se não removido de forma apropriada, pode ocasionar picos assimétricos na análise cromatográfica. O diclorometano foi escolhido, frente a outros solventes orgânicos pouco polares, por permitir que a fase aquosa contendo o fármaco derivatizado permaneça superior, devido a sua menor densidade, facilitando assim a coleta.

No estudo de De Marco foi utilizada uma coluna com fase estacionária polimérica a base de estireno divinilbenzeno para a análise cromatográfica. Esta apresentou maior estabilidade que as colunas convencionais de fase reversa, C-8 e C-18 a base de sílica, frente ao elevado pH da fase móvel utilizada (pH=8,0), o qual se faz necessário para manter a estabilidade do derivado obtido (Figura 3). O comprimento de onda escolhido para a detecção foi de 266 nm, no qual o derivado apresentou máxima absorvância. Segundo os autores, o método foi validado para o doseamento de formulação intravenosa, comprimidos e cápsulas de alendronato e para determinação da taxa de dissolução, mostrando-se preciso (Desvios Padrão Relativos – DPRs < 3%), exato e específico (DE MARCO *et al.*, 1989).

Recentemente, Ptáček e colaboradores (PTÁČEK, KLIMA & MÁČEK, 2002) descreveram um método para determinação de alendronato de sódio na urina, onde também foi empregada a derivatização com FMOC, mas usou-se detecção por fluorescência, selecionando o comprimento de onda de 260 nm para a excitação da substância ativa e de 310 nm para medida da fluorescência emitida. Nesta metodologia não houve remoção do excesso de reagente pela extração com diclorometano e foi utilizada uma coluna convencional C-18 a base de sílica em

destrimento às colunas poliméricas empregadas em outros estudos. Ainda assim foram obtidos picos simétricos e bem resolvidos, segundo o autor. Fez-se uso de um padrão interno para a realização das análises, com intuito de corrigir a variabilidade causada pela preparação das amostras biológicas. O limite de quantificação (LQ) encontrado neste estudo foi de 3,5 ng/mL, demonstrando que o método, levando-se em conta a baixa biodisponibilidade do alendronato, é adequado para a determinação do fármaco na urina (PTÁCEK, KLÍMA & MACEK, 2002).

Em outro estudo com CLAE em fase reversa (KLINE, MATUSZEWSKI & BAYNE, 1990), foi desenvolvido e validado um método para determinação do alendronato na urina, utilizando derivatização com 2,3-naftaleno dicarboxialdeído-cianeto (NDA-CN⁻) e detecção fluorimétrica (DF). O limite de quantificação (LQ) encontrado foi de 5 ng/mL, o qual se apresentou bem abaixo dos valores de LQ encontrados por outros métodos desenvolvidos até então. Posteriormente, os autores iniciaram novo estudo (KLINE & MATUSZEWSKI, 1992), buscando fornecer uma metodologia com maior sensibilidade e que possibilitasse o uso de um reagente menos tóxico que o NDA-CN⁻, substituindo o íon cianeto (CN⁻) por um outro nucleófilo. Foi então publicado um trabalho com CLAE-FR, para determinação do alendronato na urina e no plasma, onde se empregou DF após derivatização com o reagente 2,3-naftaleno dicarboxialdeído-N-acetil-D-penicilamina (NDA-NAP). Foi obtido um LQ de 1 ng/mL e um de 5 ng/mL para o alendronato de sódio na urina e no plasma, respectivamente, demonstrando assim a sensibilidade superior deste método em relação ao anterior. A reação de derivação que ocorre nos métodos propostos por Kline e colaboradores pode ser visualizada na Figura 4.

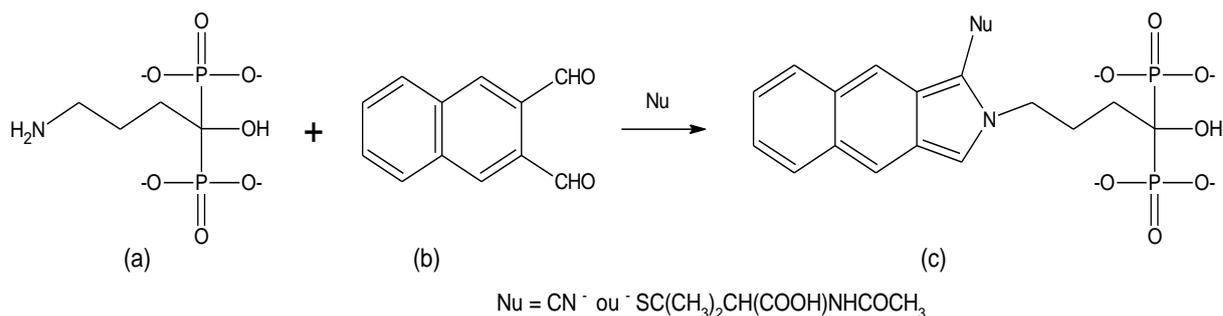


Figura 4 – Derivatização do alendronato (a), com NDA-CN⁻ e com NDA-NAP, formando derivado cromóforo (c); onde (b) é a estrutura do 2,3-naftaleno dicarboxialdeído (NDA). Fonte: KLINE & MATUSZEWSKI, 1992.

Neste mesmo estudo, além da DF, também foi explorada a detecção eletroquímica (DE) do derivado NDA-CN⁻, observada a eletroatividade do mesmo, empregando como eletrodo de trabalho carbono vitrificado. O tampão borato, usado no preparo da amostra para derivatização, ocasionou uma extensa cauda frontal interferente na análise e foi substituído por um tampão carbonato. Para a escolha do potencial a ser aplicado durante a detecção, foi registrado um voltamograma do derivado (c) (Figura 4). Na varredura de potencial, de +0,4 a +0,8 V, observou-se uma máxima intensidade de corrente em +0,65 V, o qual foi considerado o potencial de oxidação ótimo para a análise. O LQ encontrado foi de 2,5 ng/mL, demonstrando boa sensibilidade do método. A precisão (DPRs < 9%), a exatidão e a linearidade do método foram testadas e mostraram-se adequadas, para concentrações do fármaco entre 2,5 e 50,0 ng/mL (KLINE & MATUSZEWSKI, 1992).

Recentemente foi desenvolvida uma metodologia cromatográfica para determinação do alendronato, em matéria-prima e produto acabado, onde se empregou a derivatização do fármaco com ftaldialdeído e detecção por ultravioleta

em 325 nm. O método se mostrou exato, preciso (DPRs < 3 %) e seletivo, separando o alendronato dos produtos obtidos pela degradação forçada do fármaco e podendo ser utilizado como método indicador de estabilidade (EL-SATTAR, AHMAD & EL KADY, 2003).

Um recurso muito utilizado na análise de compostos ionizáveis por CLAE-FR é a formação do par iônico. Como a fase estacionária empregada na CLAE-FR é apolar, interage fracamente com o soluto iônico e reduz demasiadamente o tempo de retenção, o que pode ocasionar uma seletividade insatisfatória do método. Na técnica do par iônico, um contra-íon de carga oposta ao soluto analisado é adicionado na fase móvel, permitindo que o complexo resultante percorra a coluna como um par iônico neutro, melhorando sua interação com a fase estacionária e aumentando a seletividade do sistema.

Dentre os vários métodos descritos para a análise de compostos bisfosfonados que empregam o pareamento iônico, um envolve a determinação do alendronato em fase estacionária polimérica, usando o brometo de cetiltrimetilamônio como contra-íon. Para a detecção fluorimétrica foi realizada derivatização pós-coluna com oftalaldeído e mercaptoetanol (OPA-MERC). O método foi aplicado na determinação do alendronato em formulação intravenosa e comprimidos (KWONG *et al.*, 1990). Em 2004 foi publicada metodologia semelhante, onde se utilizou OPA-MERC como agente derivatizante e perclorato de tetrabutilamônio como contra-íon. Neste estudo foi empregada detecção espectrofotométrica para análise de alendronato em formas farmacêuticas e detecção fluorimétrica para a análise em matrizes biológicas (AL DEEB, HAMDAN & AL NAJJAR, 2004).

Também foram descritas outras derivatizações para a análise de um aminodifosfonado análogo ao alendronato (o pamidronato, ou 3-amino-1-hidroxipropilideno bisfosfonato) (SPARIDANS *et al.*, 1997 b; SPARIDANS *et al.*, 1998). Os métodos empregaram a CLAE-FR com utilização de par iônico, mas com distintos reagentes de derivatização: em um, para determinação do fármaco em formulações, foi utilizado o fenilisotiocianato, e em outro, para determinação em meios biológicos, o fármaco foi derivatizado com 1-naftilisotiocianato. Em ambos houve posterior detecção por fluorescência. Em um outro estudo realizado pelo mesmo grupo de autores (SPARIDANS *et al.*, 1997 a), a determinação do pamidronato e de outros bisfosfonados (incluindo o alendronato) através da CLAE-FR com par iônico seguiu na mesma linha, empregando-se diferentes isotiocianatos para a derivatização de cada fármaco e posterior detecção por fluorescência. Além disto foi analisada a influência de diferentes contra-íons (utilizados para a formação dos pares iônicos) na retenção relativa de cada fármaco, como pode ser visualizado na Tabela 1, onde, dependendo do contra-íon utilizado, pode-se inclusive observar a reversão da ordem de eluição.

Tabela 1 - Influência do contra-íon na retenção dos derivados aminobisfosfonados-FTC.

Componente (derivado do fenilisotiocianato)	Fator de separação (α) em relação ao derivado pamidronato-FTC		
	contra-íon TEA	contra-íon THA	Contra-íon TOA
Pamidronato – FTC	1	1	1
Neridronato – FTC	4,9	0,88	0,88
Alendronato – FTC	1,7	0,94	0,93

Fonte: adaptado de SPARIDANS *et al.*, 1997 a.

FTC = feniltiocianato; Contra-íons: TEA = tetraetilamônio, THA = tetrahexilamônio, TOA = tetraoctilamônio.

1.3.1.2 CLAE de Troca Iônica

A cromatografia líquida de troca iônica (CLAE-TI) é uma alternativa bastante utilizada na análise cromatográfica de compostos iônicos, constituindo método perfeitamente aplicável na determinação dos compostos bisfosfonados.

Em um dos métodos que aplicam a CLAE-TI para determinação do alendronato foi utilizada a condutimetria para detecção do fármaco. Como fase móvel foi usado o ácido nítrico (HNO_3) na concentração de 1,6 mmol/L, fornecendo um pH favorável para manutenção do monoíon do alendronato na solução, o qual é menos retido pela coluna de troca iônica que o di-íon, possibilitando redução no tempo de análise. Devido à alta condutividade do HNO_3 (provocada principalmente pela presença dos íons H^+), o alendronato produziu um sinal decrescente (sinal cromatográfico indireto). Tentativas de se utilizar uma coluna supressora, que reduzisse o sinal provocado pelos íons H^+ da fase móvel, não foram bem sucedidas, já que suprimiram paralelamente a resposta do alendronato. O método foi validado para duas formulações: solução intravenosa e comprimidos, e foi considerado preciso (DPRs < 2%), exato (boa recuperação), específico (alendronato foi bem separado dos outros componentes nas duas formulações) e reprodutível (determinações em equipamentos diferentes não demonstraram diferenças significativas). Foi encontrado um limite de detecção (LD) de 2 $\mu\text{g/mL}$ e um LQ de 5 $\mu\text{g/mL}$, para uma razão sinal/ruído (S/R) igual a 4. Os autores realizaram uma comparação entre a análise com detecção condutimétrica e a análise com detecção espectrofotométrica no UV (derivatização pré-coluna com 9-fluorenilmetilcloroformato - FMOC) e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos

dois métodos, os quais puderam ser considerados equivalentes (TSAI, IP & BROOKS, 1992).

Posteriormente, foi realizado outro estudo com CLAE–TI, onde se utilizou a detecção por índice de refração. Assim como na análise por detecção condutimétrica, empregou-se como fase móvel o ácido nítrico, utilizando-se no entanto uma concentração um pouco mais elevada (6,0 mmol/L) para esta metodologia. O método foi validado para a formulação do alendronato em comprimidos e demonstrou ser seletivo, separando adequadamente o fármaco de impurezas propil-análogas e dos excipientes. Da mesma forma, demonstrou ser preciso (DPRs < 2%), exato e robusto. O LD encontrado para o método foi de 0,4 µg/mL, sendo comparável ao método com detecção indireta por ultravioleta, com LD de 1 µg/mL (HAN & QIN, 1996).

Em edição recente da Farmacopéia Portuguesa, há descrição de monografia para o alendronato de sódio, onde a determinação quantitativa do fármaco é realizada por cromatografia de troca iônica, utilizando coluna trocadora de ânions e detecção por índice de refração (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002).

Também foi proposta a determinação de bisfosfonados em formulações farmacêuticas por CLAE–TI, utilizando a complexação e detecção por ultravioleta. Como fase móvel foi empregada uma mistura de ácido nítrico (HNO₃) e nitrato de cobre II (Cu(NO₃)₂). A capacidade de absorver radiação UV foi conferida pela formação de complexo cromóforo, obtido pela reação entre os fármacos e íons cúpricos (Cu²⁺) presentes na fase móvel. A leitura da absorvância foi feita no

comprimento de onda de 245 nm. Dentre os bisfosfonados analisados, o limite de detecção mais baixo (0,4 µg/mL) foi obtido para o pamidronato (SPARIDANS, HARTIGH & VERMEIJ, 1995).

Ainda explorando a detecção espectrofotométrica, foi proposta uma outra metodologia utilizando CLAE-TI para os bisfosfonados, onde se empregou uma reação fotoquímica pós-coluna para os fármacos. O método pode ser explicado, resumidamente, da seguinte maneira: o bisfosfonado passa por um reator fotoquímico (acoplado ao sistema) após eluir da coluna. No reator ele é submetido à radiação ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) transformando-se em *ortofosfato*, o qual irá reagir com o *molibdato* (reagente introduzido pós-coluna) para formar o *fosfomolibdato*. Sob radiação UV o fosfomolibdato é reduzido a *fosfomolibdênio*, um composto de cor azul que é então detectado a um comprimento de onda de 750 nm. O método foi otimizado para a determinação do ácido 2-tioetano-1,1-bisfosfônico em formulações farmacêuticas utilizando a eluição por gradiente. Esta metodologia apresenta vantagem frente a eluição isocrática por permitir a separação de produtos de degradação, obtidos nos ensaios de estabilidade do fármaco em condições de estresse (PENG & DANSEREAU, 2001).

Como esperado, a ausência de grupo cromóforo na estrutura química do alendronato dificulta sua análise por CLAE com detecção espectrofotométrica, apresentando assim a desvantagem de necessitar de extensivas preparações (no caso da derivatização pré-coluna) ou de equipamento específico e de custo mais elevado (no caso da derivatização pós-coluna). Na tentativa de elaborar procedimentos mais simples, alguns autores desenvolveram métodos para a

determinação de alendronato e outros bisfosfonados utilizando detecção indireta por ultravioleta. Estas metodologias se baseiam na medida da diminuição da absorvância da fase móvel (contendo ácido nítrico) que ocorre pela presença do soluto (bisfosfonado) (TSAI *et al.*, 1994; QUATTROCCHI *et al.*, 2001).

Em um dos estudos, foi empregado HNO_3 1,6 mmol/L como fase móvel, o comprimento de onda de 235 nm para leitura da absorvância e um detector com polaridade invertida. À medida que os íons nitrato da fase móvel são substituídos pelos ânions do bisfosfonado (alendronato, entre outros), as medidas de absorvância decrescem. Este método foi validado para uma formulação de alendronato em comprimidos e formulação injetável de dois outros bisfosfonados. Entretanto, devido ao elevado LD encontrado (1 $\mu\text{g/mL}$), o método não se mostrou adequado para detecção de produtos de degradação do alendronato em estudos de estabilidade (TSAI *et al.*, 1994).

Uma outra proposta empregou derivatização pós-coluna e detecção indireta por fluorescência para a determinação do alendronato e outros bisfosfonados em matrizes biológicas. Neste estudo foi usada uma coluna aniônica fortemente básica para a análise por CLAE-TI e a fase móvel foi composta por hidróxido de sódio (NaOH) e nitrato de sódio (NaNO_3). O reagente utilizado na derivatização foi o Al_3^+ -morin. O morin, ou 2',3,4',5,7-pentaidroxiflavona, é um composto fluorescente que na presença do íon Al^{3+} forma um complexo de fluorescência ainda mais intensa. O princípio da análise é baseado na adição pós-coluna do reagente Al_3^+ - morin à fase móvel, conferindo à mesma a capacidade de emitir fluorescência. À medida que os

íons do alendronato eluem da coluna eles competem com o morin pela complexação com o Al_3^+ , estabelecendo-se um equilíbrio da reação:



O complexo formado pelo alendronato e o alumínio não é fluorescente e o morin sem a complexação com o Al_3^+ se torna menos fluorescente, o que ocasiona decréscimo na fluorescência emitida pela fase móvel. Esta diminuição na leitura da fluorescência emitida é proporcional à concentração de alendronato que elui da coluna. O limite de detecção encontrado foi de 10 ng na coluna (LOVDAHL & PIETRZYK, 1999).

Encontra-se também, na literatura, estudo para a caracterização do alendronato onde se emprega a CLAE-TI e detecção por espectrometria de massas com eletro-pulverização (QIN *et al.*, 1994).

1.3.2 Métodos Espectrofotométricos

A utilização do método espectrofotométrico na determinação quantitativa de um fármaco pode ser muito conveniente em algumas situações, considerando-se a simplicidade, rapidez e baixo custo proporcionados por este tipo de análise. No entanto o alendronato de sódio, assim como alguns outros compostos bisfosfônicos, não possui grupamentos cromofóricos em sua estrutura, o que impede sua análise por técnicas espectrofotométricas convencionais.

Os compostos bisfosfonados são capazes de atuar como quelantes de íons metálicos, devido à propriedade ligante conferida pelo grupamento hidroxila (TSAI *et al.*, 1992). Observando esta capacidade, Ostovic e colaboradores realizaram um estudo onde foi analisada a formação de um complexo cromóforo entre o alendronato e íons cúpricos (Cu^{2+}). Foi avaliada a cinética da reação de formação do complexo e também a capacidade deste de absorver radiação ultravioleta. Os autores apontaram a possibilidade da utilização deste método para a determinação quantitativa do alendronato de sódio, mas destacaram algumas limitações, tais como: a presença de outros íons que competem pela complexação com o bisfosfonado, a presença de agentes quelantes do Cu^{2+} (como o citrato por exemplo) e a baixa solubilidade do complexo bisfosfonado – Cu^{2+} na presença de valores elevados de pH (OSTOVIC, STELMACH & HULSHIZER, 1993).

Explorando ainda a propriedade quelante dos bisfosfonados, foi desenvolvida e validada uma metodologia para determinação do alendronato de sódio em comprimidos, onde o fármaco foi inicialmente complexado com íons férricos (Fe^{3+}) para que então pudesse ser analisado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) (KULJANIN *et al.*, 2002). A complexação do alendronato ocorreu por adição de solução de cloreto férrico (em ácido perclórico) a uma solução contendo o alendronato de sódio (também em ácido perclórico). Foram realizados experimentos para determinar qual proporção entre cloreto férrico (FeCl_3) e alendronato origina melhores valores de absorvância e constatou-se que a proporção ideal para a formação do complexo é de 1:1. Kuljanin e colaboradores observaram máxima absorvância do complexo alendronato– Fe^{3+} em um comprimento de onda de 260 nm, no qual o alendronato livre não apresentou leitura, mas onde se nota razoável

interferência do cloreto férrico, embora seu comprimento de onda de máxima absorvância esteja em torno de 238 nm. Assim, para minimizar o efeito interferente dos íons férricos na análise, as leituras do complexo foram realizadas em torno de 300 nm. Para avaliar a robustez do método foram feitas medidas da absorvância, imediatamente após a formação do complexo, nos comprimentos de onda de 290, 300 e 310 nm. O LD encontrado para este método foi de 2 µg/mL (para um S/R = 3) e o LQ foi de 7 µg/mL. A especificidade foi testada avaliando-se a interferência dos excipientes da formulação na formação do complexo e nas medidas de absorvância. A amostra de placebo não apresentou sinal nas condições experimentais descritas (KULJANIN *et al.*, 2002).

Embora este método possua especificidade satisfatória quanto à interferência dos excipientes, ele não pode ser considerado seletivo para determinação de produtos de degradação e impurezas do alendronato. Portanto, não pode ser aplicado como método indicador de estabilidade.

Estudos empregando a derivatização do fármaco, objetivando conferir ao mesmo capacidade de absorver radiação e possibilitando a detecção espectrofotométrica, também foram publicados. Uma das metodologias utilizou dois diferentes reagentes para derivatização: o 1,2-naftaquinona-4-sulfonato e o 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona. Segundo os autores, o método apresentou boa recuperação e não demonstrou interferência dos excipientes normalmente utilizados nas formas farmacêuticas, podendo ser aplicado na determinação do alendronato em matéria-prima e produto acabado (MEYYA *et al.*, 2001). Em outro estudo, foi desenvolvido e validado um método espectrofotométrico para

determinação do alendronato, onde o fármaco foi derivatizado com ninhidrina e o produto formado detectado a um comprimento de onda de 568 nm (TAHA & YOUSSEF, 2003). Recentemente foi desenvolvida metodologia onde o alendronato foi derivatizado com OPA-MERC e o composto resultante analisado por ultravioleta. (AL DEEB, HAMDAN & AL NAJJAR, 2004).

1.3.3 Métodos Titulométricos

Da mesma maneira que a espectrofotometria, a titulometria consiste em um método simples e de baixo custo que pode ser aplicado para a análise quantitativa de uma grande variedade de compostos. Por outro lado, durante o procedimento, pode-se quantificar substâncias de estruturas químicas diferentes que apresentam propriedades físico-químicas semelhantes ou mesmos grupos reacionais. Portanto, na maioria dos casos, este método não pode ser considerado seletivo.

Na literatura científica, há poucos trabalhos propondo metodologia titulométrica para determinação quantitativa de derivados de ácidos bisfosfônicos, sendo que em dois relatos é empregada a complexometria. As análises são baseadas na capacidade dos compostos bisfosfonados em formar complexos. Nestes métodos, o alendronato (assim como alguns outros bisfosfonados estudados) é titulado por agentes complexantes como o dinitrilocicloexilenotetracetato de tório (Th[DCTA]) ou o etilenodiaminotetracetato de tório (Th[EDTA]), sendo o ponto final da titulação determinado utilizando-se indicadores visuais (laranja de xilenol ou azul de metil timol) (PODOLSKA *et al.*, 1997; PODOLSKA, BIALECKA & KWIATKOWSKA-PUCHNIARZ, 2000).

A Farmacopéia Americana adota metodologia semelhante para a determinação do etidronato, onde o fármaco é titulado pelo Th(DCTA) na presença do laranja de xilenol e o ponto final da titulação é caracterizado pela viragem do indicador a uma cor vermelho-violácea (UNITED States Pharmacopeia, 2000).

Ainda explorando a complexação do alendronato com íons metálicos, foi desenvolvido um outro método volumétrico, onde o fármaco foi titulado por solução de cloreto férrico (em ácido acético), utilizando como indicador visual o ácido salicílico ou o tiocianato (METWALLY & WALASH, 2000).

A volumetria de neutralização também foi proposta para determinação do alendronato de sódio em formulações farmacêuticas, aproveitando as propriedades ácidas da molécula (BUENO & BERGOLG, 2000). Foi utilizado como titulante o hidróxido de sódio 0,1 e 0,05 mol/L para análise de matéria-prima e produto acabado, respectivamente. Segundo os autores, o método se mostrou preciso e exato, porém, na análise de uma formulação sob forma de comprimidos, foi observada interferência dos excipientes. Há também registros não publicados em meios científicos, provenientes principalmente de empresas produtoras do fármaco, onde vem sendo utilizada a titulação ácido-base para a determinação quantitativa do alendronato de sódio (PROSINT, 1997; CIPLA, 1999). O método, entretanto, precisa ser melhor avaliado no que se refere a seletividade quando da presença de impurezas de caráter ácido na matéria-prima.

1.3.4 Outros métodos

Metodologias menos comuns na rotina laboratorial farmacêutica também foram empregadas para a determinação do alendronato de sódio, tais como a Eletroforese Capilar (EC), Plasma de Acoplamento Indutivo ou ICP (Inductively Coupled Plasma) e a Voltametria de Redissolução Anódica ou ASV (Anodic Stripping Voltammetry).

1.3.4.1 Eletroforese Capilar (EC)

A eletroforese capilar é um método de separação bastante eficiente e que vem sendo utilizado cada vez mais na análise de produtos farmacêuticos. Sua aplicação é voltada principalmente para a análise de moléculas carregadas eletricamente, o que torna este método bastante atraente para a determinação dos compostos bisfosfonados, já que estes possuem carga negativa. O uso da EC apresenta algumas vantagens em relação à CLAE, tais como: elevada eficiência, alta resolução, rapidez no desenvolvimento dos métodos, reduzido consumo de solvente e menor volume de amostra utilizada (este último, às vezes, tornando-se uma desvantagem face a exigência de detecção sensível).

Tsai e colaboradores desenvolveram uma metodologia para a determinação do alendronato de sódio utilizando a EC como método de separação. Foi utilizado tubo capilar de sílica, não revestido, com solução composta por uma mistura de ácido nítrico (HNO_3 1,6 mmol/L) e sulfato cúprico (CuSO_4 2 mmol/L) e empregou-se a detecção direta do complexo formado entre o alendronato e o cobre (presente na solução eletrolítica), por ultravioleta. Este método apresentou algumas vantagens em comparação a dois outros métodos utilizando CLAE (um com CLAE-FR e detecção

espectrofotométrica e outro com CLAE-TI e detecção por condutividade), tais como: maior eficiência de separação, maior simplicidade e rapidez no preparo da amostra e consumo extremamente reduzido de fase móvel. Contudo, a dificuldade dos autores em selecionar um adequado padrão interno resultou, como consequência, em menor precisão do método (DPR 2 – 5%) (TSAI *et al.*, 1992).

Outros métodos onde a EC é utilizada para a determinação de compostos bisfosfonados foram descritos e empregam tanto a detecção direta por UV como a detecção por espectrometria de massas com eletropulverização (PENG *et al.*, 1998; HUIKKO & KOSTIAINEN, 2000 a; HUIKKO & KOSTIAINEN, 2000 b).

1.3.4.2 Plasma de Acoplamento Indutivo (ICP)

O ICP é um método que utiliza o plasma como fonte de excitação para emissão atômica e pode estar associado a métodos de detecção como a Espectroscopia de Emissão Ótica ou a Espectrometria de Massas. Apesar de não ser um método de uso comum na rotina laboratorial, seu emprego na análise de substâncias farmacêuticas vem aumentando, já havendo descrição de sua utilização na quantificação do etidronato (como método de detecção acoplado à CLAE-TI) (REED *et al.*, 1995; RAFAEL G.P., 2003). O método baseia-se na aplicação de um campo de rádio frequência a um compartimento por onde passa um fluxo de argônio. Desta forma o gás é energizado e, com a ajuda de uma descarga auxiliar, forma um plasma estável que atinge uma temperatura de 9727°C. A amostra com a substância a ser analisada é nebulizada e carregada pelo fluxo de argônio até a chama de plasma, onde atinge uma temperatura extremamente alta, levando à atomização do

analito e posterior emissão de fótons. A intensidade do feixe de fótons emitido é proporcional à concentração da substância na amostra (RAFAEL G.P., 2003).

Reed e colaboradores desenvolveram uma metodologia para a determinação do alendronato de sódio em comprimidos utilizando a análise por ICP para conteúdo de fósforo. O alendronato (tanto o padrão como a amostra em comprimidos) foi dissolvido em água e diretamente analisado (sem o uso de método de separação previamente à análise). No espectrômetro acoplado ao ICP foi selecionado um comprimento de onda de 178 nm (utilizado para a detecção de fósforo). O método foi considerado linear, preciso (DPRs < 2%) e exato (comparativamente ao método por CLAE-FR, com uso do FMOC e detecção por UV). Além disto mostrou ser extremamente rápido e simples, proporcionando fácil preparo da amostra e menor tempo total de análise. No entanto não pode ser utilizado como indicador de estabilidade, pois é específico apenas para o fósforo, podendo quantificar ao mesmo tempo qualquer composto que contenha este elemento (tais como impurezas de síntese ou produtos de degradação do alendronato) (REED *et al.*, 1995).

1.3.4.3 Voltametria de Redissolução Anódica

A voltametria de redissolução é um método extremamente sensível, utilizado para a determinação de baixas concentrações de substâncias eletroativas em solução. É empregado na análise de compostos que possam ser facilmente reduzidos e oxidados, tais como os metais.

Esta técnica é baseada na aplicação de um potencial extremamente negativo (chamado de “potencial de deposição”) a um eletrodo em contato com uma solução

contendo o analito (geralmente um íon metálico), o qual sofre redução e se deposita na superfície do eletrodo. Em seguida, o potencial aplicado é modificado, realizando-se uma varredura na direção de valores positivos. Desta forma o analito acumulado é reoxidado e se dissolve, retornando à solução e resultando na geração de uma corrente. A intensidade da corrente produzida é proporcional à concentração da substância analisada que se depositou no eletrodo (BIOANALYTICAL SYSTEMS, 2003).

Recentemente, Razac e colaboradores (2003) desenvolveram uma metodologia para a análise do alendronato de sódio (além de outros dois compostos) através da Voltametria de Redissolução Anódica. Neste método foi realizada a complexação do fármaco pelo cobre (Cu^{2+}) e o complexo formado depositou-se na superfície do eletrodo sob a ação de um potencial de deposição de -1100 mV. Para a extração foi utilizada a “Voltametria de Redissolução Anódica de Pulso Diferencial” (DPASV), a qual é um tipo de voltametria de redissolução que apresenta elevada sensibilidade. Durante o estudo foi analisada a influência do pH e do tempo de agitação sobre a formação do complexo, assim como o efeito do potencial de acumulação sobre a etapa de deposição. Também foi observado que o excesso do fosfato de cobre II ($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$), utilizado na complexação, não interfere na análise, pois este reagente é fracamente solúvel e mesmo pequenos níveis de Cu^{2+} residuais não prejudicam a detecção do complexo. O método foi considerado linear (faixa de $0,1$ a $0,3$ $\mu\text{g/mL}$), preciso (DPRs $< 2\%$), exato e apresentou alta sensibilidade, com um limite de detecção igual a $8,6$ ng/mL e um limite de quantificação igual a 29 ng/mL (RAZAC *et al.*, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a aplicabilidade de método de análise alternativo – titulométrico e cromatográfico – para o alendronato de sódio, passível de ser utilizado em empresas de médio porte, no controle da qualidade de matéria-prima e produto acabado manipulado (principalmente cápsulas).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização de alendronato de sódio matéria-prima de diferentes fornecedores, para avaliar a possível presença de impurezas interferentes no método titulométrico;
- Avaliar, na execução do método titulométrico, se a determinação visual do ponto de equivalência pode substituir a determinação potenciométrica do mesmo;
- Explorar a utilização da detecção ultravioleta indireta e da detecção ultravioleta em baixo comprimento de onda na análise cromatográfica do alendronato de sódio;
- Comparação dos métodos propostos com a metodologia por CLAE-FR empregando derivatização com FMOC e detecção por UV;
- Validar os métodos alternativos no que se refere aos parâmetros de validação para metodologias analíticas adotados oficialmente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Substâncias e produtos farmacêuticos

- Alendronato de sódio triidratado – Substância de Referência (padrão secundário - Pureza: 99,6%):

ALD-SR – Fornecedor: MERCK. Lote: 0207000022.

- Alendronato de sódio triidratado – Matéria-prima:

ALD-MP1 – Fornecedor: DEG. Lote: 0805082003;

ALD-MP2 – Fornecedor: PURIFARMA. Lote: 0806122003;

ALD-MP3 – Fornecedor: DEG. Lote: 0802012004.

- Alendronato de sódio triidratado – Lotes Experimentais do produto acabado:

ALD-LE80 – Mistura de pós para cápsula para conter 56 mg de ácido alendrônico por unidade farmacêutica (80%);

ALD-LE100 – Mistura de pós para cápsula para conter 70 mg de ácido alendrônico por unidade farmacêutica (100%);

ALD-LE120 – Mistura de pós para cápsula para conter 84 mg de ácido alendrônico por unidade farmacêutica (120%).

- Alendronato de sódio – Cápsulas com 70 mg de ácido alendrônico:

ALD-CPS – Fornecedor: Farmácia Universitária / UFRJ.

3.1.2 Reagentes

- 9-fluorenilmetilcloroformato – Fmoc (SIGMA);
- Acetato de sódio triidratado (VETEC);
- Acetonitrila para CLAE (TEDIA);
- Ácido acético glacial P.A. (VETEC);
- Ácido clorídrico 37% P.A. (MERCK);
- Ácido fosfórico P.A. (TEDIA);
- Ácido γ -aminobutírico – GABA (SIGMA);
- Ácido nítrico P.A. (MERCK);
- Aerosil (VIAFARMA);
- Biftalato de potássio (MERCK);
- Borato de sódio (MERCK);
- Brometo de potássio (MERCK);
- Citrato de sódio (PROQUÍMIOS);
- Cloreto de mercúrio (PROQUÍMIOS);
- Diclorometano P.A. (VETEC);
- Etanol P.A. (VETEC);
- Fosfato dibásico de sódio anidro (VETEC);
- Fosfato monobásico de sódio monoidratado (PROQUÍMIOS);
- Hidróxido de sódio (VETEC);
- Lactose (PHARMASP);
- Metanol – MeOH (P.A: VETEC; para CLAE: TEDIA);
- Ninhidrina (SIGMA).

3.1.3 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético – CORNING Stirrer/Hotplate;
- Balança analítica METTLER TOLEDO – AG204;
- Balança de precisão METTLER TOLEDO – PB3002;
- Banho de ultra-som UNIQUE – USC 2850;
- Calorímetro de DSC METTLER TOLEDO – DSC822_e;
- Centrífuga IEC (International Equipment Company) – CENTRA MP4R;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU – bomba modelo LC-10AD vp, auto-injetor modelo SIL-10AD vp, detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M10A vp e sistema de dados (*software*) modelo CLASS-VP versão 6.1;
- Cuba cromatográfica de vidro, dimensões internas 20 x 20 x 8 cm;
- Destilador QUIMIS;
- Dissolutor HANSON – SR116;
- Eletrodo DIGIMED – DME CV1;
- Espectrofotômetro SHIMADZU – UV PC 2401;
- Espectrofotômetro de infravermelho SHIMADZU – FTIR 8300;
- Espectrômetro de RMN VARIAN – GEMINI 200 RT;
- Estufa QUIMIS – Q 3178 SE;
- pHmetro/condutivímetro METTLER-TOLEDO – MPC227;
- Placa cromatográfica de sílica-gel 60 F₂₅₄ (MERCK);
- Ponto de fusão BÜCHI B-540;
- Termobalança METTLER TOLEDO – TGA/SDTA851_e;
- Titulador automático METTLER – DL25.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Caracterização das amostras de matéria-prima

3.2.1.1 Faixa de fusão

As amostras foram introduzidas em capilares de vidro e levadas ao equipamento BÜCHI B-540 para determinação da faixa de fusão pelo método do capilar (FARMACOPÉIA Brasileira, 1988).

3.2.1.2 Perda por dessecação

Aproximadamente 1 g de cada amostra foi levado à estufa, regulada em 140°C, até peso constante (por aproximadamente 2 horas) (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002);

3.2.1.3 Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para a análise termogravimétrica (TGA), as amostras de matéria-prima alendronato de sódio foram levadas à termobalança METTLER TOLEDO – TGA/SDTA851_e e submetidas à varredura de 25 a 1000°C, com velocidade de aquecimento de 10°C/min. Para a análise por DSC foi empregada varredura entre 25 a 300°C e velocidade de aquecimento de 1°C/min, utilizando calorímetro METTLER TOLEDO – DSC822_e.

3.2.1.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram preparadas soluções aquosas das amostras de alendronato matéria-prima, na concentração de 10 mg/mL, e soluções aquosas de ácido γ -aminobutírico (GABA), nas concentrações de 10, 20, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (correspondendo a, respectivamente, 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1% de GABA na amostra). Foram aplicados 10 μL das soluções em placa cromatográfica de sílica-gel 60 F₂₅₄, utilizando a fase móvel MeOH : Água : HAc (80:18:2) para eluição por percurso de 10 cm. Após observar-se a extinção à luz UV (254 nm), a placa foi aspergida com solução alcoólica de ninhidrina 0,1% p/v e levada à estufa a 100°C por 5 minutos (PROSINT, 1997).

3.2.1.5 Determinação de fosfito

Preparo das soluções reagentes:

- Solução de acetato de sódio/ácido acético: 13,6 g de acetato de sódio triidratado foram dissolvidos em 50 mL de água destilada. Adicionaram-se 20 mL de ácido acético glacial e completou-se o volume para 100 mL com água destilada.
- Solução de cloreto de mercúrio 3%: 3 g de cloreto de mercúrio II foram dissolvidos em 100 mL de água destilada.

- Solução de ácido clorídrico 1%: 2,5 mL de ácido clorídrico 37% foram diluídos em aproximadamente 50 mL de água destilada, completando-se o volume para 100 mL com o mesmo solvente.

Procedimento:

Aproximadamente 500 mg de cada amostra de matéria-prima foram diluídos em 20 mL de água destilada. Em seguida foram adicionados, de forma lenta e sob agitação constante, 10 mL de solução de acetato de sódio/ácido acético e 15 mL de solução de cloreto de mercúrio 3%. As amostras foram levadas à estufa regulada entre 30 e 45°C, durante 2 horas. O precipitado formado foi então filtrado através de membrana de vidro sinterizado (número 4), com auxílio de vácuo, procedendo-se à lavagem do resíduo com ácido clorídrico 1% (3 lavagens) e água destilada (5 lavagens). O precipitado foi levado à estufa, regulada a $100 \pm 5^\circ\text{C}$, durante 2 horas, para posterior pesagem do material (PROSINT, 1997).

3.2.1.6 Espectrometria no infravermelho

Foram preparadas pastilhas de KBr contendo 3% p/p de alendronato de sódio triidratado, as quais foram levadas ao espectrofotômetro de infravermelho SHIMADZU – FTIR 8300, realizando-se varredura do espectro entre 400 e 4000 cm^{-1} (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002).

3.2.1.7 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

O equipamento foi calibrado utilizando-se referência externa. Em seguida as amostras de ALD-SR, ALD-MP1 e ALD-MP3 foram dissolvidas em água deuterada e levadas ao espectrômetro de RMN VARIAN – GEMINI 200 RT, realizando-se análise para medida de hidrogênio, com aplicação de frequência de 200 MHz.

3.2.2 Método Titulométrico

3.2.2.1 Preparo da solução titulante

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M foi obtida a partir de solução 10 M, utilizando-se água recém destilada para diluição. A solução titulante foi fatorada imediatamente antes de cada análise, utilizando-se como padrão primário o biftalato de potássio (previamente dessecado).

3.2.2.2 Análise titulométrica das matérias-primas

Pesou-se exatamente cerca de 200 mg da amostra, a qual foi dissolvida em aproximadamente 60 mL de água recém destilada e levada ao ultra-som por 2 minutos, com agitação manual. A solução foi levada ao titulador automático e titulada com NaOH 0,1 M, determinando-se o ponto de equivalência potenciométricamente. Para as análises com determinação visual do ponto de equivalência, foram adicionadas aproximadamente 3 gotas de fenolftaleína à solução com o fármaco, a qual foi titulada com NaOH 0,1 M até aparecimento de tênue coloração rósea. Com o volume obtido nas titulações, calculou-se o teor percentual de alendronato de sódio

triidratado contido na amostra, considerando que 1 mL de NaOH 0,1 M equivale a 32,512 mg de alendronato de sódio triidratado.

3.2.2.3 Análise titulométrica de produto acabado – Validação do método

Preparo dos lotes experimentais (LE):

Foram preparados 3 lotes experimentais (LE) da mistura de pós para cápsulas de alendronato de sódio, empregando-se a técnica da progressão geométrica dos pós em gral com pistilo e fórmula para preparo de cápsulas fornecida pela Farmácia Universitária da UFRJ (Tabela 2). O cálculo das quantidades de fármaco e excipientes utilizados na fórmula levou em consideração os seguintes fatores:

- Dose por cápsula: 70 mg de ácido alendrônico (para o lote ALD-LE100);
- Quantidade de alendronato de sódio triidratado por cápsula: 91 mg (para o lote ALD-LE100);
- Tamanho do lote: 363 cápsulas;
- Uso de cápsulas de gelatina dura com volume unitário de 0,3 mL;
- Densidade aparente do lote de alendronato de sódio triidratado utilizado na formulação (contendo 0,5% de aerosil): 0,833 g/mL;
- Densidade aparente do lote de lactose utilizado na formulação: 0,526 g/mL.

Tabela 2 – Composição dos lotes experimentais.

Lote experimental	Massa de matéria-prima (g)			Massa total (g)
	Alendronato de sódio triidratado	Lactose	Aerosil	
PLACEBO	0	36,4540	0,1661	36,6201
ALD-LE80	26,4951	36,5017	0,1733	63,1701
ALD-LE100	33,0355	36,5009	0,1651	69,7015
ALD-LE120	39,6364	36,4999	0,1670	76,3033

Onde: ALD-LE80, ALD-LE100 e ALD-LE120 correspondem aos lotes contendo, respectivamente, 80%, 100% e 120% da substância ativa (alendronato).

Procedimento para análise dos LEs:

Para a análise titulométrica, pesou-se exatamente cerca de 430 mg da mistura de pós de cada lote (contendo o equivalente a 200 mg de alendronato de sódio triidratado, baseado no esperado para o lote ALD-LE100), diluiu-se em aproximadamente 60 mL de água recém destilada e levou-se ao ultra-som por 2 minutos, com agitação manual. Procedeu-se à titulação potenciométrica das amostras com NaOH 0,1 M em titulador automático METTLER – DL25.

Para avaliação da precisão, exatidão, intervalo e especificidade, de acordo com as normas aplicadas (ANVISA, 2003), seis amostras de cada lote foram analisadas em dois dias consecutivos.

Procedimento para análise das cápsulas prontas:

Vinte unidades das cápsulas ALD-CPS foram pesadas individualmente, determinando-se o peso do conteúdo por diferença e em seguida calculando-se o peso médio para a amostragem.

O conteúdo de vinte unidades das cápsulas ALD-CPS foi homogeneizado em gral com pistilo. Foram pesadas 6 alíquotas de pó contendo o equivalente a 200 mg de alendronato de sódio, as quais foram diluídas em aproximadamente 60 mL de água recém destilada e levadas ao ultra-som por 2 minutos, com agitação manual. As amostras foram tituladas com NaOH 0,1 M, determinando-se o ponto de equivalência potenciométricamente. O teor da preparação foi determinado em relação à quantidade declarada de ácido alendrônico por cápsula.

3.2.2.4 Análise titulométrica aplicada ao teste de dissolução das cápsulas

Condições do teste – perfil de dissolução:

A dissolução das cápsulas de alendronato de sódio foi avaliada em aparelho de dissolução HANSON – SR116 de cubas com agitador tipo cesta (USP Apparatus 1) na velocidade de 75 rpm. Água destilada, previamente desaerada e aquecida a uma temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C, foi empregada como meio de dissolução, tendo sido utilizado um volume de 500 mL por cuba. Cinco unidades das cápsulas ALD-CPS e uma cápsula vazia (invólucro) foram introduzidas em seus respectivos cestos. Foram coletadas alíquotas de 15 mL de cada cuba nos tempos de 5, 15 e 30 minutos, não sendo realizada a reposição do meio de dissolução. De cada alíquota coletada na dissolução, foram transferidos exatamente 10,0 mL ao titulador automático para análise segundo metodologia descrita a seguir.

Titulação das amostras do teste de dissolução:

A determinação quantitativa da massa de ácido alendrônico dissolvida em cada tempo, por titulometria ácido-base, mereceu o ajuste descrito por Moreno e colaboradores, onde amostras diluídas de alendronato de sódio (na concentração aproximada de 1 mM) são tituladas por solução de hidróxido de sódio 0,001 M na presença de nitrato de sódio (NaNO_3). O sal adicionado tanto à solução de alendronato quanto ao titulante (NaOH), objetiva ajustar a força iônica para 0,3 M, necessária para a medida da diferença de potencial na presença de pequenas variações da força eletromotriz (MORENO, PEZZA & PEZZA, 2004).

Assim, aos 10,0 mL de meio obtidos na dissolução foram acrescentados 50 mL de NaNO_3 0,36 M, de modo a ajustar a força iônica dos 60 mL de solução titulada para 0,3 M. Em seguida procedeu-se à titulação com solução de NaOH 0,001 M (diluído em NaNO_3 0,3 M e fatorado normalmente), determinando-se potenciométricamente o ponto de equivalência.

3.2.3 CLAE em Fase Reversa com derivatização por FMOC e detecção por ultravioleta

3.2.3.1 Preparo e análise das amostras

O preparo das amostras de alendronato, os reagentes utilizados e os procedimentos analíticos foram baseados nos artigos de De Marco (DE MARCO *et al.*, 1989) e Medjedovic (MEDJEDOVIC, 2002). Recentemente, método semelhante foi publicado na Farmacopéia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2005).

Solução tampão de citrato (0,05 M) / fosfato (0,05 M) – pH 8,0: 14,7 g de citrato de sódio diidratado e 7,05 g de fosfato dibásico de sódio anidro foram dissolvidos em 900 mL de água destilada, ajustando-se o pH da solução em 8,0 com ácido fosfórico e em seguida completando-se o volume para 1000 mL com água destilada. A solução foi em seguida filtrada através de membrana com 0,45 μm de diâmetro de poro.

Solução de borato de sódio (0,1 M): 4,02 g de borato de sódio decaidratado foram dissolvidos em 200 mL de água destilada.

Solução de citrato de sódio (0,1 M): 58,8 g de citrato de sódio diidratado foram dissolvidos em 2000 mL de água destilada.

Solução de FMOC (0,5%): 50 mg de 9-fluorenilmetilcloroformato, foram dissolvidos em 100 mL de acetonitrila P.A. Tal solução pode ser armazenada por até 5 dias a 5°C (DE MARCO *et al.*, 1989).

Preparo das soluções de alendronato na concentração de trabalho (100 $\mu\text{g/mL}$): foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL, exatamente cerca de 100 mg de alendronato de sódio, diluiu-se em 60 mL de solução de citrato de sódio (0,1 M) e levou-se ao ultra-som por 2 minutos, sob agitação. Em seguida completou-se o volume com a solução de citrato. Desta solução, foi transferida alíquota de 5,0 mL para balão de 50 mL e completou-se o volume com solução de citrato (0,1 M).

Procedimento de análise (derivatização e extração):

Alíquotas das soluções foram transferidas para tubo de centrífuga com capacidade para 50 mL, em quantidade indicada na tabela 3.

Tabela 3 – Quantidade de soluções e reagentes adicionados ao tubo de centrífuga.

Reagentes / Soluções	Branco	Amostras de Alendronato (Padrão e Matérias-primas)
Solução de alendronato	0	5 mL
Solução de citrato (0,1 M)	5 mL	0
Solução de borato (0,1 M)	5 mL	5 mL
Solução de FMOC (0,5%)	5 mL	5 mL

Após adicionar as soluções e reagentes aos tubos, agitou-se por 30 segundos e em seguida deixou-se em repouso por 30 minutos. Decorrido o tempo de reação, foi adicionado a cada tubo 25 mL de diclorometano P.A., agitou-se vigorosamente e deixou-se em repouso por 5 minutos. Os tubos foram levados à centrífuga a 1000 rpm por 5 minutos e em seguida, alíquotas da camada superior aquosa foram retiradas e filtradas através de membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro, para serem injetadas no cromatógrafo.

O teor das matérias-primas ALD-MP1, ALD-MP2 e ALD-MP3 foi calculado pelo método do padrão externo, utilizando-se um ponto da curva de calibração do padrão ALD-SR, na concentração de trabalho de 100 µg/mL.

3.2.3.2 Condições do sistema cromatográfico

- Fase móvel: tampão citrato (0,05 M) / fosfato (0,05 M) – pH 8,0 : acetonitrila : metanol (75 : 20 : 5, v/v);
- Coluna: μ Bondapak C₁₈ 10 μ m – 3,9 x 300 mm (WATERS – n^o de série: W12052F);
- Vazão: 1,2 mL/min;
- Volume de injeção: 20 μ L;
- Comprimento de onda para detecção: 266 nm.

3.2.3.3 Verificação da precisão e linearidade

Preparo do padrão ALD-SR: preparou-se *Solução-estoque* contendo 625 μ g/mL de alendronato, diluindo-se cerca de 62,5 mg de ALD-SR em 100 mL de solução de citrato 0,1 M. A partir da solução-estoque, foram obtidas 5 diluições com concentrações de 50, 75, 100, 125 e 150 μ g/mL (em solução de citrato 0,1 M).

Procedimento de análise (derivatização e extração): adotou-se procedimento e condições anteriormente descritos no item 3.2.3.1.

Com o objetivo de se avaliar a linearidade e a precisão do método, triplicatas da solução-estoque e respectivas diluições (entre 50 e 150 μ g/mL) de ALD-SR foram preparadas e analisadas em dois dias consecutivos (n = 6, para cada ponto da curva de calibração). A precisão foi avaliada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR)

intra-dias e inter-dias em cada concentração da curva. Para determinar a precisão de injeção, foram realizadas 10 injeções da amostra de ALD-SR na concentração de trabalho (100 µg/mL). A linearidade foi avaliada calculando-se os valores do intercepto (a), da inclinação (b) e do coeficiente de correlação (r), obtidos do total das réplicas analisadas, submetendo-os em seguida a testes estatísticos, para avaliação da regressão linear ($y = a + bx$).

3.2.4 CLAE em Fase Reversa com detecção por ultravioleta em baixo comprimento de onda

3.2.4.1 Preparo e análise das amostras

Para o preparo da *Solução-estoque*, contendo 6,25 mg/mL de alendronato, cerca de 312,5 mg da amostra foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, acrescentou-se água destilada e, após levar ao ultra-som, completou-se o volume com o mesmo solvente. A partir da solução-estoque, foram obtidas diluições com concentrações entre 0,5 e 1,5 mg/mL (em água destilada). Todas as soluções foram filtradas através de membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro, previamente à injeção.

Para a fase móvel, ajustou-se o pH de 1000 mL de água destilada para 2,03 com ácido fosfórico, filtrando-se a solução obtida através de membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro.

3.2.4.2 Condições do sistema cromatográfico

- Fase Móvel: Água destilada pH 2,03 (acidificada com ácido fosfórico);
- Coluna: μ Bondapak C₁₈ 10 μ m – 3,9 x 300 mm (WATERS – no de série: W12052F);
- Vazão: 1,0 mL/min;
- Comprimento de onda para detecção: 210 nm;
- Volume de injeção: 20 μ L.

3.2.4.3 Validação do método para análise das matérias-primas

Com o objetivo de se avaliar a linearidade e a precisão do método, de acordo com as normas aplicadas (ANVISA, 2003), triplicatas da solução-estoque de ALD-SR e respectivas diluições (nas concentrações de 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 mg/mL) foram preparadas e analisadas em dois dias consecutivos ($n = 6$, para cada ponto da curva de calibração). A precisão do método foi avaliada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) intra-dias e inter-dias em cada concentração da curva. Já a precisão de injeção foi avaliada através do DPR observado para as áreas obtidas de 10 injeções da amostra de ALD-SR na concentração de trabalho (1,0 mg/mL)

Para a avaliação da linearidade do método, determinou-se a equação da reta calculando-se o intercepto (a), a inclinação (b) e o coeficiente de correlação (r), obtidos do total das réplicas analisadas, expressando-os em termos de média \pm erro

padrão (EP). Para avaliação da regressão linear, os valores obtidos de inclinação, intercepto e coeficiente de correlação, foram submetidos a testes estatísticos (t de student).

Além disto, amostras de GABA foram preparadas e submetidas à análise cromatográfica, para avaliar a separação entre este composto e o alendronato, considerando as condições cromatográficas aplicadas.

3.2.5 CLAE de Troca Iônica com detecção indireta por ultravioleta

O preparo das amostras de alendronato, os reagentes utilizados e os procedimentos analíticos, foram baseados no artigo descrito por Tsai e colaboradores (TSAI *et al.*, 1994).

3.2.5.1 Preparo e análise das amostras

Para o preparo da *Solução-estoque*, contendo 1000 $\mu\text{g/mL}$ (1 mg/mL) de alendronato, cerca de 100 mg da amostra foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL, acrescentou-se água destilada e, após levar ao ultra-som, completou-se o volume com o mesmo solvente. A partir da solução-estoque, foram obtidas diluições com concentrações entre 20 e 500 $\mu\text{g/mL}$ (em água destilada). Preparou-se solução de GABA na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, diluindo-se, em balão volumétrico, cerca de 25 mg de GABA em 50 mL de água. Todas as soluções foram filtradas através de membrana com 0,45 μm de diâmetro de poro, previamente à injeção.

Para a fase móvel, soluções diluídas de ácido nítrico (entre 1,5 e 7,5 mM) em água, foram preparadas a partir de solução estoque a 0,15 M e em seguida filtradas através de membrana com 0,45 μm de diâmetro de poro.

3.2.5.2 Condições do sistema cromatográfico

- Fase Móvel: Ácido Nítrico nas concentrações de 7,5; 6,0; 4,5; 3,0 e 1,5 mM;
- Coluna: $\mu\text{Bondapak NH}_2$ 10 μm – 3,9 x 300 mm (WATERS – n° de série: W92241A03);
- Vazão: 1,5 mL/min;
- Comprimento de onda para detecção indireta: 235 nm;
- Volume de injeção: 20 μL .

3.2.5.3 Coleta de alíquotas da CLAE e análise por CCD

Para confirmar a identidade dos picos obtidos no cromatograma traçado indiretamente, foram realizadas repetidas injeções de 40 μL da solução de ALD-MP1 (na concentração de 1 mg/mL) e de GABA (na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$). Recolheu-se alíquotas da fase móvel eluída, em torno dos tempos de retenção de cada pico. As alíquotas foram evaporadas em estufa por 12 horas a 60°C e o resíduo redissolvido em 1 mL de água destilada para posterior análise por CCD (de acordo com método descrito no item 3.2.1.4). A concentração esperada de ALD-MP1 na solução final era de 8 mg/mL e para o GABA era de 60 $\mu\text{g/mL}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MATÉRIA-PRIMA

4.1.1 Faixa de fusão

Todas as amostras de alendronato de sódio triidratado fundiram-se em faixas de temperatura em torno de 263°C (Tabela 4), estando próximas à faixa de 257,0 – 262,5°C, relatada na literatura (KIECZYKOWSKI *et al.*, 1995). Foi observado um fenômeno de “expansão” do pó dentro do capilar próximo à temperatura de 160°C, o qual pode ser atribuído à liberação da água de hidratação presente no fármaco. Tal fato dificultou a determinação precisa da faixa de fusão, pois o material permaneceu disperso ao longo do capilar.

4.1.2 Perda por dessecação

Como pode ser observado na tabela 4, todas as amostras apresentaram percentual de água entre 15 e 17%, mas apenas a amostra de ALD-SR apresentou percentual dentro do especificado pela Farmacopéia Portuguesa, ou seja, entre 16,1 e 17,1% (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002).

4.1.3 Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura

O resultado da análise termogravimétrica confirmou os valores encontrados na perda por dessecação das matérias-primas (Tabela 4). No entanto, os resultados encontrados na DSC não puderam esclarecer o exato ponto de fusão das matérias-

primas (o qual se mostra em torno de 250°C), já que o evento exotérmico gerado pela decomposição das amostras não permitiu a definição clara da endotérmica resultante da fusão.

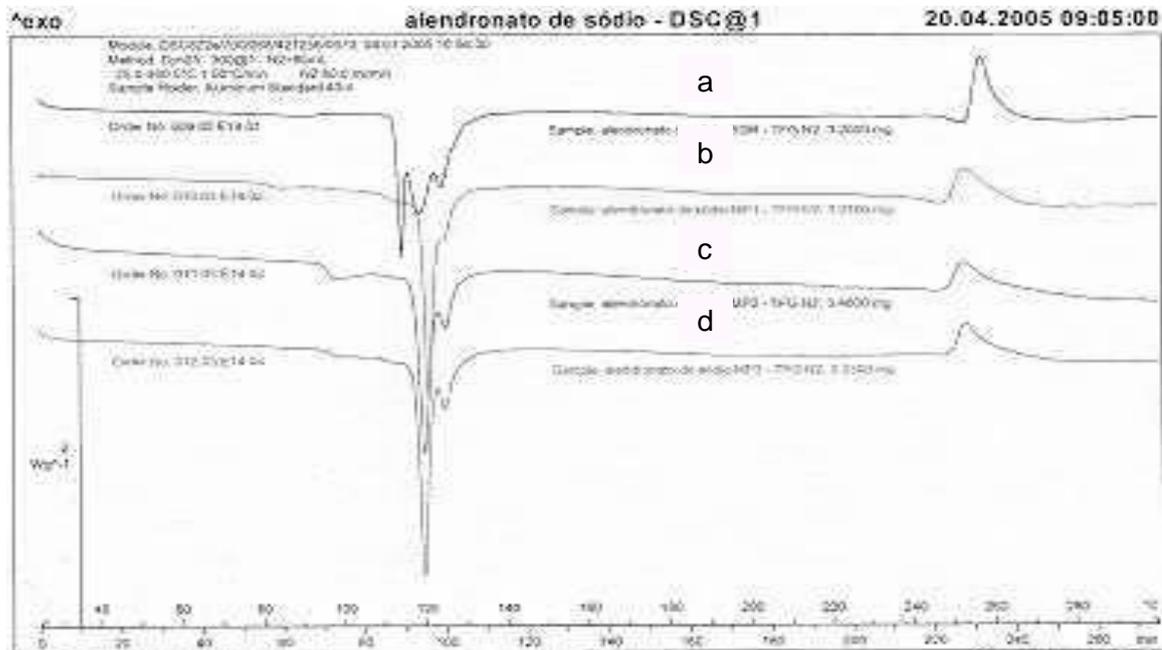


Figura 5 – Curva de DSC das matérias-primas ALD-SR (a), ALD-MP1 (b), ALD-MP2 (c) e ALD-MP3 (d).

Na análise da amostra de ALD-SR pode ser observada a ocorrência de três eventos endotérmicos próximos à temperatura de 120°C (Figura 5), diferindo do perfil encontrado para as matérias-primas ALD-MP1, ALD-MP2 e ALD-MP3. Tal ocorrência foi resultante apenas da liberação da água de hidratação da molécula, não se devendo à presença de impurezas, como sugerido pela observação do perfil encontrado para a 1ª derivada da análise termogravimétrica (Figura 6), o qual se mostrou semelhante ao perfil encontrado na DSC. A razão deste perfil diferenciado para a amostra ALD-SR não foi esclarecida, sendo necessária pesquisa mais detalhada.

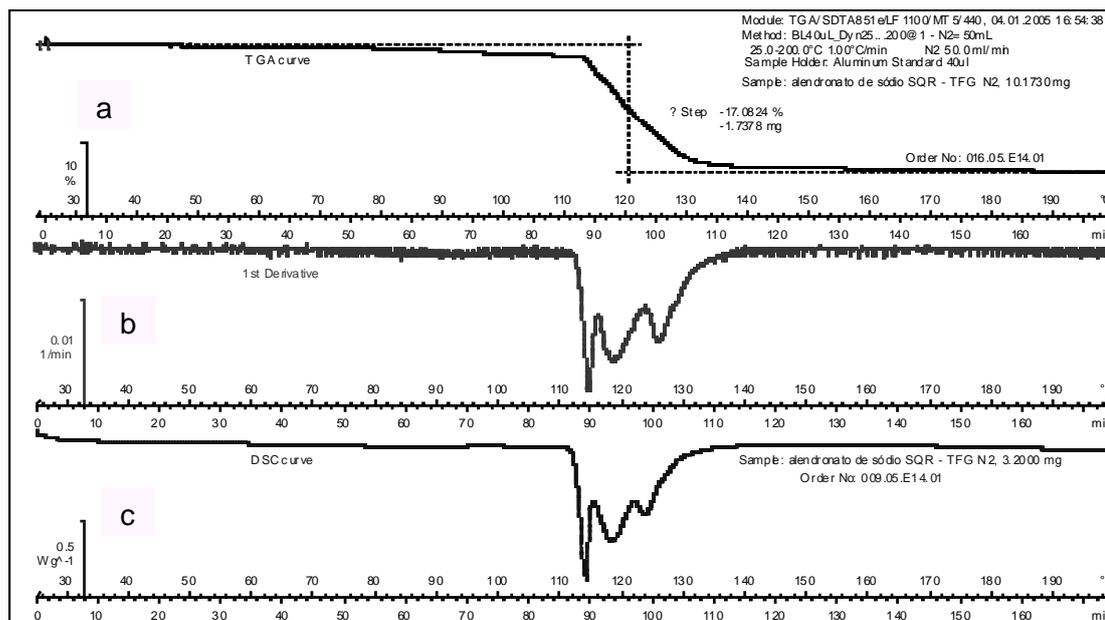


Figura 6 – Curva de TGA da matéria-prima ALD-SR (a), 1ª derivada correspondente (b) e DSC da amostra (c).

Os resultados de algumas das análises qualitativas realizadas nas amostras de matéria-prima encontram-se reunidos na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados dos testes para caracterização das amostras de alendronato.

Matéria – Prima	Teste / Ensaio				
	Faixa de fusão (T°C)	Perda por dessecação (%)	TGA (%)	CCD (% GABA)	% de fosfito monossódico
ALD-SR	262,8 – 264,0	16,55	16,57	< 0,1	0
ALD-MP1	262,5 – 264,0	15,47	15,58	0,1 a 0,2	0,52
ALD-MP2	262,0 – 264,5	15,68	15,86	< 0,1	0,22
ALD-MP3	262,5 – 264,0	15,91	15,81	< 0,1	0,05

4.1.4 Cromatografia em camada delgada

Como pode ser visualizado através da figura 7, a matéria-prima ALD-MP1 apresentou mancha característica de ácido γ -aminobutírico (GABA – $R_f = 0,5$), embora em concentração abaixo do limite especificado de 0,5% (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002). No entanto, não se observou presença de GABA na substância de referência (ALD-SR) e nas matérias-primas ALD-MP2 e ALD-MP3.

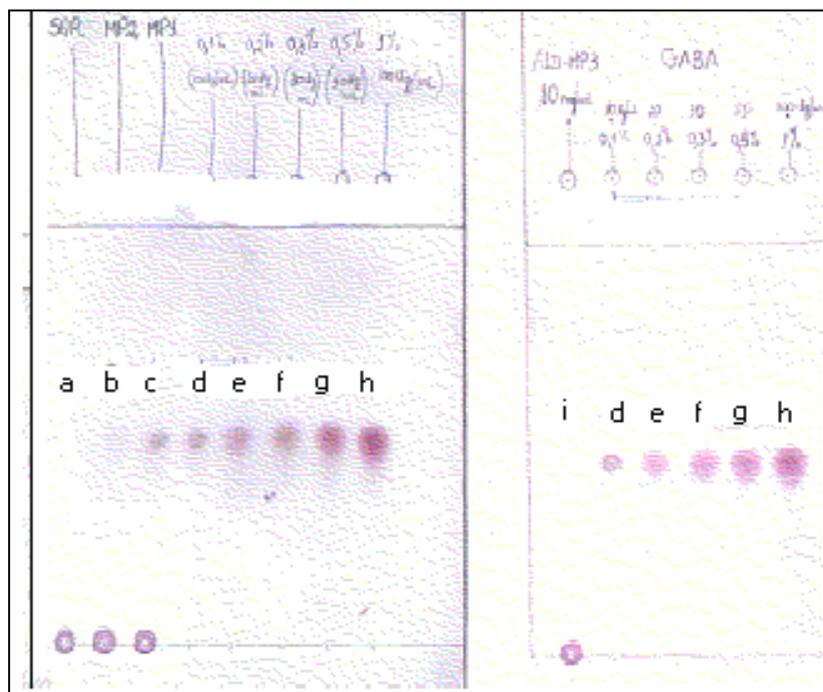


Figura 7 – CCD das amostras de alendronato de sódio triidratado. Onde a = ALD-SR; b = ALD-MP2; c = ALD-MP1; letras d a h = GABA 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1% (respectivamente); i = ALD-MP3.

Através da figura 7 é possível observar que, assim como o GABA, o alendronato também é revelado pela ninhidrina, produzindo mancha de cor lilás. A mesma se encontra retida na origem da placa cromatográfica, devido à elevada afinidade do alendronato (que está na forma ionizada) pela sílica. A reação do alendronato com a ninhidrina é possibilitada pela presença da amina primária na estrutura do fármaco, como acontece com os aminoácidos (SHRINER et al., 1980).

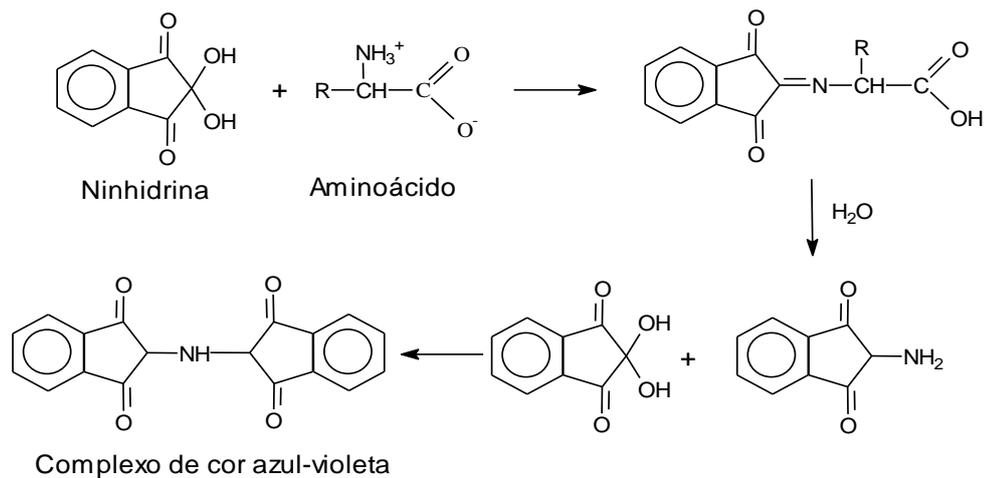


Figura 8 – Reação entre a ninhidrina e os aminoácidos (SHRINER et al., 1980).

4.1.5 Determinação de fosfito

O fundamento do ensaio para fosfitos consiste na oxidação deste grupo em presença de cloreto de mercúrio II, resultando na produção de calomelano (Hg_2Cl_2), o qual é insolúvel em meio ácido e forma precipitado branco (VOGEL, 1981). Tal precipitado, quando presente, foi filtrado e pesado (análise gravimétrica), para estimar o percentual de fosfito monossódico presente na amostra (PROSINT, 1997). Os resultados obtidos encontram-se relacionados na tabela 4, podendo-se observar que, com exceção da amostra de ALD-SR, todas as matérias-primas apresentaram reação positiva para fosfitos.

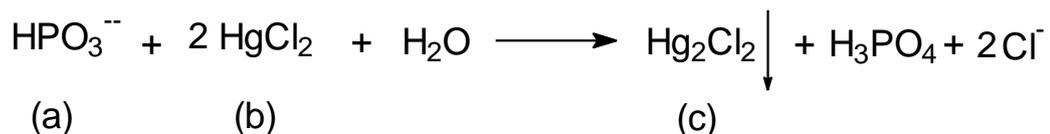


Figura 9 – Reação do fosfito (a) com o cloreto de mercúrio II (b), formando precipitado de Hg_2Cl_2 (c) (VOGEL, 1981).

A determinação do percentual de fosfitos foi realizada considerando-se a presença de fosfito monossódico (NaH_2PO_3) na amostra. Sendo assim, os cálculos basearam-se na seguinte fórmula:

$$\% \text{ Fosfito monossódico} = (\text{massa do precipitado} / \text{massa da amostra}) \times 0,22 \times 100$$

(onde 0,22 = massa molecular do fosfito monossódico / massa molecular Hg_2Cl_2).

4.1.6 Espectrometria no infravermelho

Como pode ser observado no apêndice I, todas as amostras apresentaram espectros semelhantes ao da substância química de referência, cujo espectro de absorção pode ser visualizado na figura 10, não tendo sido evidenciadas distorções apreciáveis no traçado dos espectros das matérias-primas.

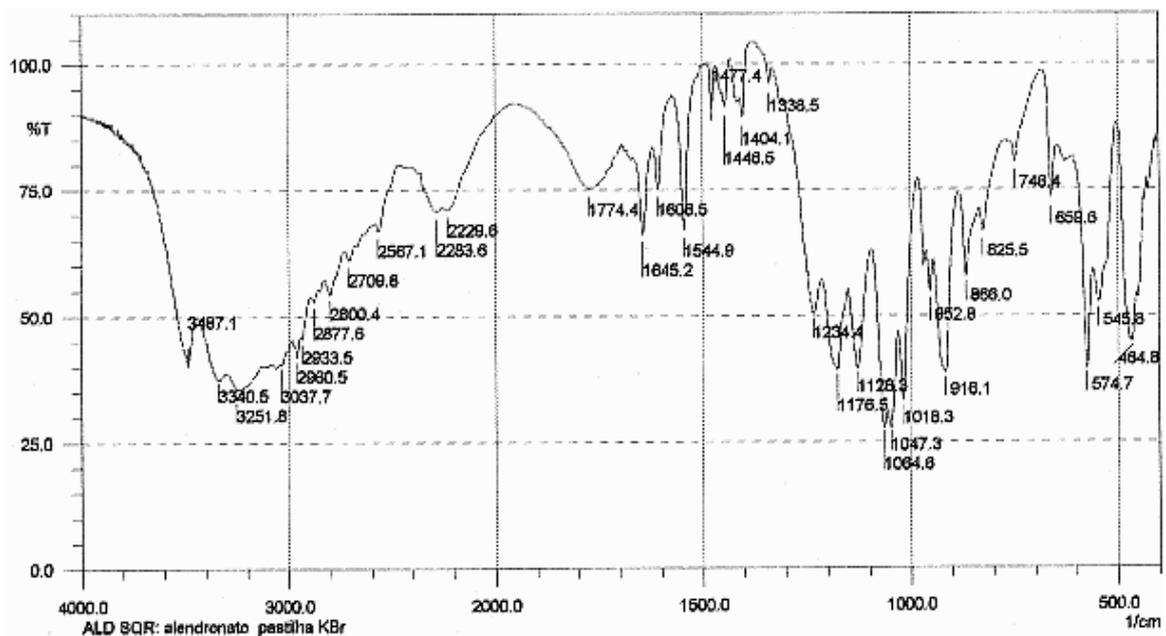


Figura 10 – Espectro de infravermelho da amostra ALD-SR.

4.1.7 Espectrometria de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de hidrogênio da amostra de ALD-SR (Figura 12) mostram a presença de um triplete de deslocamento próximo a 2 ppm, atribuído provavelmente à sobreposição de dois tripletes relacionados aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 e 3 (Figura 11), devido à distância semelhante em relação aos grupamentos com maior densidade eletrônica (fosfatos e amina). Isto explicaria a intensidade dobrada em relação ao triplete de deslocamento próximo a 3 ppm, o qual seria atribuído aos hidrogênios ligados ao carbono 4 (os quais sofreram maior efeito de blindagem por estarem mais próximos à amina).

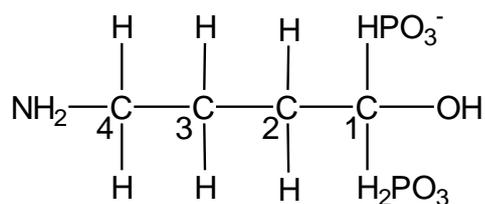


Figura 11 – Fórmula estrutural do alendronato de sódio, evidenciando os hidrogênios analisados na espectrometria de RMN.

Após cerca de 6 meses da aquisição da matéria-prima ALD-MP1, observou-se o aparecimento de manchas avermelhadas puntiformes distribuídas por todo material. Como pode ser visto na figura 12, o espectro de RMN desta amostra revelou um pequeno pico de deslocamento próximo a 2,9 ppm, evidenciando a presença de uma impureza não caracterizada. No entanto, a intensidade dos tripletes em 2 e 3 ppm apresentou a mesma proporção observada para a amostra de ALD-SR.

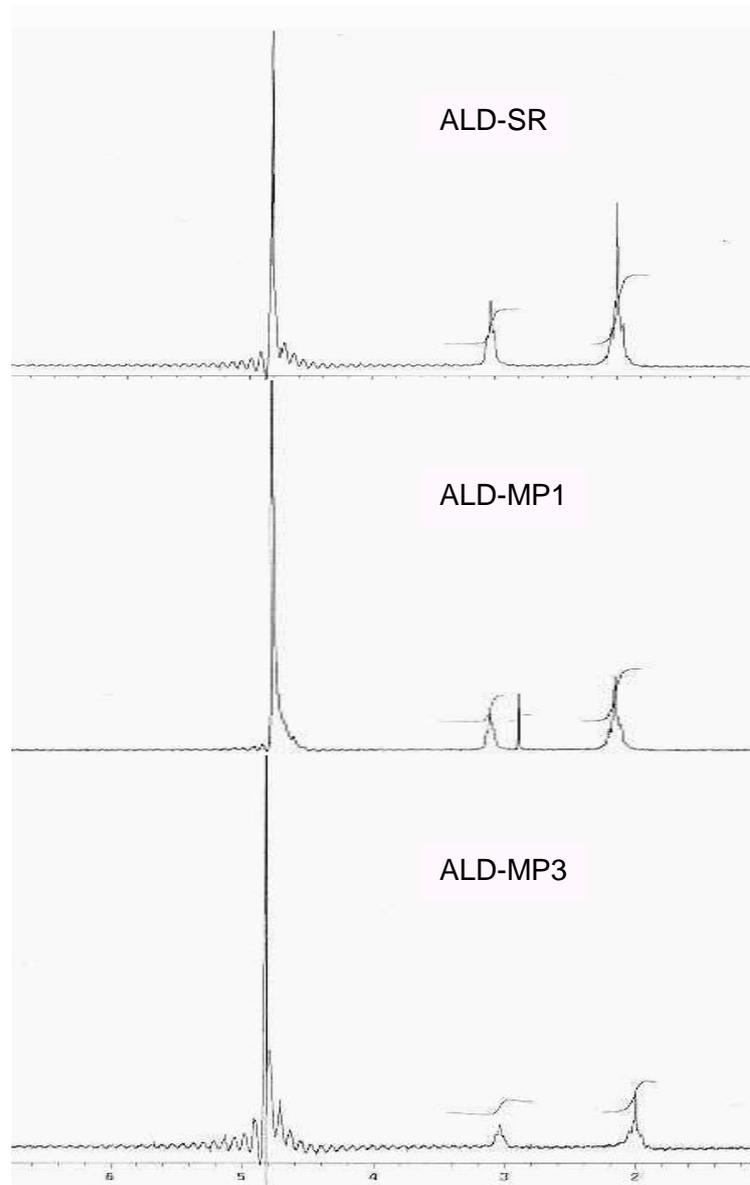


Figura 12 – Espectros de RMN das amostras de ALD-SR, ALD-MP1 e ALD-MP3.

4.2 MÉTODO TITULOMÉTRICO

4.2.1 Análise titulométrica das matérias-primas

Analisando a estrutura do alendronato de sódio (Figuras 1 e 11), pode-se observar a presença de 3 hidrogênios ácidos, ligados aos grupos fosfóricos, dos quais apenas um é neutralizado pelo hidróxido de sódio (0,1 mol/L). Tal fato é esperado, considerando-se o reduzido valor da constante de ionização ácida dos dois últimos hidrogênios da molécula, com pKas acima de 10 (MERCK Index, 2001).

Sendo assim, como também relatado no trabalho de Moreno e colaboradores (MORENO, PEZZA & PEZZA, 2004), a titulação do alendronato pelo hidróxido de sódio apresenta curva com apenas uma inflexão, cujo salto de pH mostra-se adequado para determinação do ponto de equivalência. A fenolftaleína pode ser utilizada como indicador, como mostra o estudo de Bueno (BUENO & BERGOLD, 2000), pois apresenta zona de transição (pH 8 – 10) inserida no intervalo definido pela inflexão da curva.

A realização de um “ensaio em branco”, isto é, a titulação do solvente sem a amostra, é uma prática que pode ser utilizada para eliminar a interferência de contaminantes eventualmente presentes no diluente e que tem sido adotada por alguns laboratórios na titulação ácido-base do alendronato de sódio. De fato, o uso da água como solvente nas titulações alcalimétricas merece cuidado especial, pois se sabe que a água destilada pode, durante o tempo em que permanece no barrilete ou mesmo no momento da condensação, absorver o gás carbônico presente no ar,

adquirindo certa acidez. No entanto, é preciso cautela com relação à realização do ensaio em branco nestes casos, pois tal prática pode mascarar erros inerentes ao método e se mostra desnecessária se o titulante é fatorado no mesmo momento e em condições idênticas à amostra, devendo-se preferencialmente realizar a fervura da água por 5 minutos (CONNORS, 1982) previamente à titulação.

Para eliminar a possível interferência do ácido carbônico na titulação, optou-se, neste trabalho, pela utilização de água recém-distilada na dissolução das amostras e efetuou-se a fatoração do titulante imediatamente antes de cada análise, não sendo realizado branco do solvente. A figura 13 mostra a curva da variação de pH em função do volume de NaOH adicionado às amostras do alendronato de sódio.

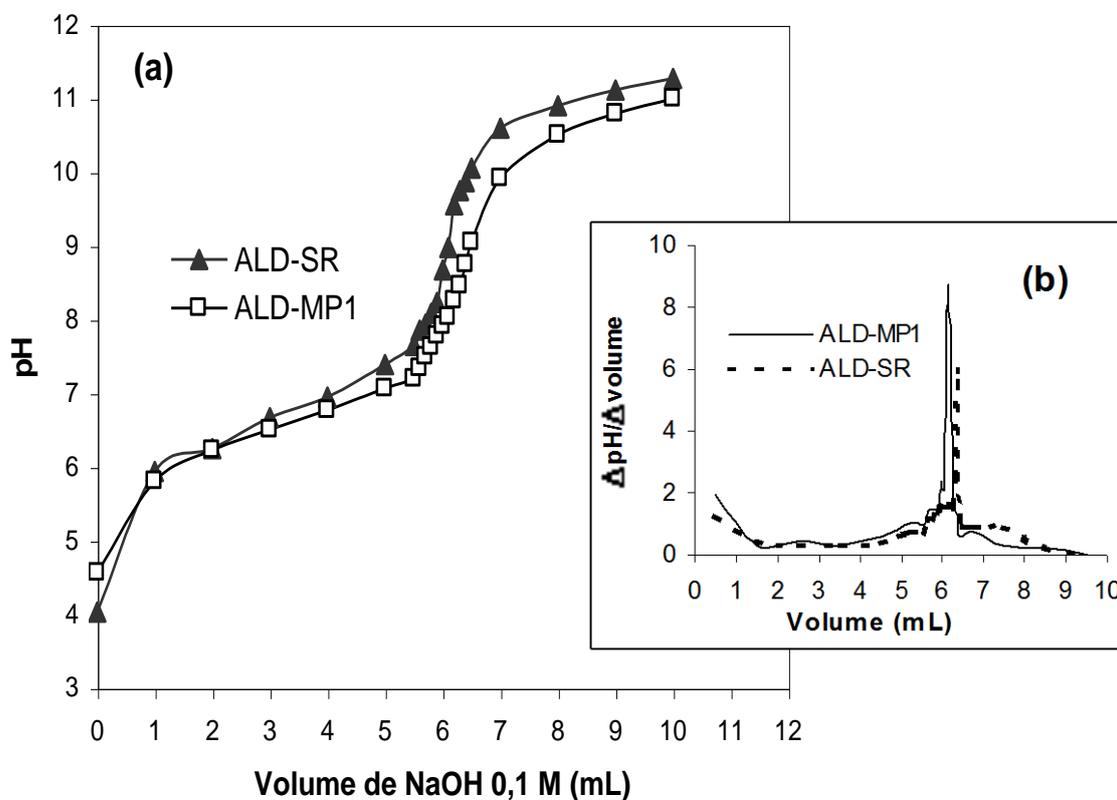


Figura 13 – Curvas de titulação das matérias-primas ALD-SR e ALD-MP1.
(a)-Medidas de pH em função do volume de NaOH adicionado;
(b)-Primeira derivada das curvas do gráfico “a”.

Os resultados obtidos através da titulação com indicador visual e os obtidos na titulação potenciométrica das matérias primas ALD-MP1, ALD-MP2 e ALD-MP3, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si (teste t), reafirmando a possibilidade do uso da fenolftaleína como indicador adequado para esta análise. Já para a amostra ALD-SR os métodos mostraram ser diferentes estatisticamente, embora as médias obtidas estejam próximas e o valor de P calculado seja próximo de 0,01, como pode ser observado nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Resultados dos ensaios de teor obtidos na titulação das matérias-primas.

Amostra	Titulação potenciométrica (n = 6)		Titulação visual (n = 6)	
	TEOR (%)	DPR (%)	TEOR (%)	DPR (%)
ALD-SR	100,41	0,33	99,70	0,40
ALD-MP1	97,78	0,92	97,40	0,49
ALD-MP2	102,91	0,62	102,19	0,74
ALD-MP3	109,13	0,21	109,24	0,52

Tabela 6 – Comparação estatística (Teste t não-pareado) entre os resultados obtidos por titulação visual e potenciométrica.

Amostra (Matéria-Prima)	Valor de P ($\alpha = 0,05$)
ALD-SR	0,007*
ALD-MP1	0,386**
ALD-MP2	0,103**
ALD-MP3	0,668**

(*) = $P < 0,05$; (**) = $P > 0,05$.

Os resultados mostrados na tabela 5 sugerem falta de especificidade do método titulométrico, principalmente com relação à análise das amostras ALD-MP2 e ALD-MP3, as quais apresentaram teor de pureza acima da faixa especificada em monografia oficial (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002). No entanto, os valores de DPR intra-dia obtidos foram menores que 1% para todas as matérias-primas, revelando excelente repetibilidade do método.

Na tentativa de se esclarecer a possível interferência de substâncias de caráter ácido presentes na matéria-prima, foi realizada titulação potenciométrica de uma amostra de GABA, a qual não forneceu resultados, uma vez que o composto não consumiu titulante. O GABA (Figura 14) é precursor de síntese do alendronato e constitui uma de suas principais impurezas (KIECZYKOWSKI *et al.*, 1995). No entanto, embora apresente característica ácida, esta substância não interfere na determinação quantitativa das amostras de alendronato. O hidrogênio ácido do GABA não é titulado pelo hidróxido de sódio, nas condições estabelecidas no método, devido ao reduzido valor da constante de ionização ácida desta molécula ($pK_a > 9,0$) (MERCK Index, 2001).

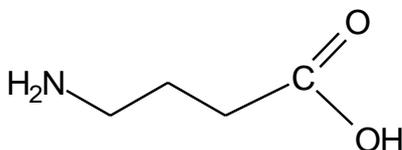


Figura 14 – Estrutura química do ácido γ -aminobutírico (GABA).

Outra possível fonte de interferência na determinação volumétrica do alendronato é a presença de fosfatos e fosfitos ácidos na matéria-prima, os quais, assim como o GABA, podem constituir impurezas de síntese. Tais substâncias

podem ser neutralizadas pelo NaOH, resultando em curvas de titulação semelhantes às observadas para o alendronato de sódio, como pode ser visualizado na titulação do fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) por solução de NaOH 0,1 mol/L (Figura 15).

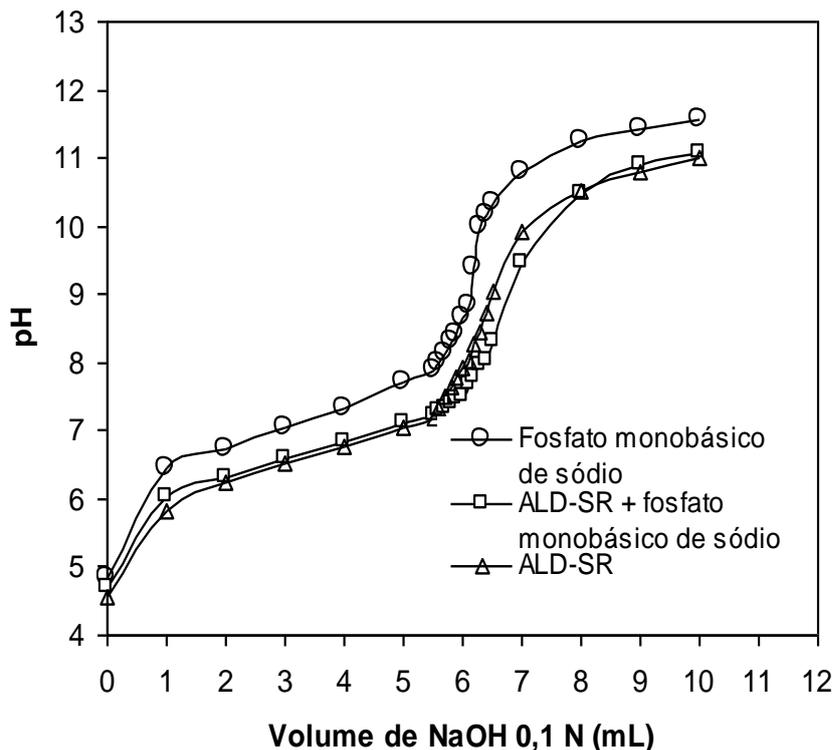


Figura 15 – Curva de titulação de amostras de NaH_2PO_4 , ALD-SR puro e contaminado com 3,7% (p/p) de NaH_2PO_4 .

Para determinar a capacidade do fosfato monobásico de sódio em influenciar na neutralização do alendronato, amostras de ALD-SR foram contaminadas com aproximadamente 3,7% (p/p) de NaH_2PO_4 e em seguida tituladas por solução de NaOH 0,1 mol/L. O percentual de NaH_2PO_4 foi selecionado calculando-se, pela estequiometria de reação, a quantidade capaz de resultar em acréscimo de volume de 0,5 mL de NaOH, quando da titulação do alendronato. Como pode ser visualizado na figura 15, a curva produzida pela titulação da amostra de ALD-SR contaminada com NaH_2PO_4 é semelhante àquela resultante da análise do ALD-SR puro. Os

valores de teor encontrados para a amostra contaminada ficaram em torno de 105,7%, revelando que a presença do fosfato ácido é capaz de produzir considerável erro positivo na análise.

As amostras de matéria-prima foram submetidas a dois diferentes testes qualitativos para determinação de fosfatos, utilizando nitrato de prata e mistura magnésiana (VOGEL, 1981). Mas tais métodos não forneceram informações conclusivas, pois o alendronato formou complexo com os metais empregados, resultando em produção de precipitado e prejudicando a detecção do fosfato. Um método mais adequado, como a cromatografia de troca iônica, poderia ser utilizado para determinar de maneira eficiente a presença de fosfatos nas amostras (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002), mas não pôde ser realizado no presente estudo devido à ausência de material e equipamento apropriados.

O ácido fosforoso (H_3PO_3) é um dos precursores de síntese do ácido alendrônico e possui 2 hidrogênios ácidos, cujos valores de pKa são: $pK_{a1} = 1,29$ e $pK_{a2} = 6,74$ (MERCK Index, 2001). Na etapa de neutralização do ácido alendrônico para obtenção do alendronato, a presença de ácido fosforoso como impureza do primeiro pode resultar em formação de fosfito monossódico (NaH_2PO_3), o qual apresenta um hidrogênio passível de ser titulado pela solução de NaOH 0,1 mol/L. A existência de fosfito monossódico em amostras de alendronato de sódio poderia também interferir positivamente na determinação volumétrica do fármaco, como mostra a tabela 7, onde em função da estequiometria da reação de neutralização, foi estimada a pureza resultante de alendronato, caso o material contivesse o percentual de fosfito monossódico indicado na primeira coluna.

Tabela 7 – Influência de diferentes quantidades de fosfito monossódico na titulação alcalimétrica do alendronato de sódio.

% de Fosfito monossódico na amostra	Teor (%) de alendronato que seria obtido para a amostra contaminada
0	100,00
0,25	100,53
0,5	101,06
0,75	101,59
1	102,13
2	104,25
3	106,38
4	108,50
5	110,63

Observando os resultados encontrados no ensaio para fosfito (Item 4.1.5 – Tabela 4), podemos perceber que todas as matérias-primas, com exceção da substância de referência, apresentaram contaminação por este composto. No entanto, os níveis encontrados não justificam os teores obtidos na titulação das matérias-primas (Tabela 5).

4.2.2 Análise titulométrica de produto acabado – Validação do método

A titulação das amostras de placebo não mostrou interferência dos excipientes utilizados para a fabricação das cápsulas na determinação quantitativa do alendronato de sódio, revelando seletividade satisfatória do método com relação à análise da formulação ALD-LE. Além disto, como mostra a tabela 8, os valores de teor encontrados no ensaio de recuperação, para os três níveis de concentração

analisados (80, 100 e 120%), permaneceram dentro da faixa de 98 a 102%, considerada aceitável para o intervalo avaliado (AOAC, 2000 apud BARROS & HIRATA, 2004) e evidenciando a adequada exatidão do método para a determinação do alendronato na formulação estudada.

Tabela 8 – Resultados do ensaio de recuperação e precisão do método titulométrico aplicado a produto acabado (mistura de pós para cápsulas).

DIA	ALD-LE	mg de ácido alendrônico		% Recuperado (Média ± dp)	DPR (%)	
		Adicionado	Encontrado		Intra-dia	Inter-dias
1	80	56	56,38	100,67 ± 0,39	0,39	0,37
2			56,18	100,33 ± 0,27	0,27	
1	100	70	70,64	100,91 ± 0,40	0,40	0,60
2			70,01	100,02 ± 0,40	0,40	
1	120	84	84,79	100,94 ± 0,68	0,67	0,73
2			83,90	99,88 ± 0,26	0,26	

Através da tabela 8 pode-se observar que os valores de desvio padrão relativo encontrados foram menores que 2%, para todo o intervalo analisado (80 a 120%). Portanto, o método apresentou repetibilidade (DPR intra-dia) e precisão intermediária (DPR inter-dias) dentro dos limites exigidos pela resolução RE 899/03 (ANVISA, 2003).

Para as cápsulas ALD-CPS o peso médio encontrado foi de 184,04 mg, observando-se que a formulação atende às exigências quanto à uniformidade de massa, para cápsulas com conteúdo inferior a 300 mg, cujo desvio limite da média deve ser menor que 10% (FARMACOPÉIA Brasileira, 1988). O teor médio de ácido

alendrônico encontrado na análise das cápsulas ($n = 6$) foi de 98,13% (DPR = 0,72%), estando dentro dos limites aceitáveis, entre 90 e 110% (UNITED States Pharmacopeia, 2005).

Também foi estudada a possibilidade de se aplicar o método volumétrico com o ajuste proposto por Moreno (MORENO, PEZZA & PEZZA, 2004), para a realização do teste de dissolução das cápsulas ALD-CPS, visto que os autores utilizaram com sucesso esta metodologia titulométrica na determinação do alendronato em formulações, empregando pequenas concentrações do fármaco durante a análise. O perfil de dissolução obtido para as cápsulas ALD-CPS, nas condições adotadas, pode ser visualizado na figura 16.

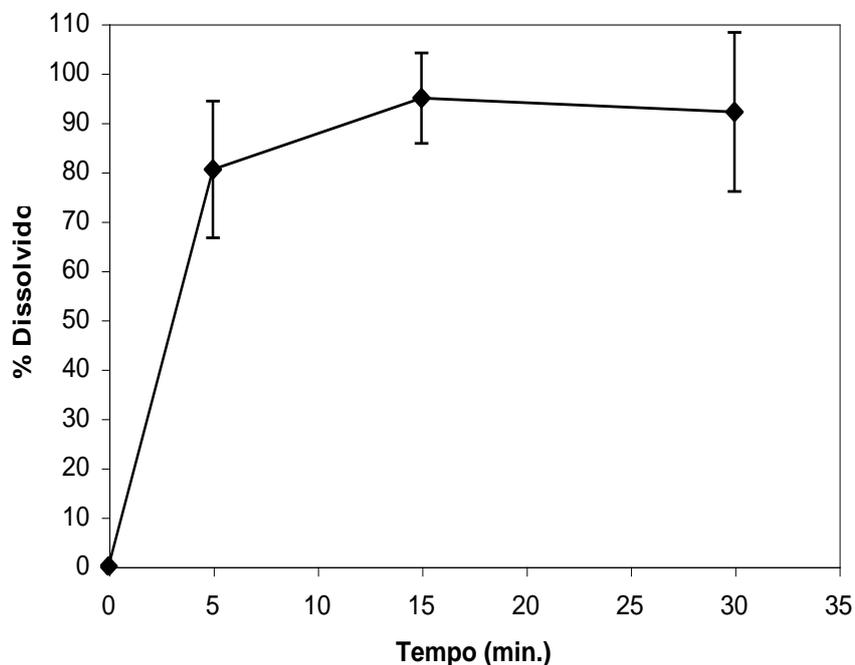


Figura 16 – Perfil de dissolução das cápsulas ALD-CPS ($n = 5$) em água, empregando cesto a 75 rpm.

Tabela 9 – Resultados do teste de dissolução para as cápsulas ALD-CPS.

Tempo (minutos)	% Dissolvido médio	DPR (%) *
0	0	0
5	80,42	17,24
15	94,88	9,64
30	92,06	17,51

* n = 5.

Quando o método titulométrico descrito por Moreno foi aplicado na análise das matérias-primas (Tabela 10), os resultados não foram concordantes com os encontrados pelo método descrito no item 4.2.1 (Tabela 5), apresentando elevada variabilidade nos valores de teor das matérias-primas ALD-MP1 e ALD-MP3 (DPRs > 2%). Tal fato pode estar relacionado às concentrações reduzidas da solução titulante (NaOH 0,001 M) e de alendronato utilizadas, levando à obtenção de curva com inflexão pouco pronunciada (Figura 17).

Tabela 10 – Resultados de teor encontrados para as matérias-primas, utilizando-se o método volumétrico proposto por Moreno e colaboradores (MORENO, PEZZA & PEZZA, 2004).

Matéria-prima	Teor Médio (%)	DPR (%) *
ALD-SR	109,92	0,36
ALD-MP1	102,51	4,78
ALD-MP2	115,93	0,60
ALD-MP3	119,16	2,87

* n = 3

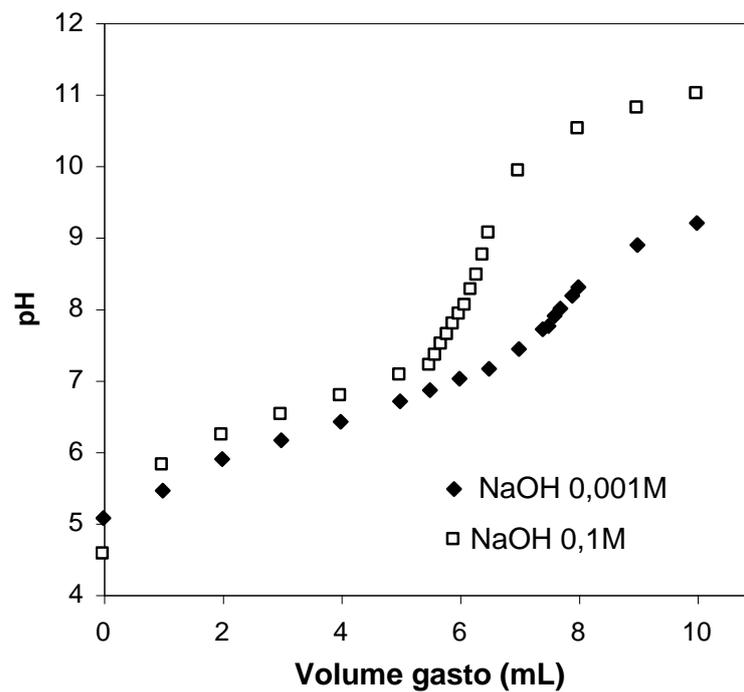


Figura 17 – Comparação entre as curvas de titulação da amostra ALD-SR, utilizando-se NaOH 0,1 M e NaOH 0,001 M.

Desta forma, não foi possível esclarecer se a dispersão encontrada no perfil de dissolução (Tabela 9), o qual apresentou elevados valores de DPR entre as cubas, é devida ao método de dissolução e à formulação, ou à titulação.

4.3 CLAE EM FASE REVERSA COM DERIVATIZAÇÃO POR FMOC E DETECÇÃO POR ULTRAVIOLETA

4.3.1 Análise das matérias-primas e avaliação da precisão e linearidade do método

O método descrito por De Marco e colaboradores (DE MARCO *et al.*, 1989), recentemente adotado pela Farmacopéia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2005), foi utilizado como referência na quantificação das amostras de alendronato, objetivando-se analisar os valores encontrados na análise volumétrica das matérias-primas. Os teores de pureza obtidos são apresentados na tabela 11, onde também estão reproduzidos os dados da análise titulométrica.

Tabela 11 – Resultados encontrados na análise das matérias-primas por método cromatográfico e por titulação ácido-base com determinação potenciométrica do ponto de equivalência.

Amostra	Titulação potenciométrica *		Método de Referência * (CLAE – UV com FMOC)	
	TEOR (%)	DPR (%)	TEOR (%)	DPR (%)
ALD-SR	100,41	0,33	99,60 **	—
ALD-MP1	97,78	0,92	91,08	0,73
ALD-MP2	102,91	0,62	95,58	1,99
ALD-MP3	109,13	0,21	98,68	1,43

* n = 6 para ambos os métodos (titulação e CLAE); ** Teor declarado para a substância de referência.

Os valores encontrados utilizando-se o método de referência (CLAE-UV com derivatização por FMOC) foram nitidamente distantes dos encontrados pelo método volumétrico, resultando, obviamente, em médias com diferenças estatisticamente

significativas para todas as matérias-primas após análise dos dados por ANOVA. Tal observação reforça a hipótese da falta de especificidade do método volumétrico na análise das matérias-primas, a qual pode estar relacionada à presença de interferentes com propriedades ácidas.

Na avaliação do método cromatográfico de referência quanto à precisão (Tabela 12), foram obtidos valores de DPR menores que 2% para praticamente todas as concentrações de ALD-SR analisadas, revelando a boa repetibilidade (DPR intra-dia) e precisão intermediária (DPR inter-dias) desta metodologia. A precisão de injeção também foi examinada e o valor de DPR encontrado foi de 0,64%. Além disto, o método apresentou linearidade adequada, visto que o coeficiente de correlação obtido para a equação da reta foi de 0,9991, mostrando-se dentro do valor recomendado pela legislação vigente, ou seja, acima de 0,99 (ANVISA, 2003).

Tabela 12 – Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método de referência (CLAE com derivatização).

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)	DIA	DPR (%)	
		Intra-dia	Inter-dias
50	1	1,86	1,50
	2	1,34	
75	1	2,12	2,14
	2	1,47	
100	1	0,59	0,81
	2	0,85	
125	1	0,37	1,86
	2	0,78	
150	1	0,20	1,14
	2	1,22	

A figura 18 mostra a curva de calibração obtida na avaliação do método de referência, podendo-se observar uma origem próxima de zero ao extrapolar a reta até o eixo das ordenadas. No entanto, a análise da regressão linear mostrou intercepto estatisticamente diferente de zero, embora o valor de P encontrado esteja próximo de 0,01 (Tabela 13).

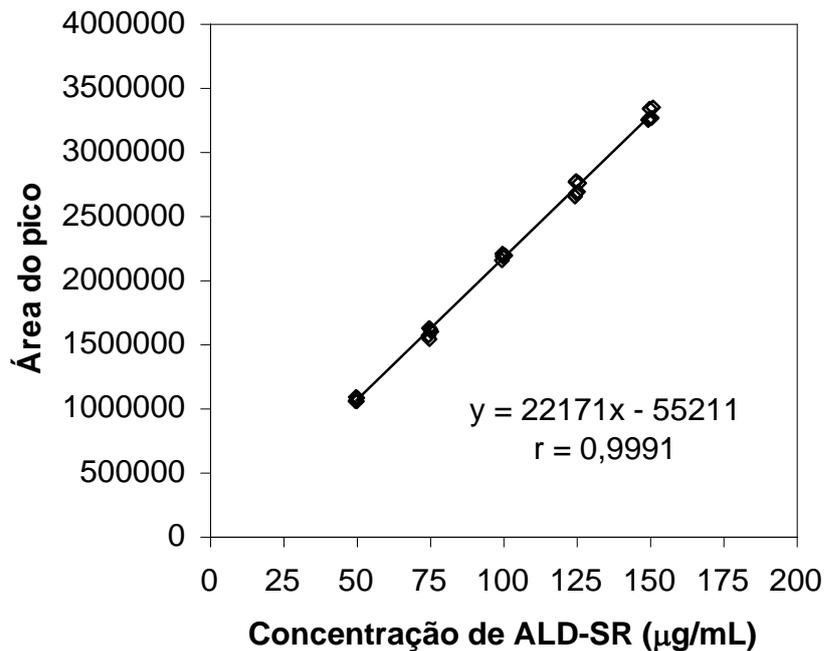


Figura 18 – Curva de calibração média obtida para o alendronato de sódio, em dois dias de análise pelo método de referência (CLAE-FR com derivatização por FMOC).

Tabela 13 – Avaliação estatística da regressão linear para o método de referência.

PARÂMETRO	MÉDIA ± EP
Intercepto (a)	-55211,97 ± 19029,82 *
Inclinação (b)	22171,35 ± 179,04 **
Coefficiente de correlação (r)	0,9991 ± 0,0001 **

Onde: $y = a + bx$; (*) $P = 0,007$; (**) $P \ll 0,01$.

4.3.2 Influência do pH da fase móvel no perfil cromatográfico

Cuidado especial deve ser dispensado com relação ao preparo da fase móvel utilizada nesta metodologia, pois valores reduzidos de pH podem prejudicar a estabilidade do derivado formado entre o alendronato e o reagente de derivatização (FMOC), sendo apropriado manter um pH em torno de 8,0 durante a análise (DE MARCO *et al.*, 1989). Por outro lado, o emprego de fase móvel com elevado potencial hidrogeniônico pode prejudicar a eficiência de colunas C18 a base de sílica, recomendando-se a utilização de valores de pH entre 2 e 8. Ainda assim, existe uma publicação na literatura onde o método cromatográfico com derivatização por FMOC foi aplicado com sucesso na determinação do alendronato em meios biológicos, usando-se este tipo de coluna (PTÁCEK & KLÍMA, 2003). Desta forma, optou-se pela utilização da coluna C18 neste trabalho, visto esta ser de uso mais corriqueiro em análises farmacêuticas.

O ajuste do pH deve ser realizado após a adição dos solventes orgânicos (acetonitrila e metanol) à fase móvel e não apenas durante o preparo do tampão, pois foi observado que este procedimento evita variações no potencial hidrogeniônico, as quais podem provocar alterações consideráveis no perfil cromatográfico obtido para o alendronato, como mostra a figura 19.

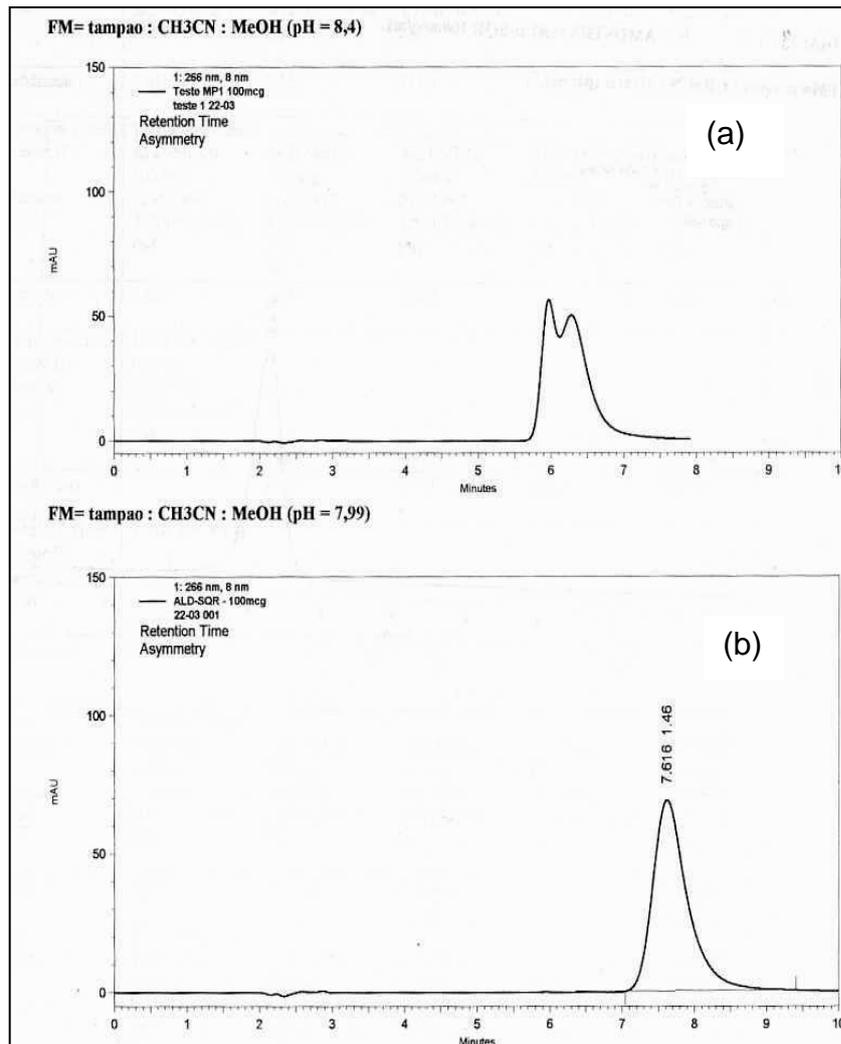


Figura 19 – Influência do pH da fase móvel no perfil cromatográfico obtido para a amostra ALD-SR, usando o método de referência (CLAE-FR com derivatização por FMOC). (a) pH = 8,4; (b) pH = 7,99.

Analisando o perfil cromatográfico (Figura 19) podemos perceber que a utilização de um pH igual a 8,4 foi capaz de alterar de forma marcante a eluição do alendronato, produzindo um pico “duplo” ou com “ombro”, por razão que não foi determinada. Já a utilização de um potencial hidrogeniônico mais próximo de 8 (pH = 7,99), produziu pico simétrico, com fator de cauda menor que 2 ($T = 1,46$), ou seja, dentro do recomendado pela Farmacopéia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2005).

A diminuição do pH da fase móvel para um valor de 7,7 produziu pico ainda mais simétrico, com menor fator de cauda ($T = 1,11$) que o anterior, provocando também uma pequena redução no tempo de retenção (Figura 20). Mas optou-se por manter o pH em torno de 8, por ser o valor mais adequado para garantir a estabilidade do derivado alendronato-FMOC, segundo De Marco e colaboradores (DE MARCO *et al.*, 1989).

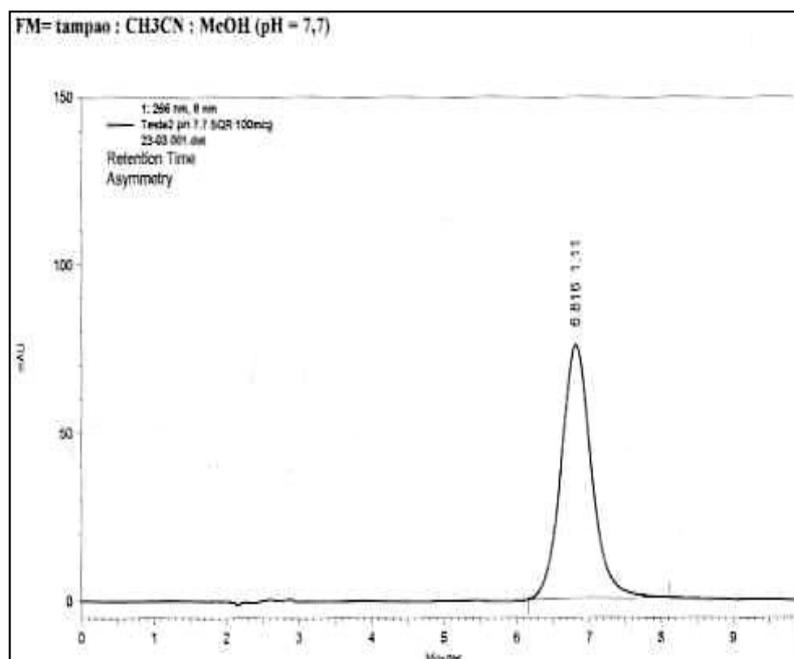


Figura 20 –Análise da amostra ALD-SR, usando o método de referência (CLAE-FR com derivatização por FMOC), com fase móvel de pH = 7,7.

Com base em trabalho anteriormente descrito (PTÁCEK & KLÍMA, 2003), foi realizada injeção direta em cromatógrafo logo após a reação de derivatização, suprimindo assim a etapa de extração do excesso de reagente (FMOC) durante o preparo das amostras. Tal procedimento não se mostrou eficaz, resultando em perfil cromatográfico inadequado para a análise do fármaco, provavelmente devido a elevada retenção do FMOC na coluna C18.

4.4 CLAE EM FASE REVERSA COM DETECÇÃO POR ULTRAVIOLETA EM BAIXO COMPRIMENTO DE ONDA

4.4.1 Comportamento do perfil cromatográfico nas condições empregadas

Observando o emprego da CLAE de fase reversa com detecção ultravioleta na análise de substâncias farmacêuticas, mesmo aquelas sem apreciável absorvidade (ZUBATA *et al.*, 2002), optou-se pelo desenvolvimento de uma metodologia com detecção na região do ultravioleta próximo.

Devido à elevada acidez da molécula de alendronato, fez-se uso de fase móvel com baixo valor de pH (água acidificada com H_3PO_4 - pH 2,03), para reduzir ao máximo a ionização do fármaco e permitir uma maior interação com as partículas apolares da coluna.

Foi necessário utilizar um reduzido valor de comprimento de onda para a detecção, pois o alendronato não apresenta absorvância considerável na região do ultravioleta, como se observa na figura 21. Assim, a detecção do fármaco foi realizada em torno de 210 nm, aproveitando a energia absorvida em transições eletrônicas menos favorecidas, tais como $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ (SILVERSTAIN, BASSLER & TERENCE, 1994).

Obteve-se pico simétrico, em torno de 2,7 minutos, como pode ser observado na figura 22.

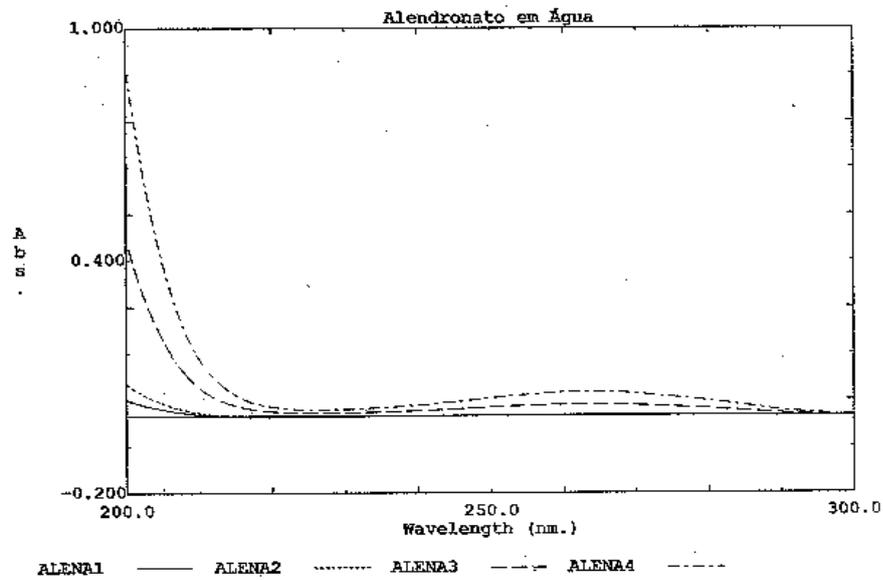


Figura 21 – Espectro de absorção no ultravioleta, do alendronato de sódio diluído em água nas concentrações de 50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (ALENA 1, 2, 3 e 4, respectivamente).

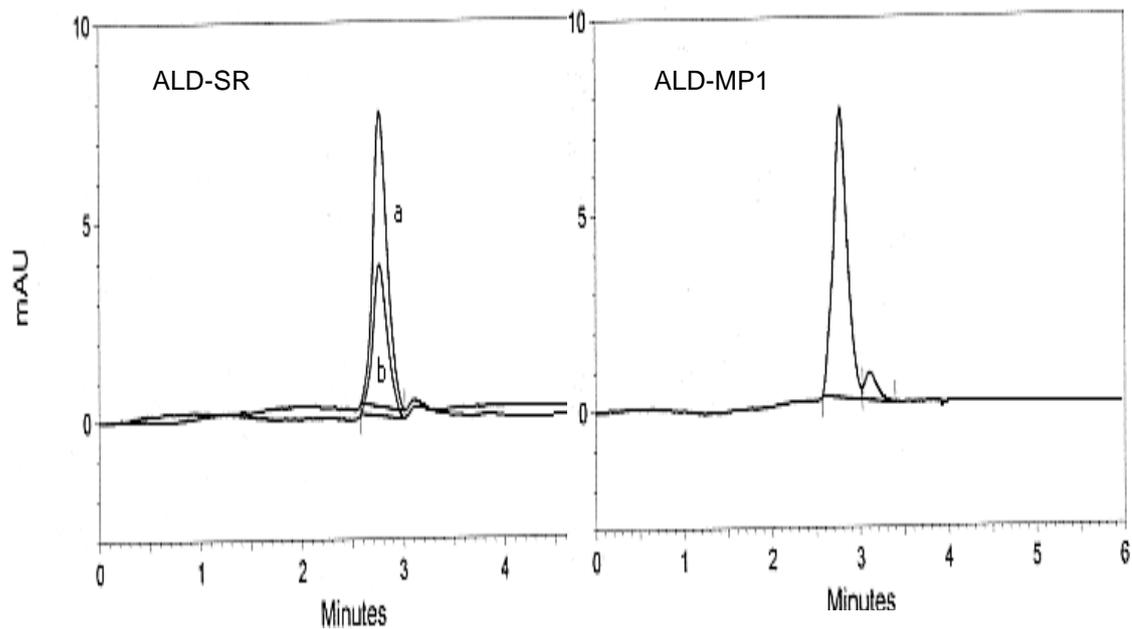


Figura 22 – Cromatogramas das amostras ALD-SR e ALD-MP1, obtidos nos experimentos utilizando CLAE-FR com detecção UV em baixo λ . Onde a = ALD-SR 1 mg/mL; b = ALD-SR 500 $\mu\text{g/mL}$.

Concentrações elevadas do fármaco foram utilizadas para esta análise, a exemplo do trabalho realizado por Zubata e colaboradores, onde foi empregada concentração acima de 1 mg/mL na análise da azitromicina, fármaco com reduzida absorção ao ultravioleta (ZUBATA *et al.*, 2002).

Para estabelecer a seletividade do método aplicado à determinação das matérias-primas, realizou-se a análise de amostras de GABA e de alendronato, avaliando-se o perfil de separação cromatográfico destas duas substâncias em diferentes condições (Figuras 23 e 24). Foi possível observar que a elevação do pH de 2,03 a 3,0 não modificou apreciavelmente o tempo de retenção do alendronato ou do GABA, mas reduziu acentuadamente a separação entre os dois compostos. Portanto, optou-se por um pH para a fase móvel em torno de 2,0, embora este valor esteja no limite de trabalho da coluna C18 utilizada.

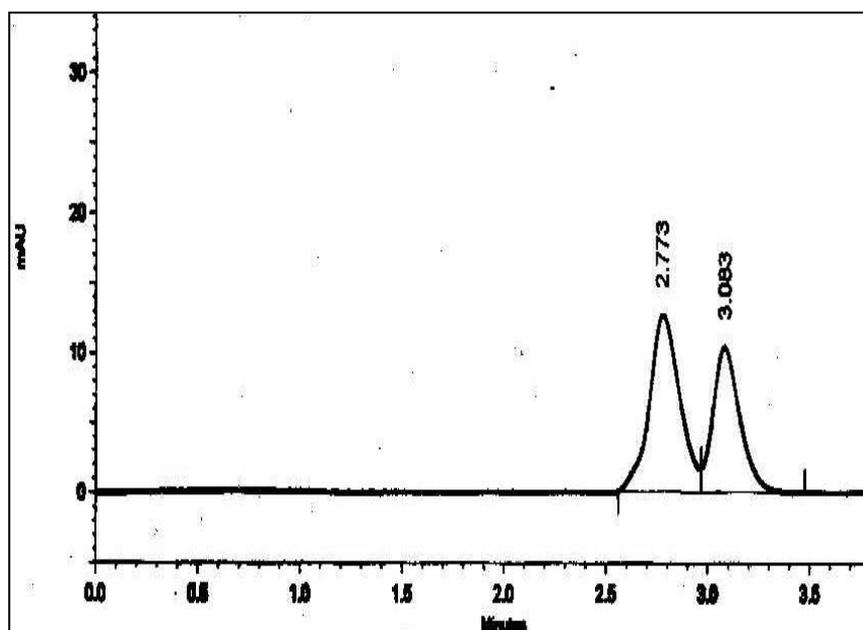


Figura 23 – Cromatograma da mistura alendronato + GABA. Fase móvel com pH = 2,03.

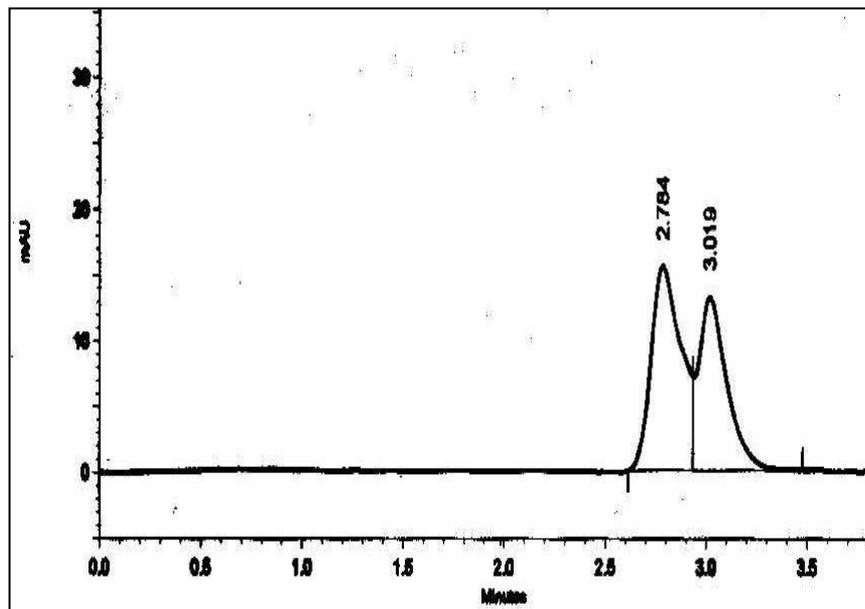


Figura 24 – Cromatograma da mistura alendronato + GABA. Fase móvel com pH = 3,0.

4.4.2 Avaliação da precisão e linearidade do método

Na avaliação do método cromatográfico quanto à precisão (Tabela 14), foram obtidos valores de DPR inter-dias maiores que 5% em todas as concentrações de ALD-SR analisadas, revelando uma elevada dispersão dos resultados e uma inadequada precisão intermediária para esta metodologia. Examinando a figura 21, podemos observar que pequenas modificações no comprimento de onda, na região do espectro em torno de 210 nm, são capazes de produzir alterações significativas na energia absorvida pelo fármaco. Portanto, a elevada variabilidade na análise inter-dias é possivelmente devida à utilização de reduzido comprimento de onda para a análise do alendronato.

A precisão de injeção também foi examinada e o valor de DPR encontrado foi de 1,12%.

Além disto, o método não apresentou linearidade adequada para a faixa de concentração estudada, pois o coeficiente de correlação encontrado para a equação da reta obtida foi de 0,9530, mostrando-se bem abaixo do valor recomendado de 0,99 (ANVISA, 2003).

Tabela 14 – Avaliação da precisão do método por CLAE utilizando detecção UV em baixo λ .

CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	DIA	DPR (%)	
		Intra-dia	Inter-dias
0,50	1	2,75	8,32
	2	1,33	
0,75	1	1,35	8,07
	2	1,27	
1,00	1	0,76	7,89
	2	1,04	
1,25	1	0,74	6,98
	2	1,05	
1,50	1	0,39	6,31
	2	1,07	

A figura 25 mostra a curva de calibração média obtida na avaliação do método cromatográfico proposto em dois dias de análise, podendo-se observar uma origem nitidamente distante de zero ao extrapolar a reta até o eixo das ordenadas. A análise da regressão linear mostrou intercepto estatisticamente diferente de zero, com valor de P abaixo de 0,01 (Tabela 15).

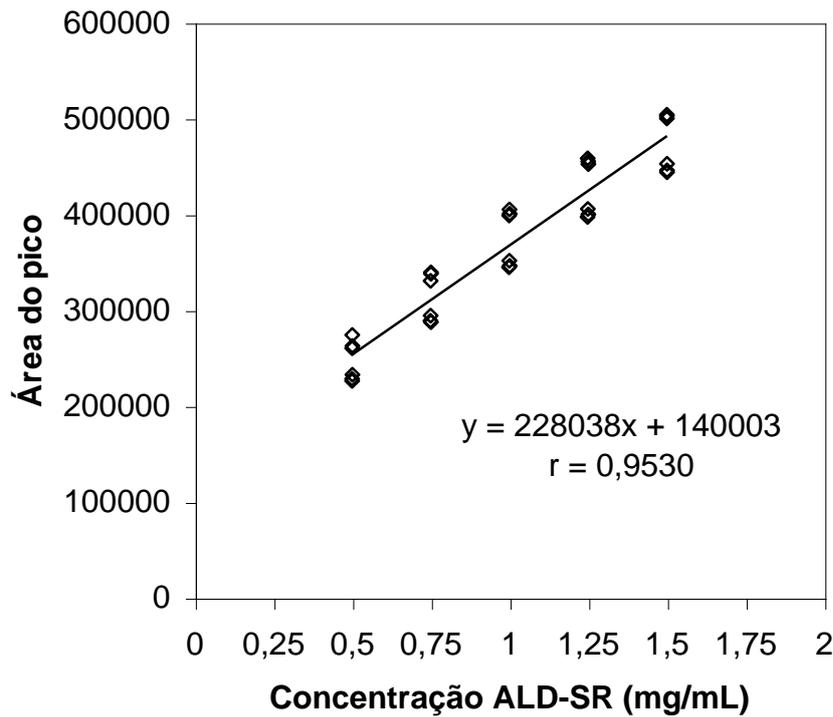


Figura 25 – Curva de calibração média obtida para a análise do alendronato de sódio, em dois dias de análise pelo método por CLAE-FR com detecção em baixo λ .

Tabela 15 – Avaliação estatística da regressão linear para o método por CLAE-FR com detecção em baixo λ .

PARÂMETRO	MÉDIA \pm EP
Intercepto (a)	140003,09 \pm 4511,42*
Inclinação (b)	228038,22 \pm 13696,12**
Coeficiente de correlação (r)	0,9530 \pm 0,005**

Onde: $y = a + bx$; (*) $P = 2,11 \times 10^{-10}$; (**) $P \ll 0,01$.

O reduzido coeficiente de correlação obtido está relacionado principalmente à dispersão dos resultados entre os dois dias de análise, pois os valores de DPR encontrados dentro de um mesmo dia foram menores que 2% (com apenas uma exceção), sendo observada a obtenção de coeficientes de correlação acima de 0,99 quando se analisa o resultado das curvas em cada dia separadamente (Figura 26).

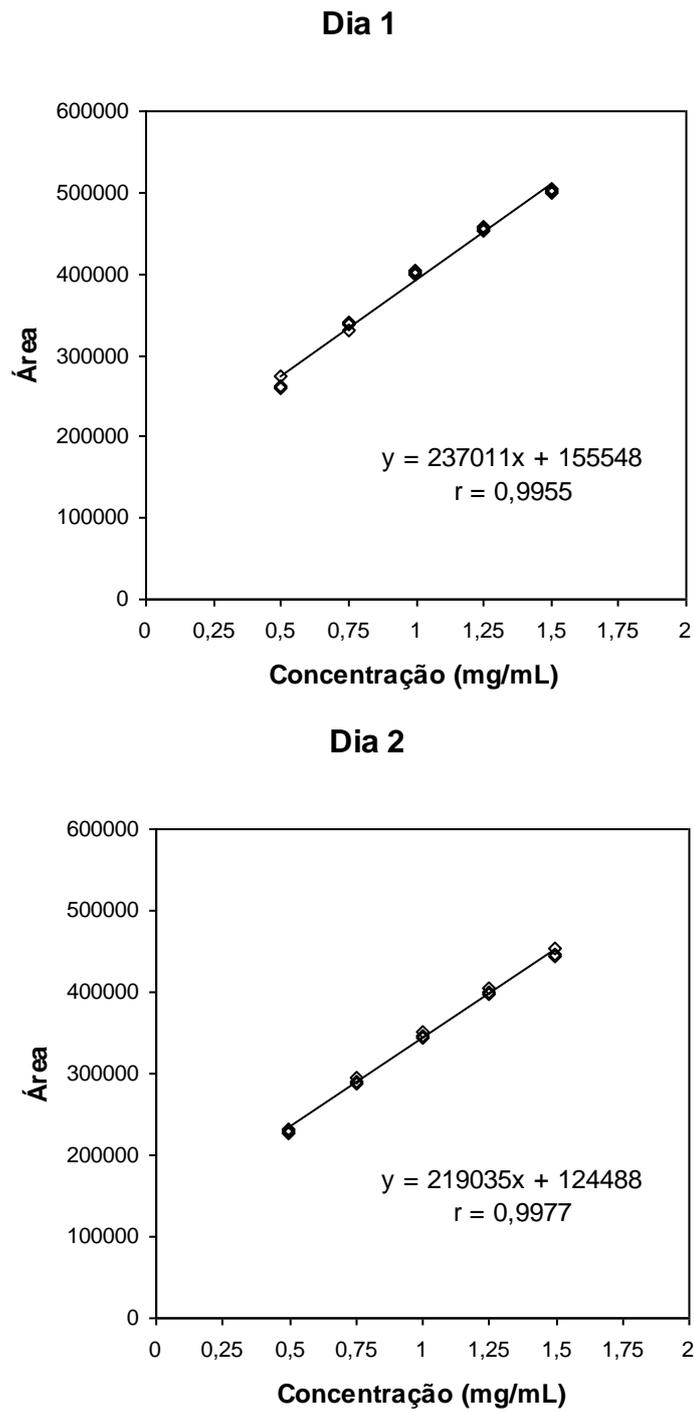


Figura 26 – Curvas de calibração obtidas na análise do alendronato pelo método proposto, em cada dia separadamente.

4.5 CLAE DE TROCA IÔNICA COM DETECÇÃO INDIRETA POR ULTRAVIOLETA

Baseado na metodologia descrita por Tsai e colaboradores (TSAI *et al.*, 1994), tentou-se desenvolver um método de análise por CLAE de troca iônica (CLAE-TI) com detecção indireta por UV, utilizando coluna propil-amínica, fluxo de 1,5 mL/min e como fase móvel o ácido nítrico 7,5 mM. Os cromatogramas obtidos mostraram um pequeno pico positivo com tempo de retenção (t_R) de aproximadamente 1,3 minuto e um pico negativo com t_R em torno de 3,3 minutos (Figura 27).

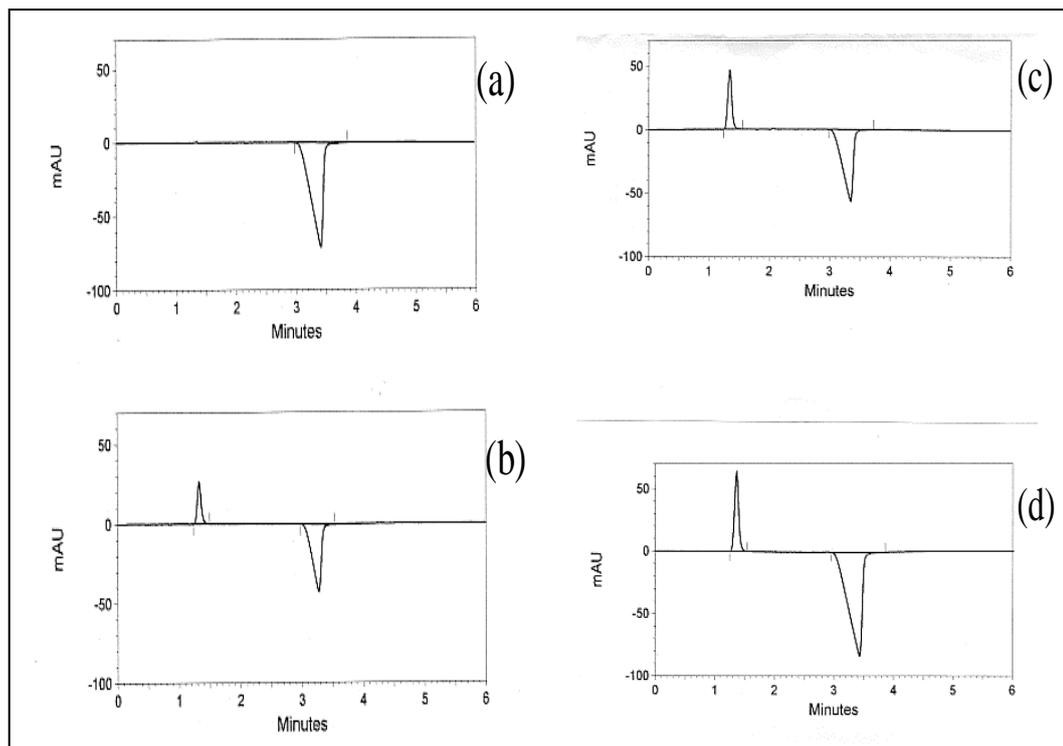


Figura 27 – Cromatogramas obtidos nos experimentos utilizando CLAE-TI com detecção indireta. Onde (a) = injeção de água destilada; (b) = injeção de ALD-SR 1 mg/mL em água; (c) injeção de ALD-MP1 1 mg/mL em água; (d) = injeção de GABA 500 μ g/mL em água.

Injeções de concentrações de ALD-MP1 entre 20 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ não resultaram em valores de área proporcionais à concentração da amostra, para o pico negativo, embora tal proporcionalidade tenha sido observada para o primeiro pico positivo do cromatograma. Por outro lado, a injeção de GABA e do solvente das amostras (água destilada pura), produziu pico negativo de mesmo t_R e valor de área da amostra ALD-MP1, como pode ser observado na figura 27.

Diante dos dados obtidos, realizou-se a coleta de alíquotas da fase móvel eluída, em torno dos tempos de retenção de cada pico (1º pico – positivo – 1,3 minutos; e 2º pico – negativo – 3,3 minutos). As alíquotas foram concentradas, de modo a fornecer quantidade adequada de alendronato, caso presente, a ser analisada por CCD. Como pode ser visto na figura 28, os resultados revelaram a presença de GABA no primeiro pico positivo (letras d e m), eluído em 1,3 minuto. No entanto, em nenhum dos spots, realizados com as alíquotas coletadas, foi observada mancha retida na origem da placa cromatográfica, confirmando que o pico negativo observado no cromatograma (Figura 27) não é devido ao alendronato. Na figura 28 (letras c e g) também é possível observar que a extinção ao UV (254nm) observada na origem de alguns spots é devida ao ácido nítrico utilizado como fase móvel.

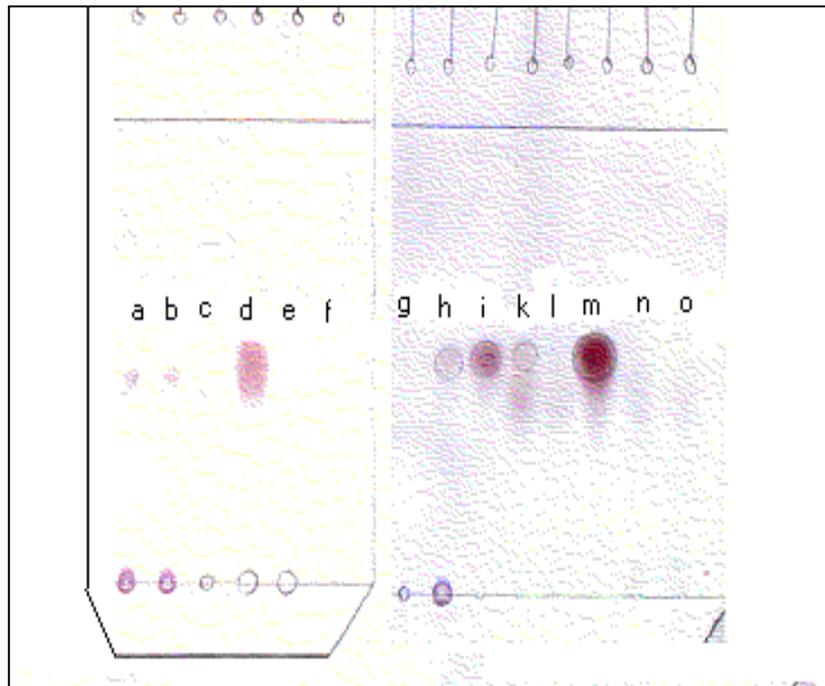


Figura 28 – CCD das alíquotas coletadas na CLAE. Onde a) e h) = ALD-MP1 10 mg/mL em água; b) = ALD-MP1 10 mg/mL em ácido nítrico; c) e g) = ácido nítrico diluído; d) e m) = coleta do 1º pico da injeção de GABA; e) e n) = coleta do 2º pico (negativo) da injeção de GABA; f) = coleta do 2º pico da injeção de ALD-MP2; i) = GABA 50 µg/mL em água; k) = coleta do 1º pico da injeção de ALD-MP1; l) = coleta do 2º pico (negativo) da injeção de ALD-MP1; o) = coleta do pico (negativo) da injeção de água pura.

Amostra de alendronato ALD-SR foi analisada por CLAE com detecção por índice de refração, utilizando os mesmos parâmetros anteriores (coluna, fase móvel, fluxo), e não foram obtidos resultados conclusivos para o tempo de retenção do fármaco. Assim, pode-se concluir que a coluna propil-amínica não se prestou à cromatografia iônica nesta situação, provavelmente por ser fraca trocadora de íons.

De acordo com a teoria, a sensibilidade para a detecção indireta pode ser determinada segundo a fórmula: $C_{lim} = C_{FM} / (DR \times N_{FM})$; onde C_{lim} é a menor concentração do analito capaz de ser detectada pelo método, C_{FM} é a concentração

do componente absorvente da fase móvel, **DR** é a habilidade do detector em medir pequenas variações do sinal na presença de ruído e **N_{FM}** é o número de moléculas da fase móvel deslocadas por 1 molécula do analito (YEUNG, 1989).

Assim, a resposta (sinal) será tanto maior quanto:

- *menor* a concentração da substância cromófora presente na fase móvel;
- *maior* a molécula do analito;
- *maior* a estabilidade da linha de base (menor ruído).

Para esclarecer melhor a resposta da detecção indireta, foram realizadas injeções em fluxo (sem coluna) de diferentes concentrações do alendronato diluído em água, empregando fase móvel com concentração variada. Não foi observada proporcionalidade entre a quantidade de amostra e a resposta do detector em qualquer das concentrações de fase móvel utilizadas (ácido nítrico entre 1,5 e 7,5 mM).

5 CONCLUSÕES

- Quanto à caracterização das amostras, as matérias-primas ALD-MP1, ALD-MP2 e ALD-MP3 apresentaram comportamento distinto da substância de referência (ALD-SR), no que se refere aos ensaios para determinação de fosfito monossódico, perda por dessecação, análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura;
- Apenas a matéria-prima ALD-MP1 apresentou contaminação por GABA, embora abaixo do limite especificado de 0,5% (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002), exibindo também contaminante visível após cerca de 6 meses de armazenamento, que na análise por ressonância magnética nuclear apresentou sinal não caracterizado em 2,9 ppm.
- A titulometria de neutralização com determinação potenciométrica do ponto de equivalência pode ser substituída pela titulação com determinação visual, pois as duas técnicas produziram resultados equivalentes;
- A titulometria de neutralização não possui especificidade adequada para análise de controle da qualidade de matérias-primas de alendronato de sódio;
- O método titulométrico de neutralização foi validado para a análise da formulação ALD-CPS, podendo ser utilizado no controle da qualidade de produto acabado contendo alendronato de sódio, desde que os excipientes

não se mostrem interferentes (como foi o caso da lactose e do aerosil) e a matéria-prima presente qualidade certificada por método analítico apropriado;

- A cromatografia de fase reversa com derivatização por FMOC e detecção ultravioleta apresentou adequada linearidade e precisão, embora seja de execução trabalhosa, demorada e dispendiosa.
- A análise cromatográfica por CLAE com derivatização por FMOC forneceu valores de pureza inferiores aos encontrados na titulação para as 3 matérias-primas avaliadas, sendo que as amostras ALD-MP1 e ALD-MP2 apresentaram teor abaixo da especificação de 98 a 102% (FARMACOPÉIA Portuguesa, 2002);
- O método cromatográfico com detecção em baixo comprimento de onda apresentou reduzida precisão intermediária e não forneceu resultados promissores para análise do alendronato de sódio;
- A coluna propil-amínica não se prestou para realização da cromatografia de troca iônica e o uso da detecção indireta para análise do alendronato de sódio, nas condições empregadas, não foi promissor.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 nov. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE n. 37, de 05 de fevereiro de 2004. **Anexo**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 16 nov. 2004. Anexo.

AL DEEB, S. K.; HAMDAN, I. I.; AL NAJJAR, S. M. Spectroscopic and HPLC methods for the determination of alendronate in tablets and urine. **Talanta**, v. 64, p.695-702, 2004.

BARROS, C.B.; HIRATA, Y.S. **Princípios e práticas de validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: Schaffer empreendimentos S/C, 2004. p.23-24.

BIOANALYTICAL SYSTEMS. Stripping Voltammetry. In: Instruction Manual for BAS EPSILON for Eletrochemistry. Disponível em: <<http://www.epsilon-web.net/Ec/manual/Techniques/Stripping/stripping.html>>. Acesso em: 8 jul. 2003.

BUENO, F.; BERGOLG, A.M. Desenvolvimento de técnicas para controle de qualidade de fármacos em farmácias de manipulação: metodologias para análise de alendronato de sódio e sua determinação em formulações farmacêuticas. **Acta Farm. Bonaerense**, v.19, n. 2, p.129-132, 2000.

CASTRO, L. F. et al. Bifosfonados (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n.3 , p. 456-460, 2004.

CIPLA. **Finished Product Specification**: test and methods. Alendronate sodium trihydrate. 1999. 9 p.

CONNORS, K.A. **A Textbook of Pharmaceutical Analysis**. 3 ed. New York: Wiley-Interscience, 1982. p.39.

CONSULTA remédios. Disponível em: <<http://www.consultaremedios.com.br>>. Acesso em: 20 dez. 2004.

DE MARCO, J. D. et al. The determination of 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-diphosphonic acid monosodium salt trihydrate in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, n. 12, p.1719- 1727, 1989.

DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas. 29. ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2000.

EL-SATTAR, O. I. Abd; AHMAD, A. A.; EL KADY, T. Validated and stability indicating HPLC-method for determination of alendronate sodium using phthaldialdehyde as a pre-column derivatizing agent. **Egyptian Journal of Biomedical Sciences**, v. 11, p.35-45, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira. Métodos de análise. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA Portuguesa. Monografias. 7. ed. Lisboa: Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, 2002. 1 CD-ROM.

GUYTON, A. C. Endocrinologia e reprodução. In: _____. **Fisiologia humana**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 484-497.

HAN, Y. R.; QIN, X. Determination of alendronate sodium by ion chromatography with refractive index detection. **Journal of Chromatography A**, v. 719, p. 345-352, 1996.

HUIKKO, K.; KOSTIAINEN, R. Analysis of bisphosphonates by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 872, p. 289-298, 2000 a.

HUIKKO, K.; KOSTIAINEN, R. Development and validation of a capillary zone electrophoretic method for the determination of bisphosphonate and phosphonate impurities in clodronate. **Journal of Chromatography A**, v. 893, p. 411-420, 2000 b.

KIECZYKOWSKI, G. R. et al. Preparation of (4-Amino-1-Hydroxybutylidene) bisphosphonic acid sodium salt, MK-217 (Alendronate Sodium). An improved procedure for the preparation of 1-Hydroxy-1,1-bisphosphonic acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 25, p. 8310-8312, 1995.

KLINE, W. F.; MATUSZEWSKI, B. K. Improved determination of the bisphosphonate alendronate in human plasma and urine by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 583, p. 183-193, 1992.

KLINE, W. F.; MATUSZEWSKI, B. K.; BAYNE, W. F. Determination of 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-bisphosphonic acid in urine by automated pre-column derivatization with 2,3-naphthalene dicarboxyaldehyde and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v. 534, p.139-149, 1990.

KULJANIN, J. et al. Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations via complex formation with Fe (III) ions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, v. 28, p.1215-1220, 2002.

KWONG, E. et al. HPLC analysis of an amino bisphosphonate in pharmaceutical formulations using postcolumn derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 28, n.11, p. 563-566, 1990.

LOVDAHL, M. J.; PIETRZYK, D. J. Anion-exchange separation and determination of bisphosphonates and related analytes by post-column indirect fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 850, p. 143-152, 1999.

MARCUS, R. Fármacos que afetam a calcificação e a renovação do osso. In: **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p. 1139-1140.

MCCARTHY, M. FDA alendronate approval. **The Lancet**, v. 346, p.1028, 1995.

MEDJEDOVIC, A. Alendronate sodium. **Pharmacopeial Forum**, v. 28, n.3, p. 737, 2002.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13. ed. Whitehouse Station, N. J.: Merck e Co. Inc., 2001. p. 44.

METWALLY, M.E.S.; WALASH, M.I. Colorimetric and titrimetric determination of bisphosphonates in pharmaceutical preparations. **Mansoura Journal of Pharmaceutical Science**, v. 16, n. 1, p.14-22, 2000.

MEYYA, N.S.N. et al. Quantitative determination of alendronate sodium in pharmaceutical dosage forms and in bulk drug by spectrophotometry. **Indian Drugs**, v. 38, n. 9, p. 462-463, 2001.

MORENO, A. de H.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Potenciometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations. **Chemia Analityczna**, v. 49, p. 351-357, 2004.

OSTOVIC, D.; STELMACH, C.; BECKY, H. Formation of a chromophoric complex between alendronate and cooper (II) ions. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 3, p. 470-472, 1993.

PARFITT, K. Bone Modulating Drugs. In: _____. **Martindale: The complete drug reference**. 32 ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. p. 730 – 735.

PENG, S. X.; DANSEREAU, S. M. Ion-exchange liquid chromatographic analysis of bisphosphonates by on-line post-column photochemical reaction and spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 914, p. 105-110, 2001.

PENG, S. X. et al. Direct pharmaceutical analysis of bisphosphonates by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 709, p. 157-160, 1998.

PODOLSKA, M. et al. Complexometric determination of diphosphonic acid derivatives. Part II. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 57, n. 3, p.159-165, 2000.

PODOLSKA, M. et al. Analysis of selected diphosphonic acid derivatives used in treatment of osteoporosis. Part I. Complexometric determination of diphosphonic acid derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 54, n. 4, p. 267-272, 1997.

PROSINT. **Informacion de producto alendronato monosodico trihidrato**: método de análisis. Buenos Aires, 1997. 11 p.

PTÁČEK, P.; KLÍMA, J.; MACEK, J. Determination of alendronate in human urine as 9-fluorenylmethyl derivative by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 767, p.111-116, 2002.

QIN, X-Z. et al. Pharmaceutical application of liquid chromatography-mass spectrometry II. Ion chromatography-ion spray mass spectrometric characterization of alendronate. **Journal of Chromatography A**, v. 686, p. 205-212, 1994.

QUATTROCCHI, O. et al. Ion exchange chromatographic determination of olpadronate, phosphate, phosphite, chloride and methanesulfonic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 1011-1018, 2001.

RAFAEL G. P. **Espectroscopia de emissão ótica de plasma indutivamente acoplado**. Disponível em: <<http://www.myway.com.br/usuarios/rafagui/exp.htm>>. Acesso em: 8 ago. 2003.

RAZAK, O. A. et al. The utilization of cooper (II) phosphate for the anodic stripping voltammetric assay of alendronate sodium, desferrioxamine mesylate and lisinopril. **Talanta**, v. 59, p. 1061-1069, 2003.

REED, D. G. et al. The determination of alendronate sodium in tablets by inductively coupled plasma (ICP). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, p. 1055-1058, 1995.

SHRINER, R. L. et al. **The systematic identification of organic compounds**. 6. ed. Canadá: John Wiley & Sons, 1980. p. 242.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Espectrometria no ultravioleta. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 263-284.

SPARIDANS, R. W. et al. Derivatization of pamidronate and other amino(bis)phosphonates with different isothiocyanates prior to ion-pair liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 782, p. 211-217, 1997 a.

SPARIDANS, R. W. et al. Semi-automatic liquid chromatographic analysis of pamidronate in serum and citrate plasma after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate. **Journal of Chromatography B**, v. 705, p. 331-339, 1998.

SPARIDANS, R. W. et al. Chromatographic analysis of bisphosphonates. **Journal of Chromatography A**, v. 868, p.141-142, 2000.

SPARIDANS, R. W. et al. The determination of pamidronate in pharmaceutical preparations by ion-pair liquid chromatography after derivatization with phenylisothiocyanate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 491-497, 1997 b.

SPARIDANS, R. W.; HARTIGH, J.; VERMEIJ, P. High-performance ion-exchange chromatography with in-line complexation of bisphosphonates and their quality control in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, p. 1545-1550, 1995.

TAHA, E. A.; YOUSSEF, N. F. Spectrophotometric determination of some drugs for osteoporosis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 12, p.1444-1447, 2003.

TSAI, E.W. et al. Determination of bisphosphonate drugs in pharmaceutical dosage formulations by ion chromatography with indirect UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n. 8, p. 983-991, 1994.

TSAI, E. W.; IP, D. P.; BROOKS, M. A. Determination of alendronate in pharmaceutical dosage formulations by ion chromatography with conductivity detection. **Journal of Chromatography**, v. 596, p. 217-224, 1992.

TSAI, E. W. et al. Application of capillary electrophoresis to pharmaceutical analysis. Determination of alendronate in dosage forms. **Journal of Chromatography**, v. 626, p. 245-250, 1992.

UNITED States Pharmacopeia. Official monographs. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000. p. 700-701.

UNITED States Pharmacopeia. Official monographs. 28. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. p. 63-65.

VADE-MÉCUM. Índice farmacológico. São Paulo: Editora Metha, 2002-2003.1 CD-ROM.

VOGEL, A. I. **Química analítica qualitativa**. 5. ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981. p.386-392.

YEUNG, E. S. Indirect detection methods: looking for what is not there. **Accounts of Chemical Research**, v. 22, p.125-130, 1989.

ZUBATA, P. et al. A new HPLC method for azithromycine quantitation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 833-836, 2002.

APÊNDICE

ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA E DAS
AMOSTRAS DE MATÉRIA-PRIMA

SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA ALD-SR

MATÉRIA-PRIMA ALD-MP1

MATÉRIA-PRIMA ALD-MP2

MATÉRIA-PRIMA ALD-MP3

ANEXO I

TRABALHO EM CONGRESSO

Aplicações da Volumetria de Neutralização na Determinação Quantitativa do Alendronato de Sódio

Ana Ferreira Ribeiro¹ & Nádia Maria Volpato²

LabCQ – Departamento de Medicamentos – Faculdade de Farmácia – UFRJ

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Av. Brigadeiro Trompowsky, Prédio CCS, Bloco Bss sala 34 – CEP.: 21941-590 – Rio de Janeiro (RJ)

e-mail: ¹afribeiro@superig.com.br; ²volpato@pharma.ufrj.br

(Palavras-chave: Alendronato, titulação, controle da qualidade)

Introdução: O alendronato de sódio é um fármaco capaz de se ligar à matriz óssea humana e inibir sua reabsorção, sendo utilizado principalmente para o tratamento da osteoporose. Diversas metodologias para determinação quantitativa deste fármaco foram desenvolvidas, a maioria empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização do alendronato, envolvendo procedimentos trabalhosos e fases estacionárias menos usuais. A característica ácida da molécula também permite sua análise por volumetria de neutralização, a qual é uma técnica simples e que tem sido utilizada por laboratórios de menor porte no controle da qualidade do alendronato, embora possa apresentar falta de especificidade. **Objetivo:** Analisar os resultados obtidos pela volumetria de neutralização do alendronato em matéria-prima e produto acabado, definindo a correta aplicação deste simples método. **Método:** Quatro amostras de matéria-prima (MP) e lotes experimentais do produto acabado (LE) foram tituladas com NaOH 0,1 mol/L (solução volumétrica recém fatorada), determinando-se o ponto de equivalência potenciométricamente. As matérias-primas foram caracterizadas por meio de diversos testes qualitativos, para investigação de impurezas interferentes. Para a validação do método a medicamento manipulado, foram preparados quatro lotes experimentais da mistura de pós para cápsulas (contendo 80, 100 e 120% do conteúdo declarado de alendronato e um placebo), utilizando como excipientes lactose e aerosil. **Resultados:** Como pode ser apreciado na tabela 1, o lote de matéria-prima utilizado como referência apresentou teor dentro da especificação farmacopeica (USP 28, 2005), concordante com o obtido por método cromatográfico, enquanto as outras matérias-primas apresentaram resultados fora da especificação (98 – 102%). A titulação do lote placebo não mostrou interferência dos excipientes e a análise dos demais lotes experimentais resultou em boa recuperação e precisão (tabela 2).

Tabela 1 – Resultados do teor obtidos por volumetria de neutralização para as matérias-primas.

	SQR	MP1	MP2	MP3
Matérias primas analisadas				
Teor médio (%) (n = 12)	100,46	97,91	103,60	108,79
DPR inter-dia (%)	0,35	0,64	0,88	0,38

Onde SQ é amostra de alendronato de sódio (Merck) com pureza declarada de 99,6%.

Tabela 2 – Resultados do ensaio de recuperação, para o produto acabado (lotes experimentais).

LOTE	DIA	Recuperado (%)	DPR intra-dia (%)	DPR inter-dia (%)
LE80	1	100,67	0,39	
	2	100,33	0,27	0,24
LE100	1	100,91	0,40	
	2	100,02	0,40	0,62
LE120	1	100,94	0,67	
	2	99,88	0,26	0,75

Onde n = 6 (intra-dia), em dois dias de análise (n_{total} = 12).

Discussão e Conclusão: Os resultados encontrados na análise de duas matérias-primas sugerem a presença de impurezas de caráter ácido, as quais podem estar sendo responsáveis pelo erro positivo observado. No entanto, para a mistura de pós obtida com matéria-prima de teor conhecido, o método foi validado, demonstrando boa exatidão, precisão e seletividade. Concluiu-se, portanto, que a volumetria de neutralização pode ser aplicada com segurança na determinação do alendronato em medicamento manipulado, observada a não interferência dos excipientes da formulação. Mas o emprego da técnica na análise de matéria-prima deve ser cuidadosamente avaliado quanto à presença de impurezas interferentes, observando-se a necessidade de caracterizar adequadamente o produto, ou mesmo recorrer a outros métodos de análise.

Agradecimentos: À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida a A.F.R.

Área de Conhecimento: Controle da qualidade.

ANEXO II

ARTIGO PUBLICADO

