



# Considerações sobre a determinação quantitativa de alendronato de sódio: titulometria x cromatografia

Ribeiro, A.F.<sup>1\*</sup>; Volpato, N.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário FIEO, UNIFIEO, Osasco, SP.

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Recebido 04/10/2009 / Aceito 23/04/2010

## RESUMO

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), com a derivatização do fármaco para poder empregar detectores de ultravioleta. Também há relatos sobre metodologias mais simples para a análise do alendronato, utilizando titulometria ou análise espectrofotométrica. Neste trabalho foi avaliado o emprego da titulometria de neutralização na determinação quantitativa do alendronato de sódio em três lotes de matéria-prima, utilizando NaOH 0,1 M como titulante. Os resultados obtidos na titulometria foram comparados aos encontrados em método cromatográfico de referência (CLAE com derivatização por 9-fluorenilmetilcloroformato ou FMOC), descrito na Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia), os quais apresentaram valores estatisticamente diferentes. Ensaio para a caracterização das amostras também foram realizados e foi observado comportamento distinto das 3 matérias-primas em relação à substância de referência (padrão secundário). O método titulométrico apresentou adequada precisão, mas não mostrou especificidade para a determinação das matérias-primas, embora possa ser validado para determinação do fármaco em produto acabado.

*Palavras-chave:* Alendronato. Titulação ácido-base. Cromatografia. Derivatização.

## INTRODUÇÃO

O alendronato de sódio (4-amino-1-hidroxibutano bisfosfonato de sódio) é um composto aminodifosfonado obtido pela neutralização do ácido alendrônico (ácido 4-amino-1-hidroxibutano bisfosfônico), cuja síntese

envolve a reação do ácido 4-aminobutírico (GABA) com ácido fosforoso e tricloreto de fósforo (Figura 1) (Kieczkowski et al., 1995). A grande afinidade desta substância pela matriz óssea humana permite sua fixação ao tecido e a inibição da reabsorção mediada por osteoclastos, sendo assim um fármaco bastante utilizado no tratamento de desordens relacionadas ao tecido ósseo, como é o caso da osteoporose (Marcus, 1996).

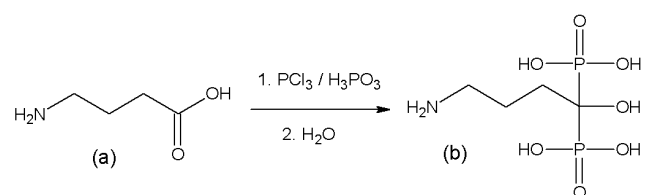


Figura 1 – Síntese do ácido alendrônico (b), onde (a) é o ácido 4-aminobutírico (GABA).

Várias empresas no Brasil têm fabricado medicamentos contendo alendronato de sódio triidratado (Figura 2), utilizando matéria-prima de diversas origens, principalmente asiática. Grande parte das formas farmacêuticas existentes no mercado consiste em comprimidos com doses do sal equivalentes a 5, 10 e 70 mg de ácido alendrônico (Vade-Mécum, 2003) já havendo registro de medicamento genérico no país (ANVISA, 2004). Farmácias magistrais também têm manipulado alendronato de sódio em cápsulas de gelatina dura.

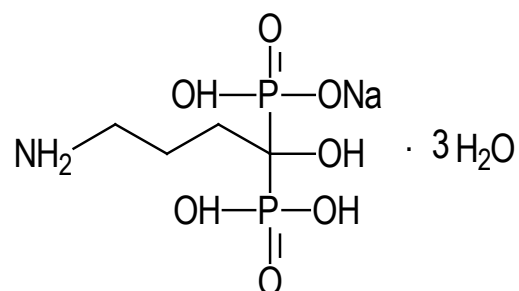


Figura 2 – Fórmula estrutural do alendronato de sódio triidratado.

*Autor correspondente:* Ana Ferreira Ribeiro - Curso de Farmácia - Centro Universitário FIEO - UNIFIEO - Avenida Franz Voegeli, 300 - Vila Yara CEP.06020-190 - Osasco - SP - telefone: (11)3651-9999 e-mail: anaribeiro.unifieo@hotmail.com

A necessidade de se adotar uma metodologia adequada para o controle da qualidade do fármaco, levou ao desenvolvimento de diversos métodos para sua análise quantitativa. A maioria utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência, seja em fase reversa (CLAE-FR) ou por troca iônica (CLAE-TI), para determinação do alendronato e de outros bifosfonados semelhantes em formulações ou em meios biológicos (Ribeiro & Volpato, 2005; Zacharis & Tzanavaras, 2008). Um dos primeiros métodos publicados para a determinação do alendronato em formulações farmacêuticas utiliza derivatização pré-coluna com 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC) para detecção do fármaco ao ultravioleta na CLAE-FR (De Marco et al., 1989), face à reduzida absorvidade do composto. Metodologia semelhante foi lançada posteriormente na Farmacopéia Americana, na edição de 2005 (United States Pharmacopeia, 2005).

Outras técnicas empregando a CLAE-FR com derivatização do fármaco foram desenvolvidas, utilizando detectores de UV (El-Sattar et al., 2003; Al Deeb et al., 2004), de fluorescência (Kwong et al., 1990; Kline et al., 1990; Kline & Matuszewski, 1992; Sparidans et al., 1997; Ptáček et al., 2002; Pérez-Ruiz et al., 2009) e eletroquímico (Kline & Matuszewski, 1992). Além destes, estão descritos métodos para a determinação do alendronato através da CLAE-TI associada a detectores de condutividade (Tsai et al., 1992a), índice de refração (Han & Qin, 1996), ultravioleta (Peng & Dansereau, 2001; Sparidans et al., 1995; Tsai et al., 1994) e fluorescência (Lovdahl & Pietrzyk, 1999). Procedimentos utilizando a eletroforese capilar (Tsai et al., 1992b) e técnicas menos empregadas no controle da qualidade de medicamentos, como o plasma de acoplamento indutivo (Reed et al., 1995) e a voltametria de redissolução anódica (Razak et al., 2003) também foram publicados.

Devido à complexidade das técnicas cromatográficas envolvendo procedimentos de derivatização ou o uso de equipamentos menos comuns na rotina laboratorial farmacêutica, foram propostos métodos mais simples para determinação do alendronato, tais como a espectrofotometria (Ostovic et al., 1993; Metwally & Walsh, 2000; Meyya et al., 2001; Kuljanin et al., 2002; Taha & Youssef, 2003) e a titulometria (Podolska et al., 1997; Podolska et al., 2000; Bueno & Bergold, 2000; Moreno et al., 2004). A característica ácida da molécula permite sua análise por titulometria de neutralização, a qual é uma técnica simples e que tem sido utilizada por laboratórios de menor porte no controle da qualidade do alendronato. No entanto, tal técnica freqüentemente apresenta pouca especificidade e produz resultados inadequados, os quais foram avaliados neste trabalho através da comparação com método cromatográfico de referência, objetivando-se definir a correta aplicabilidade do método titulométrico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Insumos farmacêuticos e reagentes

Dois lotes de alendronato de sódio triidratado (matérias-primas ALD-MP1 e ALD-MP3) foram adquiridos da empresa DEG<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil), e um lote (ALD-MP2)

da empresa Purifarma<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). Alendronato de sódio triidratado de pureza conhecida (99,6%) foi doado pela empresa Merck<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil) e utilizado como substância de referência (ALD-SR).

Para a cromatografia líquida foram utilizados solventes de grau CLAE adquiridos da empresa Tedia<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil). Os reagentes 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC) e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) foram adquiridos da empresa Sigma<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil). Fosfato dibásico de sódio anidro, citrato de sódio diidratado, diclorometano, ácido acético glacial e hidróxido de sódio foram obtidos da empresa Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil). Os demais reagentes de grau analítico foram adquiridos da empresa Merck<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil).

### Caracterização dos insumos farmacêuticos

#### *Espectrometria no infravermelho*

Foram preparadas pastilhas de brometo de potássio 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  $\text{cm}^{-1}$  (Farmacopéia Portuguesa, 2002).

#### *Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC)*

Para a análise termogravimétrica, as amostras de alendronato de sódio foram levadas à termobalança (Mettler Toledo – TGA/SDTA851) e submetidas a varredura de 25 a 1000°C, com velocidade de aquecimento de 10°C/min. Para a análise por DSC foi empregada varredura de 25 a 300°C e velocidade de aquecimento de 1°C/min, utilizando calorímetro Mettler Toledo – DSC822<sub>e</sub>.

#### *Perda por dessecação*

Aproximadamente 1 g de cada amostra foi levado à estufa (Quimis – Q 3178 SE), regulada em 140°C, até peso constante (por aproximadamente 2 horas) (Farmacopéia Portuguesa, 2002).

#### *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  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), nas concentrações de 10, 20, 30, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (correspondendo a, respectivamente, 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1% de GABA na amostra). Foram aplicados 10  $\mu\text{L}$  das soluções em placa cromatográfica de gel de sílica 60 F<sub>254</sub>, utilizando a fase móvel metanol : água : ácido acético glacial (80:18:2) para eluição por percurso de 10 cm. A placa foi aspergida com solução alcoólica de ninhidrina 0,1% p/V (solução reveladora) e levada à estufa a 100°C por 5 minutos (Prosint, 1997).

#### *Determinação de fosfito*

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 1,7 M : ácido acético glacial (80 : 20 V/V) e 15 mL de solução de cloreto mercúrico 3% p/V. As amostras foram levadas à estufa regulada entre 30 e 45°C, durante 2 horas. Em seguida foram filtradas 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 de cloreto mercuroso ( $Hg_2Cl_2$ ) formado foi levado à estufa regulada a  $100 \pm 5^\circ C$ , durante 2 horas, para posterior pesagem do material (Prosint, 1997). A determinação do percentual de fosfitos foi realizada considerando-se a presença de fosfito monossódico na amostra.

### Determinação do teor das matérias-primas por titulometria

Pesou-se, exatamente, cerca de 200 mg de cada amostra de alendronato de sódio, que foram dissolvidos em aproximadamente 60 mL de água recém destilada e levados ao ultra-som por 2 minutos, com agitação manual. A solução foi levada ao titulador automático (Mettler – DL25) provido de eletrodo de vidro (Digimed – DME CV1), procedendo-se à titulação com NaOH 0,1 M e determinação potenciométrica do ponto de equivalência.

### Determinação do teor das matérias-primas por CLAE-FR com derivatização

#### Preparo das amostras e reagentes

Solução-estoque contendo 625  $\mu g/mL$  de alendronato de sódio foi preparada, diluindo-se cerca de 62,5 mg de ALD-SR em 100 mL de solução de citrato de sódio 0,1 M. A partir da solução-estoque, foram obtidas 5 diluições com concentrações entre 50 e 150  $\mu g/mL$  (com mesmo solvente). As amostras de matéria-prima (ALD-MP1, ALD-MP2 e ALD-MP3) foram diluídas em solução de citrato de sódio 0,1 M de modo a fornecer soluções de alendronato de sódio na concentração de 100  $\mu g/mL$ .

O preparo dos reagentes utilizados (solução tampão de citrato 0,05 M / fosfato 0,05 M – pH 8,0; solução de borato de sódio 0,1 M; solução de citrato de sódio 0,1 M; solução de FMOC 0,5% em acetonitrila) e os procedimentos analíticos adotados foram baseados no artigo descrito por De Marco (1989) e na metodologia publicada na Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia, 2005).

#### Procedimento de análise (derivatização e extração):

As soluções e reagentes descritos na Tabela 1 foram adicionados a tubos de centrifuga de polipropileno com tampa e capacidade para 50 mL, seguindo o procedimento esquematizado na Figura 3. Para realização do branco, a solução de alendronato foi substituída por solução de citrato 0,1 M. O teor das matérias-primas ALD-MP1, ALD-MP2 e ALD-MP3 foi calculado pelo método do padrão externo, utilizando-se um nível da curva de calibração do padrão ALD-SR, na concentração de trabalho de 100  $\mu g/mL$ .

Tabela 1 – Quantidade de soluções e reagentes adicionados ao tubo de centrífuga para derivatização do alendronato de sódio com FMOC.

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
Diclorometano	25 mL	25 mL

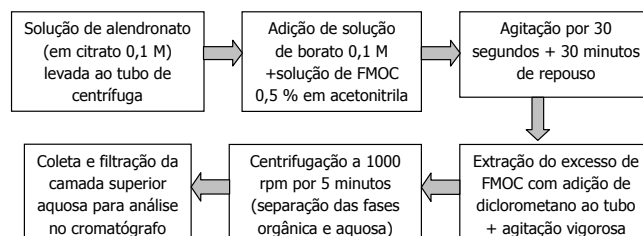


Figura 3 – Procedimento adotado para derivatização do alendronato e extração do excesso de reagente (FMOC) adicionado.

Com o objetivo de se avaliar a linearidade e a precisão do método, triplicatas da solução-estoque e respectivas diluições (entre 50 e 150  $\mu g/mL$ ) de ALD-SR foram preparadas e analisadas em dois dias consecutivos ( $n = 6$ , para cada nível da curva de calibração).

#### Condições do sistema cromatográfico

A análise foi executada em cromatógrafo a líquido Shimadzu composto de 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. Foi empregada coluna C18 da Waters, modelo  $\mu$ Bondapak (3,9 x 300 mm), contendo partículas de 10  $\mu m$ . Como fase móvel foi utilizada uma mistura de tampão citrato 0,05 M / fosfato 0,05 M (pH 8,0), acetonitrila e metanol na proporção de 75 : 20 : 5 (V/V), a um fluxo de 1,2 mL/min. O volume de injeção foi de 20  $\mu L$  e o comprimento de onda para a detecção de 266 nm.

## RESULTADOS

### Caracterização dos insumos farmacêuticos

Na espectrometria no infravermelho, todas as amostras apresentaram espectros semelhantes ao da substância química de referência (ALD-SR), cujo perfil de absorção pode ser visualizado na Figura 4, não tendo sido evidenciadas distorções apreciáveis no traçado dos espectros das matérias-primas.

A análise calorimétrica por DSC não revelou o exato ponto de fusão dos materiais (o qual se mostra em torno de  $250^\circ C$ ), já que o evento exotérmico gerado pela decomposição das amostras (Figura 5-A) não permitiu a definição clara da endoterma resultante da fusão.

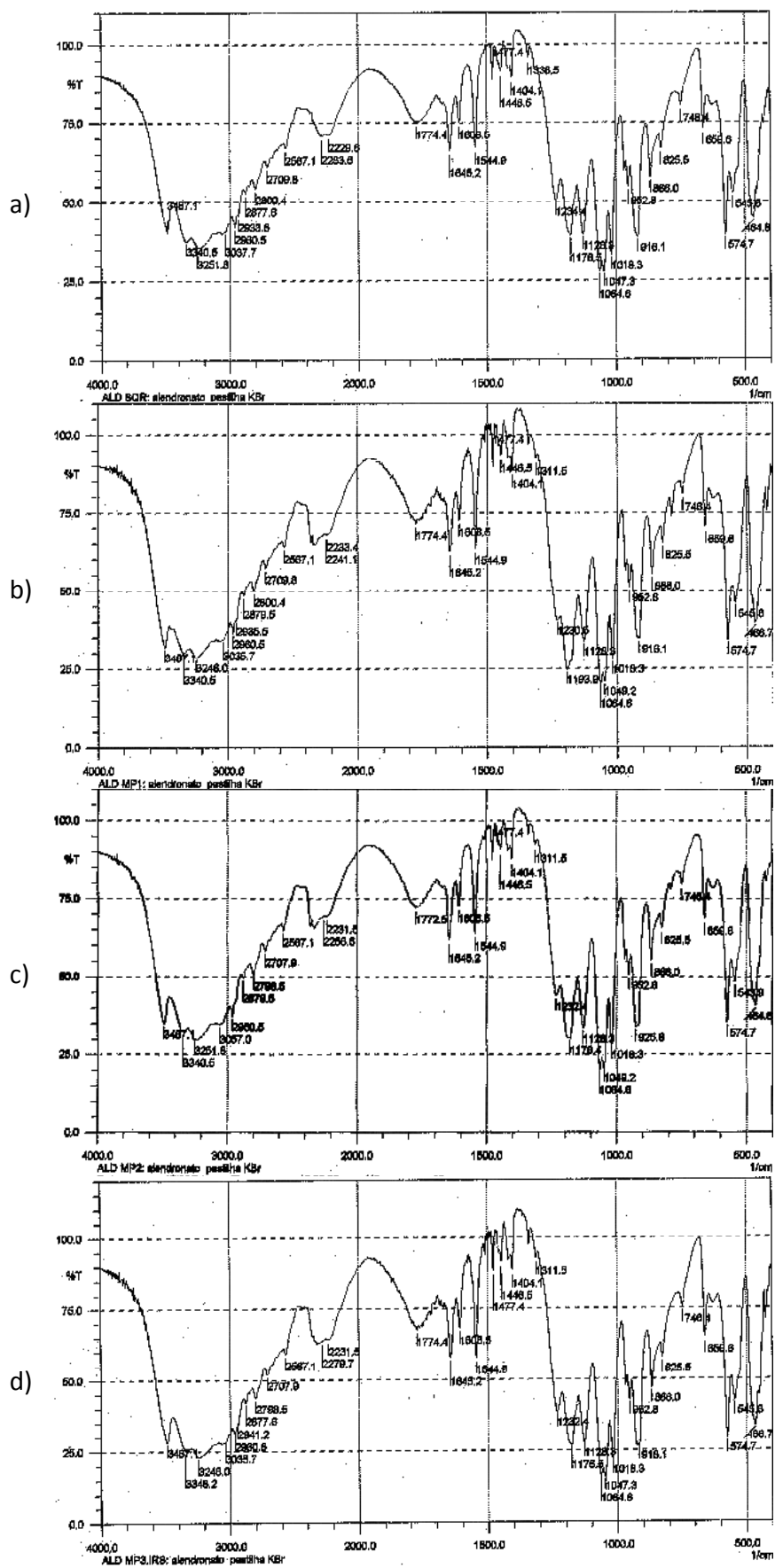


Figura 4 – Espectro de infravermelho das amostras: a) ALD-SR; b) ADL-MP1; c) ALD-MP2; d) ALD-MP3.



A análise calorimétrica por DSC não revelou o exato ponto de fusão dos materiais (o qual se mostra em torno de 250°C), já que o evento exotérmico gerado pela decomposição das amostras (Figura 5-A) não permitiu a definição clara da endoterma resultante da fusão.

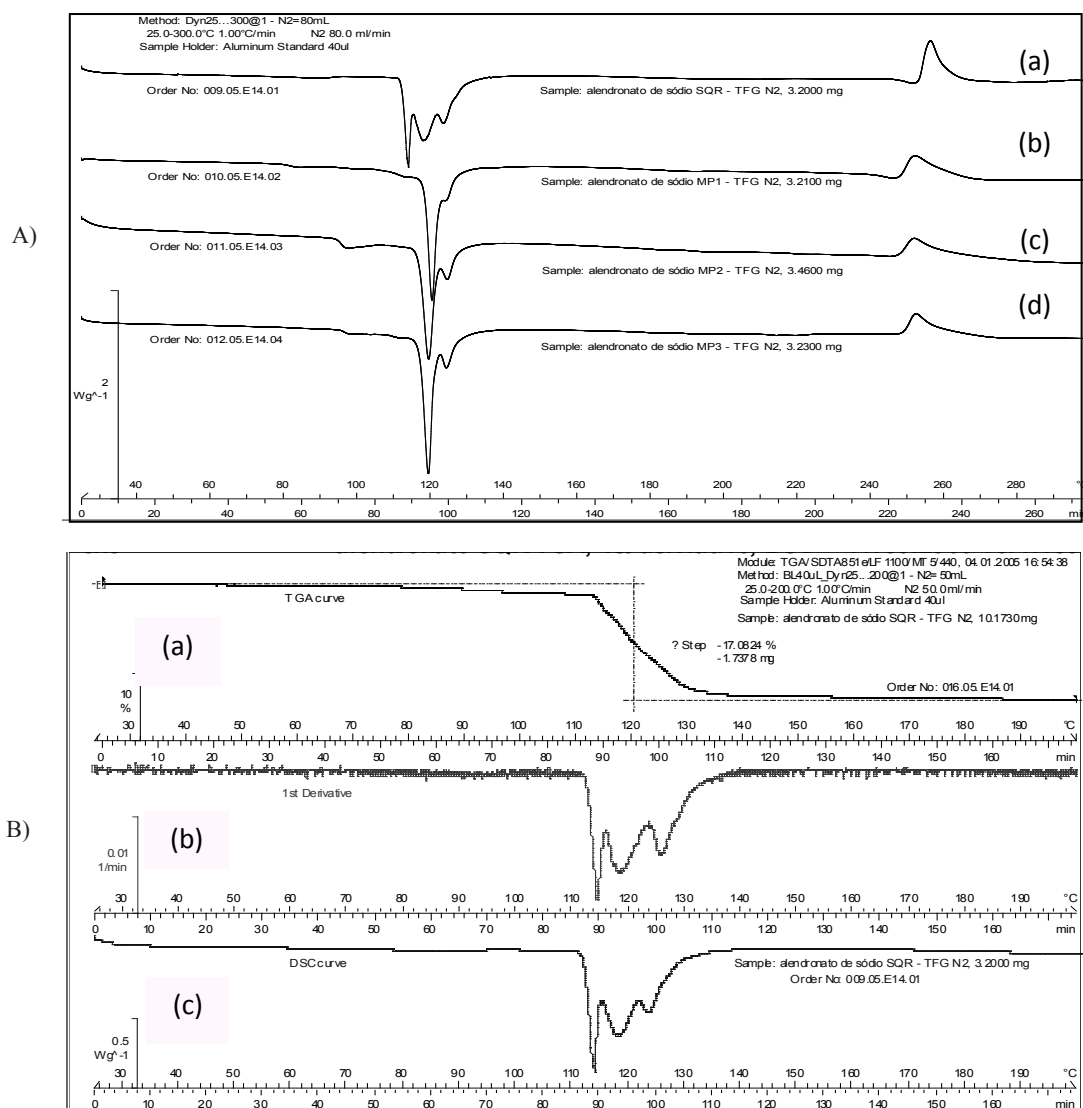


Figura 5 – A) Curva de DSC das matérias-primas ALD-SR (a), ALD-MP1 (b), ALD-MP2 (c) e ALD-MP3 (d). B) Curva de TGA da matéria-prima ALD-SR (a), 1ª derivada correspondente (b) e DSC da amostra (c).

Os resultados encontrados nos ensaios de perda por dessecação, TGA, CCD e determinação de fosfito podem ser visualizados na Tabela 2. Os resultados obtidos na perda por dessecação foram concordantes com os encontrados através da análise termogravimétrica. Apenas a amostra de ALD-SR apresentou percentual dentro do especificado por compêndio oficial, ou seja, entre 16,1 e 17,1% (Farmacopéia Portuguesa, 2002). As demais amostras forneceram valores inferiores ao limite mínimo.

Tabela 2 – Resultados dos testes para caracterização das amostras de alendronato de sódio.

Matéria – Prima	Teste / Ensaio			
	Perda por dessecação (%)	TGA (%)	CCD (% GABA)	% de fosfito monossódico
ALD-SR	16,55	16,57	Não visualizado	0
ALD-MP1	15,47	15,58	0,1 a 0,2	0,52
ALD-MP2	15,68	15,86	Não visualizado	0,22
ALD-MP3	15,91	15,81	Não visualizado	0,05

O percentual de fosfito monossódico foi determinado de acordo com o seguinte cálculo: (massa do precipitado / massa da amostra) x (massa molar do fosfito monossódico / massa molar  $Hg_2Cl_2$ ) x 100. Foi observado que, com exceção da amostra de ALD-SR, todas as matérias-primas apresentaram reação positiva para fosfitos (Tabela 2).

Apenas a matéria-prima ALD-MP1 apresentou mancha rósea característica de GABA ( $R_f = 0,5$ ), embora em concentração abaixo do limite especificado de 0,5% (Farmacopéia Portuguesa, 2002), como observado na Figura 6.

#### Determinação do teor das matérias-primas

A Figura 7 mostra a curva de titulação obtida para análise do alendronato de sódio, a qual apresentou apenas uma inflexão.



Figura 6 – CCD das amostras de alendronato de sódio triidratado. Onde a = ALD-SR; b = ALD-MP2; c = ALD-MP1; letras d até h = GABA 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1% (respectivamente); i = ALD-MP3

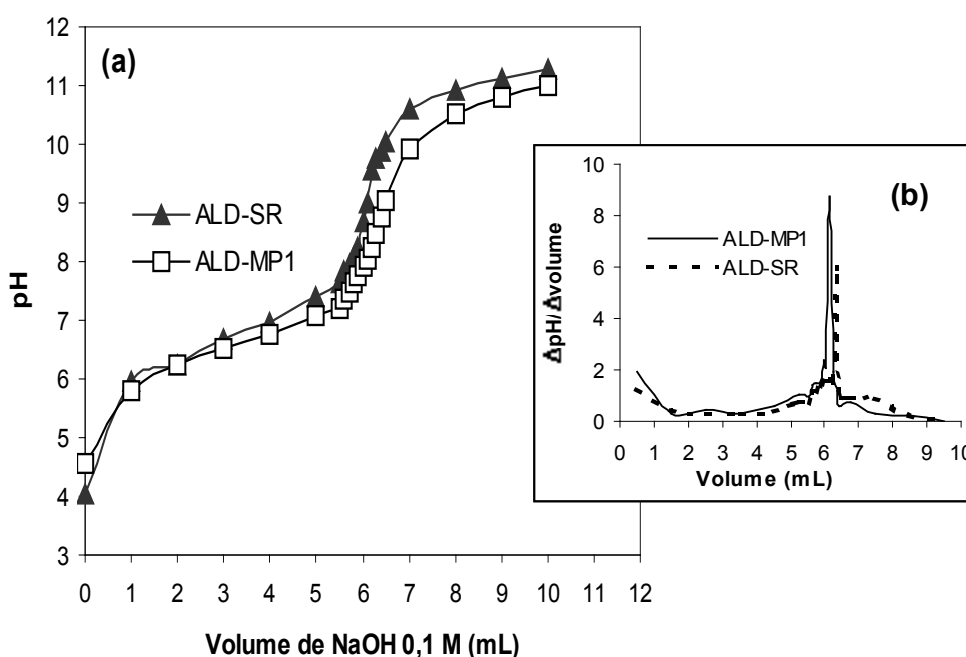


Figura 7 – Curvas de titulação das matérias-primas ALD-SR e ALD-MP1. (a)-Medidas de pH em função do volume de NaOH 0,1 M adicionado; (b)-Primeira derivada das curvas do gráfico “a”.

Como pode ser observado na Tabela 3, a análise titulométrica revelou adequada repetibilidade, com valores de desvio padrão relativo (DPR) menores que 1% para todas as matérias-primas. De outro lado, as amostras ALD-MP2 e ALD-MP3 apresentaram resultados para teor acima da faixa de 98 a 102%, especificada em monografia oficial (Farmacopéia Portuguesa, 2002; United States Pharmacopeia, 2005).

Tabela 3 – 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 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.

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.

Na avaliação do método cromatográfico de referência quanto à precisão (Tabela 4), 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 disso, o método apresentou linearidade adequada, visto que o coeficiente de correlação obtido mostrou-se dentro do valor recomendado pela legislação vigente, ou seja, acima de 0,99 (ANVISA, 2003).

Na Figura 8 pode ser observado o cromatograma obtido na análise do alendronato de sódio, empregando a metodologia oficial (United States Pharmacopeia, 2005)

com pequena adaptação nas condições cromatográficas (utilização de fase estacionária C18, em lugar de fase estacionária polimérica a base de estireno divinilbenzeno).

Tabela 4 – Avaliação da precisão e da linearidade do método de referência (CLAE com FMOC).

PARÂMETRO	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)						
	50	75	100	125	150		
Precisão (DPR)	% Intra-dias	Dia 1	1,86	2,12	0,59	0,37	0,20
		Dia 2	1,34	1,47	0,85	0,78	1,22
	% Inter-dias	1,50	2,14	0,81	1,86	1,14	
Intercepto (a)			-55211,97 ± 19029,82 *				
Inclinação (b)		Média ± EP	22171,35 ± 179,04 **				
Coefficiente de correlação (r)			0,9991 ± 0,0001 **				

Onde:  $y = a + bx$ ; EP = Erro Padrão; (\*)  $P = 0,007$ ; (\*\*)  $P < 0,01$ .

## DISCUSSÃO

A caracterização das amostras revelou comportamento distinto das matérias-primas ALD-MP1, ALD-MP2 e ALD-MP3 em relação à substância de referência (ALD-SR), no que se refere aos ensaios para determinação de fosfito monossódico, perda por dessecação e análise termogravimétrica.

Na análise da amostra de ALD-SR pode ser observada a ocorrência de três eventos endotérmicos próximos à temperatura de 120°C, diferindo do perfil encontrado para as matérias-primas ALD-MP1, ALD-MP2 e ALD-MP3 (Figura 5-A). Tal ocorrência foi resultante apenas da liberação da água de hidratação da molécula, não se devendo à presença de impurezas, como sugerido pela

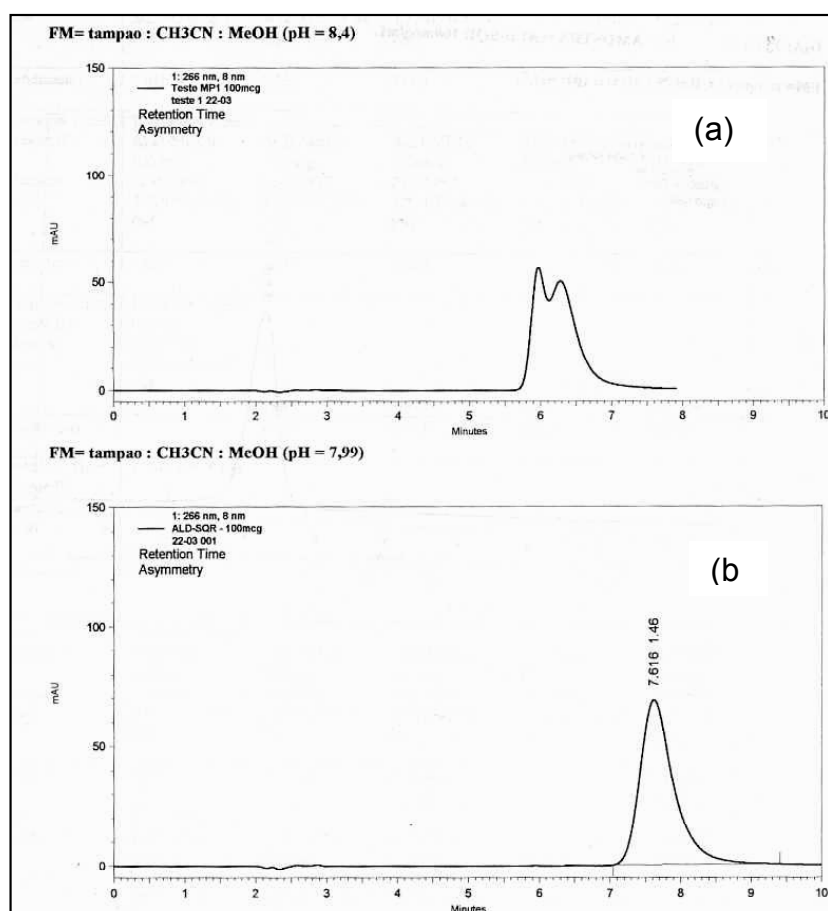


Figura 8 – Influência do pH da fase móvel no perfil cromatográfico obtido para a amostra ALD-SR, usando o método de referência (CLAE-FR com derivatização por FMOC). (a) pH = 8,4; (b) pH = 7,99.

obtenção de um perfil para a primeira derivada da análise termogravimétrica semelhante ao perfil encontrado na DSC (Figura 5-B). A razão da diferença nas curvas de DSC para as amostras não foi esclarecida. Tentativa de se determinar a faixa de fusão das matérias-primas pelo método do capilar não foi bem sucedida, devido a uma expansão do pó dentro do capilar em torno de 160°C.

Analisando a estrutura do alendronato de sódio (Figura 2), 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 M), devido ao reduzido valor da constante de ionização ácida dos dois últimos hidrogênios da molécula, com pKas acima de 10 (Budavari, 2001).

Sendo assim, como também relatado no trabalho de Moreno et al. (2004), a titulação do alendronato pelo hidróxido de sódio apresenta curva com apenas uma inflexão (Figura 7), cujo salto de pH mostra-se adequado para determinação do ponto de equivalência, mesmo visual. A fenolftaleína pode ser utilizada como indicador, como

mostra o estudo de Bueno & Bergold (2000), pois apresenta zona de transição (pH 8 – 10) inserida no intervalo definido pela inflexão da curva.

A metodologia cromatográfica utilizada apresentou boa linearidade e precisão, mas mostrou execução demorada e complexa em suas diversas etapas. É importante destacar que pequenas variações no pH da fase móvel podem provocar alterações consideráveis no perfil cromatográfico obtido para o alendronato, ao se utilizar fase estacionária C18. Analisando o cromatograma da Figura 8, 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 “desdobramento” do pico. 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).

Na comparação entre as metodologias titulométrica e cromatográfica, pode ser observado que os valores de teor encontrados utilizando-se o método de referência (CLAE com derivatização por FMOC) foram nitidamente distantes dos encontrados pelo método volumétrico (Tabela 3), resultando, obviamente, em médias com diferenças estatisticamente significativas para todas as matérias-primas após análise dos dados por ANOVA. Tal observação sugere falta de especificidade do método titulométrico na análise das matérias-primas, a qual pode estar relacionada à presença de interferentes com propriedades ácidas.

O GABA é precursor de síntese do alendronato e constitui uma de suas principais impurezas (Kieczykowski *et al.*, 1995). Mas, embora apresente característica ácida, esta substância não interfere na determinação quantitativa das amostras de alendronato, já que possui reduzida constante de ionização ácida (Budavari, 2001), não sendo titulada pelo hidróxido de sódio nas condições estabelecidas no método. Tal consideração é reforçada pelo resultado de pureza encontrado para a matéria-prima ALD-MP1, a qual foi a única a apresentar significativa contaminação por GABA e, apesar deste fato, apresentou menor valor de teor em relação às outras matérias-primas.

O ácido fosforoso, outro precursor da síntese do ácido alendrônico, possui 2 hidrogênios ácidos, cujos valores de pKa são:  $pK_{a1} = 1,29$  e  $pK_{a2} = 6,74$  (Budavari, 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, o qual apresenta um hidrogênio passível de ser titulado pela solução de NaOH 0,1 M. Observando os resultados encontrados no ensaio para fosfito monossódico (Tabela 2), apesar da reação positiva para a impureza nas matérias-primas ALD-MP1, ALD-MP2 e ALD-MP3, os níveis encontrados não justificam os teores obtidos na titulação das amostras. Fosfatos ácidos são outras impurezas relacionadas que também podem estar presentes em amostras de alendronato, sendo passíveis de neutralização por hidróxido de sódio.

Embora a titulometria de neutralização seja uma alternativa menos dispendiosa e trabalhosa que o método por CLAE-FR com derivatização por FMOC e detecção ultravioleta, frequentemente não apresenta especificidade adequada para análise de controle da qualidade de matérias-primas de alendronato de sódio.

Para ser utilizado no doseamento de matéria-prima e produto acabado, o método titulométrico deve ser adequadamente validado. Devem ser avaliadas a linearidade, precisão, robustez e, principalmente, exatidão e seletividade, verificando a ausência de possíveis interferentes na análise.

Destacamos ainda a importância de se avaliar a exatidão dos resultados de teor obtidos pelo método titulométrico na análise da matéria-prima, através da comparação com o método cromatográfico de referência. Sendo verificada a concordância entre os resultados encontrados para as duas metodologias, a técnica titulométrica poderia ser utilizada com segurança na análise das formas farmacêuticas produzidas a partir da matéria-prima em questão.

## AGRADECIMENTOS

Ao pesquisador Altivo Pitaluga, da Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz – RJ), pelo auxílio na execução das análises termogravimétrica e calorimétrica. Aos laboratórios MERCK (Rio de Janeiro, Brasil), em nome de João Ricardo, pelo material cedido. À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida a A. F. Ribeiro e ao LabCQ – UFRJ, pelo auxílio financeiro. A todos os funcionários e colegas da UFRJ, em especial à Eliane Coutinho, que contribuíram em algum momento para realização deste trabalho.

## ABSTRACT

*Observations on the quantitative determination of alendronate sodium: titrimetry vs. chromatography*

**Alendronate sodium is an aminobisphosphonate compound that can bind to the bone matrix and inhibit its osteoclast-mediated resorption. The lack of official monographs on the quantitative analysis of this drug has led to the proposal of a number of different methods for its determination, most of which employ high performance liquid chromatography (HPLC), performed after derivatization of the drug to enable ultraviolet detection. Simpler methodologies based on titrimetry and spectrophotometry have also been described. In this paper, the results obtained by acid-base titration of three batches of bulk alendronate, with 0.1 M sodium hydroxide as titrant, were compared with those achieved by a chromatographic reference method (HPLC of an FMOC derivative of the drug) published in the United States Pharmacopeia. The two methods gave statistically different results for the analysis of the three samples. Also, physical and chemical characterization of these samples showed differences between them and the reference substance (brand-name drug). The acid-base titrimetry was precise but not specific for determination of the bulk drug. However, it may be employed in the quality control of alendronate sodium dosage forms, since the excipients do not interfere with the analysis.**

**Keywords:** Alendronate. Acid-base titrimetry. Chromatography. Derivatization.



## REFERÊNCIAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 37, de 05 de fevereiro de 2004. Anexo. [citado 2004 nov 16] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
- Al Deeb SK, Hamdan II, Al Najjar SM. Spectroscopic and HPLC methods for the determination of alendronate in tablets and urine. *Talanta* 2004; 64:695-702.
- Budavari S. (Ed.) *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 13th. ed. Whitehouse Station, NJ: Merck; 2001. p. 44.
- Bueno F, Bergold AM. 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 Bonaer*. 2000; 19 (2):129-32.
- De Marco JD, Biffar SE, Reed DG, Brooks MA. The determination of 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-diphosphonic acid monosodium salt trihydrate in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 1989; 7(12):1719-27.
- El-Sattar O I Abd, Ahmad AA, El Kady T. Validated and stability indicating HPLC-method for determination of alendronate sodium using phthaldialdehyde as a pre-column derivatizing agent. *Egypt J Biomed Sci*. 2003; 11:35-45.
- Farmacopéia Portuguesa. Monografias.[CD-ROM]. 7. ed. Lisboa: Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento; 2002.
- Han YR, Qin X. Determination of alendronate sodium by ion chromatography with refractive index detection. *J Chromatogr A*. 1996; 719:345-52.
- Kieczkowski GR, Jobson RB, Melillo DG, Reinhold DF, Grenda VJ, Shinkai I. 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. *J Org Chem*. 1995; 60(25):8310-2.
- Kline WF, Matuszewski BK. 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. *J Chromatogr*. 1992; 583:183-93.
- Kline WF, Matuszewski BK, Bayne WF. 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. *J Chromatogr*. 1990; 534:139-49.
- Kuljanin J, Jankovic I, Nedeljkovic J, Prstojevic D, Marinkovic V. Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations via complex formation with Fe (III) ions. *J Pharm Biomed Anal*. 2002; 28:1215-20.
- Kwong E, Chiu AM, McClintock SA, Cotton ML. HPLC analysis of an amino bisphosphonate in pharmaceutical formulations using postcolumn derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr Sci*. 1990; 28(11):563-6.
- Lovdahl MJ, Pietrzyk DJ. Anion-exchange separation and determination of bisphosphonates and related analytes by post-column indirect fluorescence detection. *J Chromatogr A*. 1999; 850:143-52.
- 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. 1139-40.
- Metwally MES, Walash MI. Colorimetric and titrimetric determination of bisphosphonates in pharmaceutical preparations. *Mansoura J Pharm Sci*. 2000; 16(1):14-22.
- Meyya NSN, Sharma GVSR, Reddy VB, Suresh B. Quantitative determination of alendronate sodium in pharmaceutical dosage forms and in bulk drug by spectrophotometry. *Indian Drugs*. 2001; 38(9):462-3.
- Moreno, A. H.; Pezza, H. R.; Pezza, L. Potenciometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations. *Chem Anal*. 2004; 49:351-57.
- Ostovic D, Stelmach C, Becky H. Formation of a chromophoric complex between alendronate and cooper (II) ions. *Pharm. Res*. 1993; 10(3):470-2.
- Peng SX, Dansereau SM. Ion-exchange liquid chromatographic analysis of bisphosphonates by on-line post-column photochemical reaction and spectrophotometric detection. *J Chromatogr A*. 2001; 914:105-10.
- Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, García-Martínez MD. A sensitive post-column photochemical derivatization/fluorimetric detection system for HPLC determination of bisphosphonates. *J Chromatogr A*. 2009; 1216(9):1312-8.
- Podolska M, Bialecka W, Kwiatkowska-Puchniarz B. Complexometric determination of diphosphonic acid derivatives. Part II. *Acta Pol Pharm*. 2000; 57(3):159-65.
- Podolska M, Bialecka W, Kwiatkowska-Puchniarz B, Tuszyńska E. Analysis of selected diphosphonic acid derivatives used in treatment of osteoporosis. Part I. Complexometric determination of diphosphonic acid derivatives. *Acta Pol Pharm*. 1997; 54(4):267-72.
- Prosint. Información de producto alendronato monosódico 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. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 2002; 767:111-6.
- Razak OA, Belal SF, Bedair MM, Haggag RS. The utilization of cooper (II) phosphate for the anodic stripping voltammetric assay of alendronate sodium, desferrioxamine mesylate and lisinopril. *Talanta* 2003; 59:1061-9.
- Reed DG, Martin GP, Konieczny JM, Brooks MA. The determination of alendronate sodium in tablets by inductively coupled plasma (ICP). *J Pharm Biomed Anal.* 1995; 13:1055-8.
- Ribeiro AF, Volpato NM. Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa. *Quim Nova.* 2005; 28:852-8.
- Sparidans RW, Hartigh J, Beijnen JH, Vermeij P. Derivatization of pamidronate and other amino(bis) phosphonates with different isothiocyanates prior to ion-pair liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1997; 782:211-7.
- Sparidans RW, Hartigh J, Vermeij P. High-performance ion-exchange chromatography with in-line complexation of bisphosphonates and their quality control in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal.* 1995; 13:1545-50.
- Taha EA, Youssef NF. Spectrophotometric determination of some drugs for osteoporosis. *Chem Pharm Bull.* 2003; 51(12):1444-7.
- Tsai EW, Chamberlin SD, Forsyth RJ, Bell C, Ip DP, Brooks MA. Determination of bisphosphonate drugs in pharmaceutical dosage formulations by ion chromatography with indirect UV detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1994; 12(8):983-91.
- Tsai EW, Ip DP, Brooks MA. Determination of alendronate in pharmaceutical dosage formulations by ion chromatography with conductivity detection. *J Chromatogr.* 1992a; 596:217-24.
- Tsai EW, Singh MM, Lu HH, Ip DP, Brooks MA. Application of capillary electrophoresis to pharmaceutical analysis. Determination of alendronate in dosage forms. *J Chromatogr.* 1992b; 626:245-50.
- United States Pharmacopeia. Official monographs. 28. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2005. p. 63-5.
- Vade-Mécum. Índice farmacológico. [CD-ROM]. São Paulo: Editora Metha; 2002-2003.1.
- Zacharis CK, Tzanavaras PD. Determination of bisphosphonate active pharmaceutical ingredients in pharmaceuticals and biological material: A review of analytical methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 48(3):483-96.