

ALENDRONATO DE SÓDIO: METODOLOGIAS PARA ANÁLISE QUANTITATIVA

Ana Ferreira Ribeiro e Nadia Maria Volpato*

Departamento de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, 21941-590 Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 14/4/04; aceito em 8/3/05; publicado na web em 30/6/05

SODIUM ALENDRONATE: METHODS FOR ANALYTICAL QUANTITATION. This paper presents a review of some published proposals for the analysis of sodium alendronate. The drug is an aminobisphosphonate compound used to inhibit the osteoclastic resorption of bone, and different methods were developed for its quantitative determination. These methodologies employed reversed-phase or ion-exchange HPLC analysis, both associated with different detectors: UV and fluorescence detection after derivatization of the drug, conductivity and refractive index detectors, as well as the indirect UV detection. Titrimetry and spectrophotometry (with previous complexation of the drug), which are simpler procedures, were also described, but they showed poor specificity when compared to liquid chromatography.

Keywords: sodium alendronate; HPLC analysis; derivatization.

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 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 uma farmacopéia¹ (farmacopéias são compêndios oficiais para análise de fármacos e medicamentos). As demais obras internacionais desta categoria, nas suas últimas edições, ainda não contêm metodologia recomendada para análise quantitativa do alendronato de sódio.

Tendo em vista a necessidade de se adotar uma metodologia analítica adequada para controle da qualidade do fármaco em questão, vários estudos propondo métodos para sua determinação quantitativa foram publicados. Grande parte das metodologias utiliza, para determinação do alendronato e de outros bisfosfonados semelhantes, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seja em fase reversa ou por troca iônica, associada a diversos métodos de detecção e, freqüentemente, emprega a derivatização da substância. Além destes estão descritos, em menor número, métodos mais simples para determinação do alendronato, tais como a espectrofotometria e a titulometria. Procedimentos utilizando técnicas menos empregadas no controle da qualidade de medicamentos, como o plasma de acoplamento indutivo e a voltametria de redissolução anódica, também foram publicados. Algumas destas propostas serão apresentadas e discutidas nesta revisão.

DESCRIÇÃO DO FÁRMACO

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 certa maleabilidade a este tecido. Assim como outros te-

cidos do corpo, o osso se mantém em constante renovação, possuindo células como os osteoblastos, responsáveis pela síntese e deposição de material protéico na 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 osteoporose e doença de Paget².

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 síntese de diversos outros bisfosfonados e avaliação de seus efeitos fisiológicos³.

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, se incorporam à matriz óssea, conferindo ao osso a dureza necessária para sua resistência compressional^{2,4}.

Desta forma, o fármaco é indicado para 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 hipercalemia associada ao neoplasma maligno do osso e no controle da remodelagem óssea desordenada que ocorre na doença de Paget^{4,5}.

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 no caso de tratamento prolongado com o etidronato⁴. Por outro lado, pode gerar algumas reações adversas, tais como

*e-mail: volpato@pharma.ufrj.br

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^{5,6}.

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 cálcio, magnésio e alumínio, geralmente presentes em complementos alimentares, repositores e antiácidos^{5,7}.

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^{5,6}.

Além disto, a elevada afinidade dos bisfosfonatos 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 antiinflamatórios⁸.

Características químicas

O alendronato de sódio, fármaco cujo nome químico é 4-amino-1-hidroxi-butano bisfosfonato de sódio (CAS: 121268-17-5), é derivado do ácido alendrônico (ácido 4-amino-1-hidroxi-butano 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 mesma⁵.

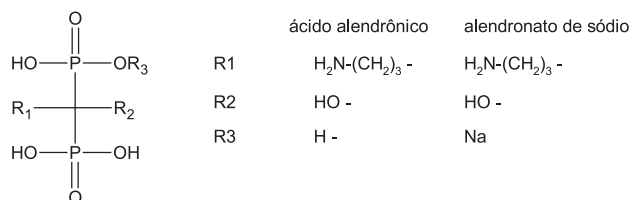


Figura 1. Estrutura geral dos bisfosfonatos: ácido alendrônico e alendronato monossódico. Adaptada das refs. 4 e 5

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 °C⁹.

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 ± 0,05; pK_{a2} = 8,73 ± 0,05; pK_{a3} = 10,5 ± 0,1; pK_{a4} = 11,6 ± 0,1¹⁰.

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 obtido⁹.

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^{11,12}.

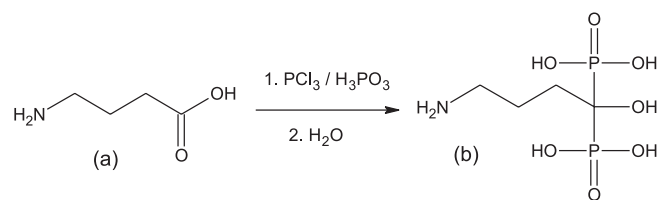


Figura 2. Síntese do ácido alendrônico (b) a partir do ácido 4-aminobutírico (a). Adaptada da ref. 9

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 1995¹³. No Brasil, o fármaco encontra-se 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^{6,7}. Em fevereiro de 2004 foi registrado, no país, o primeiro medicamento genérico fabricado pela empresa Biossintética (comprimidos de alendronato de sódio 10 mg)¹⁴. Há também uma formulação registrada sob forma de solução oral e outra, sob forma de cápsulas de gelatina mole¹⁵. Farmácias magistrais têm manipulado alendronato de sódio em cápsulas de gelatina dura.

MÉTODOS DESCRITOS PARA DETERMINAÇÃO DO ALENDRONATO

Métodos cromatográficos

A grande maioria das propostas para 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).

CLAE em fase reversa

Os métodos propostos para 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 bisfosfonatos não apresenta propriedades cromóforas¹⁶. 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 determinação do alendronato em formulações farmacêuticas faz uso da CLAE-FR, utilizando derivatização pré-coluna com 9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC) para detecção do fármaco¹⁷. Em 2002, uma proposta de monografia analítica empregando esta metodologia para análise quantitativa de matéria-prima foi encaminhada ao "Pharmacopeial Forum"¹⁸, objetivando publicação oficial no primeiro suplemento da USP 26 (compêndio oficial americano de 2003). Entretanto, a mesma não foi lançada e também não consta na edição de 2004 (USP 27)¹⁹. Provavelmente, não houve consenso entre os organizadores quanto à melhor metodologia a ser adotada pela Farmacopéia Americana.

De Marco e colaboradores¹⁷ realizaram a derivatização acres-

centando 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 min 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.

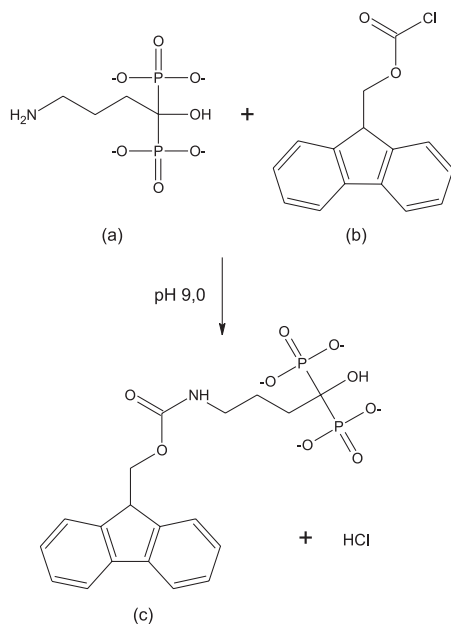


Figura 3. Reação de derivatização do alendronato (a) com 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC) (b), originando produto cromóforo (c) passível de detecção no UV. Adaptada da ref. 17

Após a reação de derivatização, faz-se necessário extrair com diclorometano o excesso de reagente (FMOC), o qual, se não for 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 à base de estireno divinilbenzeno para a análise cromatográfica. Esta apresentou maior estabilidade que as colunas convencionais de fase reversa, C-8 e C-18 à base de sílica, frente ao elevado pH da fase móvel utilizada (pH=8,0), o qual é 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 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 específico¹⁷.

Em outro estudo com CLAE em fase reversa²⁰, foi desenvolvido e validado um método para determinação do alendronato na urina, utilizando derivatização com 2,3-naftaleno dicarboxialdeído-cianida (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 estudo²¹ buscando fornecer uma metodologia com maior sensibili-

dade e que possibilitasse o uso de um reagente menos tóxico que o NDA-CN⁻, substituindo o íon cianida (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.

Neste mesmo estudo, além da DF, também foi explorada a detecção eletroquímica (DE) do derivado NDA-CN⁻, observada a eletroatividade do mesmo, empregando eletrodo de trabalho de carbono vítreo. 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 análise. O LQ encontrado foi de 2,5 ng/mL, demonstrando boa sensibilidade do método. A precisão (DPRs < 9%), exatidão e linearidade do método foram testadas e mostraram-se adequadas, para concentrações do fármaco entre 2,5 e 50,0 ng/mL²¹.

Recentemente foi descrita uma proposta para determinação de alendronato de sódio na urina (através da CLAE-FR) onde também foi empregada a derivatização com FMOC, mas usou-se detecção por fluorescência, selecionando os comprimentos de onda de 260 nm para a excitação do analito 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 à base de sílica em detrimento 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 realização das análises, com intuito de corrigir a variabilidade causada pela preparação das amostras biológicas. O 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 determinação do fármaco na urina²².

Um recurso muito utilizado na análise de compostos ionizáveis por CLAE-FR é a formação do par iônico. Como a fase estacioná-

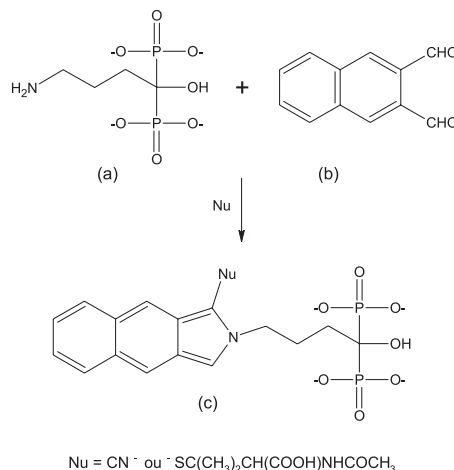


Figura 4. Derivatização do alendronato (a) com 2,3-naftaleno dicarboxialdeído (NDA) (b), originando o produto (c), de acordo com o nucleófilo empregado. Adaptada da ref. 21

ria 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 analito percorra a coluna como uma molécula neutra, melhorando sua interação com a fase estacionária e aumentando a seletividade do sistema.

Dentre os vários métodos descritos para análise de compostos bisfosfonados que empregam o pareamento iônico, um dos estudos 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 comprimidos²³.

Posteriormente foram descritas outras derivatizações para análise de um aminodifosfonado análogo ao alendronato (o pamidronato, ou 3-amino-1-hidroxipropilideno bisfosfonato)^{24,25}. 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 autores²⁶, 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. Também foi analisada a influência de diferentes contra-íons (utilizados para 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.

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 íon monovalente do alendronato na solução, o qual é menos retido pela coluna de troca iônica que o íon divalente, 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 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 por UV (derivatização pré-coluna com 9-fluorenilmetilcloroformato - FMO) e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos dois métodos, os quais puderam ser considerados equivalentes²⁷.

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 HNO_3 , 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 $\mu\text{g/mL}$, sendo comparável ao método com detecção indireta por ultravioleta, com LD de 1 $\mu\text{g/mL}$ ²⁸.

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 refração¹.

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 HNO_3 e nitrato de cobre II ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$). A capacidade de absorver radiação UV foi conferida pela formação de complexo cromóforo, obtido pela reação entre os fármacos e íons cúpricos (Cu^{2+}) presentes na fase móvel. A leitura da absorvância foi feita no comprimento de onda de 245 nm. Dentre os bisfosfonados analisados, o LD mais baixo (0,4 $\mu\text{g/mL}$) foi obtido para o pamidronato²⁹.

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 ($\lambda = 254 \text{ nm}$) 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 complexo de cor azul que é, então, detectado a um comprimento de onda de 750 nm. O método foi otimizado para determinação do ácido 2-tioetano-1,1-bisfosfônico em formulações farmacêuticas utilizando a eluição por gradiente. Esta metodologia apresenta vantagem frente à eluição isocrática por permitir a separação de produtos de degradação, obtidos nos ensaios de estabilidade do fármaco em condições de estresse³⁰.

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

FTC = feniltiocianato; Contra-íons: TEA = tetraetilamônio, THA = tetraexilamônio, TOA = tetraoctilamônio. Adaptada da ref. 26.

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 determinação de alendronato e outros bisfosfonados utilizando detecção indireta por ultravioleta. Estas metodologias baseiam-se na medida da diminuição da absorvância da fase móvel (contendo HNO_3) que ocorre pela presença do soluto (bisfosfonado)^{31,32}.

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o método não se mostrou adequado para detecção de produtos de degradação do alendronato em estudos de estabilidade³².

Uma outra proposta empregou derivatização pós-coluna e detecção indireta por fluorescência para determinação do alendronato e outros bisfosfonados em matrizes biológicas. Neste estudo foi usada uma coluna aniônica fortemente básica para 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-pentaidroxi-flavona, 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^+ torna-se 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 LD encontrado foi de 10 ng na coluna³.

Encontra-se também, na literatura, estudo para caracterização do alendronato onde se emprega a CLAE-TI e detecção por espectrometria de massas com electrospray³³.

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 hidroxila³⁴. Observando esta capacidade, Ostovic e colaboradores³⁵ 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 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 ex.) e a baixa solubilidade do complexo bisfosfonado – Cu^{2+} na presença de valores elevados de pH³⁵.

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)³⁶. 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 formação do complexo é de 1:1. Kuljanin e colaboradores³⁶ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (para um S/R = 3) e o LQ foi de 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 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 descritas³⁶.

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.

Métodos titulométricos

Da mesma maneira que a espectrofotometria, a titulometria consiste em um método simples e de baixo custo que pode ser aplicado para 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 dinitrilodioxileno-tetracetato de tório ($\text{Th}[\text{DCTA}]$) ou o etilenodiamino-tetracetato de tório ($\text{Th}[\text{EDTA}]$), sendo que o ponto final da titulação pode ser determinado utilizando-se indicadores visuais (laranja de xilenol ou azul de metil timol)^{37,38}.

A Farmacopéia Americana adota metodologia semelhante para determinação do etidronato, onde o fármaco é titulado pelo $\text{Th}(\text{DCTA})$

na presença do laranja de xilenol e o ponto final da titulação é caracterizado pela viragem do indicador a uma cor vermelho-violácea³⁹.

A volumetria de neutralização também foi proposta para determinação do alendronato de sódio em formulações farmacêuticas, aproveitando as propriedades ácidas da molécula⁴⁰. Foi utilizado como titulante NaOH 0,1 e 0,05 mol/L para análise de matéria-prima e produto acabado, respectivamente. Segundo os autores, o método mostrou-se 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 determinação quantitativa do alendronato de sódio^{11,12}. O método, entretanto, precisa ser melhor avaliado no que se refere à seletividade, quando da presença de impurezas de caráter ácido na matéria-prima.

Outros métodos

Metodologias menos comuns na rotina laboratorial farmacêutica também foram empregadas para 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”).

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 análise de moléculas carregadas eletricamente, o que torna este método bastante atraente para 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 à exigência de detecção sensível).

Tsai e colaboradores³⁴ desenvolveram uma metodologia para 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 HNO₃ 1,6 mmol/L e sulfato cúprico (CuSO₄ 2 mmol/L) e empregou-se a detecção direta do complexo formado entre alendronato e 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 por UV 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 padrão interno adequado resultou, como consequência, em menor precisão do método (DPR 2 – 5%)³⁴.

Outros métodos onde a EC é utilizada para determinação de compostos bisfosfonados foram descritos e empregam tanto a detecção direta por UV como a detecção por espectrometria de massas com electrospray⁴¹⁻⁴³.

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 Óptica ou a Espectrometria de Massas. Apesar de não ser um método de uso comum na rotina laboratorial, seu emprego na análise de substân-

cias farmacêuticas vem aumentando, já havendo descrição de sua utilização na quantificação do etidronato (como método de detecção acoplado à CLAE-TI)^{44,45}. 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 amostra⁴⁵.

Reed e colaboradores⁴⁴ desenvolveram metodologia para 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)⁴⁴.

Voltametria de redissolução anódica

A voltametria de redissolução é um método extremamente sensível, utilizado para 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 eletrodo⁴⁶.

Recentemente, Razac e colaboradores⁴⁷ desenvolveram metodologia para determinação 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 (Cu²⁺) e o complexo formado depositou-se na superfície do eletrodo, sob ação de um potencial de deposição de -1100 mV. Para a redissolução foi utilizada a técnica de pulso diferencial (DPASV), a qual é um tipo de voltametria de redissolução que apresenta elevada sensibilidade. Durante o estudo foram analisadas 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 (Cu₃(PO₄)₂), utilizado na complexação, não interfere na análise, pois este reagente é fracamente solúvel e mesmo pequenos níveis de Cu²⁺ residuais não prejudicam a detecção do complexo. O método foi considerado linear na faixa de 0,1 a 0,3 µg/mL, preciso (DPRs < 2%), exato e apresentou alta sensibilidade, com um LD igual a 8,6 ng/mL e um LQ igual a 29 ng/mL⁴⁷.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos anos 90 foram publicadas diversas metodologias analíticas para determinação quantitativa do alendronato de sódio, a maioria delas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência.

A CLAE-FR, associada a diferentes formas de detecção (principalmente ultravioleta e fluorescência), apresentou os melhores resultados quanto à sensibilidade, com limites de quantificação de até 1 ng/mL, mostrando-se, portanto, bastante adequada para determinação do alendronato em matrizes biológicas, considerando-se a biodisponibilidade extremamente reduzida deste fármaco. No entanto, como a molécula não apresenta absorção na região do UV ou capacidade de emitir fluorescência, deve sofrer derivatização previamente à detecção, com procedimentos extensivos, tornando a execução complexa e demorada.

As metodologias empregando a CLAE-TI parecem ser de execução mais simples e mostraram-se alternativas adequadas para determinação de um composto iônico, como o alendronato, em formulações. No entanto, alguns detectores utilizados nas análises com CLAE-TI são menos comuns nos laboratórios e podem ser de difícil manuseio. Além disto, apresentaram sensibilidade reduzida em relação aos métodos com CLAE-FR, sendo o menor limite de quantificação alcançado de 0,4 µg/mL. A detecção indireta por ultravioleta utiliza detector de uso mais comum e requer procedimentos mais simples, mas fornece elevado limite de detecção, prejudicando a sensibilidade do método.

Técnicas menos empregadas na rotina laboratorial farmacêutica também mostraram-se adequadas para determinação do alendronato em formulações. O plasma de acoplamento indutivo é de execução simples, a voltametria de redissolução anódica apresentou elevada sensibilidade e a EC, boa resolução dos picos. A principal desvantagem destes procedimentos é a utilização de equipamentos menos comuns quando comparados à CLAE.

A espectrofotometria e a titulometria constituem métodos mais simples para determinação do alendronato, mas poucos estudos envolvendo estas metodologias foram encontrados na literatura. Normalmente, apresentam limitações quanto à especificidade, podendo apresentar erros resultantes da presença de impurezas e produtos de degradação, além de serem métodos pouco sensíveis. Ainda assim, alguns laboratórios utilizam a volumetria de neutralização para as análises do controle de qualidade do fármaco.

Assim, a análise quantitativa de compostos bisfosfônicos, como o alendronato, necessita maiores estudos, não apenas visando o desenvolvimento de novos métodos, mas também documentando cientificamente metodologias não oficiais, rotineiramente empregadas nos laboratórios farmacêuticos que, mostrando-se adequadas e validadas, poderiam ser adotadas pela Farmacopéia Brasileira ou compêndios oficiais estrangeiros.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de mestrado recebida por A. F. Ribeiro.

REFERÊNCIAS

1. *Farmacopéia Portuguesa VII*; 7ª ed., Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento: Lisboa, 2002 (CD-ROM).
2. Guyton, A. C.; *Fisiologia Humana*, 6ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1988, cap. 36.
3. Lovdahl, M. J.; Pietrzyk, D. J.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *850*, 143.
4. Marcus, R. Em *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W.; Gilman, A. G., eds.; 9ª ed., McGraw-Hill: Rio de Janeiro, 1996, cap. 61.
5. Parfitt, K.; *Martindale. The complete drug reference*, 32ª ed., Pharmaceutical Press: London, 1999.
6. *DEF 2000/01. Dicionário de Especialidades Farmacêuticas*; 29ª ed., Publicações Científicas: Rio de Janeiro, 2000.
7. *P.R. Vade-mécum*, Edição: 2002/2003, Ed. Metha: São Paulo, 2002 (CD-ROOM).
8. Castro, L. F.; Silva, A. T. A.; Chung, M.; Ferreira, A. G.; Ferreira, E. I.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 456.
9. Kieczkowski, G. R.; Jobson, R. B.; Melillo, D. G.; Reinhold, D. F.; Grenda, V. J.; Shinkai, I.; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8310.
10. *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*; 13ª ed., Merck e Co. Inc.: Whitehouse Station, New Jersey, 2001.
11. CIPLA kurkumbh; *Finished Product Specification. Test and methods. Alendronate sodium trihydrate*, 1999.
12. PROSINT srl; *Informacion de Producto. Alendronate monosodico trihidrato. Método de Análisis*, Buenos Aires, 1997.
13. McCarthy, M.; *The Lancet* **1995**, *346*, 1028.
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 37, de 05/02/2004.
15. <http://www.consultaremedios.com.br>, acessada em Dezembro 2004.
16. Sparidans, R. W.; Hartigh, J.; Cremers, S.; Vermeij, P.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *868*, 141.
17. De Marco, J. D.; Biffar, S. E.; Reed, D. G.; Brooks, M. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1989**, *7*, 1719.
18. Medjedovic, A.; *Pharmacoepial Forum* **2002**, *28*, 737.
19. *United States Pharmacopeia*; 27ª ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004.
20. Kline, W. F.; Matuszewski, B. K.; Bayne, W. F.; *J. Chromatogr.* **1990**, *534*, 139.
21. Kline, W. F.; Matuszewski, B. K.; *J. Chromatogr.* **1992**, *583*, 183.
22. Ptáček, P.; Klíma, J.; Macek, J.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **2002**, *767*, 111.
23. Kwong, E.; Chiu, A. M.; McClintock, S. A.; Cotton, M. L.; *J. Chromatogr. Sci.* **1990**, *28*, 563.
24. Sparidans, R. W.; Hartigh, J.; Ramp-Koopmanschap, W. M.; Langebroek, R. H.; Vermeij, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *16*, 491.
25. Sparidans, R. W.; Hartigh, J.; Beijnen, J. H.; Vermeij, P.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *705*, 331.
26. Sparidans, R. W.; Hartigh, J.; Beijnen, J. H.; Vermeij, P.; *J. Chromatogr. A* **1997**, *782*, 211.
27. Tsai, E. W.; Ip, D. P.; Brooks, M. A.; *J. Chromatogr.* **1992**, *596*, 217.
28. Han, Y. R.; Qin, X.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *719*, 345.
29. Sparidans, R. W.; Hartigh, J.; Vermeij, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1995**, *13*, 1545.
30. Peng, S. X.; Dansereau, S. M.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *914*, 105.
31. Quattrocchi, O.; Frisardi, L.; Iglesias, M.; Noya, M.; Caputto, M.; Damián, F.; Siliprandi, D.; Piccini, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *24*, 1011.
32. Tsai, E. W.; Chamberlin, S. D.; Forsyth, R. J.; Bell, C.; Ip, D. P.; Brooks, M. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1994**, *12*, 983.
33. Qin, X.; Tsai, E. W.; Sakuma, T.; Ip, D. P.; *J. Chromatogr. A* **1994**, *686*, 205.
34. Tsai, E. W.; Singh, M. M.; Lu, H. H.; Ip, D. P.; Brooks, M. A.; *J. Chromatogr.* **1992**, *626*, 245.
35. Ostovic, D.; Stelmach, C.; Becky, H.; *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 470.
36. Kuljanin, J.; Jankovic, I.; Nedeljkovic, J.; Prstojevic, D.; Marinkovic, V.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *28*, 1215.
37. Podolska, M.; Bialecka, W.; Kwiatkowska-Puchniarz, B.; Tuszyńska, E.; *Acta Poloniae Pharmaceutica* **1997**, *54*, 267.
38. Podolska, M.; Bialecka, W.; Kwiatkowska-Puchniarz, B.; *Acta Poloniae Pharmaceutica* **2000**, *57*, 159.
39. *United States Pharmacopeia*; 24ª ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000.
40. Bueno, F.; Bergold, A. M.; *Acta Farm. Bonaerense* **2000**, *19*, 129.
41. Peng, S. X.; Takigiku, R.; Burton, D. E.; Powell, L. L.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *709*, 157.
42. Huikko, K.; Kostianen, R.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *872*, 289.
43. Huikko, K.; Kostianen, R.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *893*, 411.
44. Reed, D. G.; Martin, G. P.; Konieczny, J. M.; Brooks, M. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1995**, *13*, 1055.
45. <http://www.myway.com.br/usuarios/rafagui/exp.htm>, acessada em Agosto 2003.
46. <http://www.epsilon-web.net/Ec/manual/Techniques/Stripping/stripping.html>, acessada em Julho 2003.
47. Razak, O. A.; Belal, S. F.; Bedair, M. M.; Haggag, R. S.; *Talanta* **2003**, *59*, 1061.