

**RODRIGO DE SOUZA LEITE**

**ANÁLISES DE BISFOSFONATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE TROCA ANIÔNICA, DETECÇÃO INDIRETA NO ULTRAVIOLETA  
E POR CONDUTIVIDADE COM SUPRESSÃO DE ELUENTE**

Tese apresentada ao Instituto de Química  
de São Carlos, da Universidade de São  
Paulo, como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de doutor em Ciências

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. Lanças

**São Carlos**

**2008**

*Aos meus pais,*

*Ary de Souza Leite (in memoriam) e Elza Rebelo da Silva pelos constantes incentivos e compreensão em meus estudos, pela moral e ética que sempre me ensinaram e simplesmente pela minha existência...*

*A minha filha,*

*Camille, por ter me dado um novo sentido na vida; depois de você minha vida nunca mais foi a mesma. Serei eternamente grato pela sua existência.*

*Dedico este trabalho com todo meu amor e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho, não somente pela paciência e confiança em mim depositada, mas principalmente por “não me dar o peixe, mas me ensinar a pescar”.

Ao Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice e à Prof. Dra. Maria Eugênia Queiroz, pelas importantes sugestões apresentadas durante o Exame de Qualificação.

Ao Sr. Mário W. Stelman, Vanderlei de Abreu e Rosangela Cristina Contieri de Camargo, pela oportunidade de realizar uma importante parte do trabalho no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Biorigin.

À CAPES, pelo apoio financeiro sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Cromatografia, que mesmo distantes sempre serão lembrados com muito carinho.

Ao Christian, Álvaro e Claudete, pela amizade e ajuda incondicionais quando precisei.

À Odete Milão e Elaine Gobato, sempre prestativas e atenciosas, fundamentais na realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Centro de P&D da Biorigin: Larissa (grande ajuda no processo de formatação do trabalho), Moisés, William, Claudinha, Patrícia, Hevenilton, Regina, Regiane, PIM, João, Rosangelinha e Luzia Canute e as mais recentes Érica Arnosti, Fabiana, Ellen e Érica Durão.

Aos meus colegas da minha primeira república: Daniel, Juliano e Ronaldo, que me ensinaram a sobreviver em uma Universidade Federal.

Aos meus amigos José Ricardo, Alexandre Ataíde, William (cabelo), Ronaldo Nunes (Tony), Márcio Bergamini, que deixaram ótimas lembranças.

E finalmente, mas não menos importante, às minhas irmãs Ariany, Juliana, Melina e aos meus sobrinhos Matheus, Vítor e Renata, por toda paciência e amor que têm comigo.

## RESUMO

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de métodos cromatográficos para a análise de Bisfosfonatos em medicamentos acabados, matérias-prima e em fluidos biológicos utilizando Cromatografia Iônica com detecção Indireta no UV e detecção por Condutividade com Supressão de Eluente. No capítulo 1, descreve-se a pesquisa bibliográfica das propriedades farmacológicas dos BP's, suas principais rotas sintéticas e sobre os métodos analíticos apresentados na literatura científica. No capítulo 2, foi descrito o desenvolvimento de um método para a determinação dos BP's etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato em matéria-prima e para medicamentos de alendronato, utilizando Cromatografia Iônica e detecção indireta no Ultravioleta. O método foi aplicado na análise de medicamentos contendo alendronato em comprimidos de referência e em comprimidos genéricos. No capítulo 3, descreve-se estudos visando a determinação de etidronato em plasma humano, utilizando Cromatografia Iônica Multidimensional com detecção indireta no Ultravioleta. No capítulo 4, foi desenvolvido outro método para a determinação do BP's etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato em matéria-prima e em medicamentos contendo alendronato, utilizando Cromatografia Iônica e detecção por Condutividade com supressão de eluente. O método foi aplicado na análise de medicamentos contendo alendronato em comprimidos similares e em comprimidos manipulados. No capítulo 5, um método utilizando Cromatografia Iônica e detecção por Condutividade com supressão de eluente foi desenvolvida para determinar clodronato em urina humana.

## ABSTRACT

This work presents the development of chromatographic methodologies for analysis of Bisphosphonates in drugs, raw material and biological fluids using Ion Chromatography with indirect UV detection and conductivity detection with eluent suppression. In chapter 1, an extensive bibliographical research was accomplished in relationship to the pharmacological properties of bisphosphonates, their more important synthetic routes and about the analytical methods presented in the scientific literature. In chapter 2, the development of a method was described for the determination of BP's etidronate, clodronate, pamidronate and alendronate in raw material and for alendronate tablets, using Ionic Chromatography with indirect UV detection. The methodology was applied to the analysis of medicines containing alendronate in both forms, generic and reference. In chapter 3, studies conducted to determinate etidronate in human plasma, using Multidimensional ionic chromatography with indirect UV detection are described. In chapter 4, a methodology developed for the determination of etidronate, clodronate, pamidronate and alendronate in raw material and for alendronate tablets using ionic chromatography and detection for conductivity with eluente suppression is described. The methodology was applied in the analysis of medicines with alendronate generic and reference. In chapter 5, a methodology using ion chromatography and detection for conductivity with eluente suppression was developed and validated to determine clodronate in human urine.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO .....	8
1 FARMACOLOGIA .....	10
1.1 Farmacodinâmica .....	10
1.2 Farmacocinética .....	13
2 SÍNTESE .....	14
3 ANÁLISE .....	21
3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	22
3.2 Cromatografia gasosa .....	26
3.3 Eletroforese capilar .....	27
3.4 Outros métodos .....	28
4 OBJETIVOS DO PRESENTE ESTUDO .....	29
CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE BISFOSFONATOS POR CROMATOLOGRAFIA IÔNICA E DETECÇÃO INDIRETA NO ULTRAVIOLETA .....	30
1 INTRODUÇÃO .....	30
1.1 Experimental .....	31
1.1.1 Padrões e reagentes .....	31
1.1.2 Instrumentação e condições cromatográficas .....	32
1.1.3 Preparo das soluções padrão .....	32
1.1.4 Preparo das amostras de comprimidos de alendronato .....	33
1.1.5 Avaliação dos métodos .....	33
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
2.2.1 Otimização das condições cromatográficas .....	34
2.2.2 Linearidade e faixa de trabalho .....	35
2.2.3 Seletividade .....	37
2.2.4 Precisão .....	37
2.2.5 Limite de quantificação .....	38
2.2.6 Limite de detecção .....	38
2.2.7 Exatidão .....	39
2.2.8 Robustez .....	39
2.2.9 Determinação de alendronato no produto acabado .....	40
2.3 Conclusão .....	41
CAPÍTULO 3 – DETERMINAÇÃO DE BISFOSFONATOS EM PLASMA HUMANO POR CROMATOLOGRAFIA IÔNICA MULTIDIMENSIONAL E DETECÇÃO INDIRETA NO UV COM INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRA .....	43
1 INTRODUÇÃO .....	43
1.1 Experimental .....	43
1.1.1 Padrões e reagentes .....	43
1.1.2 Otimização das condições cromatográficas .....	44
1.2 Resultados e discussões .....	46
1.3 Conclusão .....	48
CAPÍTULO 4 – DETERMINAÇÃO DE BISFOSFONATOS EM MATÉRIA PRIMA E EM PRODUTOS ACABADOS ATRAVÉS DE CROMATOLOGRAFIA IÔNICA E DETECÇÃO POR CONDUTIVIDADE COM SUPRESSÃO DE ELUENTE .....	49
1 INTRODUÇÃO .....	49
1.1 Experimental .....	51

1.1.1 Padrões e reagentes .....	51
1.1.2 Instrumentação e condições cromatográficas .....	51
1.1.3 Preparo das soluções padrão.....	52
1.1.4 Preparo das amostras de comprimidos de alendronato .....	52
1.1.5 Avaliação dos métodos .....	52
1.2.1 Otimização das condições cromatográficas .....	53
1.2.2 Linearidade.....	56
1.2.3 Seletividade.....	58
1.2.4 Precisão .....	60
1.2.5 Limite de quantificação e de detecção .....	62
1.2.6 Exatidão .....	62
1.2.7 Recuperação para o alendronato .....	62
1.2.8 Determinação de alendronato no produto acabado .....	63
1.3 Conclusão .....	64
CAPÍTULO 5 – DETERMINAÇÃO DE CLODRONATO EM URINA ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA IÔNICA E DETECÇÃO POR CONDUTIVIDADE COM SUPRESSÃO DE ELUENTE.....	65
1 INTRODUÇÃO .....	65
1.1 Experimental .....	66
1.1.1 Padrões e reagentes .....	66
1.1.2 Instrumentação e condições cromatográficas .....	66
1.1.3 Preparo das soluções padrão.....	66
1.1.4 Avaliação dos métodos .....	66
1.2 Resultados e Discussão.....	67
1.2.1 Otimização das condições cromatográficas .....	67
1.2.2 Linearidade.....	68
1.2.3 Seletividade.....	69
1.2.4 Precisão .....	69
1.2.5 Limite de quantificação e de detecção .....	70
1.2.6 Exatidão .....	70
1.2.7 Recuperação do método .....	70
1.3 Conclusão .....	71
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS .....	83

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BP's) constituem uma classe de substâncias químicas que possuem uma ligação P-C-P em sua estrutura e agem como inibidores da reabsorção óssea, mediada pelos osteoclastos. Estes compostos são extensivamente utilizados no tratamento de várias doenças ósseas, destacando-se doença de Paget, hipercalemia maligna, osteoporose e doença metastática e osteolítica.

São análogos químicos da substância endógena denominada pirofosfato (Figura 1), um inibidor natural da reabsorção óssea. No entanto, essa substância não pode ser utilizada como agente terapêutico no tratamento de doenças ósseas, pois ocorre uma rápida hidrólise enzimática. Os bisfosfonatos são análogos sintéticos em que o átomo central de oxigênio foi substituído por um de carbono. Essa modificação faz com que os BP's sejam mais resistentes à degradação enzimática e possuam uma meia-vida biológica maior, suficiente para influenciar o metabolismo ósseo [1].

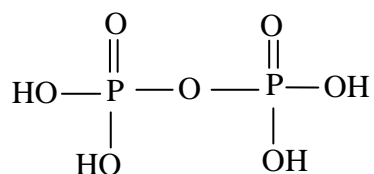


Figura 1 – Estrutura química do ácido pirofosfórico.

Diferentes substituintes ligados ao átomo de carbono central conferem características únicas para cada fármaco (Figura 2). O grupo R1 fornece a afinidade dos BP's pelos cristais ósseos, enquanto o grupo R2 é responsável pela potência



(atividade anti-reabsortiva) e atividade farmacológicas [2]. Segundo SHINODA (1983), o tamanho da cadeia lateral alifática é um importante fator que influencia a ação dos BP's [3].

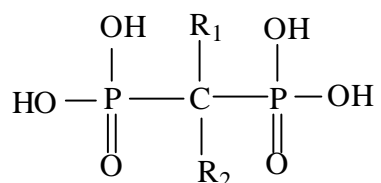


Figura 2 – Estrutura química geral dos Bisfosfonatos (BP's).

Vários métodos têm sido relatados para a síntese dos BP's. Tais compostos podem ser preparados pela reação de um ácido carboxílico com ácido fosforoso e tricloreto de fósforo; pela reação de um cloreto de acila com tris(trimetilsilil)fosfito e posterior metanólise; pela reação de hidrofosforilação catalisada por paládio; dentre vários outros procedimentos descritos.

Os BP's podem ser analisados quantitativamente e qualitativamente por um conjunto de técnicas analíticas eficientes. As mais usuais são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC) e eletroforese capilar (CE), utilizando diferentes detectores, tais como: espectrômetro de massas (MS), índice de refração, espectrofotômetro de ultravioleta e eletroquímicos. Para a determinação estrutural utiliza-se ainda a ressonância magnética nuclear (NMR), espectrofotometria no infravermelho (IR) e análise elementar.

# 1 FARMACOLOGIA

## 1.1 Farmacodinâmica

O tecido ósseo contém três tipos de células: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos formam os ossos por deposição de materiais protéicos na matriz, levando à mineralização. A função dos osteoclastos é a reabsorção óssea. Essas células destroem a matriz sempre que o osso precisa ser remodelado. As células do terceiro tipo, os osteócitos, encontram-se localizados nas fibras protéicas da matriz óssea estando, provavelmente, envolvidos na homeostase do cálcio plasmático [4].

O mecanismo molecular pelo qual os BP's inibem a reabsorção óssea ainda não é completamente entendido. Inicialmente acreditava-se que apenas um mecanismo físico-químico, após a adsorção óssea, era suficiente para sua ação. No entanto, ultimamente, tem-se tornado claro que efeitos celulares também estão envolvidos. Como os osteoclastos produzem endocitose, os BP's presentes no espaço onde ocorre a reabsorção podem penetrar nestas células, afetando seu metabolismo intracelular e induzindo apoptose [5]. Recentes estudos têm demonstrado que parte da ação inibitória dos BP's sobre os osteoclastos é mediada por uma atividade dos osteoblastos [6].

Green (2000) demonstrou em estudos in vitro que os BP's também inibem a proliferação, reduzem a viabilidade e induzem apoptose em muitas células tumorais humanas [7].

As propriedades físico-químicas dos BP's são bem similares entre si. No entanto, suas atividades anti-reabsortivas diferentes. Por causa dessa grande

diferença de potência entre os BP's, suas doses clínicas também diferem acentuadamente [8]. Os principais BP's estudados estão apresentados na Tabela 1.

Os BP's se tornaram o tratamento de escolha para uma variedade de doenças ósseas em que há uma excessiva atividade dos osteoclastos, incluindo doença de Paget, hipercalcemia maligna, osteoporose e doença metastática e osteolítica [9]. São também úteis em muitas formas de osteoporose secundária, causadas por utilização de glicocorticóides, gravidez, transplante de órgãos e paraplegia [1].

Tabela 1 – BP's e suas respectivas potências anti-reabsortivas relativas em modelos in vivo <sup>1</sup>.

<b>Bisfosfonato</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Potência</b>
Clodronato	Cl	Cl	~10
Etidronato	OH	CH <sub>3</sub>	1
Pamidronato	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	~100
Alendronato	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	>100-<1000
Neridronato	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	~100
Olpadronato	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	>100-<1000
Ibandronato	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	>1000-<10000
Risedronato	OH	CH <sub>2</sub> -3-piridina	>1000-<10000
Zoledronato	OH	CH <sub>2</sub> -imidazol	>10000

Altas doses de muitos BP's podem dificultar a mineralização normal dos ossos [10]. Dessa forma busca-se atualmente, o desenvolvimento de BP's com alta atividade anti-reabsortiva que tenham uma ampla faixa de segurança para a mineralização normal.

Os BP's também estão sendo estudados para serem utilizados contra o *Trypanosoma cruzi* (protozoário causador da doença de Chagas). Este protozoário contém importantes depósitos de pirofosfato e polifosfatos em organelas

denominadas acidocalcisomas. Estudos recentes mostram que os BP's inibem o crescimento do protozoário *T. cruzi* in vitro e in vivo, por meio da competição com o pirofosfato em sua via metabólica, sem causar toxicidade nas células hospedeiras [11].

MARTIN et al. (2001) verificaram a ação dos BP's, que possuem nitrogênio na cadeia lateral, sobre o crescimento dos parasitas *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*. O mecanismo de ação dos BP's consiste basicamente na inibição da formação de proteínas de importância vital para os parasitas [12].

A artrite reumatóide está relacionada com uma erosão óssea nas articulações. Alguns estudos clínicos têm sido realizados para avaliar a eficiência de agentes anti-artríticos, e recentemente, a família dos BP's vem obtendo destaque no tratamento dessa doença. Os ésteres dos BP's têm conseguido diminuir, significativamente, as inflamações associadas com a formação do granuloma cutâneo e com a artrite erosiva, inibindo a erosão óssea nas articulações [13,14].

Devido à sua capacidade quelante, os bisfosfonatos também têm sido estudados para elaboração de novos medicamentos capazes de controlar a quantidade de íons ferro e alumínio no organismo humano [15]. Recentemente, novos BP's foram sintetizados por meio das reações de Michaelis-Arbuzov, Michaelis-Becker e transesterificação do fosfonoacetato de terietila. Estes bisfosfonatos mostraram-se eficientes agentes quelantes frente a diferentes metais [16].

Estudos realizados com etidronato e clodronato demonstraram que estes fármacos apresentam baixa toxicidade. Testes realizados em diferentes espécies animais indicaram não serem teratogênicos, mitogênicos e carcinogênicos [17].

De maneira geral, os BP's apresentam poucos efeitos colaterais. O etidronato pode causar inibição na mineralização normal dos ossos, originando fraturas [18]. Distúrbios gastrintestinais e alterações no paladar também podem ocorrer [19]. Para o clodronato, apenas alguns poucos casos de diarreia branda foram relatados [20]. O pamidronato pode causar distúrbios gastrintestinais tais como náusea, vômito e diarreia. Após a administração oral ou intravenosa, pode induzir pirexia de 1 a 2 °C [21].

## **1.2 Farmacocinética**

A Biodisponibilidade oral, fração de uma dose que alcança a circulação sistêmica, é determinada pela comparação da área total sob a curva concentração no plasma versus tempo, após a administração oral e intravenosa [22].

Os BP's apresentam baixa absorção intestinal em humanos, com biodisponibilidade cerca de 0,7% para alendronato, 0,3% para pamidronato, 3-7% para etidronato e 1-2% para clodronato [8]. Esta baixa absorção é causada porque estes fármacos são pouco lipofílicos, dificultando o transporte através da barreira epitelial [23]. Além do mais, são moléculas negativamente carregadas no pH intestinal, e que complexam facilmente com o cálcio, prejudicando ainda mais a sua absorção [24]. Os alimentos causam uma acentuada diminuição na absorção dos BP's, devendo estes serem administrados pelo menos trinta minutos antes da primeira alimentação diária [25].

Estudos realizados em ratos, com o alendronato, demonstraram que ele possui ligações com as proteínas plasmáticas, principalmente a albumina sérica. O aumento do pH e da concentração de íons cálcio acentua ainda mais essa ligação [26].

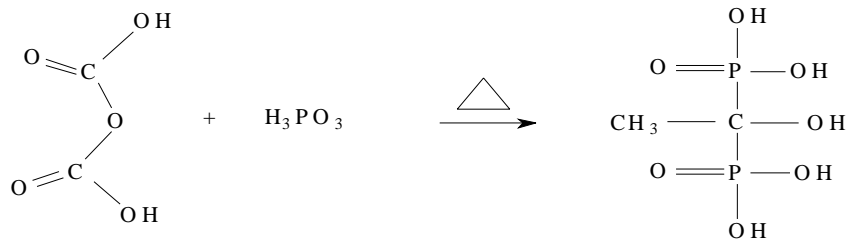
Após a administração intravenosa, o alendronato é amplamente distribuído por todo o corpo, incluindo os tecidos calcificados e não calcificados. Os BP's se ligam preferencialmente em ossos com alta taxa de remodelagem, devido à grande exposição da hidroxiapatita nesses sítios [8].

Não foram encontradas evidências de metabólitos dos BP's nos estudos realizados, indicando serem muito estáveis. Essa característica minimiza a toxicidade dos BP's devido à ausência de intermediários reativos e metabólitos tóxicos [27].

A excreção renal é a única rota de eliminação dos BP's. Estudos realizados em animais e humanos indicam que os BP's administrados sistemicamente são parcialmente ligados aos tecidos ósseos e o restante é excretado pela urina. Após a administração intravenosa, os BP's desaparecem do plasma rapidamente, com uma meia-vida de 1-2 horas. Por outro lado, uma vez ligado ao osso, eles só são liberados quando ocorre reabsorção no tecido ósseo no qual estão ligados [8].

## 2 SÍNTESE

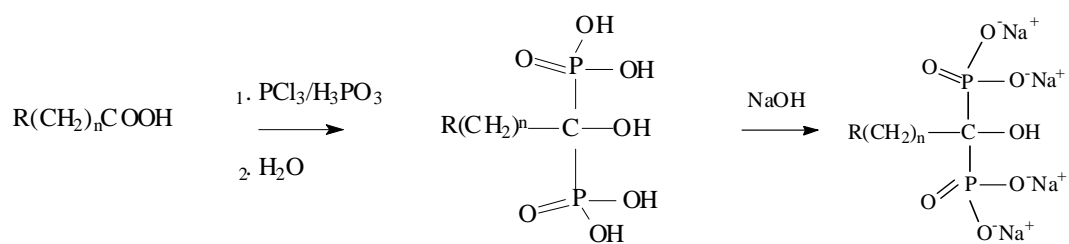
O primeiro bisfosfonato utilizado no tratamento de doenças ósseas foi o etidronato, que pode ser facilmente sintetizado por meio da reação do anidrido acético com o ácido fosforoso [28], exemplificada no Esquema 1.



Esquema 1 – Síntese do etidronato.

Estudos posteriores aos realizados com o etidronato, demonstraram que os BP's que possuem um átomo de nitrogênio em sua cadeia lateral possuem potência superior ao etidronato [29]. Mais recentemente, foi demonstrado que o grupo amino não deve estar, necessariamente, no final da cadeia. Há um incremento na atividade do etidronato quando um grupo metil e um pentil são ligados no nitrogênio [30].

A reação mais comum utilizada na preparação desses BP's é entre um ácido carboxílico e o ácido fosforoso, na presença de tricloreto de fósforo (Esquema 2) [30]. Vários tipos de BP's são obtidos a partir de diversos ácidos carboxílicos, com bons rendimentos (Tabela 2). Os reagentes são deixados sob agitação a 65 °C por aproximadamente 18 h, utilizando como solvente o ácido metanosulfônico ou benzenosulfônico. Logo após, é adicionado hidróxido de sódio para ocorrer a precipitação dos sais de BP's.

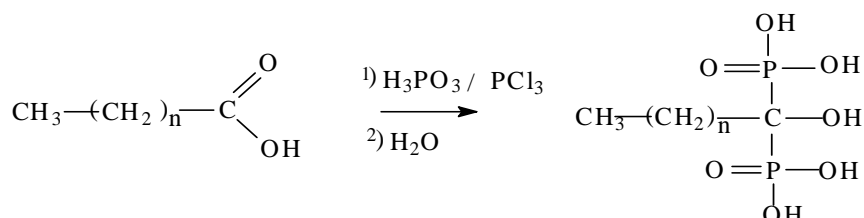


Esquema 2 – Síntese de BP's através de um ácido carboxílico e ácido fosforoso na presença de tricloreto de fósforo.

Tabela 2 – Valores típicos de rendimento da síntese dos BP's para diferentes ácidos carboxílicos [29].

R	n	R%
NH <sub>2</sub>	2	57
NH <sub>2</sub>	3	89
NH <sub>2</sub>	4	78
NH <sub>2</sub>	5	89
CH <sub>3</sub>	10	95
3-imidazol	1	31
3-piridil	1	38
4-amonifenil	1	26
Cl	3	30

A síntese descrita anteriormente também pode ser realizada utilizando-se ácidos graxos de cadeia pequena e que não contenham nitrogênio (Esquema 3). Os BP's assim formados mostraram-se ativos contra o crescimento do *Trypanosoma cruzi* [11].



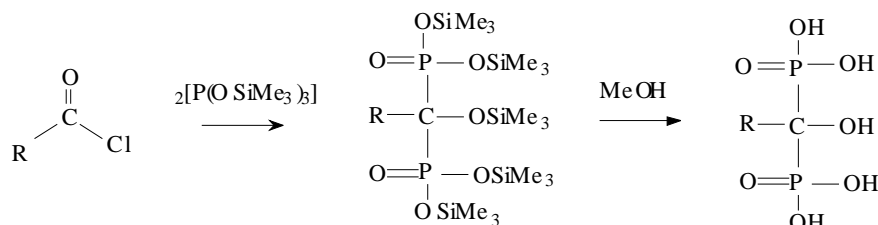
Esquema 3 – Síntese de BP's a partir de ácidos graxos de cadeia pequena (n=1, 2, 3, 4).

Outra síntese é feita pela reação entre um cloreto de acila e o tris(trimetilsilil)fosfito, com posterior metanólise [31].

A reação do cloreto de acila com 2 equivalentes de tris(trimetilsilil)fosfito leva, em poucos minutos e com temperatura de 25°C, à formação do éster tetrakis(trimetilsilil) do ácido 1-trimetilsiloxi-1,1-bifosfônico. Logo após, ocorre a



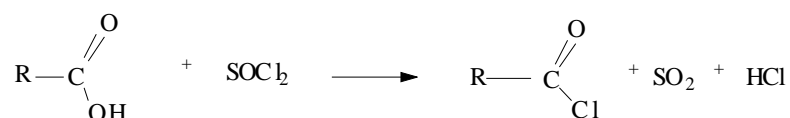
metanólise durante 1 hora à temperatura de 25°C. Os BP's são obtidos com a evaporação da fração volátil (Esquema 4).



Esquema 4 - Síntese de bisfosfonatos por meio da reação entre o cloreto de acila e o tris(trimetilsilil)fosfito.

Esta reação possui grandes vantagens quando comparada à reação mencionada anteriormente, dentre as quais destacam-se: condições mais brandas do sistema reacional, altos rendimentos obtidos e menor tempo de reação. Por outro lado, observam-se algumas desvantagens: alto custo do reagente tris(trimetilsilil)fosfito e dificuldade de se encontrar comercialmente cloretos de acila (sendo necessária a preparação dos mesmos) [31].

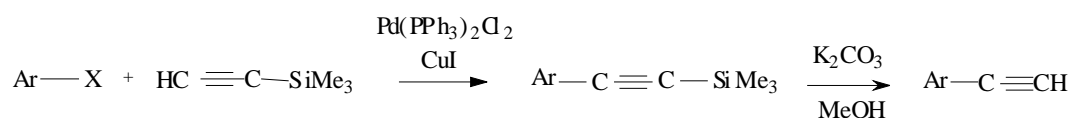
A preparação de cloretos de acila é bastante conhecida na literatura e consiste na reação entre um ácido carboxílico e o cloreto de tionila (Esquema 5) [32]. Entretanto, isso representa uma nova etapa na síntese dos BP's, acarretando, principalmente, redução do rendimento total.



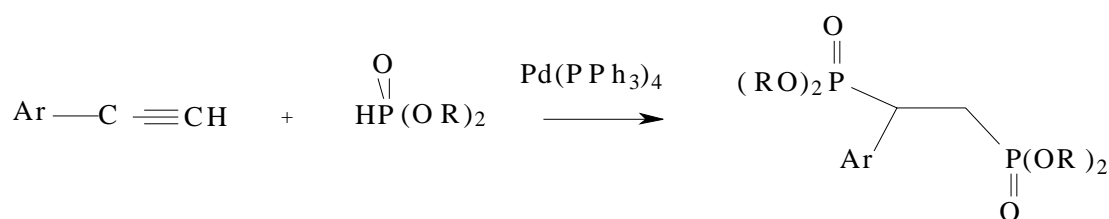
Esquema 5 - Síntese de cloretos de acila.

Outro método de preparação dos BP's consiste na reação de bis-hidrofosforilação de alcinos terminais por dialquil fosfitos, catalisada por paládio [33].

Os alcinos terminais são sintetizados por uma reação de Heck entre um haleto de arila e o trimetilsililacetileno, com a remoção do grupo trimetilsilil em condições básicas (Esquema 6-a). Refluxando a mistura contendo 1 equivalente do alcino terminal e 3 equivalentes de dialquilfosfito na presença de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> e tolueno (solvente), obtém-se uma grande variedade de BP's vicinais com ótimos rendimentos (Esquema 6-b).



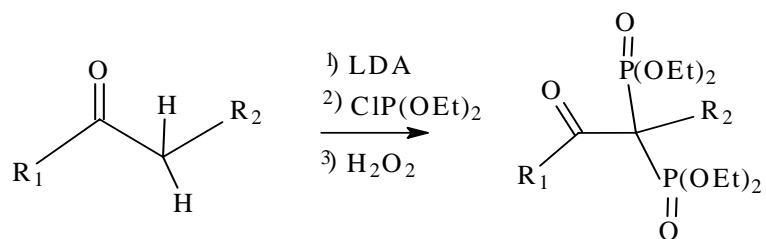
(a)



(b)

Esquema 6 - Síntese de BP's através de uma reação de bis-hidrofosforilação catalisada por paládio: (a) síntese do alcino terminal; (b) reação do alcino terminal com dialquil fosfito.

Outros tipos de BP's podem ser preparados utilizando os íons enolato como intermediários. O tratamento de compostos carbonílicos com uma base forte e posterior adição de excesso de grupos eletrofílicos (CIP(OEt)<sub>2</sub>) resulta na formação de duas ligações P-C no carbono. Estes BP's são obtidos após oxidação com peróxido de hidrogênio [34]. O Esquema 7 demonstra a reação realizada nestas condições.



Esquema 7 – Síntese de BP's utilizando íons enolato como intermediário.

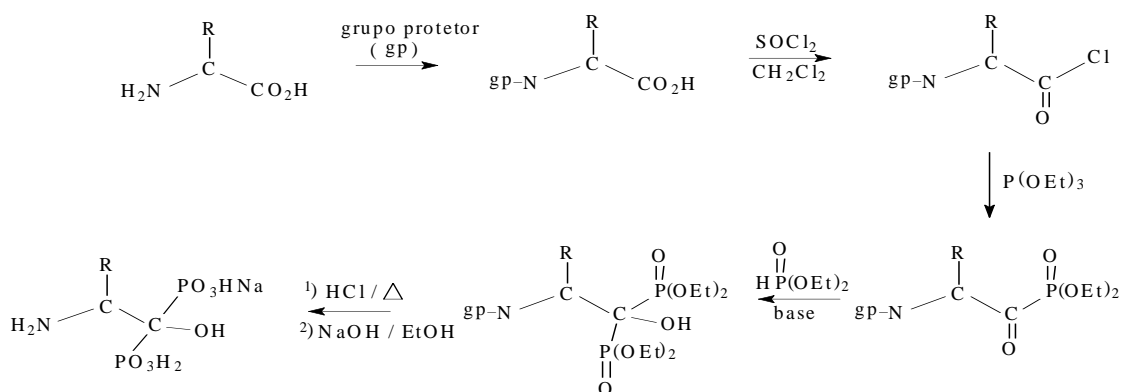
Na Tabela 3 são mostrados alguns exemplos de produtos formados a partir de diferentes substratos.

Tabela 3 – BP's obtidos a partir de diferentes lactamas e compostos carbonílicos [34].

Reagentes	Produtos	Rendimento (%)
		50
		77
		67
		72
R =		

BP's derivados de  $\alpha$ -aminoácidos foram sintetizados, demonstrando, também, atividade anti-reabsortiva [35]. Nesta reação, ocorre, inicialmente, a proteção do grupo amina do aminoácido, seguida de substituição do grupo hidroxila pelo cloro. Posteriormente, é feita a inserção dos átomos de fósforo, em duas etapas. Primeiramente, ocorre reação com um reagente adequado de fósforo formando um

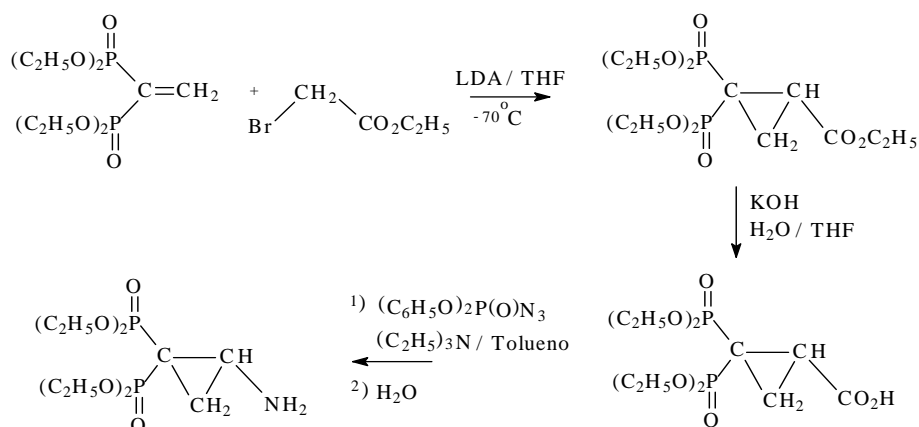
acilfosfonato e, em seguida, ocorre ataque de um segundo átomo de fósforo, formando o bisfosfonato. Finalmente, o grupo protetor é retirado, os grupos ésteres são hidrolisados e os BP's são obtidos como sais de sódio (Esquema 8).



Esquema 8 – Síntese de BP's derivados de α-aminoácidos.

Como descrito anteriormente, a estrutura da cadeia lateral, bem como a presença ou não de heteroátomo fornece características bem distintas aos BP's. O tetraetil 2-aminociclopropilideno-1,1-bisfosfonato, ainda não avaliado clinicamente, possui anel de 3 membros em sua cadeia lateral, podendo proporcionar uma atividade farmacológica ainda não encontrada em outros BP's [36].

A síntese deste composto é realizada em três passos (Esquema 9). Primeiramente, o lítio-carbânion do etil 2-bromoacetato é adicionado, via adição de Michael, ao tetraetil vinilideno 1,1-bisfosfonato. Essa adição é seguida de uma ciclização intramolecular levando à formação de um derivado ciclopropil. Logo após, o ácido obtido é convertido em uma amina.



Esquema 9 – Síntese do tetraetil 2-aminociclopropilideno-1,1-bisfosfonato.

### 3 ANÁLISE

Os BP's podem ser analisados através de diferentes técnicas analíticas, destacando-se a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar. Estas técnicas são utilizadas para a determinação de BP's na matéria-prima, no produto acabado e em fluidos biológico sendo neste caso, necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas com alta sensibilidade, tendo em vista a baixa concentração destes fármacos nos fluidos biológicos.

A análise em meio biológico requer a utilização de técnicas de pré-concentração, onde os analitos são concentrados, e de limpeza (clean-up), onde os analitos de interesse são isolados da matriz biológica. Para este fim, destacam-se a microextração em fase sólida (SPME) e extração em fase sólida (SPE), sendo esta última a mais comum.

O desenvolvimento de métodos sensíveis é dificultado pelas características das moléculas dos BP's mais utilizados. Estes não possuem grupos cromóforos e não podem ser determinados pelos detectores mais usuais (ultravioleta e

fluorescência). Para contornar esta dificuldade têm sido desenvolvidos métodos de derivação e detecção indireta. Entretanto, estes métodos requerem maior tempo para sua execução, além de serem mais passíveis de erros.

Nos últimos anos tem-se observado um aumento no desenvolvimento de métodos que utilizam a espectrometria de massas. Este detector possui a grande vantagem de ser seletivo e universal, além de possuir boa sensibilidade. Por outro lado, é uma técnica de alto custo, e que exige grande experiência por parte dos analistas.

### **3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência**

Esta técnica é a mais utilizada para análise dos BP's, sendo empregados diferentes detectores, fases móveis e mecanismos de retenção.

CHESTER (1980) desenvolveu um detector seletivo a fósforo, baseado na emissão de luz pelo HPO, para HPLC, analisando diversos ácidos fosfônicos [37]. Posteriormente, o mesmo autor utilizou esse detector para análise do clodronato em fluidos biológicos. O mecanismo de separação empregado foi de troca aniônica, obtendo-se um limite de quantificação de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  [38].

Há muitos métodos que utilizam detecção por índice de refração. Um método para determinação do ácido metilenobisfosfônico, utilizando pareamento iônico, foi desenvolvido por YEH (1981). Foi utilizada uma coluna convencional C18 e o composto tri-n-octilamina como agente de pareamento iônico [39]. WONG et al. (1987) desenvolveram um método empregando coluna de troca aniônica, para análise de diferentes polifosfonatos, obtendo limites de detecção de 2,4 a 15,2 ppm [40]. HAN et al. (1996) desenvolveram um método para análise de comprimidos de alendronato sódico, utilizando coluna de troca aniônica. Este método mostrou-se

exato, seletivo, robusto e com limite de detecção adequado para análises de rotina de comprimidos de alendronato [41].

A análise de BP's utilizando detectores de fluorescência também é muito utilizada. Como estas moléculas, em geral, não possuem grupos que fluorescem, são necessárias algumas estratégias para a utilização de tais detectores. Derivações pré ou pós-coluna e detecção indireta são as mais utilizadas. No primeiro caso, uma molécula fluorescente é ligada ao BP, enquanto que na detecção indireta o composto fluorescente encontra-se presente na fase móvel.

Métodos de determinação indireta de BP's foram desenvolvidos utilizando o complexo de alta fluorescência formado entre o alumínio e o morin (2',3',4',5,7-penthidroxiflavona). Na presença dos BP's o alumínio se liga nestes compostos formando um complexo mais estável, e que não fluoresce. A passagem do complexo alumínio-morin pelo detector de fluorescência gera absorção ao passo que o complexo BP-alumínio, ao passar pelo detector, causa diminuição da absorção, registrando um pico negativo [42,43]. A detecção por fluorescência com derivação pós-coluna foi descrita por KWONG et al. (1990) para a análise de alendronato em comprimidos. Foram utilizados os compostos o-ftalaldeído e mercaptoetanol (OPA-MERC) como reagente pós-coluna, sendo avaliada a eficiência da reação de derivação, variando-se os seguintes parâmetros: pH, fluxo da fase móvel, fluxo do reagente pós-coluna, temperatura da reação, tamanho e tipo do reator. Foi utilizada cromatografia de fase reversa com pareamento iônico [44].

Vários compostos podem ser utilizados para a derivação pré-coluna em detecção por fluorescência. O pamidronato foi determinado em urina, empregando a fluorescamina como reagente de fluorescência e coluna de fase reversa (C18). O limite de quantificação obtido foi de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  em urina e o limite de detecção foi de

50 nmol L<sup>-1</sup> em urina [45]. Posteriormente, melhores limites de quantificação e detecção (0,7 µmol L<sup>-1</sup> de urina e 10 nmol L<sup>-1</sup> de urina, respectivamente) foram alcançados, aprimorando-se o processo de extração dos analitos [46].

O composto 2,3-naftaleno dicarboxaldeído também é utilizado em derivações pré-coluna. KLINE et al. (1990) determinaram o alendronato em urina utilizando este reagente, na presença do íon cianeto, e coluna de fase reversa polimérica. Foi obtido limite de quantificação de 5 ng mL<sup>-1</sup> [47]. Este método foi melhorado substituindo-se o íon cianeto pelo composto N-acetil-D-penicilamina, obtendo-se um limite de quantificação de 1 ng mL<sup>-1</sup> [48].

Outra opção para a derivação pré-coluna é a utilização do reagente 1-naftilisotiocianato, para a determinação do pamidronato em fluidos biológicos. Para tanto, o fármaco foi analisado por meio de pareamento iônico [49-51].

Para a determinação de BP's utilizando detectores de ultravioleta (UV) são também necessárias estratégias devido à ausência de grupos cromóforos nestes fármacos. SPARIDANS et al. (1995) desenvolveram um método para a análise de oito diferentes BP's, em que estes são complexados "in-line" com íons cobre(II), absorvendo no UV em 245 nm. Os autores utilizaram coluna de troca aniônica e fase móvel constituída de ácido nítrico 1,5 mM e nitrato de cobre(II) 0,5 mM. O limite de detecção obtido foi de 0,4 µg mL<sup>-1</sup> [52].

Métodos utilizando derivações pré-coluna também foram desenvolvidos. DE MARCO et al. (1989) determinaram o alendronato empregando o composto 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC), na presença de citrato de sódio, como reagente de derivação. Utilizou-se cromatografia de fase reversa, com detecção em 266 nm [53]. Outro método foi desenvolvido utilizando o fenilisotiocianato seguido de



tratamento com peróxido de hidrogênio, antes da injeção. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  [54].

A análise de BP's com detecção no UV-Visível e derivação pós-coluna é muito utilizada. DALEY-YATES et al. (1989) desenvolveram um método para análise de BP's em plasma e na urina. Os BP's foram oxidados a ortofosfato com persulfato de amônio e posterior reação com molibdênio-ascorbato, formando o cromóforo fosfomolibdato, detectado em 820 nm. Obteve-se limite de detecção de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  [55].

Outro método para análise de clodronato foi desenvolvido, empregando coluna de poliestireno-divinilbenzeno. O analito foi detectado em 300 nm após reação com solução ácida de ferro (III) [56]. Métodos utilizando o complexo tório-EDTA-laranja de xilenol foram propostos. Os BP's reagem quantitativamente com este complexo em condições levemente ácidas [57,58].

Outra alternativa para a detecção no UV são os métodos indiretos. TSAI et al. (1993) propuseram um método para análise de comprimidos de etidronato utilizando ácido nítrico (absorção máxima em 220 nm) como eluente. Os cromatogramas obtidos apresentam uma queda no sinal quando ocorre a passagem dos BP's pela célula do detector [59].

Detectores eletroquímicos também podem ser utilizados na determinação de BP's, com a vantagem de não haver necessidade de derivação do analito. Entretanto, são muito sensíveis a variações externas, o que compromete a reprodução dos resultados. USUI et al. (1992) propuseram um método para análise de um novo bisfosfonato, extraído de plasma, urina e osso, empregando detector eletroquímico operando no modo oxidativo. Foram obtidos limites de quantificação de  $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$  no plasma,  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  na urina e  $25 \text{ ng g}^{-1}$  em osso [60].

Detectores condutimétricos são utilizados na determinação de diferentes BP's, também sem a necessidade de derivação do analito. São empregadas colunas de troca aniônica [61-63].

A utilização de espectrômetro de massas, como detectores, para análise de BP's tem aumentado significativamente nos últimos anos. Este detector permite a análise direta dos BP's, sem necessidade de derivação, com boa sensibilidade e robustez.

QIN et al. (1994) desenvolveram um método para a determinação de alendronato, que é altamente polar e termolábil presente em comprimidos, utilizando cromatografia iônica acoplada a detector de massas com interface "íon-spray" operando no modo negativo. Os autores observaram neste estudo que a fragmentação dominante deste composto é a clivagem das ligações C-P [64].

O clodronato foi analisado por espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray no modo negativo, em um equipamento com triplo quadrupolo. Foram propostos diferentes caminhos para a fragmentação do clodronato e avaliada a influência do pH no grau de desprotonação [65].

### **3.2 Cromatografia gasosa**

Os BP's possuem natureza polar e baixa volatilidade, desta forma, para a análise por cromatografia gasosa, é necessária a derivação para a formação de compostos voláteis e estáveis. O etidronato foi analisado por meio da derivação com bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida. Utilizou-se, para a determinação cromatográfica, o detector de ionização por chama e detector de massas para controle do derivado formado. O método se mostrou rápido e específico, porém sem sensibilidade suficiente para análise deste fármaco em fluidos biológicos [66].

AURIOLA et al. (1989) descreveram um método para análise de clodronato em urina. O analito extraído foi reagido com um derivado trimetil-silil e analisado utilizando detector de massas [67].

SAKYIAMA et al. desenvolveram um método para análise de diferentes BP's nitrogenados utilizando o composto isobutilcloroformato como reagente de derivação. Utilizou-se detector fotométrico de chama acoplado a um cromatógrafo gasoso, obtendo-se limite de detecção no plasma de 200 ng/mL. Realizou-se também análise com espectrômetro de massas para confirmação estrutural dos derivados formados [68].

### **3.3 Eletroforese capilar**

A isotacoforese capilar foi utilizada para análise de pamidronato e impurezas de síntese e degradação presentes em matéria-prima. Foram comparados dois sistemas com diferentes condições e estes se mostraram adequados para análises de rotina [69].

Um método para análise de alendronato em formulações farmacêuticas foi descrito por Tsai et al. Os autores utilizaram detecção direta no UV baseada na formação on-line de complexo cromóforo entre este fármaco e os íons cobre(II) presentes na solução eletrolítica. No entanto, este método não pode ser utilizado para análise de alendronato em soluções intravenosas, devido à presença dos ânions citrato, que é forte agente quelante, em suas formulações [70].

SIRÉN et al. (1997) desenvolveram um método para a análise de BP's , com detecção indireta no UV, utilizando corantes nitrosonaftóis sulfonatados na solução eletrolítica. O limite de detecção foi de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  em 254 nm [71].

PENG et al. determinaram um BP, 2-tioetano-1,1-ácido bisfosfônico, utilizando método com determinação direta no UV, coluna revestida com glicerol, tampão fosfato e injeção eletrocínética sob condições de “sample stacking”. O limite de detecção foi de  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  [72].

Um método para a determinação de clodronato e suas impurezas, utilizando detecção de massas por “eletrospray” e modo negativo, foi desenvolvido por Huikko et al. Este método mostrou ter alta capacidade de separação e especificidade para análise de BP's [73].

Método com detecção direta no UV em baixo comprimento de onda e polaridade invertida foi aplicado para a separação e quantificação de impurezas em clodronato. Utilizou-se capilar de poliacrilamida e avaliou-se a influência do pH e força iônica do eletrólito sobre a separação [74].

### **3.4 Outros métodos**

REED et al. (1995) descreveram método direto para análise de alendronato presentes em comprimidos. As amostras foram dissolvidas em água e o conteúdo de fósforo foi analisado por plasma acoplado indutivamente (ICP). O método apresentou boa precisão e exatidão [75].

A formação de complexo entre alendronato e cloreto férrico em solução de ácido perclórico foi estudada e analisada por espectrofotometria. Este método apresentou limite de detecção de  $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , suficiente para análise nas formulações farmacêuticas [76].

#### **4 OBJETIVOS DO PRESENTE ESTUDO**

Este trabalho teve como objetivo geral investigar, através de técnicas cromatográficas, a determinação de BP's em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos, plasma e urina, utilizando detecção indireta no UV e detecção por condutividade com supressão do eluente, sem a necessidade de processos de derivatização e com injeção direta de amostra.

## **CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE BISFOSFONATOS POR CROMATOGRAFIA IÔNICA E DETECÇÃO INDIRETA NO ULTRAVIOLETA**

### **1 INTRODUÇÃO**

O presente capítulo apresenta o desenvolvimento e otimização de métodos alternativos para análises de rotina dos BP's etidronato, clodronato, alendronato e pamidronato, Figura 3, em matéria-prima e produtos acabados, utilizando cromatografia iônica e detecção indireta no ultravioleta. Este método está baseado no decaimento do sinal de UV quando um composto que não possui grupo cromóforo passa pela cela do detector em que a fase móvel possui absorção, obtendo-se então picos cromatográficos negativos. Entretanto, o software utilizado permite a inversão do pico cromatográfico, possibilitando a integração do mesmo. Métodos que utilizam detecção indireta são úteis em diversas ocasiões onde os analitos não absorvem no ultravioleta, permitindo analisar, por exemplo, ânions e cátions inorgânicos com uma instrumentação simples comumente encontrada em laboratórios. Após o desenvolvimento e otimização do método, efetuou-se a avaliação de alguns parâmetros como precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa de trabalho e robustez. Os métodos desenvolvidos são simples, rápidos, o que facilita consideravelmente análises rotineiras de controle de qualidade e utilizam colunas de diâmetro reduzido, o que implica na utilização de pequena quantidade de solventes.

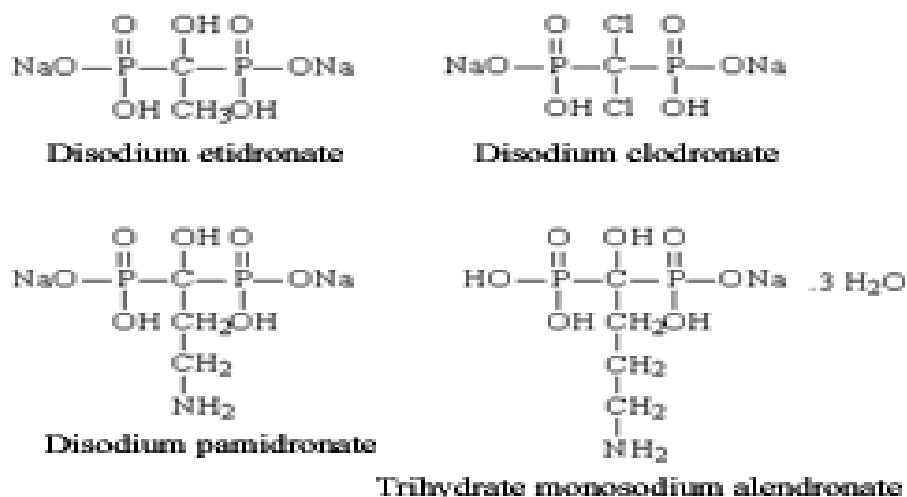


Figura 3 – Estruturas químicas dos BP's estudados.

## 1.1 Experimental

### 1.1.1 Padrões e reagentes

O padrão de clodronato foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Steinheim, Alemanha) e os padrões de alendronato, pamidronato e etidronato foram gentilmente cedidos por Bufa B.V. (Uitgeest, Holanda). As soluções dos padrões utilizadas nas análises foram preparadas utilizando água purificada em sistema Milli-Q (Millipore). Foram utilizados medicamentos de 2 diferentes laboratórios: Merck Sharp & Dohme (referência) e Teva (genérico), na forma de comprimidos contendo, respectivamente, 10 e 11,6 mg de alendronato sódico. Os medicamentos foram adquiridos no comércio. Utilizou-se, para o preparo das fases móveis, ácido cítrico Merck (Rio de Janeiro, Brasil) e citrato de sódio diidratado Mallinckrodt (Cidade do México, México).

### 1.1.2 Instrumentação e condições cromatográficas

Para a realização das análises foi utilizado cromatógrafo a líquido série LC-10A, equipado com duas bombas (modelo LC-10Ai), forno para coluna (modelo CTO-10ASVP), detector UV-Visível de comprimento de onda fixo (SPD-10AVP), amostrador automático (modelo SIL-10Ai), controlador de sistema (modelo SCL-10AVP), desgaseificador (modelo DGU14A) e software de aquisição de dados Class-VP, ambos da Shimadzu (Kioto, Japão). Foi também utilizado detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M10AVP), também da Shimadzu, para a obtenção de espectros no ultravioleta utilizados na avaliação da especificidade. As condições cromatográficas empregadas na determinação de etidronato e clodronato foram: coluna Phenosphere SAX (150 x 2,0 mm, 5  $\mu$ m), fase móvel constituída de tampão citrato 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 3,6, fluxo: 0,3 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50  $\mu$ L, comprimento de onda de detecção de 226 nm com polaridade invertida e temperatura do forno de 30 °C. Para os fármacos alendronato e pamidronato as condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Sphereclone SAX (250 x 2,0 mm, 5  $\mu$ m), fase móvel constituída de tampão citrato 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 4,6, fluxo de 0,25 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50  $\mu$ L, comprimento de onda de detecção de 222 nm com polaridade invertida e temperatura do forno de 30 °C.

### 1.1.3 Preparo das soluções padrão

Os padrões de etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato foram pesados adequadamente e transferidos para balão volumétrico de 10 mL, formando soluções de concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>. As soluções padrão foram diluídas com água para concentrações definidas, de acordo com as necessidades analíticas.



#### 1.1.4 Preparo das amostras de comprimidos de alendronato

Foram pesados e macerados 10 comprimidos contendo 10 mg de alendronato. Dos comprimidos macerados, foram pesados o equivalente a 10 mg de alendronato e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL. Deixou-se em agitação mecânica por 10 minutos e completou-se o volume com água. Filtrou-se, desprezando os primeiros mililitros do filtrado. Transferiu-se 3,0 mL do extrato para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água, obtendo-se desta forma solução de alendronato com concentração teórica de  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As amostras foram preparadas em duplicata.

#### 1.1.5 Avaliação dos métodos

A seletividade foi avaliada comparando-se os espectros no ultravioleta obtidos em diferentes pontos do pico cromatográfico com o auxílio do detector de arranjo de diodo. A linearidade foi verificada por meio da construção de curva analítica (em triplicata para cada ponto) com os seguintes pontos: 50, 100, 200, 300 e  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o etidronato e clodronato e 100, 200, 300, 400 e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o pamidronato e alendronato. A equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) foram calculados por meio do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Avaliou-se a precisão intra-dia ( $n=3$ ) nos níveis inferior, intermediário e superior da curva analítica. O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração onde o desvio padrão relativo (DPR), foi inferior a 2,0%. O limite de detecção foi estabelecido como a menor concentração onde o pico relativo ao fármaco era cerca de três vezes maior que o ruído da linha de base. Para o alendronato, a exatidão foi avaliada por meio do cálculo da recuperação, em três

concentrações (n=3). A robustez do método foi avaliada verificando-se a influência de algumas alterações no sistema, tais como: pH da fase móvel, composição da fase móvel e temperatura.

## **2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.2.1 Otimização das condições cromatográficas**

Durante a otimização dos métodos para a determinação dos BP's, foi avaliada a influência da concentração e pH do tampão utilizado como fase móvel no tempo de retenção e no sinal analítico dos fármacos. O tampão citrato foi escolhido por apresentar absorção no ultravioleta e por ser um tampão orgânico, que danifica menos o equipamento. Para o etidronato e o clodronato a concentração de tampão citrato de sódio foi de 20 mmol L<sup>-1</sup> e pH=3,6. Essa condição mostrou-se adequada para uma análise rápida de clodronato e etidronato. Para o pamidronato e alendronato foi mantida a mesma concentração do tampão, fixando o pH em 4,6.

A concentração de 20 mmol L<sup>-1</sup> do tampão citrato de sódio permitiu obter-se a maior sensibilidade, pois foi nesta concentração de tampão em que houve a maior absorção da fase móvel, permitindo o maior decaimento quando os analitos passam pela cela do detector. Além disso, esta concentração do tampão permitiu análises rápidas com resolução adequada entre os picos dos analitos e os picos da água e do sistema. O pico da água é o tempo morto da coluna, pois a água presente na amostra não interage com a coluna e não possui absorção no ultravioleta. O pico do sistema é característico de métodos que empregam cromatografia iônica e detecção indireta no ultravioleta. O pico é resultante de uma zona deficiente de eluente, formada pela injeção da amostra e depende do pH da amostra [36].

A Figura 4 apresenta os cromatogramas típicos das soluções padrões de etidronato (A), clodronato (B), pamidronato (C) e alendronato (D), com tempos de retenção de 3,3; 3,5; 4,3 e 4,3 minutos, respectivamente.

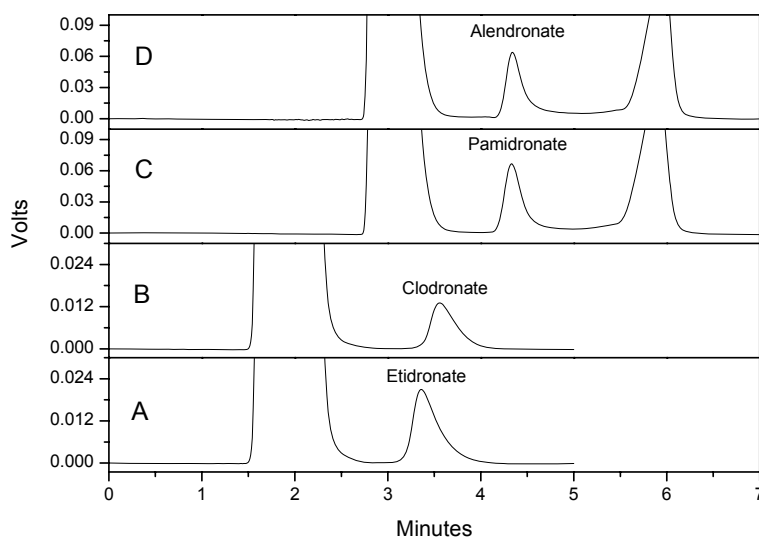


Figura 4 – Cromatograma típico dos padrões de etidronato (A), clodronato (B), pamidronato (C) e alendronato (D).

### 2.2.2 Linearidade e faixa de trabalho

A faixa de trabalho para os fármacos etidronato e clodronato foi de 50 a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e para o alendronato e pamidronato foi de 100 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As curvas analíticas nestas faixas estão demonstradas na Figura 5.

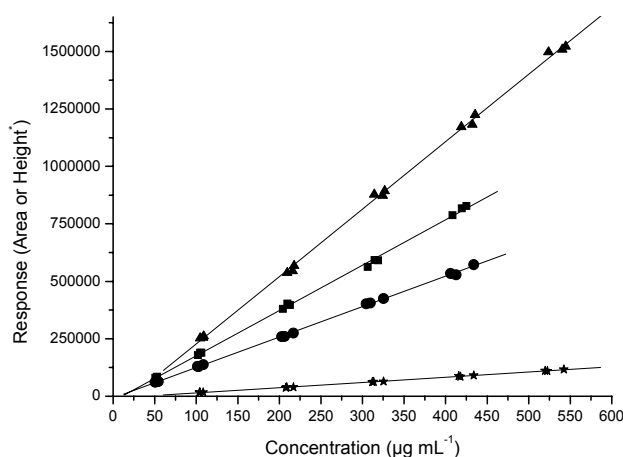


Figura 5 – Curvas analíticas para os fármacos etidronato (■), clodronato (●), pamidronato (▲) e alendronato (\*).

Foram utilizados valores de altura para o alendronato, pois se obteve resultados mais precisos quando comparados com valores de área. Para os outros fármacos foram utilizados valores de área. Em todos os métodos o coeficiente de correlação foi maior que 0,999, indicando que há correlação linear entre a concentração e a resposta obtida. As equações da reta e os valores de coeficiente de correlação dos métodos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Equação da reta e valores dos coeficientes de correlação para os BP's estudados

Fármaco	Equação da reta	Coefficiente de correlação
Etidronato	$Y = -21248,5962 + 1971,41548X$	0,99947
Clodronato	$Y = -6868,83482 + 1322,86749X$	0,99969
Pamidronato	$Y = -65693,9955 + 2932,01134X$	0,99949
Alendronato	$Y = -8004,3083 + 226,9868X$	0,99924

### 2.2.3 Seletividade

A comparação dos espectros no ultravioleta em diferentes pontos do pico cromatográfico de todos os fármacos mostrou uma similaridade maior que 98,0%, o que indica que no tempo de retenção dos picos obtidos não haviam outros compostos co-eluindo. Os espectros dos fármacos, na faixa de 200 a 300 nm estão apresentados na Figura 6.

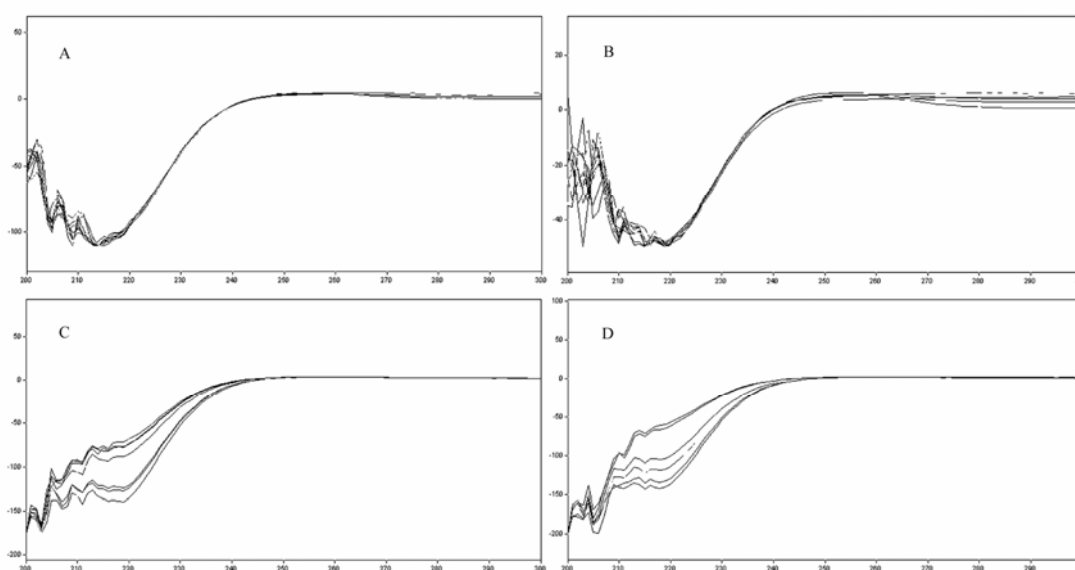


Figura 6 – Espectros na região do ultravioleta (faixa de 200 a 300 nm), dos fármacos etidronato (A), clodronato (B), pamidronato (C) e alendronato (D).

### 2.2.4 Precisão

O desvio padrão relativo (DPR) medido para a avaliação da precisão intra-dia foi menor que 2,0% em todas as concentrações avaliadas. Isto indica que o método possui boa precisão quando análises são realizadas no mesmo dia. Os valores de DPR obtidos estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de concentração e DPR obtidos para o cálculo da precisão intra-dia.

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Etidronato	Clodronato	Pamidronato	Alendronato
50	0,89	1,65	–	–
100	1,70	0,93	1,06	0,85
200	1,72	0,56	1,72	1,98
300	1,18	0,56	1,87	1,42
400	0,61	1,70	1,47	1,93
500	–	–	1,29	1,04

### 2.2.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação encontrado para os fármacos etidronato e clodronato foi de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  e para o pamidronato e alendronato foi de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Foi considerado como limite de quantificação a menor concentração onde o DPR era menor que 2,0%.

### 2.2.6 Limite de detecção

Os valores de limites de detecção encontrados para os fármacos analisados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Limites de detecção dos bisfosfonatos.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Étidronato</b>	<b>Clodronato</b>	<b>Pamidronato</b>	<b>Alendronato</b>
	5,3	5,1	26,3	25,1

### 2.2.7 Recuperação

A Tabela 7 apresenta os valores de altura dos picos obtidos no cálculo da recuperação para o alendronato. Os valores de porcentagem de recuperação obtidos variaram de 97,12 a 102,92%, valores próximos de 100%, o que indica que o método possui recuperação adequada para a análise do alendronato

### 2.2.8 Robustez

O pH e a composição da fase móvel alteram o tempo de retenção, área e altura dos picos cromatográficos dos fármacos, bem como a resolução entre os picos dos fármacos, picos da água e do sistema. Assim, estes parâmetros devem ser bem controlados para garantir a reprodutibilidade do método.

A temperatura não é um parâmetro que exerce influência significativa no método, pois o mecanismo de separação em Cromatografia de Troca Iônica é baseada em interações eletrostáticas entre os sítios de troca da coluna e os analitos de carga oposta. Já em Cromatografia de Fase Reversa, o mecanismo de separação está baseada na partição, e o coeficiente de partição está diretamente ligado a temperatura.

Tabela 7 - Valores de concentração e altura obtidos para o cálculo da recuperação do alendronato.

Concentração (µg/mL)	Altura	Fator de resposta	Fator de resposta (média das 3 replicatas)	Recuperação (%)
109,3	18097,3	165,57		100,67
108,6	17975,7	165,52	164,46	100,64
108,4	18348,5	169,27		102,92
327,9	64136,0	195,60		98,60
325,8	62767,7	192,66	198,37	97,12
325,2	63473,7	195,18		98,39
546,5	118393,7	216,64		101,60
543,0	118010,0	217,33	213,22	101,93
542,0	117809,0	217,36		101,94

### 2.2.9 Determinação de alendronato no produto acabado

O teor encontrado para o medicamento referência foi de 102,7% enquanto que para o medicamento genérico foi de 96,7%. Os valores encontrados estão dentro da faixa de 90,0 a 110,0%, demonstrando a qualidade do medicamento em termos do teor do princípio ativo. Além disso, estes resultados mostram que o método é adequado para a análise de medicamentos contendo alendronato. Os cromatogramas obtidos para o medicamento de referência e genéricos estão mostrados nas Figuras 7 e 8 respectivamente.



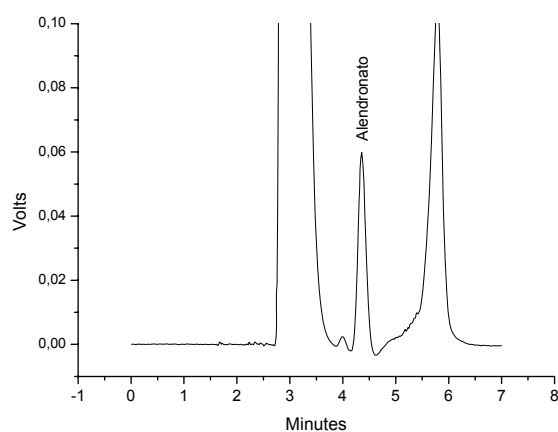


Figura 7 – Cromatograma do alendronato referência na concentração de  $300,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

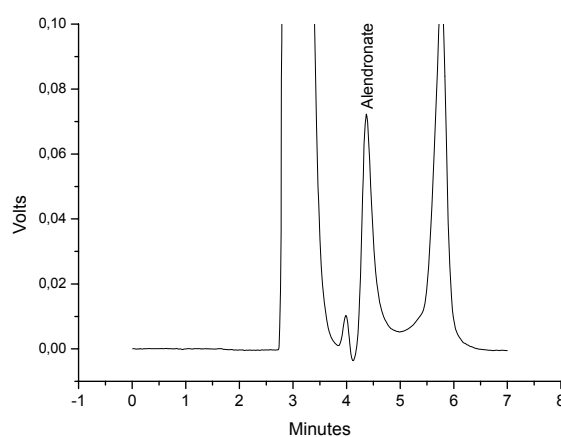


Figura 8 – Cromatograma do alendronato genérico na concentração de  $300,21 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 2.3 Conclusão

Os métodos descritos neste trabalho para a determinação dos fármacos etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato em matéria-prima e produtos acabados se mostraram simples, precisos, exatos e seletivos. Estes métodos são

rápidos, com tempo de análise de 5 minutos para o etidronato e clodronato e 7 minutos para o alendronato e pamidronato. Além disso, estes métodos empregaram detecção no ultravioleta, que é um detector comumente encontrado nos laboratórios analíticos. Foram empregadas colunas de diâmetro reduzido (2,0 mm), o que reduz em cerca de 80% o consumo de solventes, quando comparado com o uso de colunas de diâmetro convencional (4,6 mm) e de fase baseada em sílica, mais baratas que as poliméricas utilizadas em trabalhos anteriores, o que é muito importante em análises de rotina.

Ademais, estes métodos utilizaram tampão citrato de sódio, como fase móvel, que é menos danoso para o sistema cromatográfico, que o ácido nítrico empregado em outros trabalhos, pois o ácido nítrico é um ácido forte e corrosivo e o ácido cítrico é um ácido orgânico e fraco.

## **CAPÍTULO 3 – DETERMINAÇÃO DE BISFOSFONATOS EM PLASMA HUMANO POR CROMATOLOGRAFIA IÔNICA MULTIDIMENSIONAL E DETECÇÃO INDIRETA NO UV COM INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRA**

### **1 INTRODUÇÃO**

A determinação de fármacos em fluidos biológicos é de crucial importância em estudos de bioequivalência, que é uma importante etapa para a aprovação de medicamentos genéricos pelo órgão de registro de medicamentos. Entretanto, os métodos tradicionais para determinação de BP's em fluidos biológicos (plasma e urina) necessitam de um extenuante processo de extração e derivatização da molécula com grupos fluorescentes, tornando-se uma análise de alto custo.

Neste capítulo, são abordados os resultados obtidos de estudos visando a determinação de clodronato em plasma humano utilizando Cromatografia Líquida Iônica Multidimensional, com o intuito de solucionar os problemas inerentes aos métodos tradicionais. Esse sistema consiste em uma coluna extratora “home made” de troca aniônica, uma coluna analítica polimérica, uma válvula para seleção de coluna e uma válvula solenóide para seleção de solvente. A fase móvel consiste em solução aquosa de ftalato de potássio, água purificada em sistema Milli Q como solvente de lavagem, e os componentes de um cromatógrafo à líquido, como bombas, auto injetor e detector de ultravioleta, da marca Shimadzu (Kyoto, Japão).

#### **1.1 Experimental**

##### **1.1.1 Padrões e reagentes**

Todos os padrões utilizados foram descritas na secção 2.1.1 e a instrumentação utilizada está mostrada na seção 2.1.2; entretanto foi adaptado um

sistema de Cromatografia Líquida Multidimensional, com a configuração forflush demonstrada na Figura 9.

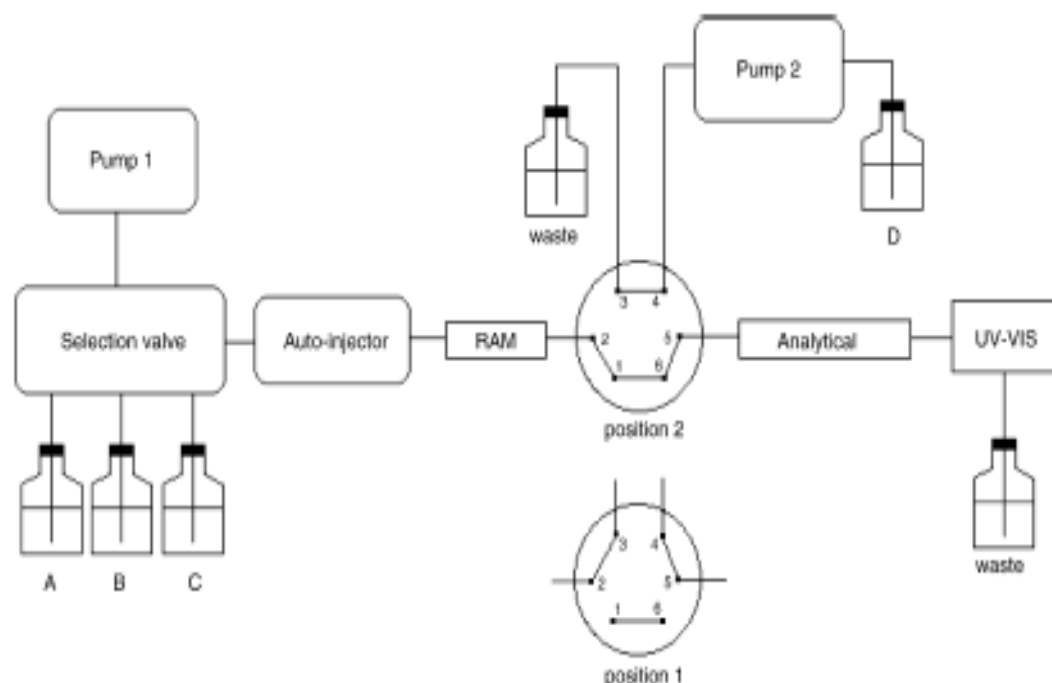


Figura 9 – Esquema da instrumentação utilizada em Cromatografia Multidimensional.

### 1.1.2 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas em que se obteve os melhores resultados foram: fase móvel constituído de uma solução aquosa de ftalato de potássio com concentração de 1 mM (solvente B e D), comprimento de onda utilizado de 254 nm, fluxo de 0,25 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L e água Milli Q como solvente de lavagem (A) com fluxo de 0,5 mL/min. Foram utilizadas uma coluna analítica polimérica Waters SAX 50 x 2,0 mm (comprimento x diâmetro interno) com 5  $\mu$ m de tamanho de partícula e uma coluna extratora “home made” com 50 x 2,0 mm (comprimento x diâmetro interno) e fase estacionária polimérica SAX Waters Oasis

Max com 60  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula. A configuração forflush está mostrada na Tabela 9. A concentração de etidronato utilizada foi de 392 mg/L.

Tabela 8. Configuração forflush

Tempo(min)	Evento	Seletor de solvente	Posição
0	Injeção de amostra	A	1
4	Passagem de eluente pela coluna extratora	B	1
7	Passagem de eluente pela coluna extratora e analítica	B	2
12	Passagem de água pela coluna extratora	B	1
30	Término da análise	A	1

## 1.2 Resultados e discussões

Os cromatogramas obtidos nas condições descritas na seção 3.2.2. para o etidronato estão mostrados nas Figuras de 10 a 13.

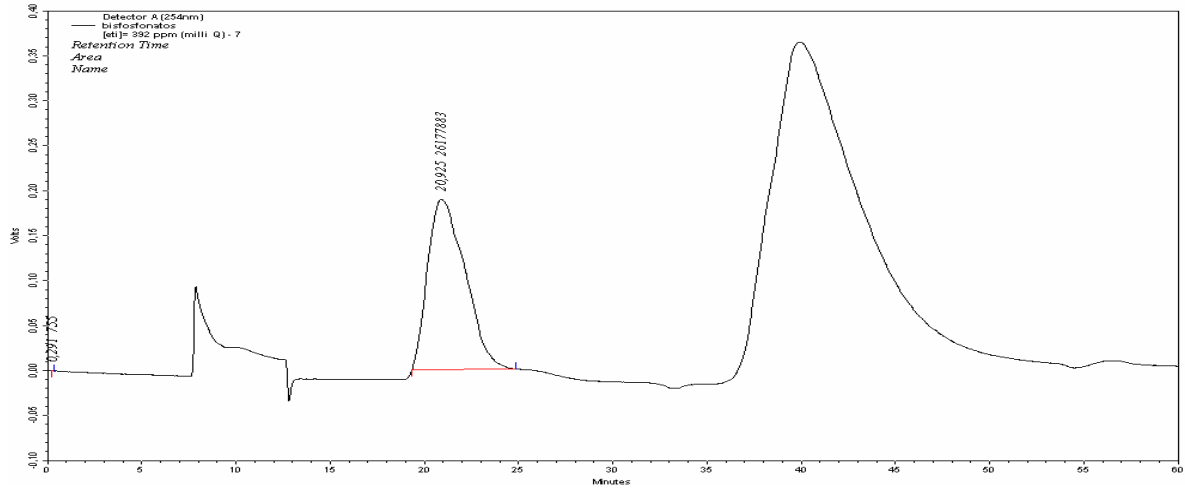


Figura 10. Cromatograma obtido para o etidronato ( $t_r=20,925$  min) em água

Milli Q

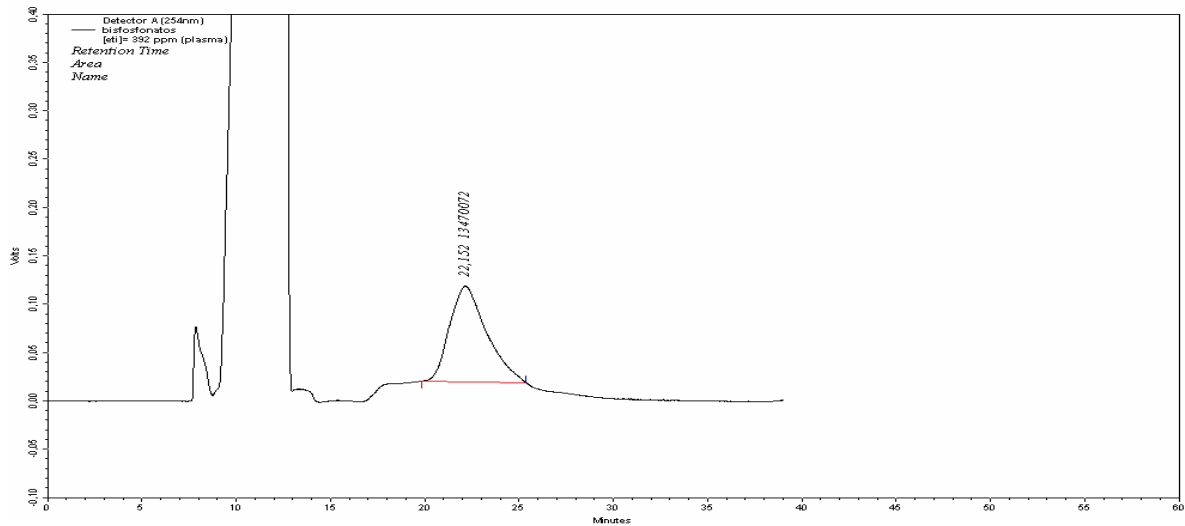


Figura 11. Cromatograma obtido para o etidronato ( $t_r=22,152$  min) em plasma

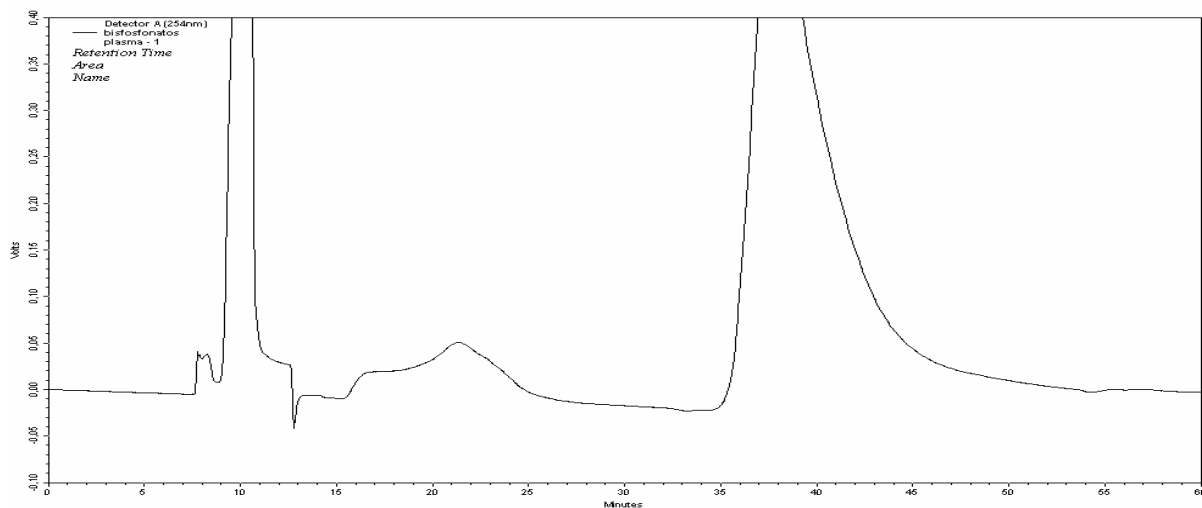


Figura 12. Cromatograma obtido para o plasma (branco)

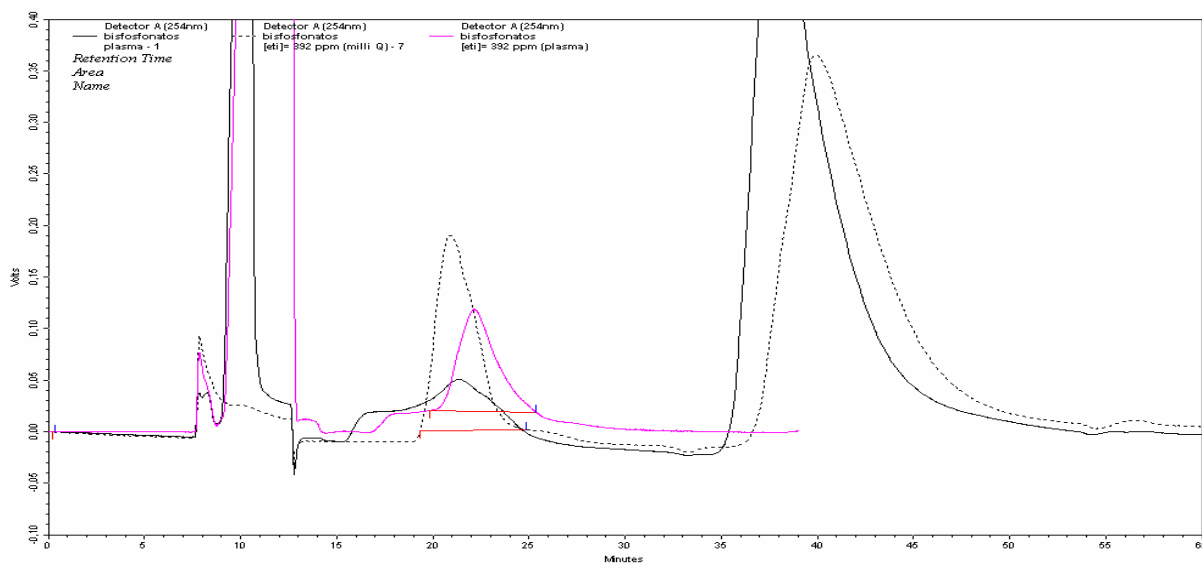


Figura 13. Cromatograma das Figuras 10 a 12 sobrepostos.

Depois de diversas tentativas de separar o etidronato de amostras de plasma, observou-se, ainda, a co-eluição do analito de interesse com os interferentes da matriz, com uma recuperação em torno de 50%.

### **1.3 Conclusão**

Após diversas tentativas com os bisfosfonatos, os melhores resultados foram obtidos com o etidronato, entretanto, esses resultados não foram satisfatórios devido, principalmente, a impossibilidade de separar o analito dos interferentes do plasma, apesar de inúmeras mudanças nas condições experimentais, e a baixa sensibilidade do método que não permite a detecção em fluídos biológicos.



## **CAPÍTULO 4 – DETERMINAÇÃO DE BISFOSFONATOS EM MATÉRIA PRIMA E EM PRODUTOS ACABADOS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA IÔNICA E DETECÇÃO POR CONDUTIVIDADE COM SUPRESSÃO DE ELUENTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

Neste capítulo foi abordado a análise dos BP's por Cromatografia Iônica com detecção por Condutividade e Supressão de eluente. Nesta técnica, a separação cromatográfica é seguida de uma detecção condutimétrica, após a neutralização da fase móvel (NaOH) com uma membrana supressora. Esta membrana (as vezes chamada apenas de supressora) realiza a eletrólise da água gerando prótons ( $H^+$ ), que são trocados por íons  $Na^+$  na fase móvel neutralizando a mesma. Este processo de neutralização garante um aumento na sensibilidade do detector, pois o eluente neutralizado conduz pouca corrente elétrica quando comparado com uma solução aquosa de NaOH. Assim, a diferença de condutividade entre a fase móvel e o analito, que é responsável pela detecção, aumenta quando comparado com uma fase móvel não neutralizada. O esquema utilizado na supressão do eluente está apresentado e a configuração da supressora no equipamento está na Figura 15.

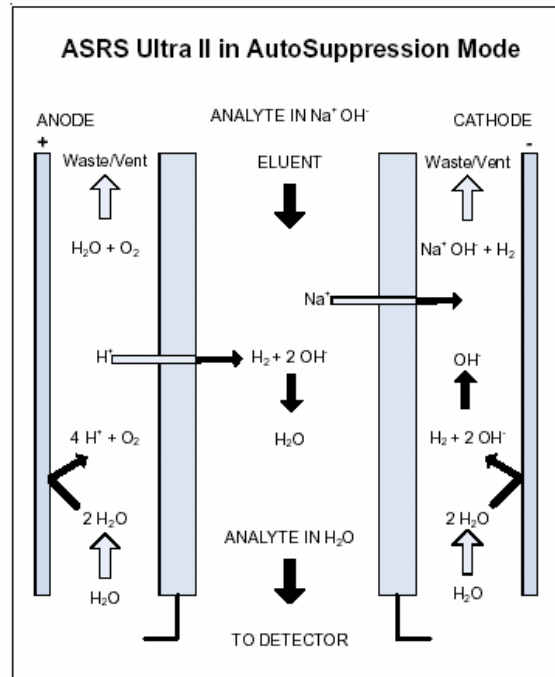


Figura 14 – Supressão eletrolítica do eluente NaOH (Dionex)

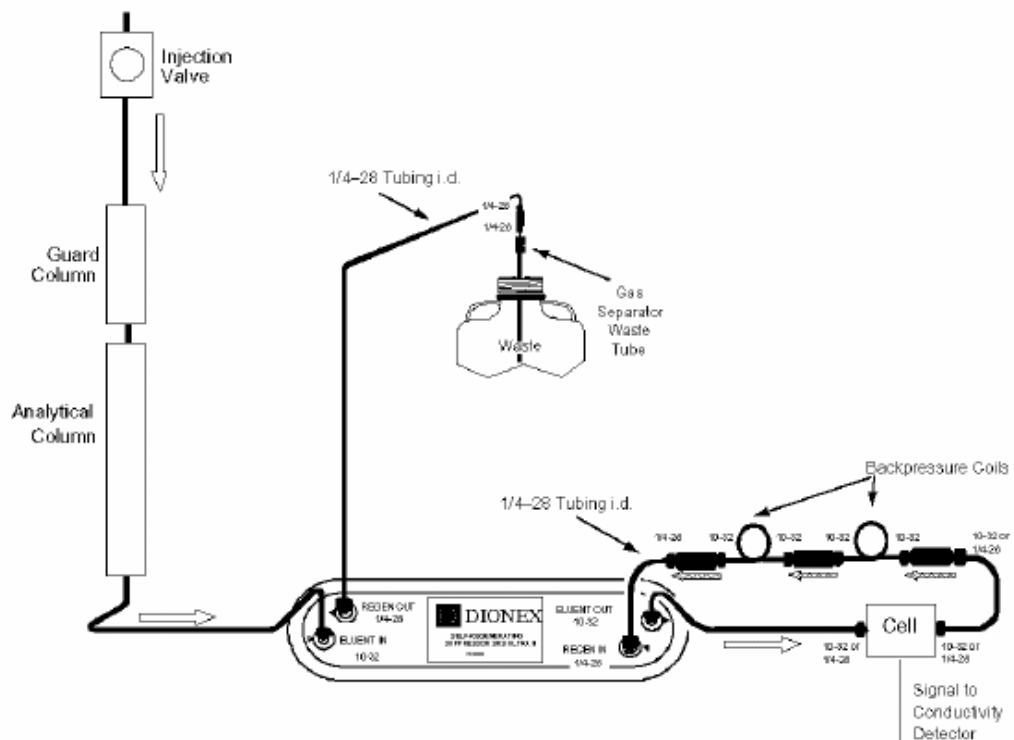


Figura 15 – Configuração da supressora no equipamento. (Dionex)

## 1.1 Experimental

### 1.1.1 Padrões e reagentes

O padrão de clodronato foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Steinheim, Alemanha) e os padrões de alendronato, pamidronato e etidronato foram gentilmente cedidos por Bufa B.V. (Uitgeest, Holanda). Foram utilizados medicamentos de dois diferentes laboratórios: SIGMA PHARMA (similar) e um medicamento manipulado, na forma de quatro comprimidos contendo 70 mg alendronato sódico. Os medicamentos foram adquiridos no comércio. Utilizou-se, para o preparo da fase móvel, hidróxido de sódio 50% Merck (Alemanha) e água ultra pura Milli Q (MILLIPORE).

### 1.1.2 Instrumentação e condições cromatográficas

Para a realização das análises foi utilizado cromatógrafo à líquido iônico série BioLc, equipado com uma bomba quaternária GS50, forno para coluna modelo AS50, supressora ASRS II 2mm, detector de condutividade DS3, amostrador automático modelo AS50 e software para aquisição de dados Cromeleon 6.0. Todos os módulos do cromatógrafo são da marca Dionex ( Sunnyvale, USA).

As condições cromatográficas empregadas na determinação de etidronato e clodronato foram: coluna Dionex Íon Pack (250 x 2,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel constituída de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 40  $\text{mmol L}^{-1}$ , fluxo: 0,40  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção de 25  $\mu\text{L}$ , corrente da supressora de 64 mA e temperatura do forno de 30  $^{\circ}\text{C}$ . Para os fármacos alendronato e pamidronato as condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Dionex Íon Pack (250 x 2,0 mm,

5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel constituída de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 26  $\text{mmol L}^{-1}$ , fluxo: 0,50  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção de 25  $\mu\text{L}$ , corrente da supressora de 52 mA e temperatura do forno de 30  $^{\circ}\text{C}$ .

### **1.1.3 Preparo das soluções padrão**

Os padrões de etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato foram pesados adequadamente e transferidos para balão volumétrico de 10 mL, formando soluções de concentração de 0,50  $\text{mg mL}^{-1}$ . As soluções padrão foram diluídas com água para concentrações definidas, de acordo com as necessidades analíticas.

### **1.1.4 Preparo das amostras de comprimidos de alendronato**

Foram pesados e macerados 4 comprimidos de 70 mg cada. Pesou-se, do pó dos comprimidos, o equivalente a 30 mg de alendronato e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Deixou-se em agitação mecânica por 10 minutos e completou-se o volume com água. Filtrou-se, desprezando os primeiros mililitros do filtrado. Transferiram-se 1,0 mL do extrato para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água, obtendo-se desta forma solução com concentração de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As amostras foram preparadas em triplicata.

### **1.1.5 Avaliação dos métodos**

A seletividade foi avaliada através da injeção dos padrões com uma mistura de sete ânions. A linearidade foi verificada por meio da construção de curva analítica com cinco pontos, na faixa de 2 a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o etidronato, 4 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para

o clodronato, de 4.6 a 46  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o pamidronato e 4,52 a 49,78  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o alendronato. A equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) foram calculados por meio do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Avaliou-se a precisão com o auxílio do software Validate 1.0 em três níveis de concentração. Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram avaliados com o auxílio do software Validate 1.0 como sendo a menor concentração em que a altura do pico cromatográfico era de 9 e 3 vezes o valor do ruído, respectivamente. A exatidão foi avaliada com o auxílio do software Validate 1.0, em três concentrações ( $n=3$ ). A recuperação foi determinada adicionando uma quantidade conhecida de alendronato nos medicamentos. A robustez do método foi avaliada verificando-se a influência de algumas alterações no sistema, tais como: pH da fase móvel, composição da fase móvel e temperatura.

## **1.2 Resultados e Discussão**

### **1.2.1 Otimização das condições cromatográficas**

Durante a otimização dos métodos foi avaliada a influência do fluxo e da concentração de NaOH utilizado como fase móvel, em relação ao tempo de retenção e separação entre os BP's e os ânions, a fim de se obter o menor tempo de análise. Otimizou-se também a corrente utilizada na supressora a fim de obter-se o menor ruído. As condições selecionadas estão mostradas na seção 4.2.2 para todos os BP's estudados. As Figuras 16 a 19 apresentam os cromatogramas obtidos para os padrões de etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato nestas condições, respectivamente.

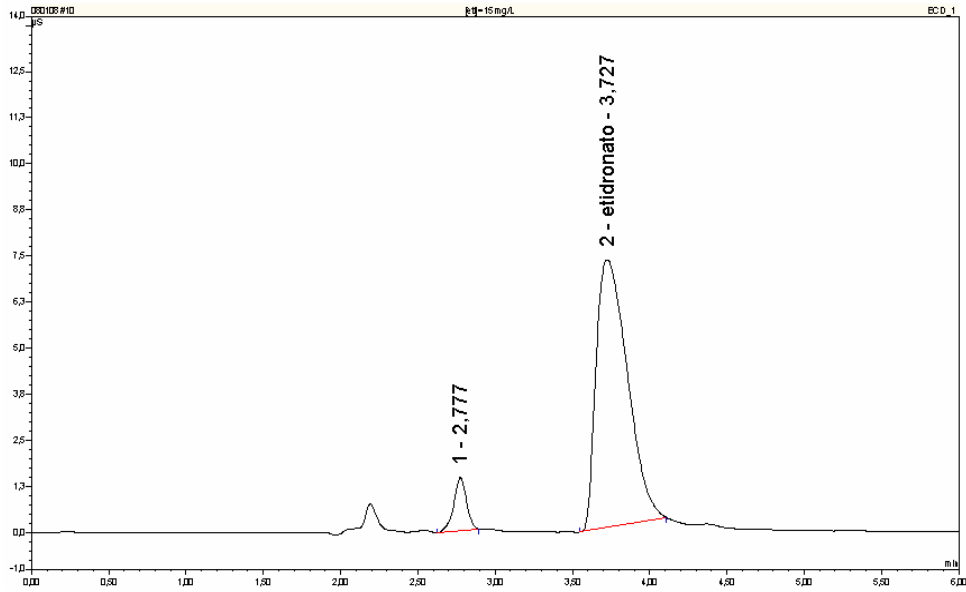


Figura 16 – Cromatograma padrão de etidronato ( $t_r=3,727$  min), a  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  de concentração.

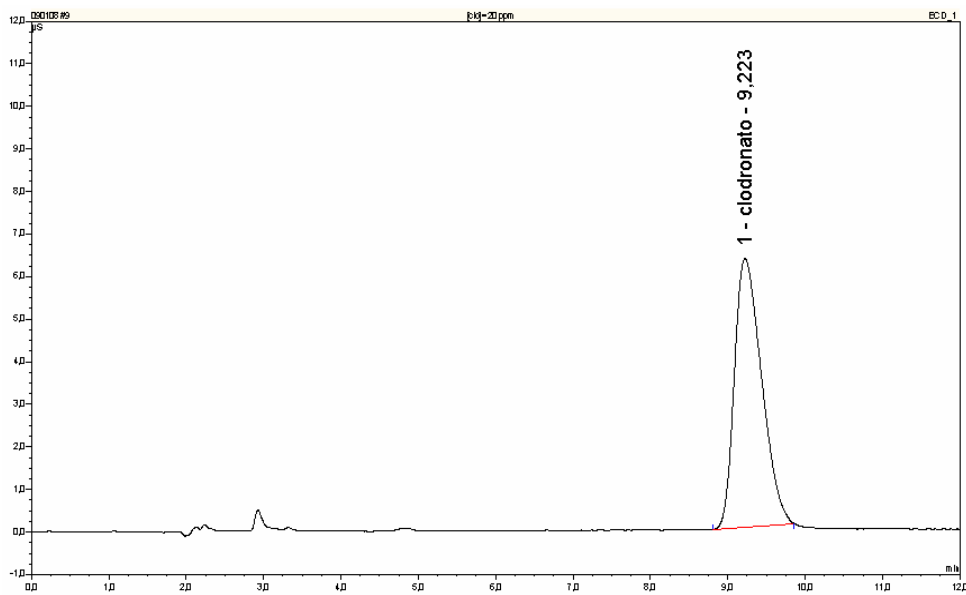


Figura 17 – Cromatograma padrão de clodronato ( $t_r=9,223$ ), a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de concentração.

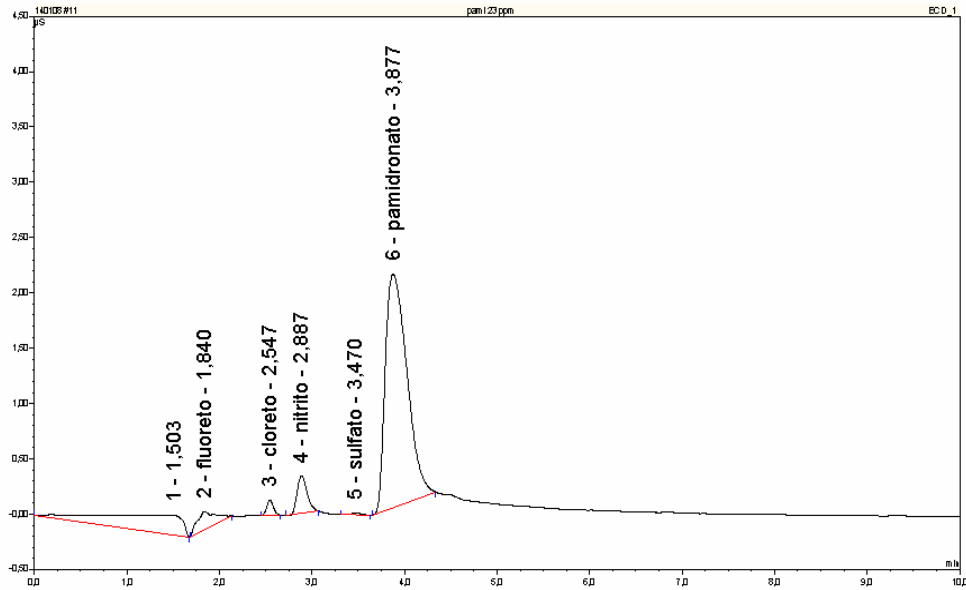


Figura 18 – Cromatograma padrão de pamidronato ( $t_r=3,877$  min), a  $23 \mu\text{g mL}^{-1}$  de concentração.

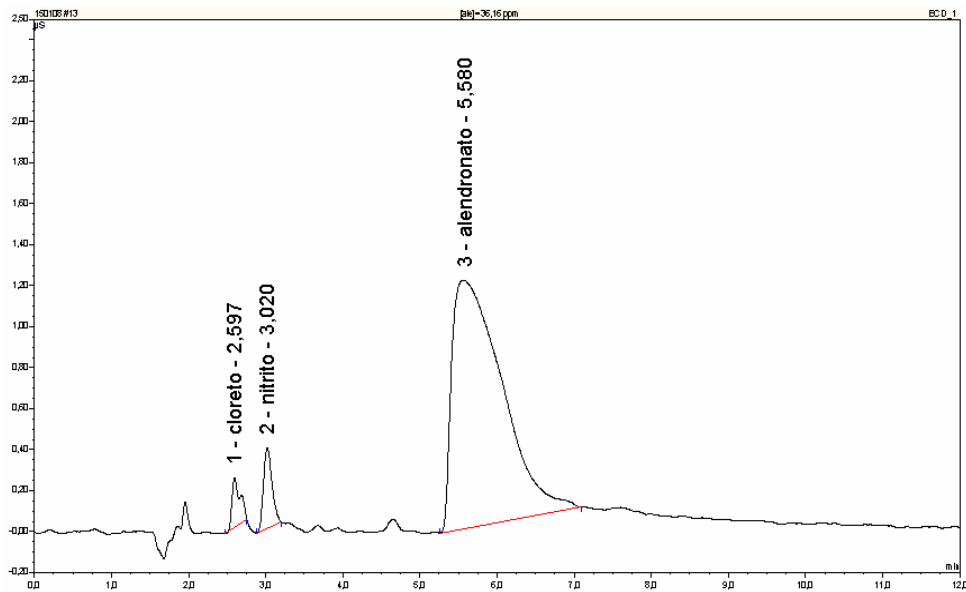


Figura 19 – Cromatograma padrão de alendronato ( $t_r=5,580$  min), a  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$  de concentração.

### 1.2.2 Linearidade

As curvas analíticas para o etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato estão mostradas nas Figuras 20 a 23.

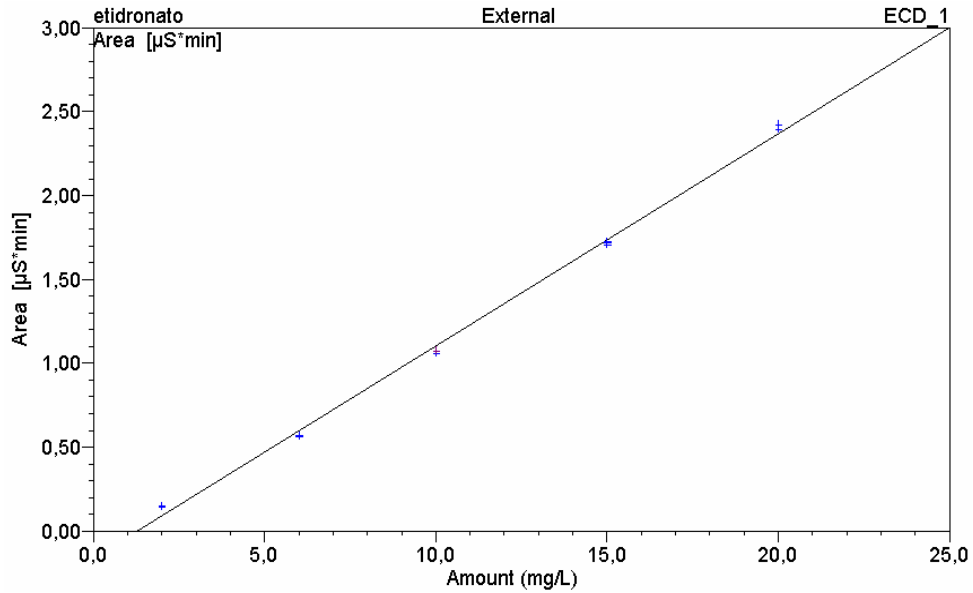


Figura 20 – Curva analítica para o fármaco etidronato

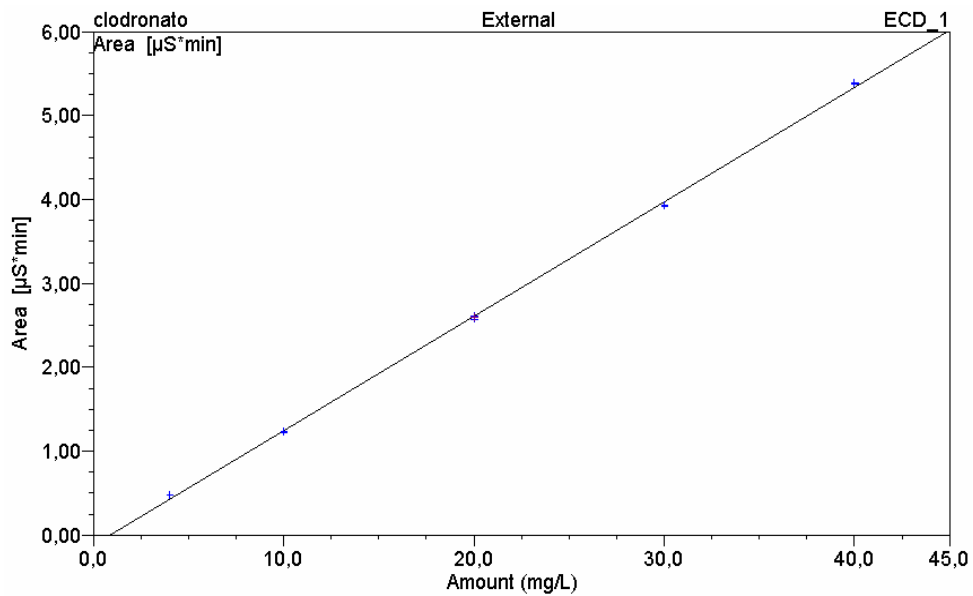


Figura 21 – Curva analítica para o fármaco clodronato.



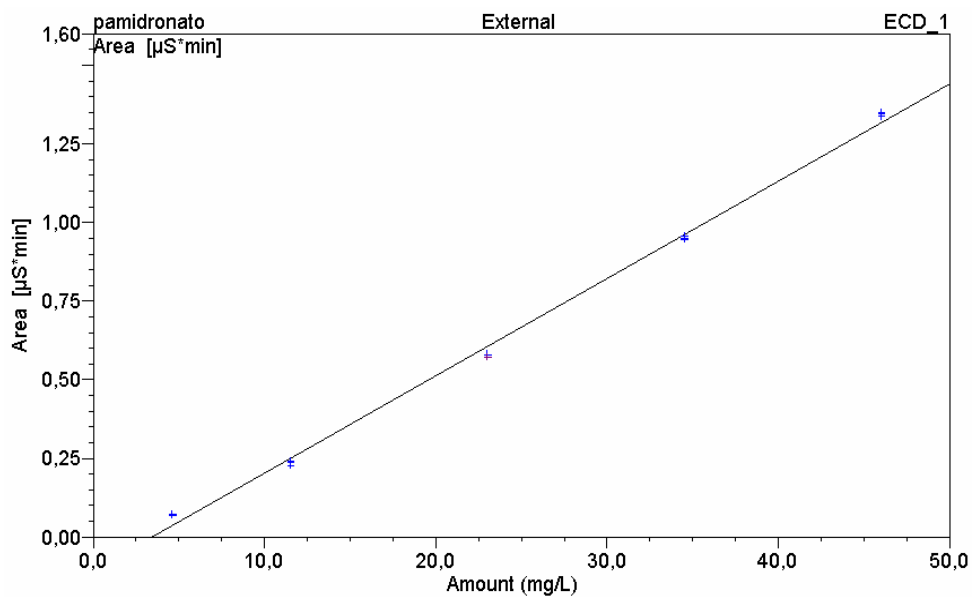


Figura 22 – Curva analítica para o fármaco pamidronato.

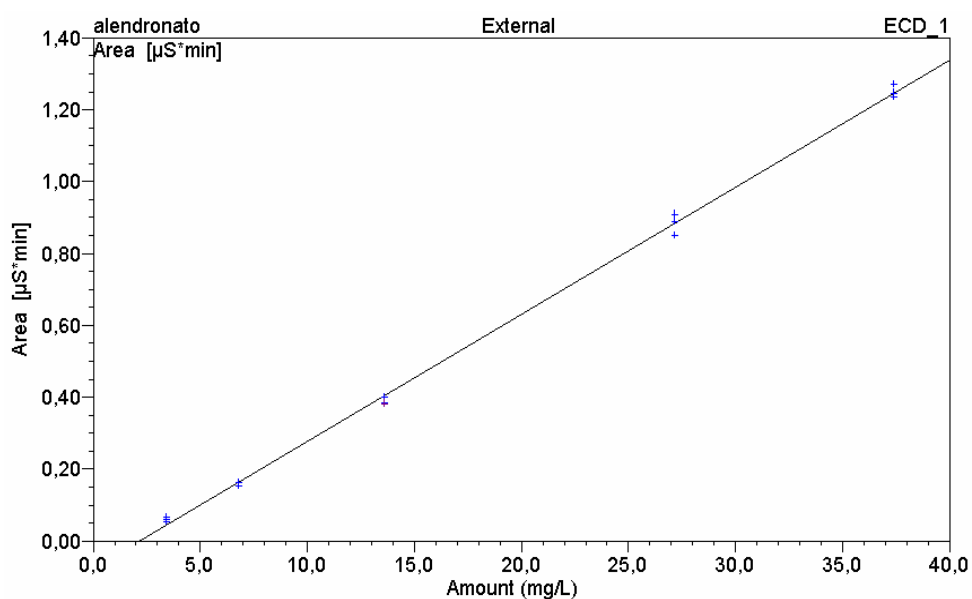


Figura 23 – Curva analítica para o fármaco alendronato

Em todos os métodos descritos o coeficiente de correlação foi maior que 0,99, indicando que há correlação linear entre a concentração e a resposta obtida. As equações da reta e os valores de coeficiente de correlação dos métodos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Equações da reta e os valores de coeficiente de correlação.

Fármaco	Equação da reta	Coefficiente de correlação
Etidronato	$y = 0,1265x - 0,1586$	0,99758
Clodronato	$Y = 0,1363x - 0,1137$	0,99954
Pamidronato	$Y = 0,031x - 0,1052$	0,99716
Alendronato	$Y = 0,0266x - 0,0765$	0,99855

### 1.2.3 Seletividade

A seletividade do método foi determinada utilizando um padrão de sete ânions junto com os padrões de cada BP's, os ânions utilizados foram: fluoreto, cloreto, nitrito, nitrato, sulfato, fosfato e brometo. Pode-se observar nas Figuras 24 a 27, que não ocorre a co-eluição dos BP's com os ânions testados.

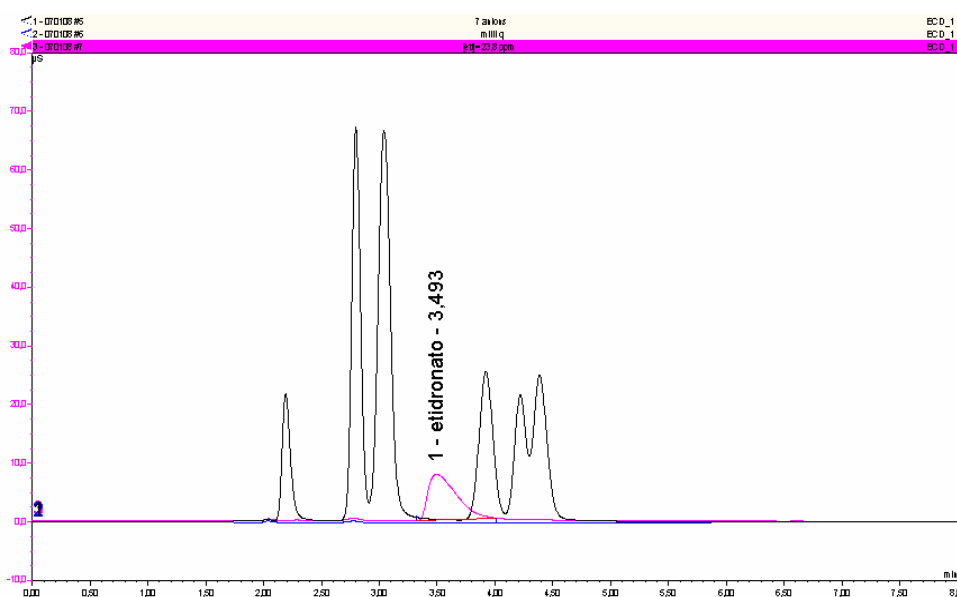


Figura 24 – Cromatogramas sobrepostos obtidos para o etidronato, sete ânions e água milli Q.

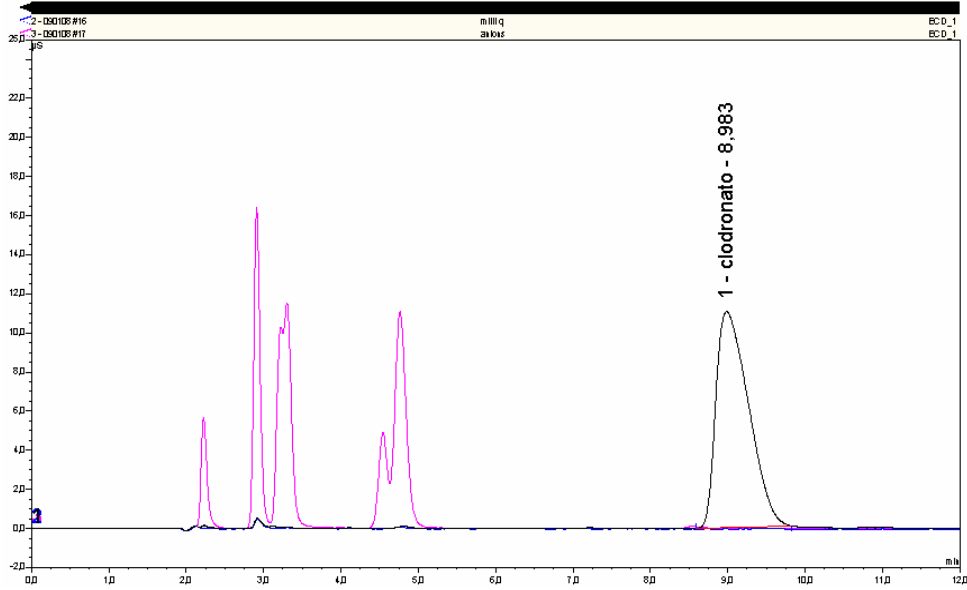


Figura 25 - Cromatogramas sobrepostos obtidos para o clodronato, sete ânions e água milli Q.

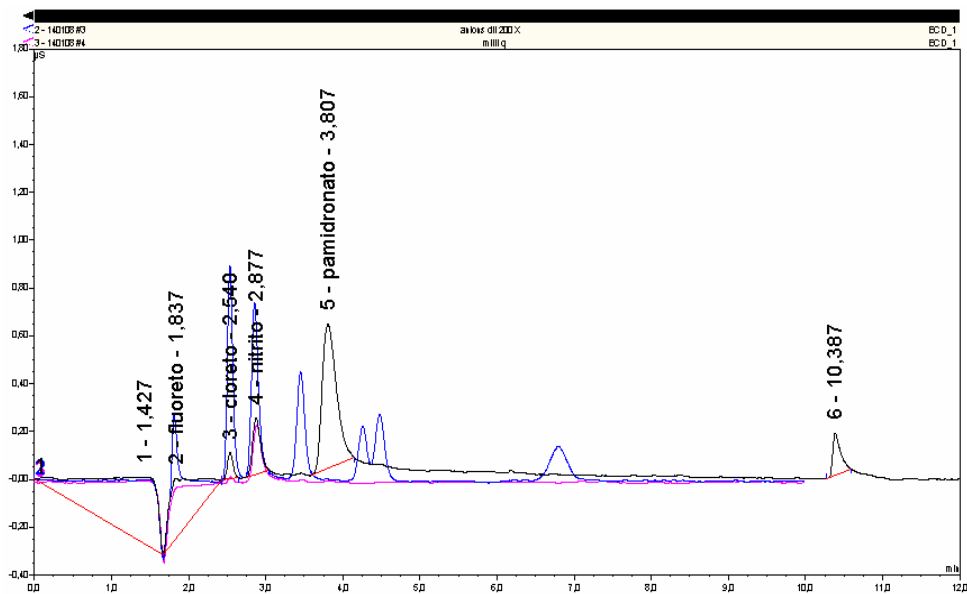
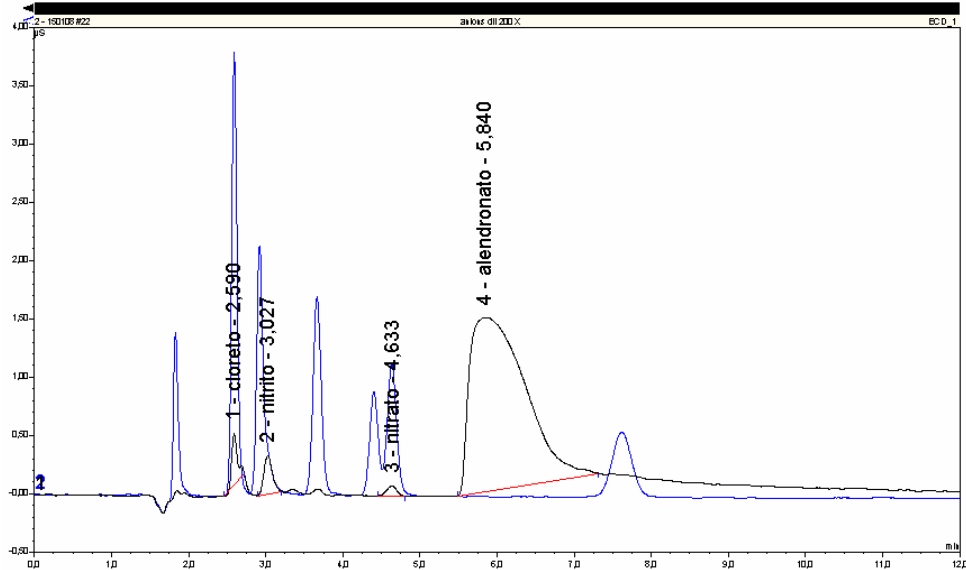


Figura 26 - Cromatogramas sobrepostos obtidos para o pamidronato, sete ânions e água milli Q.



#### 1.2.4 Precisão

O desvio padrão relativo (DPR) medido para a avaliação da precisão intra-dia foi menor que 2,0% em todas as concentrações avaliadas e para todos os BP's avaliados. Isto indica que o método possui precisão adequada quando análises são realizadas no mesmo dia. Para o cálculo da precisão foi utilizado o software Validate1.0. As Tabelas 10 a 13 mostram os valores de precisão obtidos para o etidronato, clodronato, pamidronato e alendronato, respectivamente.

Tabela 10 – Concentração e DPR obtidos para o cálculo da precisão intra-dia para o etidronato.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	2,0	6,0	10,0	15,0	20,0
<b>Etidronato (DPR) %</b>	0,57	0,30	0,53	0,60	0,60

Tabela 11 – Concentração e DPR obtidos para o cálculo da precisão intra-dia para o clodronato

<b>Concentração (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	4,0	10,0	20,0	30,0	40,0
<b>Clodronato (DPR) %</b>	0,57	0,32	0,60	0,17	0,10

Tabela 12 – Concentração e DPR obtidos para o cálculo da precisão intra-dia para o pamidronato.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	4,60	11,5	23,0	34,5	46,0
<b>Pamidronato (DPR) %</b>	1,41	1,99	0,73	0,46	0,37

Tabela 13 – Concentração e DPR obtidos para o cálculo da precisão intra-dia para o alendronato.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	4,52	9,04	18,08	36,16	49,78
<b>Alendronato (DPR) %</b>	1,83	1,78	1,51	1,47	1,36

### 1.2.5 Limite de quantificação e de detecção

Os limites de detecção e quantificação foram calculados utilizando o software Validate 1.0, como sendo a menor concentração em que a altura do pico cromatográfico era de 3 e 9 vezes o valor do ruído, respectivamente. Seus valores estão mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 – Limites de quantificação e detecção para os BP's estudados.

Fármacos	etidronato	clodronato	pamidronato	alendronato
LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,28	0,42	1,80	3,56
LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,094	0,14	0,60	1,18

### 1.2.6 Exatidão

Para os fármacos todos os estudados, a exatidão foi determinada com o auxílio do software Validate 1.0, em três concentrações (n=3). A Tabela 15 mostra os resultados para exatidão obtidos.

Tabela 15 – Exatidão obtidas para os BP's estudados

BP's	etidronato	clodronato	pamidronato	alendronato
Exatidão (%)	101,48	100,76	101,22	97,22

### 1.2.7 Recuperação para o alendronato

Na determinação da recuperação do método, foi adicionada certa quantidade conhecida de padrão de alendronato ao medicamento similar (com concentração medida de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e efetuado o procedimento de extração. Na solução final, a concentração seria de  $40,74 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mas concentração encontrada foi de  $39,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ , indicando uma recuperação de 97,71%.

### 1.2.8 Determinação de alendronato no produto acabado

O teor encontrado para o medicamento similar foi de 104,6% enquanto para o medicamento manipulado foi de 98,2%. Os valores encontrados estão dentro da faixa de 90,0 a 110,0%, demonstrando a qualidade do medicamento em termos do teor do princípio ativo. Além disso, estes resultados mostram que o método é adequado para a análise de medicamentos contendo alendronato. Os cromatogramas obtidos para o medicamento similar e manipulados estão mostrados nas Figuras 28 e 29.

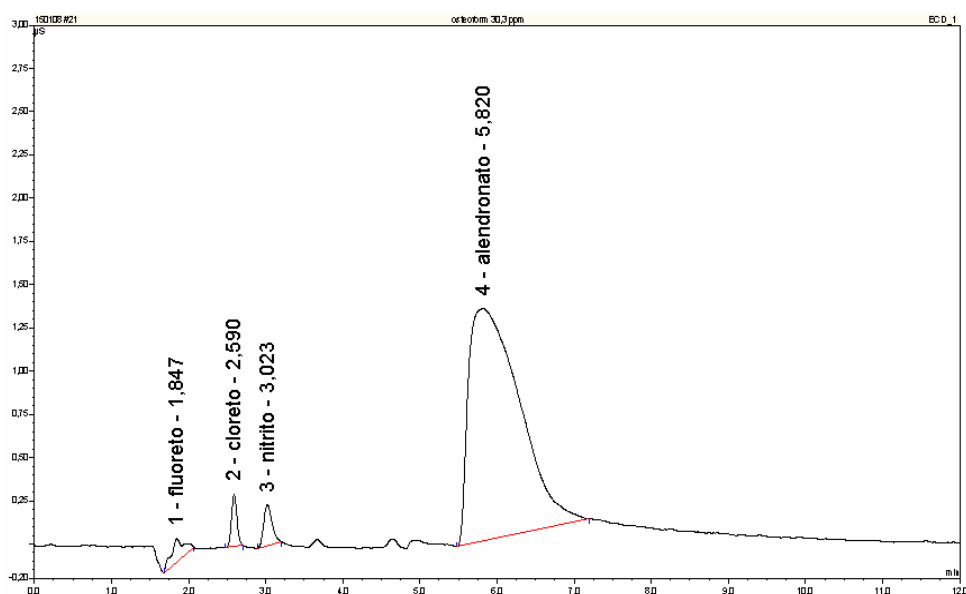


Figura 28 – Cromatograma da solução do medicamento similar na concentração de 31,70  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

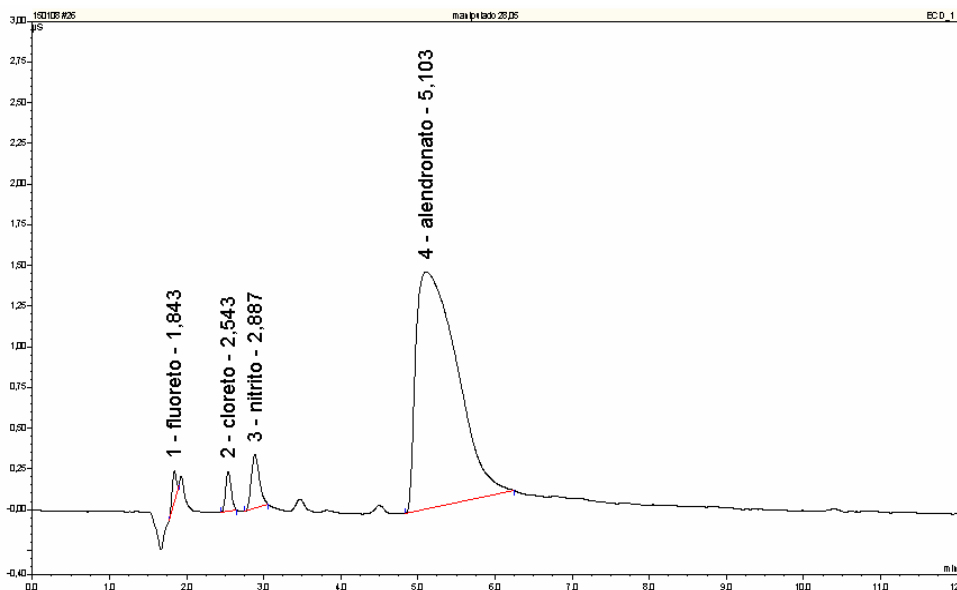


Figura 29 – Cromatograma da solução do medicamento manipulado na concentração de  $27,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 1.3 Conclusão

Neste capítulo foram descritos e otimizados metodologias alternativas para a determinação de BP's em matéria-prima e medicamentos acabados. Estes métodos empregaram um detector universal, que exigiu um maior trabalho na determinação dos parâmetros cromatográficos, ou seja, necessitaram de uma maior atenção nas condições básicas em cromatografia. Os métodos apresentados empregam colunas microbore, que por possuírem diâmetro reduzido, utilizam cerca de 50% a menos de fase móvel, quando comparado com o uso de colunas de diâmetro convencional (4,6 mm). Ademais, estes métodos utilizaram soluções de hidróxido de sódio, facilmente encontradas e com pouco impacto ambiental. Pode-se dizer também que os métodos possuem a melhor sensibilidade quando comparadas com outros métodos que possuem detecção direta das moléculas, sem serem as mesmas derivatizadas.



## **CAPÍTULO 5 – DETERMINAÇÃO DE CLODRONATO EM URINA ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA IÔNICA E DETECÇÃO POR CONDUTIVIDADE COM SUPRESSÃO DE ELUENTE.**

### **1 INTRODUÇÃO**

A identificação e a quantificação de fármacos em fluídos biológicos têm importância fundamental em estudos de farmacocinética, na avaliação de novas formas farmacêuticas, na monitorização terapêutica e em estudos de bioequivalência para estabelecimento de medicamentos genéricos.

As análises de fármacos em meio biológico compreende as etapas de extração do composto de interesse, separação cromatográfica dos interferentes e detecção, em que se pode obter informações a respeito da quantidade e identidade dos fármacos.

Neste capítulo, é descrito um método desenvolvido para a determinação de clodronato em urina através de Cromatografia Iônica e detecção por Condutividade com supressão de eluente, com a injeção direta da amostra e sem a necessidade de derivatização ou pré-concentração do analito.

O clodronato foi o fármaco de selecionado para este estudo por apresentar o maior tempo de retenção entre os fármacos estudados no Capítulo 4 conseguindo, assim, ser separado mais facilmente dos compostos encontrados na urina. Aliada a essa característica, o clodronato é administrado em maior dosagem em relação ao alendronato e o pamidronato, devido as suas características anti-reabsortivas, sendo sua concentração no meio biológico significativamente maior, o que torna possível analisar esse fármaco com sensibilidade necessária e equivalente às encontradas na literatura.

## **1.1 Experimental**

### **1.1.1 Padrões e reagentes**

O padrão de clodronato foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Steinheim, Alemanha). Utilizou-se, para o preparo da fase móvel, hidróxido de sódio 50% Merck (Alemanha) e água ultra pura Milli Q (MILLIPORE)).

### **1.1.2 Instrumentação e condições cromatográficas**

Todos os equipamentos utilizados estão descritos na seção 4.2.2. As condições cromatográficas empregadas na determinação do clodronato foram: coluna Dionex Ion Pack (250 x 2,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel constituída de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 33  $\text{mmol L}^{-1}$ , fluxo: 0,50  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção de 25  $\mu\text{L}$ , corrente da supressora de 66 mA e temperatura do forno de 30  $^{\circ}\text{C}$ .

### **1.1.3 Preparo das soluções padrão**

O padrão de clodronato foi pesado adequadamente (5 mg) e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, formando uma solução de concentração de 0,50 mg  $\text{mL}^{-1}$ . A solução padrão foi diluída em urina para concentrações definidas, de acordo com as necessidades analíticas.

### **1.1.4 Avaliação dos métodos**

A seletividade foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos para a urina sem e com fortificação de padrão de clodronato. A linearidade

foi verificada por meio da construção de curva analítica com cinco pontos, na faixa de 1,0 a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de clodronato em urina, ou seja, no próprio meio biológico. A equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) foram calculados por meio do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Avaliou-se a precisão com o auxílio do software Validate 1.0 em três níveis de concentração. Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram avaliados com o auxílio do software Validate 1.0 como sendo a menor concentração em que a altura do pico cromatográfico era de 9 e 3 vezes o valor do ruído, respectivamente. A exatidão foi avaliada com o auxílio do software Validate 1.0, em três concentrações ( $n=3$ ). A recuperação foi determinada comparando os cromatogramas obtidos para o clodronato diluído em água Milli-Q e diluído em urina, nas mesmas concentrações e em um nível intermediário de concentração. A robustez do método foi avaliada verificando-se a influência de algumas alterações no método, tais como: pH da fase móvel, composição da fase móvel e temperatura.

## **1.2 Resultados e Discussão**

### **1.2.1 Otimização das condições cromatográficas**

Durante a otimização dos métodos foi avaliada a influência do fluxo e da concentração de NaOH utilizado como fase móvel, em relação ao tempo de retenção e separação entre o clodronato e os compostos da urina. A corrente da supressora também foi otimizada a fim de se obter a maior sensibilidade. As condições escolhidas estão mostradas na seção 1.1.2.

### 1.2.2 Linearidade

A curva analítica para o clodronato diluído em urina está mostrada na Figura 30.

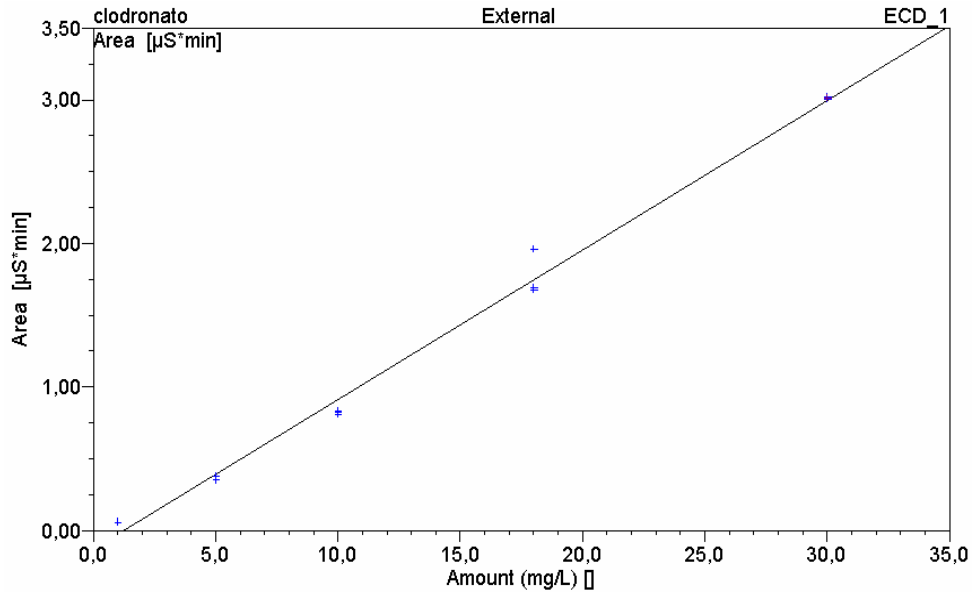


Figura 30 – Curva analítica para o fármaco clodronato em urina

Neste método, o coeficiente de correlação foi maior que 0,99, indicando que há correlação linear entre a concentração e a resposta obtida. A equação da reta e o valor de coeficiente de correlação dos métodos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Equações da reta e os valores de coeficiente de correlação.

Fármaco	Equação da reta	Coefficiente de correlação
Clodronato	$y = 0,1041x - 0,1275$	0,9941

### 1.2.3 Seletividade

A especificidade do método foi determinada através da comparação entre os cromatogramas obtidos para a urina (branco) e fortificada com padrão de clodronato. Esta comparação está mostrada na Figura 31.

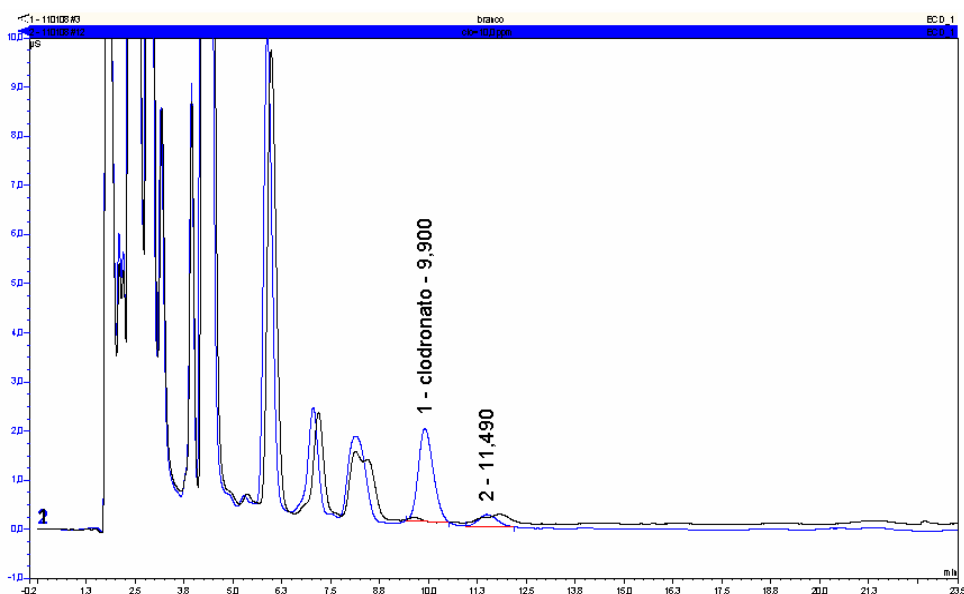


Figura 31 – Cromatogramas sobrepostos para urina (branco) e urina fortificada com clodronato  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 1.2.4 Precisão

O desvio padrão relativo (DPR) medido para a avaliação da precisão intra-dia foi menor que 5,0% em todas as concentrações avaliadas e para todos os BP's avaliados. Isto indica que o método possui boa precisão quando análises são realizadas no mesmo dia. Para o cálculo da precisão foi utilizado o software Validate1.0. A Tabela 17 mostra os valores de precisão obtidos para o método.

Tabela 17 – Concentração de clodronato e DPR obtido para o cálculo da precisão intra-dia.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	1,0	5,0	10,0	18,0	30,0
<b>Clodronato (DPR) %</b>	0,81	3,26	1,37	1,06	0,30

### 1.2.5 Limite de quantificação e de detecção

Os limites de detecção e quantificação foram calculados utilizando o software Validate 1.0, como sendo a menor concentração em que a altura do pico cromatográfico era de 3 e 9 vezes o valor do ruído, respectivamente. Os valores encontrados foram de  $0,60 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o LOQ e  $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o LOD.

### 1.2.6 Exatidão

A exatidão do clodronato foi determinada com o auxílio do software Validate 1.0, em três concentrações (n=3). O valor obtido foi de 99,56%.

### 1.2.7 Recuperação do método

Na determinação da recuperação do método, foram comparados os cromatogramas obtidos para o clodronato diluído em urina, e o fármaco diluído em água Milli Q, com a mesma concentração de clodronato. O valor de recuperação obtido foi de 96,74%. Os cromatogramas obtidos estão mostrados na Figura 32.

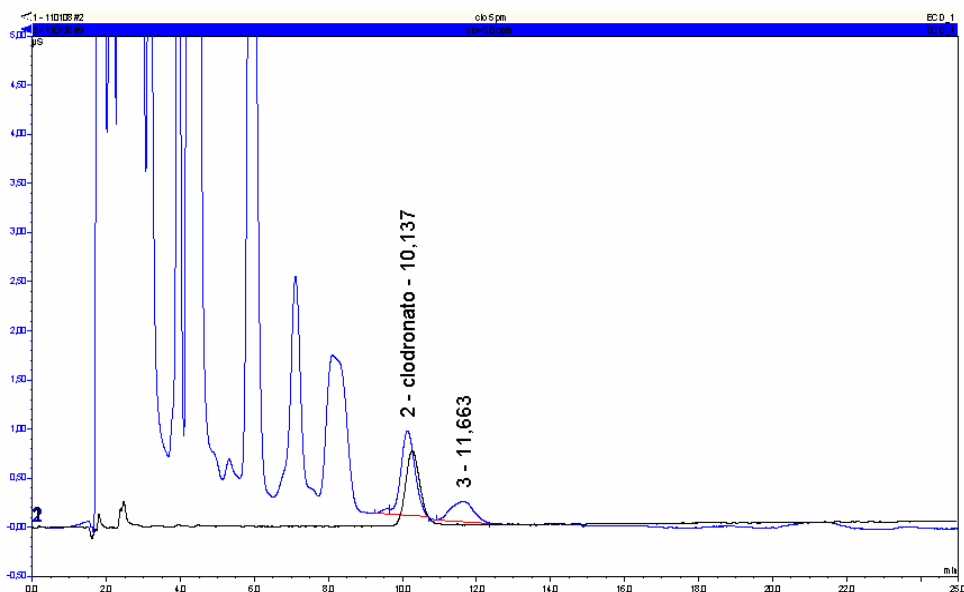


Figura 32 – Cromatogramas sobrepostos para clodronato diluído em água e clodronato diluído em urina.

### 1.3 Conclusão

Conclui-se que este método é eficaz na determinação de clodronato presente em urina humana masculina, e que a mesma poderá ser utilizada em estudos de farmacocinética, desde que sejam ainda avaliadas outras matrizes (urina feminina) e precisão inter-dias. Contudo, pode-se dizer que o método foi capaz de determinar o clodronato em uma matriz biológica complexa, sem a pré-concentração do analito e sem a necessidade de derivatização do mesmo.

Igualmente ao método desenvolvido e descrito no capítulo 4, este método utilizou uma coluna microbore, que por possuir diâmetro reduzido, utiliza cerca de 50% a menos de fase móvel, quando comparado com o uso de colunas de diâmetro convencional (4,6 mm). Verifica-se, também, a ausência de resíduos gerados pelo processo de derivatização, e de colunas de extração em fase sólida. Também é

reduzido o tempo no processo de preparação das amostras, que torna a análise bem mais simples e barata.



## CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho apresentou-se um conjunto de resultados obtidos com uma importante classe de fármacos, os bisfosfonatos (BP's), em diferentes matrizes. As principais conclusões obtidas a partir dos resultados foram:

- No Capítulo 2 descreve-se um método rápido para determinação de BP's em matéria-prima e produtos acabados por cromatografia iônica e detecção indireta no UV. O método foi otimizado e demonstrou ser adequado para a finalidade proposta.

- No Capítulo 3 descreve-se um método por cromatografia iônica multidimensional para análise de BP's em plasma humano. Os resultados obtidos sugerem que o método desenvolvido não é ainda adequado (e por isso não foi avaliado), demandando mais estudos.

- No Capítulo 4 descreve-se o uso de cromatografia iônica unidimensional com detecção por condutividade com supressão de eluente. O método foi otimizado e mostrou-se adequado para a determinação de BP's em matéria-prima e medicamentos acabados.

- No capítulo 5 descreve-se o desenvolvimento e otimização de um método para análise de clodronato em urina. O método mostrou-se adequado para a finalidade pretendida.

Dentre os estudos efetuados, o único que não permitiu atingir resultados satisfatórios para otimização e uso em amostras biológicas foi o de cromatografia iônica multidimensional, o qual requer mais estudos. Todos os demais métodos desenvolvidos foram otimizados e empregados na análise de BP's em amostras de matérias-primas, produtos acabados ou fluidos biológicos, demonstrando a

adequação dos mesmos às finalidades pretendidas. Conclui-se, assim, que os objetivos propostos neste trabalho foram atingidos.

## REFERÊNCIAS

- [1] LICATA, A.A. Bisphosphonates therapy. **Am. J. Méd. Sci.**, v. 313, p. 17-22, 1997.
- [2] RUSSELL, R. G. G.; ROGERS, M. J.; FRITH, J.C.; LUCKMAN, S. P.; COXON, F. P.; BENFORD, H. L.; CROUCHER, P. I.; SHIPMAN, C.; FLEISCH, H. A. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. **J. Bone Miner. Res.**, v. 14, p. 53-65, 1999.
- [3] SHINODA, H.; ADAMEK, G.; FELIX, R.; FLEISCH, H.; SCHENK, R.; HAGAN, P. Structure-activity relationships of various bisphosphonates. **Calcif. Tissue Int.**, v. 35, p. 87-99, 1983.
- [4] FLEISCH, H. Bone and mineral metabolism. In: FLEISCH, H. (Ed). **Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patients**. Berne: Stampfli, 1993. p. 8-24.
- [5] NEVES, M.; GANO, L.; PEREIRA, N.; COSTA, M.C.; COSTA, M.R.; CHANDIA, M.; ROSADO, M.; FAUSTO, R. Synthesis, characterization and biodistribution of bosphosphonates Sm-153 complexes: correlation with molecular modeling interaction studies. **Nucl. Med. Biol.**, v. 29, p. 329-338, 2002.
- [6] SAHNI, M.; GUENTHER, H.L.; FLEISCH, H.; COLLIN, P. MARTIN, T.J. Bisphosphonates act on rat bone-resorption through the mediation of osteoblasts. **T. Clin. Invest.**, v.91 p. 2004-2011, 1993.
- [7] GREEN, J.R. Bisphosphonates: preclinical review. **The Oncologist.**, v. 9, p. 3-13, 2004.
- [8] LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v. 18, p.75-85, 1996.
- [9] FLEISCH, H. Bisphosphonates: machanisms of action. **Endocrine Ver.**, v.19, p. 80-100, 1998.
- [10] REITSMA, P.H.; BIJVOET, O. L. M.; VERLINDEN-OOMS, H.; VAN DER WEEPALS, L. J. A. Kinetic studies of bone and mineral metabolism during treatment with (3-amino-1-hydroxy-propylidene)-1,1-bisphosphonate (APD) in rats. **Calci. Tissue Int.**, v. 32, p. 145-157, 1980.
- [11] SZAJNMAN, S.H.; BAILEY, B.N.; DOCAMPO, R. RODRIGUEZ, J.B. Bisphosphonates derived from fatty acids are potent growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, p. 789-792, 2001.

- [12] MARTIN, M.B.; GRIMLEY, J.S.; LEWIS, J.C.; HEATH, H.T.; BAILEY, B.N.; KENDRICK, H.; YARDLEY, V.; CALDERA, A.; LIRA, R.; URBINA, J.A.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R.; CROFT, S.L.; OLDFIELD, E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 909-916, 2001.
- [13] NUGENT, R.A.; MURPHY, M.; SCHLACHTER, S.T.; DUNN, C.J.; SMITH, R.J.; STAITE, N.D.; GALINET, L.A.; SHIELDS, S.K.; WU, H.; ASPAR, D.G.; RICHARD, K.A.; ROHLOFF, N.A. Pyrazoline bisphosphonates esters as novel anti-inflammatory and antiarthritic agents. **J. Med. Chem.**, v. 36, p. 134-139, 1993.
- [14] NUGENT, R.A.; SCHLACHTER, S.T.; MURPHY, M.; DUNN, C.J.; STAITE, N.D.; GALINET, L.A.; SHIELDS, S.K.; WU, H.; ASPAR, D.G.; RICHARD, K.A. Carbonyl-containing bisphosphonate esters as novel anti-inflammatory and antiarthritic agents. **J. Med. Chem.**, v. 37, p. 4449-4454, 1994.
- [15] KONTECKA, E.G.; SILVAGNI, R.; LIPINSKI, R.; LECOUEY, M.; MARINCOLA, F.C.; CRISPONI, G.; NURCHI, V.M.; LEROUX, Y; KOZLOWSKI, H. Bisphosphonate chelating agents: complexation of Fe(III) and Al(III) by 1-phenyl-1-hydroxymethylene bisphosphonate and its analogues. **Inorg. Chim. Acta.**, v. 339, p. 111-118, 2002.
- [16] RODRIGUES, J. M.; DACOSTA, J. B. N. Synthesis and characterization of new symmetrical bisfosfonates. **Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.**, v. 177, p. 137-149, 2002.
- [17] NIXON, G.A.; BUEHLER, E.V.; NEWMANN, E.A. Preliminary safety assessment of disodium etidronate as an additive to experimental oral hygiene products. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 22, p. 661, 1972.
- [18] FLORA, L.; HASSING, G.S.; PARFITT, A.M.; VILLANUEVA, A.R. The long-term skeletal effects of EHDP in dogs. **Metab. Bone. Disease Relat. Res.** v. 3, p. 289-300, 1981.
- [19] SINGER, F.R.; RITCH, P.S.; LAD, T.E.; RINGEBERG, Q.S.; SCHILLER, J.H. Treatment of hypercalcemia of malignancy with intravenous etidronate-a controlled multicenter study. **Arch. Intern. Med.**, v. 151, p. 471-476, 1991.
- [20] MARKKULA, R.; REPO, H.; LEIRISALO, M.; BLOMQVIST, C.; ELOMAA, I. Effect of dichloromethylene disphosphonate (Cl<sub>2</sub>MDP) on immune function in breast-cancer patients with bone metastases. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 15, p. 159-161, 1983.
- [21] DODWELL, D.J.; HOWELL, A.; FORD, J. Reduction in calcium excretion in women with breast-cancer and bone metastases using the oral bisphosphonate pamidronate. **Br. J. Cancer.**, v. 61, p. 123-125, 1990.

[22] GIBALDI, M.; PERRIER, D. **Pharmacokinetics**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1982. p. 494.

[23] LIN, J.H.; CHEN, I-W.; DELUNA, F.A. On the absorption of alendronate in rats. **J. Pharm. Sci.**, v. 83, p. 1741-1746, 1994.

[24] RUIFROK, P.G.; MOL, W.E.M. Paracellular transport of inorganic and organic ions across the rat ileum. **Biochem. Pharmacol.**, v. 32, p. 637-640, 1983.

[25] GERTZ, B.J.; HOLLAND, S.D.; KLINE, W.F.; MATUSZEWSKI, B.K.; PORRAS, A.G. Clinical-pharmacology of alendronate sodium. **Osteopor. Int.**, v. 3, suppl. 3, p. S13-S16, 1993.

[26] LIN, J.H.; CHEN, I-W.; DELUNA, F.A.; HICHENS, M. Role of calcium in plasma-protein binding and renal handling of alendronate in hypocalcemic and hypercalcemic rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 267, p. 670-675, 1993.

[27] MICHAEL, W.R.; KING, W.R.; WAKIN, J.M. Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-disphosphonate (disodium etidronate) in rat, rabbit, dog and monkey. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 21, p. 503-515, 1972.

[28] WADA, H.; FERNANDO, Q. Determination of formation constants of copper(II) complexes of (hydroxyethylidene)diphosphonic acid with solid state cupric ion-selective electrode. **Anal. Chem.**, v. 43, p. 751-755, 1971.

[29] FLEISCH, H. Bisphosphonates-pharmacology and use in treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. **Drugs**, v. 42, p. 919-944, 1991.

[30] KIECZYKOWSKI, G.R.; JOBSON, R.B.; MELILLO, D.G.; REINHOLD, D.F.; GREY, V.J.; 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.**, v. 60, p. 8310-8312, 1995.

[31] LECOUCVEY, M.; MALLARD, I.; BAILLY, T.; BURGADA, R.; LEROUX, Y. A mild and efficient one-step synthesis of 1-hydroxymethylene-1,1-bisphosphonic acids. Preparation of new tripod ligands. **Tetrahedron Lett.**, v. 42, p. 8475-8478, 2001.

[32] VOGEL, A.I. **A textbook of practical organic chemistry including qualitative organic analysis**. London: Longmans, 1951. p. 1033.

[33] ALLEN, A.J.; MANKE, D.R.; LIN, W. Synthesis of functional bisphosphonates via new palladium-catalyzed bis-hydrophosphorylation reactions. **Tetrahedron Lett.**, v. 41, p. 151-154, 2000.

- [34] DU, Y.; JUNG, K.Y.; WIEMER, D.F. A one-flask synthesis of alpha-bisphosphonates via enolate chemistry. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, p. 8665-8668, 2002.
- [35] MIZRAHI, D.M.; WANER, T.; SEGALL, Y. Alpha-amino acid derived bisphosphonates. Synthesis and anti-resorptive activity. **Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.**, v. 173, p. 1-25, 2001.
- [36] COUTHON, H.; GOURVÈS, J.P.; GUERVENOU, J.; CORBEL, B.; STURTZ, G. Synthesis of two novel 2-aminocyclopropylidene-1,1-bisphosphonates. **Synth. Commun.**, v. 29, p. 4251-4260, 1999.
- [37] CHESTER, T.L. Dual flame photometric phosphorus-selective detector for high-performance liquid-chromatography. **Anal. Chem.**, v. 52, p. 1621-1624, 1980.
- [38] CHESTER, T.L.; LEWIS, E.C.; BENEDICT, J.J.; SUNBERG, R.J.; TETTENHORST, W.C. Determination of (dichloromethylene)diphosphonate in physiological fluids by ion-exchange chromatography with phosphorus-selective detection. **J. Chromatogr.**, v. 225, p. 17-25, 1981.
- [39] YEH, P. Determination of methylenediphosphonic acid by ion-pairing high-pressure liquid-chromatography with refractive-index detection. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 19, p. 27-29, 1981.
- [40] WONG, D.; JANDIK, P.; JONES, W.R.; HAGENAARS, A. Ion chromatography of polyphosphates with direct refractive-index detection. **J. Chromatogr.**, v. 389, p. 279-285, 1987.
- [41] HAN, Y.-H.R.; QIN, X.-Z. Determination of alendronate sodium by ion chromatography with refractive-index detection. **J. Chromatogr. A.**, v. 719, p. 345-352, 1996.
- [42] MEEK, S.E.; PIETRZYK, D.J. Liquid-chromatographic separations of phosphorus oxo acids and others anions with postcolumn indirect fluorescence detection by aluminum morin. **Anal. Chem.**, v. 60, p. 1397-1400, 1988.
- [43] LOVDAHL, M.J.; PIETRZYK, D.J. Anion-exchange separation and determination of bisphosphonates and related analytes by post-column indirect fluorescence detection. **J. Chromatogr. A.**, v. 850, p. 143-152, 1999.
- [44] KWONG, E.; CHIU, A.M.Y.; McCLINTOCK, S.A.; COTTON, M.L. HPLC analysis of an amino bisphosphonates in pharmaceutical formulation using postcolumn derivatization and fluorescence detection. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 28, p. 563-566, 1990.

- [45] FLESCH, G.; HAUFFE, S.A. Determination of the bisphosphonate pamidronate disodium in urine by pre-column derivatization with fluorescamine, high-performance liquid-chromatography and fluorescence detection. **J. Chromatogr.**, v. 489, p. 446-451, 1989.
- [46] FLESCH, G.; TOMINAGA, N.; DEGEN, P. Improved determination of the bisphosphonate pamidronate disodium in plasma and urine by pre-column derivatization with fluorescamine, high-performance liquid-chromatography and fluorescence detection. **J. Chromatogr.**, v. 568, p. 261-266, 1991.
- [47] KLINE, W.F.; MATUSZEWSKI, B.K.; BAYNE, W.F. Determination of 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-bisphosphonic acid in urine by automated precolumn derivatization with 2,3-naphthalene dicarboxyaldehyde and high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr.**, v. 534, p. 139-149, 1990.
- [48] 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. **J. Chromatogr.**, v. 583, p. 183-193, 1992.
- [49] SPARIDANS, R.W.; HARTIGH, J.D.; BEIJNEN, J.H.; VERMEIJ, P. Derivatization of pamidronate and other amino(bis)phosphonates with different isothiocyanates prior to ion-pair liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 782, p. 211-217, 1997.
- [50] SPARIDANS, R.W.; HARTIGH, J.D.; BEIJNEN, J.H.; VERMEIJ, P. Determination of pamidronate in urine by ion-pair liquid chromatography after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, v. 696, p. 137-144, 1997.
- [51] SPARIDANS, R.W.; HARTIGH, J.D.; BEIJNEN, J.H.; VERMEIJ, P. Semi-automatic liquid chromatography analysis of pamidronate in serum and citrate plasma after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, v. 705, p. 331-339, 1998.
- [52] SPARIDANS, R.W.; HARTIGH, J.D.; VERMEIJ, P. High-performance ion-exchange chromatography with in-line complexation of bisphosphonates and their quality control in pharmaceutical preparations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 13, p. 1545-1550, 1995.
- [53] DE MARCO, J.D.; BIFFAR, S.E.; REED, D.G.; BROOKS, M.A. 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.**, v. 7, p. 1719-1727, 1989.

- [54] SPARIDANS, R.W.; HARTIGH, J.D.; RAMP-KOOPMANSCHAP, W.M.; LANGEBROEK, R.H.; VERMEIJ, P. The determination of pamidronate in pharmaceutical preparations by ion-pair liquid chromatography after derivatization with phenylisothiocyanate. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 16, p. 491-497, 1997.
- [55] DALEY-YATES, P.T.; GIFFORD, L.A.; HOGGARTH, C.R.. Assay of 1-hydroxy-3-aminopropylidene-1,1-bisphosphonate and related bisphosphonates in human-urine end plasma by high-performance ion chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 490, p. 329-338, 1989.
- [56] KOSONEN, J.P. Determination of disodium clodronate in bulk material and pharmaceuticals by ion chromatography with postcolumn derivatization. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 10, p. 881-887, 1992.
- [57] VIRTANEN, V.; LAJUNEN, L.H.J. High-performance liquid-chromatography method for simultaneous determination of clodronate and some clodronate esters. **J. Chromatogr.**, v. 617, p. 291-298, 1993.
- [58] VIRTANEN, V.; LAJUNEN, L.H.J. Determination of clodronate in aqueous-solutions by HPLC using postcolumn derivatization. **Talanta**, v. 40, p. 661-667, 1993.
- [59] TSAI, E.W.; IP, D.P.; BROOKS, M.A. Determination of etidronate disodium tablets by ion chromatography with indirect UV detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 11, p. 513-516, 1993.
- [60] USUI, T.; WATANABE, T.; HIGUCHI, S. Determination of new bisphosphonate, YM175, in plasma, urine and bone by high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, v. 584, p. 213-220, 1992.
- [61] TSAI, E.W.; IP, D.P.; BROOKS, M.A. Determination of alendronate in pharmaceutical dosage formulations by ion chromatography with conductivity detection. **J. Chromatogr.**, v. 596, p. 217-2247, 1992.
- [62] HARTIGH, J.D.; LANGEBROEK, R.; VERMEIJ, P. Ion-exchange liquid-chromatographic analysis of bisphosphonates in pharmaceutical preparations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 11, p. 977-983, 1993.
- [63] TAYLOR, G.E. Determination of impurities in clodronic acid by anion-exchange chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 770, p. 261-271, 1997.
- [64] QIN, X-Z.; TSAI, E.W.; SAKUMA, T. IP, D.P. Ion chromatography ion-spray mass-spectrometric characterization of alendronate. **J. Chromatogr. A.**, v. 686, p. 205-212, 1994.



[65] HUIKKO, K.; KOTIAHO, T.; YLI-KAUHALUOMA, J.; KOSTIAINEN, R. Electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry of clodronate and related bisphosphonates and phosphonate compounds. **J. Mass. Spectrom.**, v. 37, p. 197-208, 2002.

[66] ISMAIL, Z.; ALDOUS, S.; TRIGGS, E.J.; SMITHURST, B.A.; BARRY, H.D. Gas-chromatography analysis of didronel tablets. **J. Chromatogr.**, v. 404, p. 372-377, 1987.

[67] AURIOLA S.; KOSTIAINEN, R.; YLINEN, M.; MÖNKKONEN, J.; YLITALO, P. Analysis of (dichloromethylene) bisphosphonate in urine by capillary gas-chromatography mass-spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 7, p. 1623-1629, 1989.

[68] SAKYIAMA, N.; KATAOKA, H.; MAKITA, M. Gas chromatography analysis of 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate and related bisphosphonate as their N-isobutoxycarbonyl methyl ester derivatives. **J. Chromatogr. A.**, v. 724, p. 279-284, 1996.

[69] ZELLER, M.; KESSLER, R.; MANZ, H.J.; SZÉKELY, G. Determination of disodium 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate pentahydrate. **J. Chromatogr.**, v. 545, p. 421-425, 1991.

[70] TSAI, E.W.; SINGH, M.M.; LU, H.H.; IP, D.P.; BROOKS, M.A. Application of capillary electrophoresis to pharmaceutical analysis: determination of alendronate in dosage forms. **J. Chromatogr.**, v. 626, p. 245-250, 1992.

[71] SIRÉN, H.; MÄÄTTÄNEN, A.; RIEKKOLA, M.L. Determination of small anions by capillary electrophoresis using indirect UV detection with sulphonated nitrosonaphthol dyes. **J. Chromatogr.**, v. 767, p. 293-301, 1997.

[72] PENG, S.X.; TAKIGIKU, R.; BURTON, D.E.; POWELL, L.L. Direct pharmaceutical analysis of bisphosphonates by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.**, v. 709, p. 157-160, 1998.

[73] HUIKKO, K.; KOSTIAINEN, R. Analysis of bisphosphonates by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, v. 872, p. 289-298, 2000.

[74] HUIKKO, K.; KOSTIAINEN, R. Development and validation of capillary zone electrophoretic method for the determination of bisphosphonate and phosphonate impurities in clodronate. **J. Chromatogr. A.**, v. 893, p. 411-420, 2000.

[75] REED, D.G.; MARTIN, G.P.; KONIECZNY, J.M.; BROOKS, M.A. The determination of alendronate sodium in tablets by inductively coupled plasma (ICP). **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 13, p. 1055-1058, 1995.

[76] KULJANIN, J.; JANCOVIC, I.; NENDELJKOVIC, J.; PRSTOJEVIC, D.; MARINKOVIC, V. Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations via complex formation with Fe(III) ions. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p. 1215-1220, 2002.

## **ANEXOS**

## **Produção científica durante o doutorado**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. FERNANDES, C.; LEITE, R.S.; LANÇAS, F.M. Rapid determination of bisphosphonates by ion chromatography with indirect ultraviolet detection. *Journal of Chromatography Science*.
2. FERNANDES, C.; LEITE, R.S.; LANÇAS, F.M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. *Química nova*, v. 28, p. 274-280, 2005.

### **Comunicações e resumos publicados em anais e congressos**

1. LEITE, R.S.; FERNANDES, C.; LANÇAS, F.M. Otimização das condições cromatográficas para determinação de etidronato em urina por HPLC In: 13° Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói/RJ. CD de Resumos - 13° ENQA.
2. FERNANDES, C.; LEITE, R.S.; LANÇAS, F.M. Determinação rápida de bisphosphonatos em medicamentos: desenvolvimento e validação do método In: 28° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas. Livro de Resumos, p. QA043
3. FERNANDES, C.; LEITE, R.S.; LANÇAS, F.M. Determinação rápida de bisphosphonatos utilizando cromatografia de troca aniônica em sílica modificada e detecção indireta no UV In: Tenth Latin American Congress On Chromatography and Related Techniques, 2004, Campos do Jordão. Book of Abstracts p. 211.
4. FERNANDES, C.; LEITE, R.S.; LANÇAS, F.M. Análise de clodronato por cromatografia líquida de alta eficiência via complexação com íons Fe(III) In: 12° Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luís. *Química Analítica Moderna: uma contribuição para a química limpa*.

## **Experiência Profissional**

- Dois anos de experiência profissional no Centro de P&d da Empresa Biorigin, uma unidade de negócios do grupo ZILOR, trabalhando com o desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos, bem como sua utilização em análises de rotina para os seguintes compostos: carboidratos, aminoácidos, micotoxinas, ânions, ácidos orgânicos, selenometionina e nucleotídeos.