

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL

EDEILSON VITOR GONZAGA

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS FORMAS CRISTALINAS DO ALENDRONATO DE
SÓDIO

ALFENAS/MG

2015

EDEILSON VITOR GONZAGA

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS FORMAS CRISTALINAS DO ALENDRONATO DE
SÓDIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.
Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto.

ALFENAS/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Gonzaga, Edeilson Vitor.
Estudo físico-químico das formas cristalinas do alendronato de sódio. / Edeilson Vitor Gonzaga. -- Alfenas/MG, 2015.
80 f.

Orientador: Antônio Carlos Doriguetto.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal de Alfenas, 2015.
Bibliografia.

1. Alendronato - Sódio. 2. Transição de Fase. 3. Polimorfismo (Cristalografia). 4. Fotometria de chama. I. Doriguetto, Antônio Carlos. II. Título.

CDD-615.19

EDEILSON VITOR GONZAGA

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS FORMAS CRISTALINAS DO ALENDRONATO DE
SÓDIO

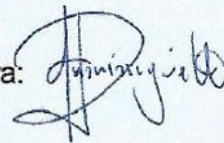
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas pela Universidade
Federal de Alfenas.

Aprovado em: 26/02/2015

Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto

Instituição: UNIFAL-MG

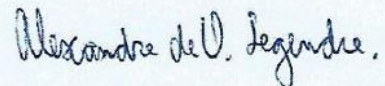
Assinatura:



Prof. Dr. Alexandre de Oliveira Legendre

Instituição: UNESP-SP

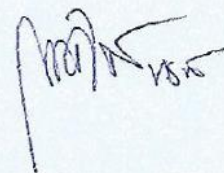
Assinatura:



Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e a capacidade de poder sonhar e de poder lutar por estes sonhos.

Não posso deixar de agradecer meu pai, minha mãe, irmãos, tios e em especial minha esposa (Vanessa) pelo apoio, presença, incentivo, paciência e presença constante durante este período de estudos sempre me motivando.

Agradeço meu orientador Antonio Carlos Doriguetto pelos ensinamentos, dedicação e atenção aos estudos realizados durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de estar completando este mestrado.

À Capes e à UNIFAL-MG pelo apoio financeiro.

Ao NCQ e Labiq da Unifal por me ajudarem durante as pesquisas e me fornecerem todos os aparatos necessários para a realização de um bom trabalho.

Ao Lacfar pelas análises térmicas realizadas.

Ao grupo de cristalografia pelos novos conhecimentos e ajudas durante todo este período.

Aos amigos André, Olímpia e Jennifer que sempre me ajudaram e sempre me apoiaram.

Ao Deiverson e Leandro pela ajuda nas análises de DRXP.

Todos os amigos e colegas da pós-graduação que de alguma maneira me ajudaram na idealização e realização deste trabalho.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram ou torceram pela realização de mais esta conquista em minha vida.

RESUMO

A maioria dos medicamentos é formulada com excipientes e ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) na forma de sólidos por uma série de razões tais como facilidade de dispensação, estabilidade do medicamento, maior tempo de concentração plasmática da droga após dosagem, etc. Porém as formulações que se utilizam de IFAs sólidos possui um fato importante a ser relatado e, com destaque ultimamente, que é o fenômeno do polimorfismo, definido como a capacidade de um mesmo composto se arranjar de duas ou mais formas distintas no estado sólido, o que pode causar diferenças nas suas propriedades físicas e, conseqüentemente, acarretar sérios problemas para quem se utiliza destes medicamentos devido a variações inadvertidas da concentração sérica do IFA. O alendronato de sódio é um fármaco muito utilizado para o tratamento da osteoporose, doença relacionada com o desgaste do tecido ósseo e que acometem, em sua maioria, mulheres pós-menopausa. A literatura tem reportado diferentes polimorfos, ou formas sólidas, desse fármaco. Nesse trabalho foram estudadas duas dessas formas cristalinas, a anidra e a triidratada. Os estudos realizados demonstraram que as técnicas de DRXP (difração de raios X por pó), IV (infravermelho), DSC (calorimetria exploratória diferencial) e TG/DTA (análise termogravimétrica diferencial) foram capazes de, individualmente, diferenciar as duas formas. Assim, escolheu-se a DRXP para o estudo de duas amostras de matéria-prima e três medicamentos comerciais o referência (R), genérico (G) e o Similar (S) do alendronato de sódio. Os resultados obtidos comprovaram que a forma presente nas cinco amostras era a triidratada, a qual é a forma cristalina preconizada pela USP 34. Os resultados comprovaram ainda não haver indícios da presença da forma anidra. Com a avaliação de interconversão de fases entre as formas notou-se que a conversão da forma triidratada em anidra ocorre de forma mais rápida do que o mencionado na literatura e também a conversão da forma anidra em triidratada ocorre de maneira instantânea quando em presença de água. Os resultados mostraram ainda que a interconversão de fase se dá com modificação da estrutura cristalina. Assim, nesse trabalho foi proposto, pela primeira vez, um mecanismo de transição de fase cristalográfica envolvendo o processo de hidratação/desidratação do alendronato de sódio. Outro resultado relevante dessa dissertação foi à proposta de um método de quantificação alternativo do alendronato de sódio por meio de fotometria de chama. O método desenvolvido e validado, foi posteriormente aplicado no estudo da solubilidade em equilíbrio e da dissolução intrínseca discriminatória das duas formas do alendronato de sódio. Entre os meios testados, observou-se diferença significativa da solubilidade em equilíbrio entre as duas formas apenas em tampão acetato pH 6,0 (isento de íons sódio). Nesse meio foi realizada a dissolução intrínseca que mostrou ser discriminatório entre as formas.

Palavras-chave: Alendronato de sódio. Interconversão de Fases. Polimorfismo. Fotometria de chama. Dissolução intrínseca.

ABSTRACT

Most drugs are formulated with excipients and active pharmaceutical ingredients (APIs) in solid form for a number of reasons such as ease of dispensation of the medicine stability, longer duration of plasma drug concentration after dosing, etc. But the formulations that use solid IFAs have an important fact to be reported and, especially lately that is the phenomenon of polymorphism, defined as the ability of a compound to get the same two or more distinct solid state forms, which may cause differences in its physical properties and hence cause problems for those using these drugs due to inadvertent variations in serum concentration of the API. Alendronate sodium is a drug widely used for the treatment of osteoporosis related illness wear bone tissue and that affects mostly postmenopausal women. The literature has reported different polymorphs, or solid forms of this drug. In this work were study two of these crystalline forms, anhydrous and the trihydrate. The studies demonstrated that the XRPD technique (X-ray diffraction powder), IR (infrared), DSC (differential scanning calorimetry) and TG/DTA (differential thermogravimetric analysis) were able to individually distinguish between the two forms. Thus we chose to study XRPD for two samples of raw material and three commercial reference drug (R), generic (G) and similar (S) of sodium alendronate. The results showed that the form present in the five samples was trihydrate, which the crystalline form is recommended by USP 34. The results also have shown no evidence of the presence of anhydrous form. With the assessment phases interconversion between the forms was noted that the conversion of trihydrate in anhydrous form occurs faster than mentioned in the literature and also the conversion of the anhydrous form of trihydrate occurs instantaneously when the presence of water . The results also showed that the phase interconversion occurs with modification of the crystalline structure. Thus, this work was proposed for the first time, a crystallographic phase transition mechanism involving the process of hydration / dehydration of sodium alendronate. Another important result of this dissertation was the proposal of an alternative method of quantification of alendronate sodium by flame photometry. The developed and validated method was subsequently applied to the solubility of study in balance and discriminatory intrinsic dissolution of the two of alendronate sodium forms. Among the tested media, there was a significant difference in the solubility equilibrium between the two forms only in acetate buffer pH 6.0 (sodium free ions). The intrinsic dissolution showed discriminate between that forms this medium was performed.

Keywords: Alendronate Sodium. Interconversion phases. Polymorphism. Flame photometry. Intrinsic dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação esquemática da relação estrutural de polimorfos, solvatos, fase amorfa, sal e co-cristal de uma molécula no estado sólido.....	14
Figura 2-	Tipos de polimorfos que podem surgir devido às diversas etapas do processo de fabricação de um medicamento.....	15
Figura 3-	Forma estrutural do alendronato de sódio.....	20
Figura 4-	Representação química das formas anidra (direita) e triidratada (esquerda) de alendronato de sódio.....	21
Figura 5-	Difratograma das amostras AL 17* e AL 25* comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.....	39
Figura 6-	Difratograma das amostras AL 17* e AL 25* comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.....	40
Figura 7-	Difratograma das matérias-primas A e B comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.....	41
Figura 8-	Difratograma dos medicamentos referência (R), genérico (G) e similar (S) (comprimido e moído) comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.....	42
Figura 9-	Espectros da absorção na região do infravermelho das matérias-primas A e B e da forma anidra de alendronato de sódio.....	43
Figura 10-	Curva de DSC das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio.....	44
Figura 11-	Curva de TG/DTA da forma triidratada de alendronato de sódio.....	45
Figura 12-	Curva de TG/DTA da forma anidra de alendronato de sódio.....	45
Figura 13-	Difratograma demonstrando a completa conversão da forma triidratada em forma anidra de alendronato de sódio.....	47
Figura 14-	Difratograma da forma triidratada aquecida a 150°C por 15, 30, 45 e 60 minutos comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.....	47
Figura 15-	Difratograma da forma anidra com adição de H ₂ O 50µL (vidro de relógio) e diretamente no porta amostra do difratômetro comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.....	48
Figura 16-	Difratogramas experimentais das formas anidra e triidratada após incubação a 40°C, 75% UR por 12h, comparados com seus respectivos difratogramas simulados.....	49
Figura 17-	Representação Mercury das unidades assimétricas da forma (a) triidratada e da (b) forma anidra do Alendronato de Sódio. As representações foram geradas a partir dos CIF (TEHWOS e UTOKAQ) depositados para as duas estruturas no CSD. Para a forma triidratada as águas de cristalização e coordenação são destacadas.....	50
Figura 18-	Representação do Mercury do polímero de coordenação 2D formado para a forma anidra do Alendronato de Sódio visto normal ao eixo cristalográfico a (plano (100)). (Esquema de cores: Sódio = lilás, oxigênio = vermelho, carbono = cinza, fosforo = laranja, Nitrogênio = azul). Hidrogênios não mostrados para melhor clareza das representações. Os octaedros compartilhando arestas são destacados por círculos pontilhados.....	52
Figura 19-	Representação do Mercury de três camadas do polímero de coordenação 2D formado para a forma anidra do Alendronato de Sódio visto normal ao eixo cristalográfico b (plano (010)). A representação ilustra que as camadas, alternadas em vermelho e azul para melhor ilustração, são paralelas ao plano (-101).....	52

Figura 20-	Representação Mercury mostrando o polímero de coordenação 1D formado no empacotamento cristalino da forma triidratada do Alendronato de Sódio. As águas presentes na estrutura são destacadas. (Esquema de cores: Sódio = lilás, oxigênio = vermelho, carbono = cinza, fosforo = laranja, Nitrogênio = azul).....	53
Figura 21-	Representação Mercury do empacotamento cristalino mostrado normal ao plano cristalográfico (101) mostrado a disposição inter-cadeias (vermelho e azul) e a localização das moléculas de água (verde e rosa).....	53
Figura 22-	Representação do Mercury do polímero de coordenação 2D formado para a forma anidra do Alendronato de Sódio visto normal ao plano (101). (Esquema de cores: Sódio = lilás, oxigênio = vermelho, carbono = cinza, fosforo = laranja, Nitrogênio = azul).....	55
Figura 23-	Representação do Mercury do polímero de coordenação 2D formado para a forma triidratada do Alendronato de Sódio visto normal ao plano (100). (Esquema de cores: Sódio = lilás, oxigênio = vermelho, carbono = cinza, fosforo = laranja, Nitrogênio = azul). As moléculas de água de cristalização são mostradas em azul e verde. A molécula de água coordenada ao Na ⁺ é mostrada em rosa.....	55
Figura 24-	Representação do Mercury do empacotamento parcial da forma triidratada do Alendronato de Sódio visto normal ao plano (010). (Esquema de cores: alendronato e Na ⁺ = verde, oxigênio das águas de cristalização = vermelho e azul, oxigênio da água de coordenação = magenta). A dupla seta em preto mostra a direção em que as cadeias paralelas da forma anidra (direção cristalográfica a da fase triidratada) se fundem para a forma o polímero de coordenação 2D da forma anidra. As grandes setas pontilhadas mostram esquematicamente a saída das águas.....	56
Figura 25-	Representação do Mercury da supraestrutura contendo os cátions Na ⁺ (lilás). Em (a) os demais átomos da estrutura estão presentes. Em (b) são mantidos apenas os cátions Na ⁺ sendo a parte orgânica representada por segmentos de reta. As setas em azul representam as pontes de fosfato que ligam as cadeias em comum as duas fases que ocorre ao longo do eixo b. As setas em laranja representam os oxigênios dos octaedros que compartilham suas arestas, o qual ocorre apenas para a fase anidra.....	57
Figura 26-	Curva analítica do alendronato de sódio.....	60
Figura 27-	Histograma do estudo de solubilidade dos polimorfos anidro e trihidratado de alendronato de sódio em água, HCl 0,01 M e em soluções tampões pH's 3,5, 6,0 e 7,2.....	66
Figura 28-	Difratogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de H ₂ O.....	67
Figura 29-	Difratogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de HCl 0,01M.....	68
Figura 30-	Difratogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de tampão acetato pH 3,5.....	68
Figura 31-	Difratogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de tampão acetato pH 6,0	69

Figura 32-	Difratogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de tampão acetato pH 7,2.....	69
Figura 33-	Gráfico do perfil de dissolução intrínseca discriminatória das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio.....	70
Figura 34-	Difratogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após o estudo de DID comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Recristalizações com misturas de solventes, água (H ₂ O), acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), tetrahidrofurano (THF), com armazenamento em diferentes locais, estufa 40°C (E), ambiente (temperatura ambiente) (A) e dessecador (temperatura ambiente) (D).....	26
Tabela 2-	Soluções de alendronato de sódio.....	32
Tabela 3-	Comparação dos parâmetros de Celas das formas anidra e triidratada do Alendronato de Sódio.....	51
Tabela 4-	Avaliação da linearidade do método de quantificação de alendronato de sódio por fotometria de chama.....	59
Tabela 5-	Avaliação da precisão do método de quantificação de alendronato de sódio por fotometria de chama.....	61
Tabela 6-	Avaliação da exatidão do método de quantificação de alendronato de sódio por fotometria de chama.....	62
Tabela 7-	Avaliação do LD e LQ do método de quantificação de alendronato de sódio por fotometria de chama.....	63
Tabela 8-	Média das repetições do teste de solubilidade em equilíbrio das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio e desvio padrão relativo entre as formas.....	65
Tabela 9-	pHs dos meios teste após os estudos de solubilidade em equilíbrio.....	65
Tabela 10-	Média (\bar{x}) de liberação em mg das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio e desvio padrão relativo (DPR) entre os 3 estudos de DID.....	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	<i>O DILEMA DAS FORMAS SÓLIDAS DE FÁRMACOS</i>	12
1.2	<i>ALENDRONATO DE SÓDIO</i>	17
2	OBJETIVOS	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	<i>OBTENÇÃO DAS FORMAS SÓLIDAS DE ALENDRONATO DE SÓDIO</i>	24
3.1.1	<i>Amostras policristalinas</i>	24
3.1.2	<i>Amostras monocristalinas</i>	24
3.2	<i>ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS E MEDICAMENTOS DE ALENDRONATO DE SÓDIO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR PÓ (DRXP)</i>	27
3.3	<i>ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)</i>	27
3.4	<i>ANÁLISES TÉRMICAS (DSC, TG/DTA)</i>	28
3.5	<i>ESTUDOS DE INTERCONVERSÃO DAS FORMAS ANIDRA E HIDRATADA DE ALENDRONATO DE SÓDIO</i>	29
3.6	<i>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ALTERNATIVO DE DOSEAMENTO DO ALENDRONATO DE SÓDIO POR FOTOMETRIA DE CHAMA</i>	29
3.6.1	<i>Método de quantificação do alendronato de sódio por fotometria de chama</i>	29
3.6.2	<i>Validação analítica</i>	31
3.6.2.1	<i>Linearidade</i>	31
3.6.2.2	<i>Precisão</i>	32
3.6.2.3	<i>Exatidão</i>	33
3.6.2.4	<i>Seletividade</i>	33
3.6.2.5	<i>Limite de Detecção e Quantificação (LD e LQ)</i>	34
3.7	<i>ESTUDOS DE SOLUBILIDADE</i>	35
3.8	<i>ESTUDO DE DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA DISCRIMINATÓRIA (DID)</i>	35
3.9	<i>EQUIPAMENTOS E REAGENTES</i>	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	<i>PREPARAÇÃO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS (POLIMORFOS)</i>	38
4.2	<i>ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS E MEDICAMENTOS DE ALENDRONATO DE SÓDIO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR PÓ (DRXP)</i>	40
4.3	<i>ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)</i>	42
4.4	<i>ANÁLISES TÉRMICAS (DSC, TG/DTA) DAS FORMAS ANIDRA (RECRISTALIZADA) E TRIIDRATADA (MATÉRIA-PRIMA) DE ALENDRONATO DE SÓDIO</i>	43
4.5	<i>ANÁLISES DOS ESTUDOS DE INTERCONVERSÃO DAS FORMAS SÓLIDAS DE ALENDRONATO DE SÓDIO</i>	46
4.6	<i>PROPOSTA MECANÍSTICA DE TRANSIÇÃO DE FASE CRISTALINA ENTRE AS FORMAS ANIDRA E TRIIDRATADA DO ALENDRONATO DE SÓDIO</i>	49
4.7	<i>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DO ALENDRONATO DE SÓDIO POR FOTOMETRIA DE CHAMA</i>	58

4.7.1	<i>Método de quantificação do alendronato de sódio</i>	58
4.7.2	<i>Validação analítica</i>	58
4.7.2.1	<i>Linearidade</i>	59
4.7.2.2	<i>Precisão</i>	60
4.7.2.3	<i>Exatidão</i>	61
4.7.2.4	<i>Seletividade</i>	62
4.7.2.5	<i>Limite de Detecção e Quantificação (LD e LQ)</i>	63
4.7.2.6	<i>Aplicação do método</i>	64
4.8	<i>ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE EQUILÍBRIO</i>	64
4.9	<i>ESTUDO DE DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA DISCRIMINATÓRIA (DID)</i>	70
5	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

As formas sólidas de fármacos podem apresentar o fenômeno do polimorfismo, que podem alterar principalmente suas propriedades físicas e químicas, o que será abordado neste trabalho.

1.1 O DILEMA DAS FORMAS SÓLIDAS DE FÁRMACOS

Os medicamentos são formulados, em sua maioria, com excipientes e ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) na forma de sólidos. A facilidade e o custo de se trabalhar com as formulações sólidas em relação às líquidas demonstra a preferência da indústria farmacêutica pelas formulações sólidas no desenvolvimento de medicamentos, sendo estas as de melhor comercialização. Os medicamentos em formas farmacêuticas sólidas são mais bem aceitos pelos pacientes adultos que as líquidas, e também com o avanço da tecnologia farmacêutica estas formulações têm conseguido abranger uma faixa etária maior. As formas farmacêuticas líquidas têm um desenvolvimento mais complexo e dispendioso, pois se deve garantir estabilidade física, química e microbiológica através de agentes tamponantes, conservantes e antioxidantes, sem contar que alguns fármacos possuem um sabor desagradável que deve ser mascarado com outros agentes (NUNN; WILLIAMS, 2005).

Porém, as formulações que utilizam de IFAs sólidos têm despertado preocupação quanto ao fenômeno do polimorfismo, definido como a capacidade de uma mesma molécula se arranjar de distintas maneiras no estado sólido cristalino ou amorfo. Ou seja, o polimorfismo ocorre quando um IFA pode apresentar-se de duas ou mais formas cristalinas, mantendo a composição química, mas com arranjos diferentes no estado cristalino (BILTON et al., 1999; BRITAIN; GRANT, 2001; DESIRAJU, 2008; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011; PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009; VIPPAGUNTA; KARPINSKI, 2006).

A introdução do termo polimorfismo em ciências dos materiais ocorreu em 1788, quando Klaproth identificou duas formas cristalinas diferentes de carbonato de cálcio: calcita e aragonita. Em ciências dos materiais, o termo polimorfismo se relaciona com a capacidade da substância apresentar-se em duas ou mais fases cristalinas diferentes, com diferentes

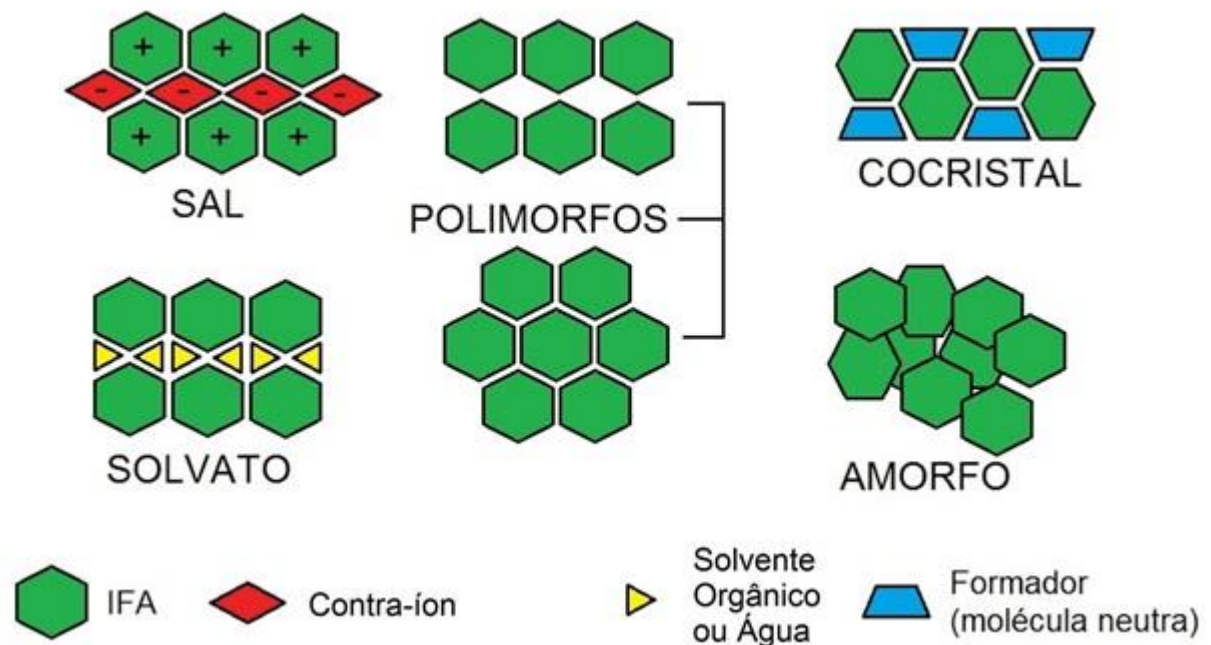
arranjos e/ou mudança no ordenamento molecular, definido como o polimorfismo de empacotamento, e também alterações na conformação da molécula na rede cristalina o qual é denominado polimorfismo conformacional de acordo com Martins (2010), este que quase sempre é acompanhado pelo polimorfismo de empacotamento (SARMA, 2011). Quando se trata do polimorfismo em ciências farmacêuticas, este termo refere-se às diferentes formas sólidas de fármacos e excipientes, incluindo formas amorfas, solvatos, hidratos, sais e co-cristais (AALTONEN et al., 2009).

Quando ocorre a inclusão de uma ou mais moléculas de um solvente na estrutura cristalina da substância usa-se o termo solvatomorfismo (pseudopolimorfismo). Quando o solvente é orgânico denomina-se por solvatos e quando é a água a forma cristalina é denominada por hidrato (EUROPEAN PHARMAPOEIA, 2008; FDA, 2007a; HILFIKER, BLATTER, RAUMER, 2006).

A falta de periodicidade a longo alcance de uma estrutura no estado sólido designa uma substância amorfa, a qual é sempre a mais solúvel, porém menos estável do que a correspondente cristalina. Além disso, a forma anidra pode se converter na forma mais estável com o passar do tempo, o que é extremamente indesejável no caso de um IFA (CHIENG et al., 2009; HANCOCK; PARKINS, 2000; YU, et al., 2003;). A Figura 1 mostra uma representação esquemática, dando a relação estrutural de polimorfos, solvatos, fase amorfa, sal e co-cristal de uma molécula no estado sólido.

A ocorrência do polimorfismo e os efeitos por ele gerados nos sólidos são explicados pelas ligações intermoleculares existentes. Moléculas são formadas por átomos conectados por ligações covalentes, já os cristais desses fármacos são formados por moléculas conectadas por meio de interações intermoleculares (ALLESØ et al., 2008). Essas interações de natureza não covalente, tais como ligações de hidrogênio, Van der Waals, ligações π - π e interações eletrostáticas, determinam o arranjo das moléculas em um cristal (DESIRAJU, 1995, 2001; (ETTER; MACDONALD; BERNSTEIN, 1990; MOULTON; ZAWOROTKO, 2002; PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009;). E essas determinam a existência de diferentes polimorfos e também são responsáveis pelas distintas propriedades físicas e químicas do composto ou polimorfo, dentre as quais podemos citar: compressibilidade, dureza, fluxo de pó, condutividade, densidade, higroscopicidade, índice de refração, cor, morfologia das partículas, entalpia, entropia, capacidade calorífica, temperaturas de fusão e ebulição, pressão de vapor, estabilidade, solubilidade e taxa de dissolução, etc. (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

Figura 1 - Representação esquemática da relação estrutural de polimorfos, solvatos, fase amorfa, sal e co-cristal de uma molécula no estado sólido.



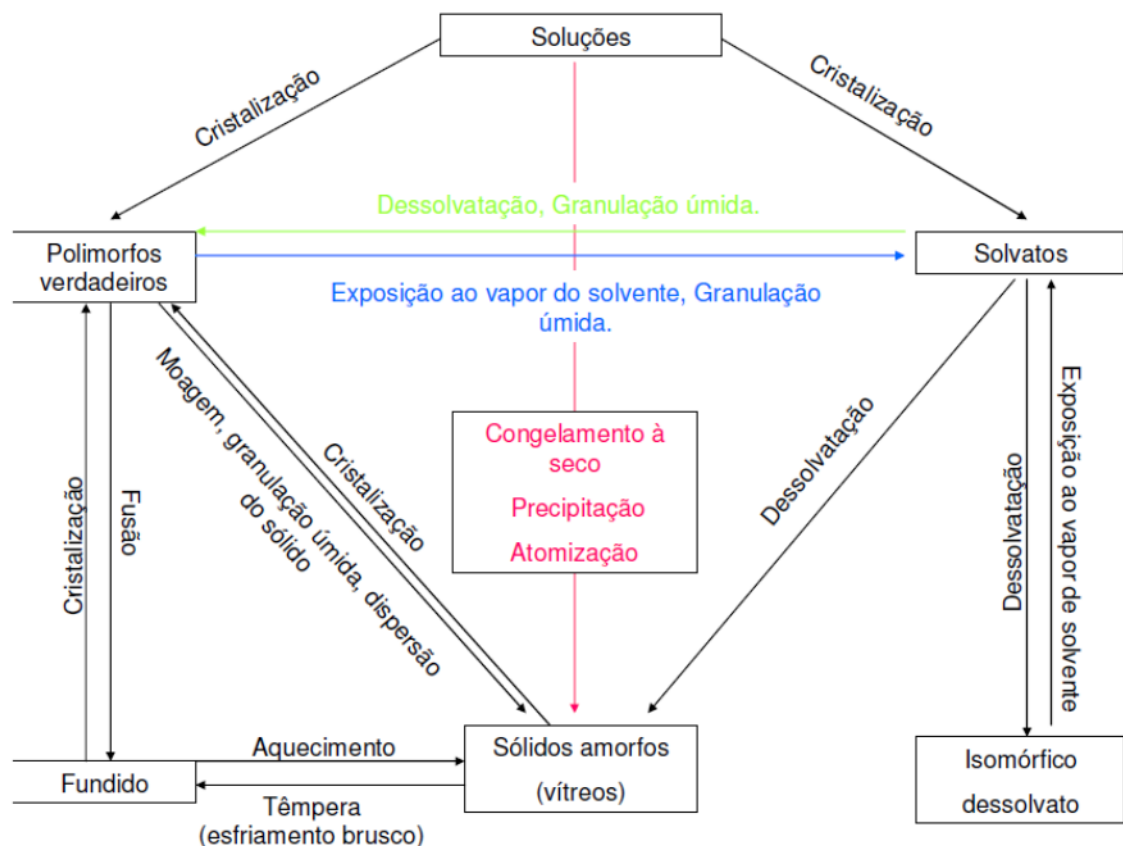
Fonte: adaptada do trabalho de revisão "Los cocrisiales farmacéuticos: conceptos generales", BALDERAS, et al., 2014.

Dentro da indústria farmoquímica e farmacêutica diferentes polimorfos podem inadvertidamente surgir, pois a síntese do IFA e a produção do medicamento envolvem vários processos, e durante estes processos ocorre o surgimento de novos polimorfos, pois grandes variações reacionais, físicas e químicas acontecem e isto pode facilitar a transição de fase cristalina do IFA. Quando se trata do produto acabado (medicamento), pode também ocorrer transição de fase durante a estocagem devido a interação do fármaco com os excipientes (IBRAHIM; PISANO; BRUNO, 1977; TAKENAKA; KAWASHIMA; LIN, 1980; YORK, 1983;). A produção de um medicamento envolve vários fatores e várias etapas durante todo o processo e isso pode levar à formação de diferentes polimorfos, como ilustrado na Figura 2.

Um dos principais casos de polimorfismo em sólidos farmacêuticos que impactou a Indústria Farmacêutica ocorreu em 1998, para o Norvir® (ritonavir), medicamento utilizado para o tratamento da AIDS. Durante o processo de manufatura do medicamento surgiu um novo polimorfo do ritonavir, o que acarretou em grandes problemas financeiros para Abbott, empresa responsável pela sua produção e, também problemas de eficácia do medicamento. A partir desse marco histórico, os órgãos fiscalizadores passaram a ter uma maior atenção para o tema do polimorfismo em sólidos farmacêuticos, tendo em vista seu potencial impacto na

solubilidade e conseqüentemente na dissolução e biodisponibilidade do IFA em medicamentos (CHEMBURKAR, et al, 2000; BAUER, et al, 2001). Atenção maior tem sido dada aos IFAs de baixa solubilidade, para os quais a taxa de dissolução é o fator limitante para a absorção (LLINÀS; GOODMAN, 2008). Conseqüentemente, isto pode dificultar a obtenção de bioequivalência entre formulações contendo diferentes polimorfos e prejudicar principalmente o paciente. Além disso, o polimorfismo pode influenciar na estabilidade física e química dos medicamentos, devido às diferenças termodinâmicas dos polimorfos (SAIFEE et al, 2009).

Figura 2 - Tipos de polimorfos que podem surgir devido às diversas etapas do processo de fabricação de um medicamento



Fonte: adaptada da Figura 2 da referência YU, REUTZEL, STEPHENSON, 1998.

É importante destacar a alta prevalência de tal fenômeno entre moléculas orgânicas, incluindo IFAs (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011), o que é sabido há muitos anos. Para se ter ideia, data-se dos meados dos anos de 1960 a famosa frase de Walter C. McCrone de que “todo composto tem diferentes polimorfos e, geralmente, o número de formas conhecidas de um dado composto é proporcional ao tempo e dinheiro gastos na pesquisa desse composto” (MCCRONE, 1965). Apesar disso, apenas no final dos anos e 1990, com o caso NORVIR, é que o interesse pela temática disseminou-se na área acadêmica e, principalmente, industrial.

O conhecimento do polimorfo a ser incluído em um medicamento é de extrema importância dentro da indústria farmacêutica, pois o desenvolvimento de um novo medicamento necessita obedecer regras de órgãos fiscalizadores como, por exemplo, o guia Q6A do International Commission on Harmonization (ICH). No desenvolvimento de um fármaco, o polimorfo preferido é o mais estável, embora nem sempre seja a forma farmacológica ideal (BYRN; GRANT, 2004; SHINGAL; CURATOLO, 2004; VON RAUMER; DANNAPPEL; HILFIKER, 2006;).

Em busca de um controle maior em relação aos diferentes polimorfos que surgem e ainda podem surgir, a Food and Drug Administration (FDA) sugere uma sequência de procedimentos para monitorar e controlar o problema do polimorfismo para quem pretende fabricar e colocar no mercado um medicamento (FDA, 2007b).

As diferenças entre as variadas formas cristalinas dos sólidos podem ser detectadas por meio de uma série de técnicas complementares. Dentre elas pode-se listar: a difratometria de raios X por monocristal e por pó (DRXM e DRXP); espectroscopia Raman; espectroscopia no infravermelho (IV); análise térmica diferencial (DTA); análise termogravimétrica (TG); calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a dissolução. Dentre as técnicas de difração, a DRXM é a principal técnica de elucidação de estruturas de polimorfos inéditos, enquanto a DRXP é mais utilizada para a diferenciação de polimorfos em amostras policristalinas (MARTINS, 2010; NEVES, 2008).

Além do uso de técnicas instrumentais de análise do estado sólido, polimorfos também podem ser identificados por meio de testes comparativos de solubilidade e dissolução uma vez que estas propriedades físicas e químicas podem variar significativamente com as forças químicas que mantêm unidas às moléculas no estado sólido. Ou seja, diferentes polimorfos podem ter diferentes solubilidades de equilíbrio (termodinâmico) e velocidade de dissolução (cinético) e, quando é o caso, quase sempre implicam em diferentes biodisponibilidades (MARTINS, 2010; YU et al., 2003). Assim, a dissolução intrínseca tem sido utilizada para caracterizar fármacos no estado sólido, além de permitir a prevenção de problemas com a biodisponibilidade (AMIDON, et al, 1995; AMIDON, 1982; ROSA, 2005). Dentre suas principais utilizações, tem-se determinado parâmetros termodinâmicos associados com a transição de fases cristalinas, investigado o fenômeno de transferência de massa durante o processo de dissolução, estudado o efeito de tensoativos e da alteração do pH para solubilização de fármacos pouco solúveis em água e tentado entender a relação entre velocidade de dissolução e a forma cristalina de uma substância (YU, et al, 2004).

No entanto, para a grande maioria dos fármacos, a identificação de fase polimórfica não é um teste obrigatório, fazendo-se necessárias mais pesquisas na área e um maior comprometimento das autoridades regulatórias e de controle de qualidade no monitoramento do polimorfismo na qualidade dos medicamentos. Apesar de todo o conhecimento científico acumulado a respeito dos efeitos de transição de fase em fármacos no estado sólido, ensaios de caracterização da forma cristalina não fazem parte da maioria das monografias descritas em compêndios oficiais (SANTOS, et al, 2014).

Esse é um fato preocupante, pois apesar dos grandes investimentos feitos pela indústria farmacêutica, ainda não é possível prever todos os polimorfos estáveis de um IFA (LLINÀS; GOODMAN, 2008). Esta dificuldade deve-se a conversão de polimorfos menos estáveis termodinamicamente em polimorfos mais estáveis e menos solúveis (LLINÀS; GOODMAN, 2008).

Uma regra universalmente aceita é que formas metaestáveis possuem maior solubilidade do que formas estáveis (PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009), e que solvatos são sempre menos solúveis do que o sólido original (HUANG; TONG, 2004). Diante do exposto, uma das motivações para esse trabalho consistiu em estudar um fármaco que apresentasse relatos na literatura da ocorrência de forma anidra e de forma hidratada. Nesse sentido, escolheu-se trabalhar com o alendronato de sódio.

1.2 *ALENDRONATO DE SÓDIO*

O osso é uma matriz complexa envolvida na sustentação do organismo e, como todos os outros tecidos do corpo, ele possui células de renovação: os osteoblastos e osteoclastos. Quando há um desequilíbrio no processo de renovação óssea isso faz com que ocorram desordens no tecido o que caracteriza algumas doenças ósseas como a osteoporose e síndrome de Paget. (GOODMAN; GILMAN, 2006; GUYTON, 1988).

A osteoporose é uma doença que está diretamente ligada a desordens no processo de renovação óssea (perda de massa óssea), que gera uma fragilidade óssea podendo ocasionar fraturas facilmente. É uma doença que atinge principalmente mulheres pós-menopausa (30 e 50%) e entre 15 e 30% dos homens, caracterizando um problema de saúde pública (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Pode-se classificar a osteoporose de duas maneiras distintas, primária e secundária, sendo que a primária está diretamente relacionada aos distúrbios ósseos durante a remodelagem óssea, que dentre outros motivos podem ser causados por deficiências nutricionais e principalmente pela deficiência hormonal da mulher no período do climatério. Já a secundária pode ser causada por doença sistêmica ou pelo uso de alguns medicamentos, como por exemplo, glicocorticoides e fenitoína. A osteoporose primária ou secundária está associada a uma desordem na remodelagem óssea, portanto a terapia se dá da mesma maneira para ambas (GOODMAN; GILMAN, 2006).

A classe farmacológica amplamente utilizada para o tratamento das desordens na remodelagem óssea são os bifosfonatos, classe que apresenta uma ação farmacológica única, a inibição da reabsorção óssea, incluindo sua capacidade de captar seletivamente e preferencialmente em locais no esqueleto onde há aumento na remodelagem óssea e a liberação lenta nos ossos, que os tornam diferentes e com maior eficácia sem apresentar grandes efeitos adversos ao paciente (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; GOODMAN; GILMAN, 2006).

Os bifosfonatos são análogos estáveis de compostos de ocorrência natural, o pirofosfato. Ele possui em sua estrutura dois grupos de fosfonato que estão fixos a um carbono central, o qual substitui o oxigênio no pirofosfato. Como formam uma estrutura tridimensional capaz de fixar cátions divalentes, como o Ca^{2+} , os bifosfonatos possuem acentuada afinidade pelo osso, especialmente pelas superfícies ósseas em processo de remodelagem (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Dentro da classe dos bifosfonatos têm-se os de primeira, segunda e terceira geração, o que os diferem são os diferentes ligantes nas cadeias laterais da estrutura principal e também a diferença de potência sendo os mais potentes os de terceira geração. O alendronato de sódio está dentro da segunda geração dos bifosfonatos, considerado de potência intermediária, que são de 10 a 100 vezes mais potentes que os de primeira geração e 100 vezes menos potentes que os de terceira (GOODMAN; GILMAN, 2006).

O alendronato de sódio é um fármaco de grande importância clínica, sendo o principal medicamento para o tratamento da osteoporose. Seu mecanismo de ação está diretamente ligado à sua capacidade de inibir especificamente o processo de reabsorção óssea mediada por osteoclastos e sua capacidade de se fixar facilmente a matriz óssea (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; MARCUS, et al 1996).

A principal via de administração dos bifosfonatos é oral, o que ocorre para o alendronato de sódio. Ele é um fármaco muito pouco absorvido pelo intestino e apresenta

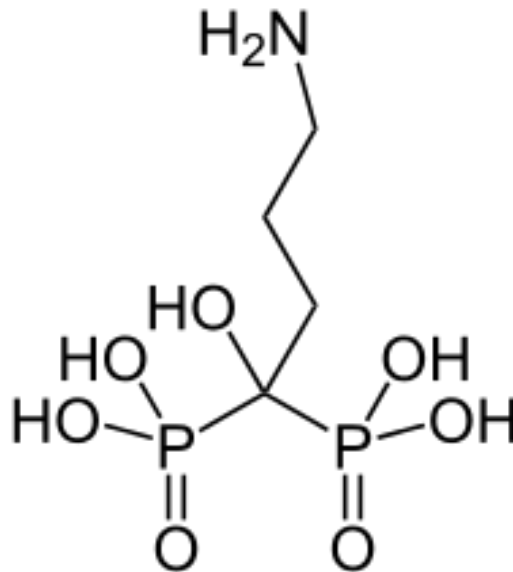
limitada biodisponibilidade, entre 0,4 e 0,7%, e deve ser administrado após uma noite de jejum, pois sofre grandes influências da alimentação ou da administração concomitante com alguns alimentos. O uso deste medicamento tem sido evitado em crianças e adolescentes, pois não se sabe a sua influência a longo prazo no desenvolvimento ósseo do paciente. Como é um fármaco com grande afinidade pela matriz óssea (cerca de 50% da dose administrada fica fixa à matriz óssea) ele apresenta uma meia vida de eliminação alta: em torno de 10 anos. A excreção primariamente ocorre pelos rins, sendo eliminado na sua forma inalterada (CREMERS, PAPAPOULOS, 2011; GOODMAN; GILMAN, 2006; VADE-MÉCUM, 2002).

O alendronato de sódio é um fármaco derivado do ácido alendrônico cujo nome químico é 4-amino-1-hidroxitributano bifosfonato de sódio (CAS: 121268-17-5), possui uma estrutura geral característica dos bifosfonatos, com dois átomos de fósforo ligados a um carbono central e cadeias laterais que podem variar o constituinte de acordo com a geração do bifosfonato. O alendronato de sódio possui um grupo nitrogênio e o átomo de sódio, sendo este o que o diferencia do ácido alendrônico (Figura 3) (GOODMAN; GILMAN, 2006; PARFITT, MARTINDALE, 1999).

A síntese do alendronato de sódio ocorre a partir da neutralização do ácido alendrônico em forma de sal monossódico, frequentemente encontrado na forma triidratada. A qual é reportada em compêndios oficiais. Ele possui faixa de fusão de 257 a 262 °C (KIECZYKOWAKI, et al., 1995; USP 34). É um fármaco de caráter anfótero, pois apresenta como características ácidas os dois grupos fosfóricos e básicos o grupamento amina específico dos bifosfonatos de segunda geração. Devido a seu comportamento anfótero ele apresenta quatro diferentes constantes de ionização, sendo elas: $pK_{a1} = 2,72 \pm 0,05$; $pK_{a2} = 8,73 \pm 0,05$; $pK_{a3} = 10,5 \pm 0,1$; $pK_{a4} = 11,6 \pm 0,1$ (THE MERCK INDEX, 2007).

Como características de solubilidade é um fármaco solúvel em água e de maneira geral praticamente insolúvel em compostos orgânicos (CIPLA, 1999).

Figura 3 - Forma estrutural do alendronato de sódio.



Fonte: adaptada P.R.Vade-mécum ABIMIP 2006/2007.

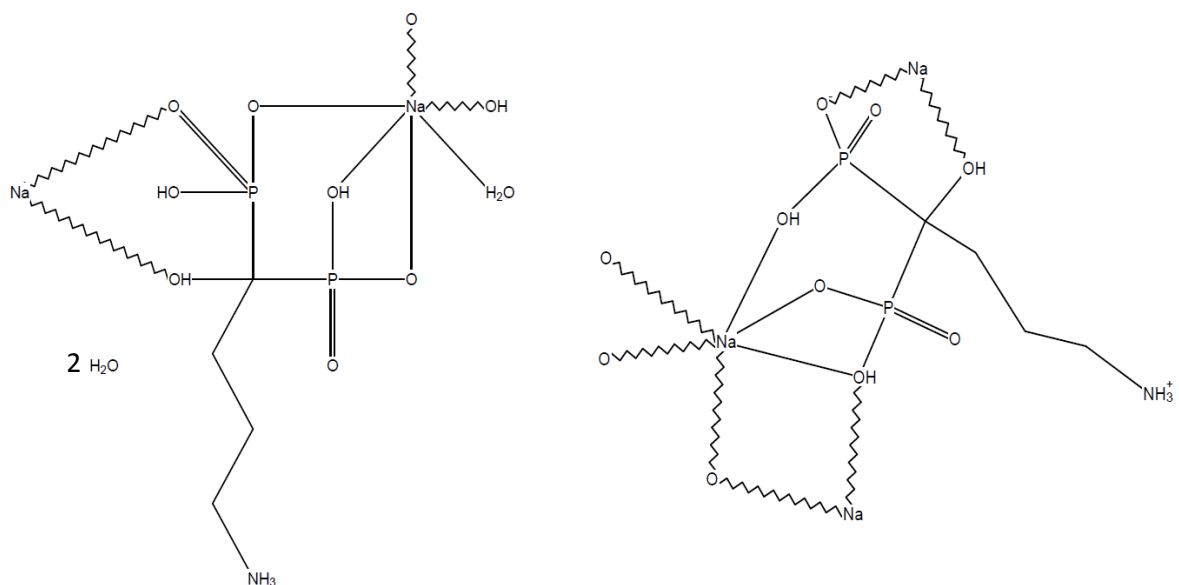
No Brasil ele é comercializado na forma de comprimidos de alendronato monossódico com doses de 5, 10 e 70mg de ácido alendrônico por comprimido, nas formas farmacêuticas de medicamentos Referência (lançado pela Merck Sharp & Dohme, com o nome de Fosamax®), Similar e Genérico, e em associação com vitamina D, sendo que a forma preconizada pelos compêndios oficiais é a forma triidratada de alendronato de sódio. As farmácias magistrais têm manipulado alendronato de sódio em cápsulas de gelatina dura (ANVISA; Resolução RE nº 37, de 05/02/2004; VADE-MÉCUM, 2002; ANVISA; 2014).

A forma cristalina do alendronato monossódico triidratado, utilizada como IFA do medicamento comercial, possui estrutura cristalina conhecida (VEGA, et al, 1996). É conhecida também a forma monossódica anidra (ASNANI, et al., 2009), que pode ser obtida a partir da desidratação da forma hidratada. Além dessas, são conhecidas também uma forma zwitterionica monoidratada (LEROUX, et al., 1991), uma forma zwitterionica anidra (OHANESSIAN, et al., 1997), um sal de alendronato de lítio diidratado (DEACON, et al., 2011) e três complexos de metais de transição, alendronato-Cu (DEMORO, et al., 2012), alendronato-Zn (DUFAU, et al., 1995) e Alendronato-Co (SIUD PUI MAN, et al., 2006). Têm-se também algumas patentes reportadas, sendo estas relacionadas com a variação de quantidade de água presente na composição da molécula (FINKELSTEIN, et al., 2001;

KIECZYKOWAKI, et al., 1989;; SIENKIEWICZ, et al., 2004). A Figura 4 representa a disposição dos átomos na molécula de alendronato de sódio das formas anidra e triidratada.

O alendronato de sódio, em sua estrutura, não apresenta grupo cromóforo, dificultando assim seu doseamento por técnicas espectrofotométricas, mais especificamente na região do visível dependendo de técnicas de derivatização. Como alternativa e viabilidade de doseamento de sódio, tem-se a espectroscopia emissão/absorção atômica, que se refere à medição do comprimento de onda ou da intensidade de luz que é emitida ou absorvida por átomos livres (HAGE, 2012).

Figura 4 - Representação química das formas anidra (direita) e triidratada (esquerda) de alendronato de sódio.



Fonte: Adaptada do “Search Overview” do CSD mantido pelo Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) salvo em 16/04/2013.

Dentre as técnicas de espectrometria atômica, a fotometria de chama está entre as mais simples. Seu princípio é baseado na radiação emitida por espécies atômicas ou iônicas em estado de excitação quando amostras contendo cátions metálicos são inseridos em uma chama. A chama é a fonte de energia, capaz de dissolver, vaporizar, atomizar e excitar os átomos presentes na amostra e, quando estes átomos retornam ao seu estado fundamental, eles geram ondas eletromagnéticas características de cada elemento químico e esta onda (energia e amplitude) é medida através de um detector. Conhecida por sua simplicidade, esta técnica envolve vários conceitos a respeito dos princípios da espectroscopia, e principalmente ao preparo de amostras e eliminação de interferentes, pois se trata de uma técnica consideravelmente sensível (HARRIS, 2005).

Como discutido anteriormente, a análise de IFAs sólidos é de fundamental importância para assegurar a qualidade dos produtos acabados, garantindo a segurança dos medicamentos

dispensados à população, haja visto que existem poucos relatos nas literaturas oficiais sobre a influência do fenômeno de polimorfismo na qualidade e segurança dos medicamentos comercializados. Nesse sentido, serão utilizadas nesse trabalho as técnicas de DRXP, Análises Térmicas e Espectroscopia na região do infravermelho para a caracterização das formas anidra e triidratada do alendronato de sódio. Já os estudos de solubilidade e dissolução intrínseca, em que o composto é quantificado por via úmida, o alendronato será dosado indiretamente por meio de fotometria de chama no comprimento de onda de emissão do sódio, que tem relação molar de 1 : 1 com o alendronato na estrutura.

2 OBJETIVOS

Avaliar a ocorrência de polimorfismo em matéria-prima de alendronato de sódio e o impacto deste em formulações farmacêuticas comerciais.

Os objetivos específicos são:

- a) A partir da forma monossódica triidratada do alendronato de sódio, disponível comercialmente como IFA, buscar monocristais e policristais da forma anidra e de novos polimorfos por meio de técnicas de Engenharia de Cristais;
- b) Caracterizar estruturalmente as formas de alendronato de sódio (anidra e triidratada) por espectroscopia no infravermelho (IV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica diferencial (TG/DTA e) e difratometria de raios X por pó (DRXP);
- c) Avaliar as formas farmacêuticas comerciais (referência, genérico e similar) e matérias-primas de diferentes fornecedores por meio de DRXP;
- d) Avaliar a interconversão de fases entre a forma anidra e triidratada de alendronato de sódio;
- e) Realizar os estudos de solubilidade em equilíbrio das formas de alendronato de sódio (anidra e triidratada) para avaliar o impacto em suas propriedades físicas e químicas;
- f) Realizar os estudos de dissolução intrínseca discriminatória das formas de alendronato de sódio (anidra e triidratada) buscando verificar alterações em suas propriedades físicas e químicas;
- g) Desenvolver e validar um método alternativo de doseamento do alendronato de sódio por fotometria de chama.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão descritas todas as metodologias, reagentes e equipamentos utilizados na realização deste trabalho.

3.1 OBTENÇÃO DAS FORMAS SÓLIDAS DE ALENDRONATO DE SÓDIO

As formas sólidas do alendronato de sódio foram obtidas através de técnicas de recristalização e estas foram divididas em amostras policristalinas e monocristalinas.

3.1.1 Amostras policristalinas

A forma triidratada de alendronato de sódio foi obtida adquirindo-se seu material comercial. A forma anidra foi recristalizada a partir da forma triidratada (comercial e reportada pela USP 34 NF 29), por aquecimento a temperatura de 150°C por uma hora, de acordo com a literatura (ASNANI et al., 2009).

3.1.2 Amostras monocristalinas

Para os experimentos na tentativa de se obter monocristais da forma anidra e da forma triidratada do alendronato de sódio, ou de novas formas cristalinas desse fármaco, foi feito um estudo para identificar os métodos e técnicas a serem utilizados na sua recristalização.

Os principais métodos testados foram: recristalização por saturação de vapor empregando diferentes solventes (água, metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano) e recristalização solvo-térmica (mistura de soluto e solvente em ambiente de temperatura e pressão modificadas).

Inicialmente utilizou-se o método de recristalização por saturação de vapor para obter formas hidratadas e/ou, solvatadas do alendronato. O método consistiu na mistura de 10 mg do pó do insumo puro (alendronato de sódio tri-hidratado) até a sua total solubilização em diferentes solventes. Após a dissolução filtrou-se em papel de filtro quantitativo. Posteriormente a solução foi deixada em repouso para evaporação lenta do solvente. Além das variações de solventes, (quantidade e solvente), variaram-se também os locais de recristalização (dessecador, ambiente e estufa) conforme Tabela 1.

Na tentativa de se obter amostras monocristalinas da forma anidra de alendronato de sódio, utilizou-se da técnica de recristalização solvo-térmica, a qual se emprega um reator que suporta altas temperaturas e pressões. Esta técnica foi necessária devido ao fato de a amostra não poder ser exposta a presença de água e ao fato de ter baixa solubilidade em solventes orgânicos.

Primeiramente foi feito utilizando cerca de 5 mg da forma anidra de alendronato de sódio (obtido conforme descrito no item 3.1.1) o qual foi colocado no reator com 7 mL de metanol (% H₂O Karl-Fischer (KF): máx. 0,05%), à uma temperatura de 80°C por 6h com resfriamento de 1°C por minuto até a temperatura de 30°C. Em uma segunda tentativa foi colocada a mesma quantidade de pó e solvente no reator, alterando a temperatura e o tempo, sendo para esta, a temperatura de 200°C por um tempo de 8h, com resfriamento de 1°C por minuto até a temperatura de 30°C.

Tabela 1 - Recristalizações com misturas de solventes, água (H₂O), acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), tetrahydrofurano (THF), com armazenamento em diferentes locais, estufa 40°C (E), ambiente (temperatura ambiente) (A) e dessecador (temperatura ambiente) (D).

Nome	Quantidade (mg)	H ₂ O (mL)	Tempo no ultrassom (min)	Solvente (mL)	Local de armazenamento	Dias
AL1	11,0	2	5	0	A	56
AL2	11,3	2	5	0	D	56
AL3	12,7	3	5	0	A	56
AL4	15,1	3	5	0	D	57
AL5	13,9	4	5	ACN 2	A	56
AL6	15,0	2	5	ACN 1	A	60
AL7	12,8	2	5	ACN 1	D	56
AL8	13,0	2	5	ACN 2	A	60
AL9	11,9	2	5	ACN 2	D	2
AL10	12,0	2	5	ACN 3	A	60
AL11	11,3	2	5	ACN 3	D	56
AL12	12,0	4	5	MeOH 3	A	56
AL13	12,7	2	5	MeOH 1	A	60
AL14	11,6	2	5	MeOH 1	D	56
AL15	14,9	2	5	MeOH 2	A	60
AL16	11,9	2	5	MeOH 2	D	2
AL17	10,9	2	5	MeOH 3	A	2
AL18	12,9	2	5	MeOH 3	D	56
AL19	13,4	2	5	0	E	9
AL20	11,0	2	5	ACN 1	E	9
AL21	12,1	2	5	ACN 2	E	9
AL22	10,6	2	5	ACN 3	E	9
AL23	11,5	2	5	MeOH 1	E	9
AL24	10,2	2	5	MeOH 2	E	9
AL25	10,0	2	5	MeOH 3	E	9
AL26	12,5	3	5	0	E	9
AL27	12,0	3	5	THF 3	A	60
AL28	13,4	3	5	THF 3	E	60
AL29	14,1	3	5	THF 3	D	57
AL30	12,0	3	5	THF 2	A	60
AL31	13,0	3	5	THF 2	E	60
AL32	11,8	3	5	THF 2	D	57
AL33	12,1	3	5	THF 1	A	60
AL34	10,4	3	5	THF 1	E	60
AL35	12,2	3	5	THF 1	D	60
AL36	11,6	3	5	THF 1,5	A	56
AL37	11,1	3	5	THF 1,5	E	60
AL38	14,2	3	5	THF 1,5	D	57

FONTE: DO AUTOR.

3.2 ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS E MEDICAMENTOS DE ALENDRONATO DE SÓDIO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR PÓ (DRXP)

Para identificar a estrutura de materiais policristalinos a difratometria de raios X por pó tem sido a mais utilizada dentre as técnicas de caracterização. A identificação se dá por meio de consulta ao banco de dados do CSD que é mantido pelo Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC), das diferentes fases cristalinas da amostra. Um levantamento bibliográfico foi realizado para verificar quais formas cristalinas de alendronato de sódio são reportadas. Diferentes maneiras de pesquisa foram utilizadas, tendo como principais: livros e busca de artigos científicos por meio do portal de periódicos da CAPES, Web of Science (ISI Web of Knowledge) e Science Direct e pela busca direta no CSD.

Os experimentos de DRXP foram realizados em difratômetro de raios X por pó da marca Rigaku modelo Ultima IV de geometria θ - 2θ , com detector de cintilação, e radiação monocromatizada por grafite proveniente de um tubo selado de Cu ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$). As varreduras foram realizadas entre intervalos de 3 até $35^\circ 2\theta$, à temperatura ambiente, com passo de 2θ de $0,01^\circ$, corrente de 30 mA , tensão de 40 kV , velocidade de varredura de $1^\circ 2\theta \cdot \text{min}^{-1}$.

Além dos materiais recristalizados nesse trabalho, foram também estudadas amostras comerciais de insumos e medicamentos de alendronato de sódio. Foram estudadas matérias primas de dois diferentes fornecedores, os quais serão caracterizados como matéria prima A e B. Também foram feitas análises de três diferentes medicamentos de alendronato de sódio existentes no mercado, o referência (R), o genérico (G) e o similar (S), todos com dosagem de 70 mg . Para a análise dos comprimidos um de cada origem foi pulverizado em gral de ágata e outro polido em lixa de maneira a obter uma seção plana para ser colocado no difratômetro.

3.3 ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)

A espectroscopia na região do infravermelho tornou-se parte integral das técnicas físicas de caracterização de sólidos farmacêuticos. A aplicação desta técnica permite a obtenção de

espectros, cujas bandas decorrem dos modos vibracionais das moléculas, oferecendo informações sobre a estrutura e conformação molecular do sólido (BRITTAIN, 2009).

As análises foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier da marca Shimadzu, modelo Affinity-1, acoplado a um acessório de refletância total atenuada da marca Pike Miracle. Os dados foram coletados a temperatura ambiente, na região do infravermelho entre 4000-600 cm^{-1} , sendo que as amostras não necessitam de preparo inicial.

As medidas foram feitas para as amostras de matérias primas (A e B) e também para a forma de alendronato de sódio recristalizada (anidra).

3.4 ANÁLISES TÉRMICAS (DSC, TG/DTA)

As técnicas de análise térmica, como a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e termogravimetria com análise térmica diferencial (TG/DTA), baseam-se nas transições de fase (sólido-sólido e/ou sólido-líquido) que ocorrem quando há mudança de temperatura, que distinguem diferentes polimorfos e fornecem importantes informações, como a temperatura de transição polimórfica, ponto de fusão, a dessolvatação, a cristalização, e a transição de vítrea. Além de poder determinar a estabilidade relativa entre polimorfos avaliando as transições de fases ocorridas durante a variação de temperatura.

As informações das medidas térmicas não somente serão úteis para se distinguir os polimorfos, mas podem fornecer dados que são importantes na busca de um novo polimorfo de um determinado fármaco, o que é de especial interesse para as questões de propriedade intelectual.

As análises de DSC e TG/DTA foram realizadas no laboratório de caracterização de fármacos da UNIFAL-MG, onde foram empregadas cerca de 5 a 10 mg de cada uma das formas analisadas (anidra e tri-hidrata). A análise de DSC foi realizada em cadinho hermético, com temperatura de 50 a 400°C com taxa de aquecimento de 10°C min e fluxo de nitrogênio de 50mL \cdot min⁻¹. A análise de TG/DTA foi realizada em cadinho de alumínio, com temperatura de 50 a 500°C com taxa de aquecimento 10°C \cdot min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50mL \cdot min⁻¹. Os equipamentos utilizados para a análise foram: TG/DTA (Termo-balança modelo TG/DTA7300, SII Nano Technology, Japão) e DSC (Calorímetro DSC modelo DSC7020, SII Nano Technology, Japão).

3.5 ESTUDOS DE INTERCONVERSÃO DAS FORMAS ANIDRA E HIDRATADA DE ALENDRONATO DE SÓDIO

Para verificar o tempo necessário de conversão da forma triidratada na forma anidra, alíquotas da forma triidratada foram aquecidas a 150°C em estufa a diferentes tempos de aquecimento (15, 30, 45 e 60 minutos). A conversão da forma anidra em triidratada também foi estudada, expondo a forma anidra à presença de água. Isto foi feito acrescentando-se uma pequena quantidade de água (50µL) em uma massa de pó da forma anidra (200mg) suficiente para umedecê-la sendo o material obtido imediatamente analisado por DRXP. No terceiro e último teste, as formas anidra e triidratada foram acondicionadas em câmara climática por 12h com controle de temperatura (40°C) e umidade (75% UR).

3.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ALTERNATIVO DE DOSEAMENTO DO ALENDRONATO DE SÓDIO POR FOTOMETRIA DE CHAMA

A seguir será descrito o desenvolvimento e a validação do método alternativo de doseamento do alendronato de sódio por fotometria de chama.

3.6.1 Método de quantificação do alendronato de sódio por fotometria de chama

Para o desenvolvimento de uma metodologia analítica, diversos fatores devem ser considerados, dentre os quais: detecção e separação de todos os compostos de interesse, rapidez de análise, reduzida necessidade de pré-tratamento da amostra e baixo custo (WÄTZIG, 2008). Ademais, um método deve ser confiável, ou seja, com resultados exatos e garantidos, reprodutíveis e que possa ser aplicado em qualquer laboratório, desde que este esteja apto e possua a instrumentação adequada (VOGT; KORD, 2011).

Através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade têm sido cada vez mais reconhecida e exigida à necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas. Um método analítico novo ou até mesmo um oficial que passou por alguma modificação necessita

ser validado (RATH et al., 2008), para garantir que este método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, pois decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis podem ser consequências de dados analíticos não confiáveis. (RIBANI et al., 2004).

A resolução número 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, no qual informa que o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (ANVISA, 2014).

O objetivo da validação deste método indireto de fotometria de chama para quantificação de alendronato de sódio foi a de conseguir um método rápido, simples e barato comparado aos métodos descritos em compêndios oficiais que utilizam a cromatografia líquida com coluna polar (L21 – coluna rígida, de copolímero esférico de estireno – divinilbenzeno, de 1 a 10 μm de diâmetro) e um derivatizante (9 – fluorenil – metil cloroformato) de alto custo. A derivatização é necessária, pois o fármaco não apresenta grupamentos cromóforos em sua estrutura (USP 34, 2011; HAGE, 2012).

O fotômetro de chama (Celm modelo FC-280) utilizado para o desenvolvimento da metodologia de quantificação indireta do alendronato de sódio foi calibrado para efetuar uma diluição automática de duzentas vezes (200). Portanto, as amostras analisadas nesse trabalho foram preparadas na faixa de trabalho do equipamento (mmol). Sendo assim, as repostas obtidas foram divididas por 200, por ser o fator de diluição “default” aplicado pelo equipamento.

As análises quantitativas foram realizadas da seguinte maneira:

- a) o fotômetro de chama da foi zerado com o branco (água ultrapura);
- b) uma solução padrão comercial adquirida (FC-280) com concentração de $140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de Na^+ foi utilizada para calibração do equipamento;
- c) uma solução de alendronato de sódio triidratada foi preparada em água ultrapura na concentração de $32,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou $0,100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de sódio para verificação da resposta do equipamento;
- d) o equipamento foi zerado novamente com o branco (água deionizada ultrapura);
- e) as emissões provenientes das soluções em análise (estudos de solubilidade e dissolução intrínseca discriminatória) foram lidas;
- f) Entre as medições das amostras o equipamento foi lavado com água ultrapura e, a medida do padrão de calibração, repetida.

3.6.2 Validação analítica

Os parâmetros avaliados na validação analítica foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação.

3.6.2.1 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente (ou indiretamente, através de uma transformação matemática bem definida) proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Frequentemente, a linearidade é medida pelo coeficiente de correlação linear (Pearson (r^2)) e pelo intercepto da equação produzida, quando se correlaciona a resposta em função da concentração. Os pontos se ajustam bem à linha de regressão quando obtemos um alto coeficiente de correlação, sendo aceitável, para métodos de análises farmacêuticas, um coeficiente de correlação maior que 0,999 (FDA, 2000). Já para a ANVISA, um coeficiente de correlação de 0,99 é considerado aceito (BRASIL, 2003).

Na prática, a linearidade é avaliada através do preparo de soluções do padrão de referência em diversas concentrações abrangendo a faixa de trabalho. Os guias de validação mais utilizados recomendam um mínimo de cinco concentrações, abrangendo de 80 a 120% da concentração utilizada na análise (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; UNITED, 2011).

Para a curva de calibração foram preparadas em triplicata cinco soluções de alendronato de sódio triidratado nas concentrações de: 20, 80, 200, 280 e 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, as quais são equivalentes a: 0,0615, 0,246, 0,615, 0,861 e 1,23 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de sódio respectivamente. Devido à relação molar de alendronato⁻ : Na⁺ ser de 1:1, tanto para a forma anidra como para a triidratada, pôde-se calcular indiretamente a quantidade de alendronato presente nas amostras. Essa faixa foi escolhida para abranger a faixa de 5 a 100% de liberação no ensaio de dissolução intrínseca. E uma solução de verificação (32,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) do equipamento também foi preparada (solução utilizada nas análises de solubilidade e dissolução intrínseca discriminatória), conforme Tabela 2:

Tabela 2 - Soluções de alendronato de sódio.

Concentração ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Massa de alendronato de sódio (mg)	Volume de diluição (H_2O mL)
20	2	100
80	8	100
200	20	100
280	28	100
400	40	100
32,5	16,25	500

FONTE: DO AUTOR.

3.6.2.2 Precisão

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância entre o valor que é aceito como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência e o valor encontrado. Ela reflete a dispersão dos resultados de uma série de medidas de uma mesma amostra ou solução padrão (BRASIL, 2003; ICH, 2005). É expressa por meio do desvio padrão relativo (D.P.R.) ou coeficiente de variação (C.V) entre as respostas analíticas (JIMIDAR; HEYLEN; SMET, 2007), de acordo com a equação (1):

$$\text{DPR} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1)$$

Em que: DPR = desvio padrão relativo das leituras; s = desvio padrão amostral; \bar{x} = média das leituras.

A precisão foi avaliada intra e interdias. Para tanto, uma solução com concentração conhecida ($0,615 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) de alendronato de sódio foi lida no equipamento de fotometria de chama 6 vezes no mesmo dia (intradia – $n=6$) e 6 vezes em outro dia (interdia $n=12$). O cálculo de DPR foi aplicado para as análises intra e interdias.

3.6.2.3 Exatidão

A exatidão no método analítico representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A exatidão deve ser determinada por toda a faixa do procedimento analítico (ICH, 2005) e é expresso em termos de porcentagem de recuperação, erro relativo ou desvio em relação ao valor teórico (WHITMIRE et al., 2010).

Quando um material de referência certificado ou um método referência não é disponível, um estudo de recuperação deve ser realizado. Esse procedimento é realizado pela adição de quantidade conhecida do analito (por peso ou volume) no branco (matriz). A recuperação é então calculada pela divisão da quantidade encontrada pelo método pela quantidade teórica adicionada e multiplicando-se o valor por 100 (RAVICHANDRAN et al., 2010), segundo equação 2:

$$\%E = \frac{xc}{xv} \times 100 \quad (2)$$

Em que: %E = erro relativo; xc = concentração calculada; xv = concentração verdadeira.

Para a avaliação da exatidão do método, foram realizadas leituras do branco (água ultrapura), e depois leituras de padrões com concentrações conhecidas (0,0615; 0,615; e 1,23 mmol · L⁻¹). A partir das respostas, os cálculos de DPR e também o de %E foram realizados.

3.6.2.4 Seletividade

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação, solventes e componentes da matriz (BRASIL, 2003; WATZIG, 2008). A definição especificidade é erroneamente utilizada como equivalente à seletividade, pois especificidade significa que não existe nenhum interferente que possa ocorrer. A seletividade, portanto, pode ser classificada como alta, baixa, parcial, etc. Já o termo específico se refere sempre a um método que apresenta 100% de seletividade (ARAÚJO, 2009).

Para análise de seletividade foram preparadas soluções de cloreto de lítio e cloreto de potássio em água nas mesmas concentrações da curva analítica produzida para o ensaio de linearidade (0,0615 mmol . L⁻¹ à 1,23 mmol . L⁻¹ de Li e K).

3.6.2.5 Limite de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Quando se fala em limite de detecção (LD), é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O modo mais comum de se determinar o limite de detecção é baseado na inclinação e no desvio padrão da resposta analítica ao nível de concentração zero. A inclinação pode ser estimada a partir da curva analítica obtida no estudo de linearidade (ÉPSHTEIN, 2004), de acordo com a equação 3:

$$LD = \frac{3\sigma}{S} \quad (3)$$

Em que: σ é o desvio padrão das respostas e S é a inclinação da curva analítica.

Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O limite de quantificação pode ser determinado baseado no desvio padrão das respostas e na inclinação, pela equação 4:

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (4)$$

Em que: σ é o desvio padrão das respostas e S é a inclinação da curva analítica.

O ruído do equipamento é medido através da análise de replicatas do branco. Assim, analisou-se 10 replicatas do branco para as determinações dos limites de detecção e de quantificação método analítico em desenvolvimento.

3.7 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE

Os estudos de solubilidade foram realizados pelo método do equilíbrio, empregando a técnica do shake-flask, no equipamento shaker (mesa agitadora). As amostras utilizadas para o estudo foram os materiais policristalinos das formas anidra e triidratada do alendronato de sódio.

Os estudos de solubilidade devem ser realizados na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8) em pelo menos três diferentes meios de acordo com a RDC-nº 31 de 11 de agosto de 2010 (ANVISA, 2010). Neste trabalho foram utilizados cinco meios, todos livres da presença de sódio, sendo eles: água deionizada (H₂O), ácido clorídrico 0,01M (HCl), tampão acetato pH 3,5 (T 3,5), tampão acetato pH 6,0 (T 6,0) e tampão acetato pH 7,2 (T 7,2).

Após a tamisação das amostras, estas foram adicionadas ao eppendorf de 1,5mL que continha 1mL do meio em estudo e isto foi realizado em triplicata. Ao adicionar o pó agitava em vortex até que se formasse um corpo de fundo. Feito isto, as amostras foram levadas a mesa agitadora a 150 rpm, por 48h a 25°C.

As amostras foram dosadas de forma indireta, em que o sódio presente foi dosado por um método desenvolvido e validado de fotometria de chama. Os materiais sólidos residuais (corpo de fundo) foram analisados por DRXP.

3.8 ESTUDO DE DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA DISCRIMINATÓRIA (DID)

O ensaio de dissolução intrínseca é um estudo de caracterização e por isso não consta nas monografias de formas farmacêuticas das farmacopeias. A farmacopeia americana (USP 34), por exemplo, descreve o ensaio no capítulo geral 1087.

Enquanto a solubilidade é um parâmetro estático, que se refere ao equilíbrio termodinâmico, a velocidade de dissolução é um conceito dinâmico, que representa a quantidade de fármaco dissolvida por unidade de tempo (HULSE, GRAY, FORBES, 2012).

No ensaio de dissolução intrínseca o fármaco é compactado de forma que a área exposta ao meio de dissolução permaneça constante.

A taxa de dissolução intrínseca das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio foram determinadas utilizando discos com área de superfície constante (0,5cm²). Estes discos

foram preparados por prensagem do pó, utilizando uma prensa hidráulica. Portanto, 200 mg de cada forma sólida foi pesada e comprimida em uma punção $1 \text{ KN} \cdot \text{min}^{-1}$.

Os parâmetros utilizados no estudo para a determinação da taxa de dissolução foram obtidos na monografia do fármaco na USP 34, 2011, alterando-se o meio de dissolução, pois após os estudos de solubilidade verificou-se que o meio tampão acetato pH 6,0 é discriminatório entre as formas anidra e triidratada de alendronato de sódio. Após a realização dos estudos as pastilhas das formas (anidra e triidratada de alendronato de sódio) foram analisadas por DRXP. Os estudos foram realizados em triplicata para as duas formas.

Parâmetros do estudo de DID:

- a) tampão acetato pH 6,0 como meio de dissolução (500mL);
- b) temperatura do meio teste foi de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- c) aparato discos rotativos;
- d) rotação de 50 rpm;
- e) tempos de coleta : 3, 5, 7, 15, 30, 60 minutos;
- f) volume de coleta em cada tempo, 10mL, que foram filtrados em filtros de membrana $0,45\mu\text{m}$, com reposição de meio;
- g) doseamento por fotometria de chama.

3.9 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Os equipamentos e reagentes empregados no estudo foram:

- a) Difratômetro de raios X de pó Rigaku® modelo Ultima IV (tipo II) (Rigaku Co., Ltd., Tokyo, Japan);
- b) Espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier Shimadzu®, modelo Affinity-1 (Shimadzu®, Tokyo, Japan) acoplado à um acessório de amostragem por refletância total atenuada Pike Miracle® com cristais de ZnSe Pike Technologies®, Madison, Wisconsin, USA);
- c) Mesa agitadora Solab ® modelo SL 180 DT (Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- d) Analisadores térmicos: TG/DTA (termo-balança TG/DTA7300, SII Nano Technology, Japão) e DSC (Calorímetro DSC modelDSC7020, SII Nano Technology, Japão);

- e) Sistema purificador de água Gehaka®, modelo osmose reversa 10 LTH (São Paulo, SP, Brasil);
- f) Prensa Hidráulica Shimadzu Modelo SSP-10A – Japão;
- g) Dissolutor Eletrolab Modelo TDT-08L – Índia;
- h) Balança analítica Sartorius Modelo CP-225 – Alemanha;
- i) Câmara climática Nova Ética® modelo CLD 420, disponível no Laboratório Núcleo Controle de Qualidade NCQ/UNIFAL-MG;
- j) Medidor de pH Marconi®, modelo PA 200 (Piracicaba, SP, Brasil);
- k) Aparelho de ultrassom Unique®, modelo USC 2800A (Indaiatuba, SP, Brasil).
- l) Fotômetro de chama da Celm modelo FC-280;
- m) Acetonitrila (Proquímicos), Metanol (Dinâmica), Tetrahidrofurano (Vetec), Fosfato de potássio monobásico, Trietilamina, Ácido fosfórico, Acetado de amônio, Ácido clorídrico e Ácido acético glacial;
- n) Alendronato de sódio; Gemini; Lote: AS/15/11; Fab.: 01/11/11; Val.: 31/10/16.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

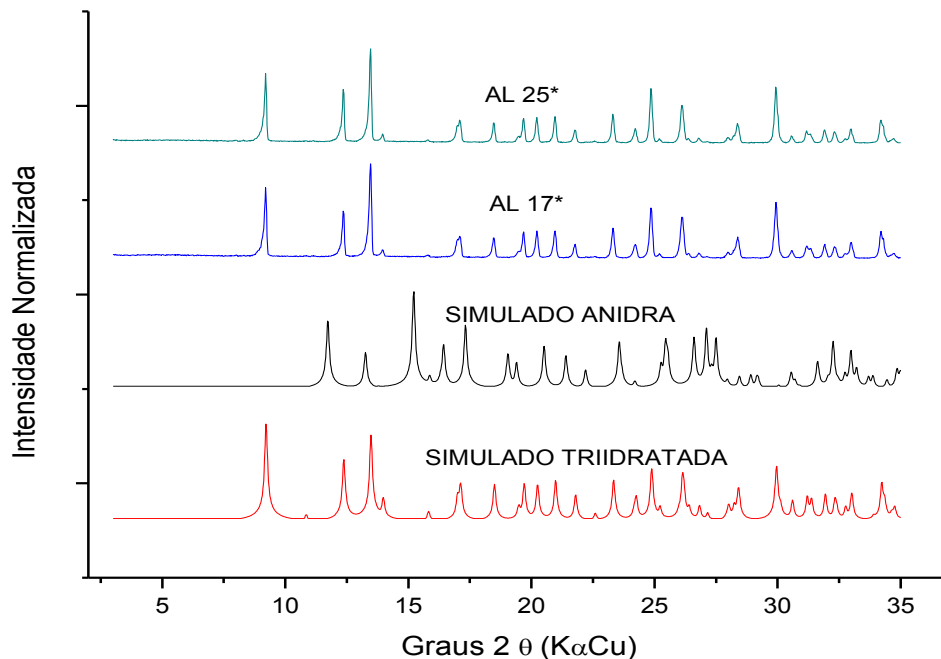
A seguir serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho.

4.1 PREPARAÇÃO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS (POLIMORFOS)

A formação de monocristais e policristais sob as condições descritas na Tabela 1 foram acompanhadas diariamente. Com dois dias de cristalização verificou-se visualmente que as amostras AL9, AL16 e AL17 já apresentaram cristais formados. Também por inspeção visual verificou-se a formação de cristais, a partir do nono dia, para as amostras AL19, AL20, AL21, AL22, AL23, AL24, AL25 e AL26. As demais recristalizações levaram tempos ainda maiores para a formação de monocristais. Por meio de uma análise mais detalhada dos cristais formados por meio de um microscópio do tipo lupa com luz polarizada verificou-se que a maioria dos cristais formados eram geminados, os quais são inadequados para um experimento de difração de raios X com o objetivo de se determinar a estrutura cristalina. As amostras dos lotes que propiciaram a formação de monocristais foram levadas para análise de DRXM no LabCri da UFMG. Contudo, a medida da cela unitária mostrou que todos se tratavam da forma triidratada de alendranato de sódio. Ou seja, nenhuma forma cristalina inédita do alendranato de sódio foi obtida a partir dos experimentos de recristalização descritos na Tabela 1. Esse resultado permite afirmar que a formação da forma triidratada de alendranato de sódio é termodinamicamente preferida nas condições hídricas e hidrotermais em que as recristalizações foram conduzidas nesse trabalho.

Dentre as condições de recristalização que propiciaram a formação de monocristais adequados para experimentos de difração, duas foram repetidas (AL17* e AL25*) utilizando uma maior quantidade de soluto no sentido de gerar material cristalino suficiente para a caracterização por DRXP. Os difratogramas experimentais dessas amostras comparados aos difratogramas teóricos calculados a partir das estruturas das formas conhecidas do alendronato de sódio, mostrou que as mesmas se tratavam da forma triidratada (Figura 5).

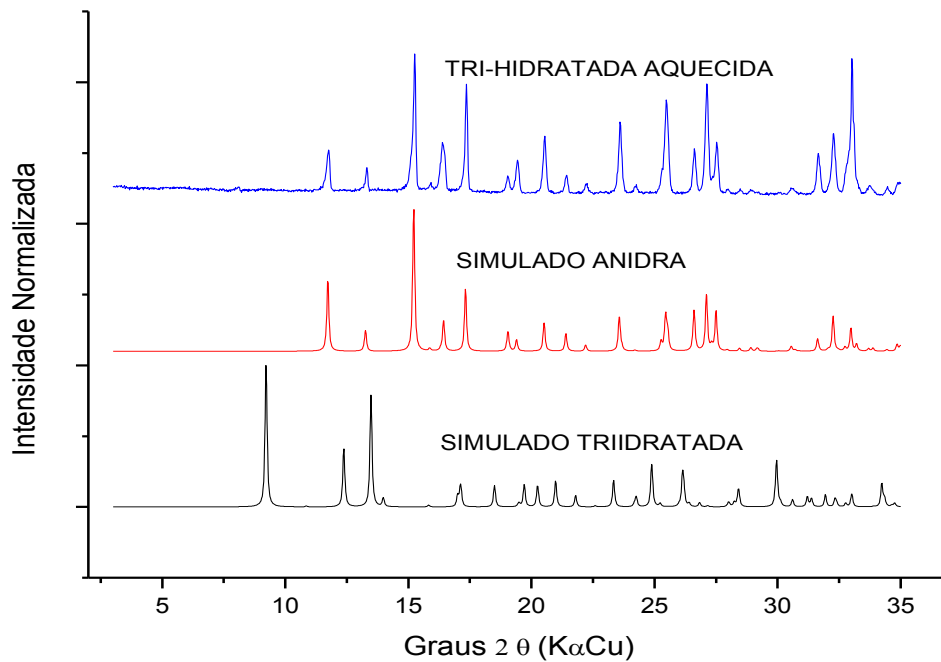
Figura 5 - Difratoogramas das amostras AL 17* e AL 25* comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

De acordo com ASNANI et al., 2009, a forma anidra pode ser obtida à partir da forma triidratada, através de sua exposição a uma temperatura de 150°C por uma hora. Este processo foi realizado e a forma anidra foi confirmada através da comparação do DRXP simulado da forma anidra com o DRXP do experimento (Figura 6). Com a obtenção da forma anidra policristalina deu-se sequência na busca por monocristais da mesma para que pudesse ser realizada sua caracterização estrutural por DRXM uma vez que a estrutura reportada na literatura foi resolvida por DRXP. Primeiramente foi verificada sua solubilidade frente a diferentes solventes anidros. Notou-se que sua solubilização era extremamente baixa em vários solventes orgânicos (benzonitrila, metanol, acetonitrila, dicloroetano e n-hexano). Diante dessa dificuldade foram realizadas duas tentativas de recristalização solvo-térmica. Na primeira tentativa utilizando o metanol como solvente, notou-se que após o processo não houve solubilização do soluto e, portanto, inviabilizou a sua recristalização no sentido de se obter monocristais. Na segunda tentativa, onde foi mantido o solvente, tendo sido aumentado a temperatura e o tempo de reação, obteve-se o mesmo resultado insatisfatório.

Figura 6 - Difratoograma da forma triidratada aquecida a 150°C por 1h, comparada com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.

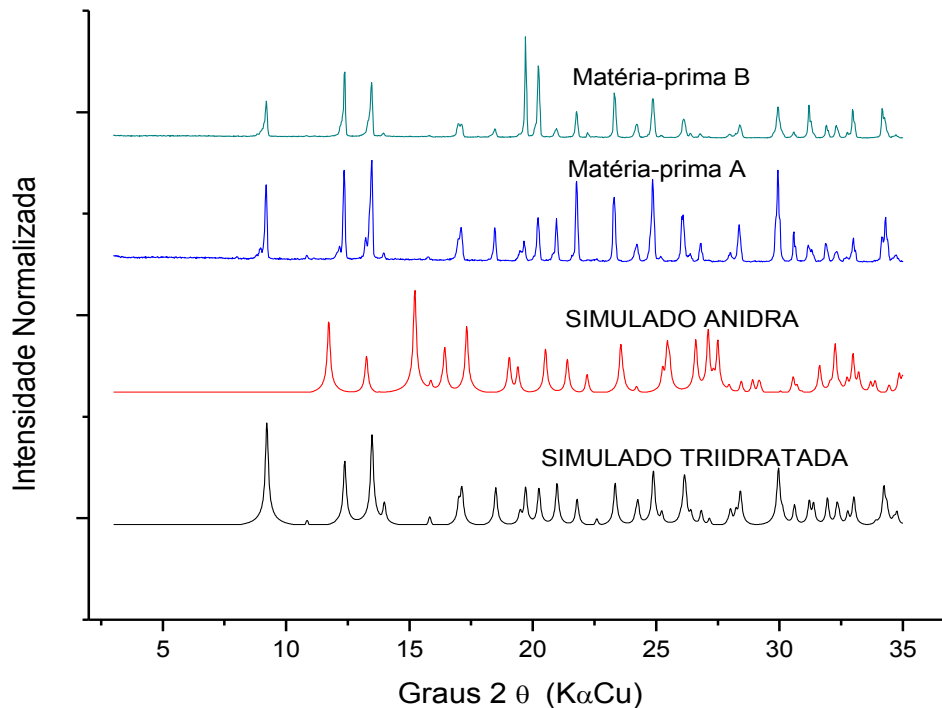


FONTE: DO AUTOR.

4.2 ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS E MEDICAMENTOS DE ALENDRONATO DE SÓLIDO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR PÓ (DRXP)

Os difratogramas de raios X por pó experimental das duas matérias-primas de alendronato de sódio estudado nesse trabalho são mostrados na Figura 7. Os resultados mostram que tanto a forma comercial obtida no NCQ-UNIFAL (matéria prima A) quanto a amostra obtida junto a uma farmácia de manipulação (matéria prima B) possui um difratograma de raios X experimental coincidente com o simulado a partir da estrutura do alendronato de sódio tri-hidratado.

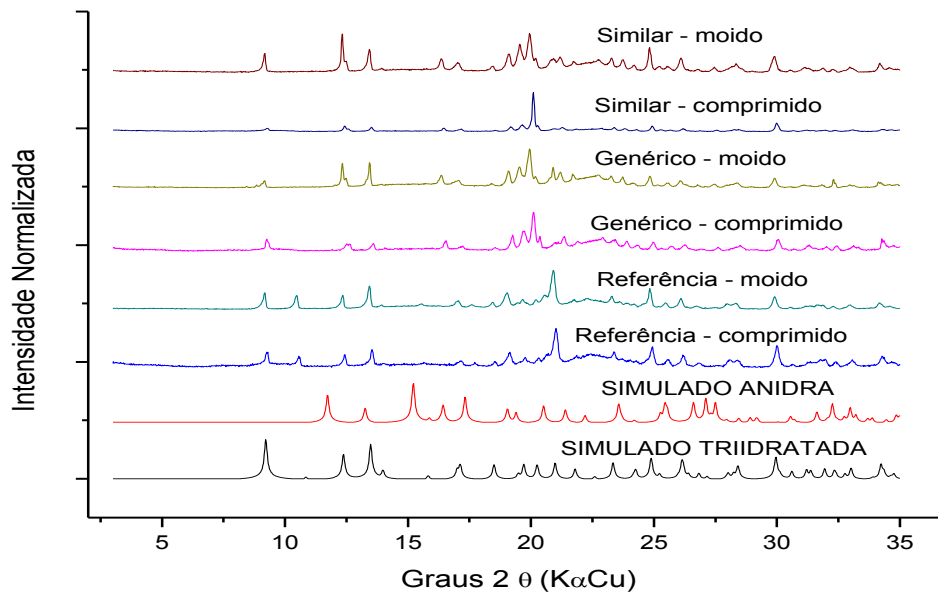
Figura 7 - Difratoogramas das matérias-primas A e B comparados com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

Os padrões experimentais de DRXP dos medicamentos estudados nesse trabalho (amostras R, G e S), representados na Figura 8, foram conduzidos de duas formas. Em uma das análises o difratograma de raios X foi obtido a partir de uma seção plana de cada comprimido montado diretamente no goniômetro do difratômetro. Na segunda condição de medida, o comprimido foi triturado antes de a análise ser efetivada. Os difratogramas mostram que a fase triidratada do alendronato de sódio é o constituinte dos medicamentos R, G e S. Destaca-se o fato de a fase cristalina do insumo ser facilmente identificável mesmo na presença dos excipientes no caso dos medicamentos. E finalmente, que a identificação do insumo pode ser feita diretamente no comprimido não sendo necessária sequer sua trituração. O estudo por DRXP mostra ainda que não há evidências da presença da forma anidra do alendronato nas amostras estudadas.

Figura 8 - Difratoogramas dos medicamentos referência (R), genérico (G) e similar (S) (comprimido e moído) comparados com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.



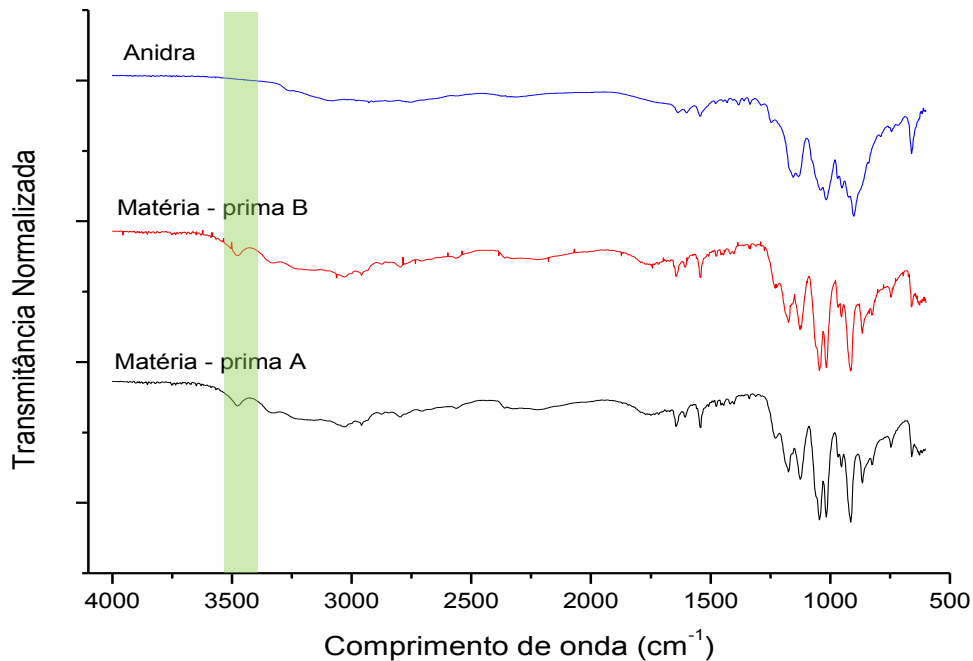
FONTE: DO AUTOR.

4.3 ANÁLISES DE MATÉRIAS-PRIMAS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)

Os espectros das matérias primas (A e B) mostraram bandas características do alendronato de sódio (Figura 9). Entre 1200 e 900 cm^{-1} estão presentes bandas fortes características de ligações C – O e P = O. Entre 1470 e 1430 cm^{-1} apareceram deformações angulares características de CH_2 . Bandas médias, correspondentes à deformação angular simétrica no plano de NH_2 ocorrem entre 1590 e 1550 cm^{-1} . E bandas características de H_2O apareceram em torno de 3500 cm^{-1} , demonstrando que ambas as matérias primas tratam-se da forma a triidratada, a qual é a comercialmente preconizada.

Comparando os espectros no IV da forma anidra com a triidratada, puderam-se verificar os estiramentos característicos do alendronato de sódio, porém quando se observa a forma anidra nota-se a atenuação da banda característica de H_2O em torno de 3500 cm^{-1} , comprovando assim diferenças entre os espectros de absorção no IV entre as formas em estudo (Figura 9).

Figura 9 - Espectros da absorção na região do infravermelho das matérias-primas A e B e da forma anidra de alendronato de sódio com destaque para o estiramento característico da molécula de água.

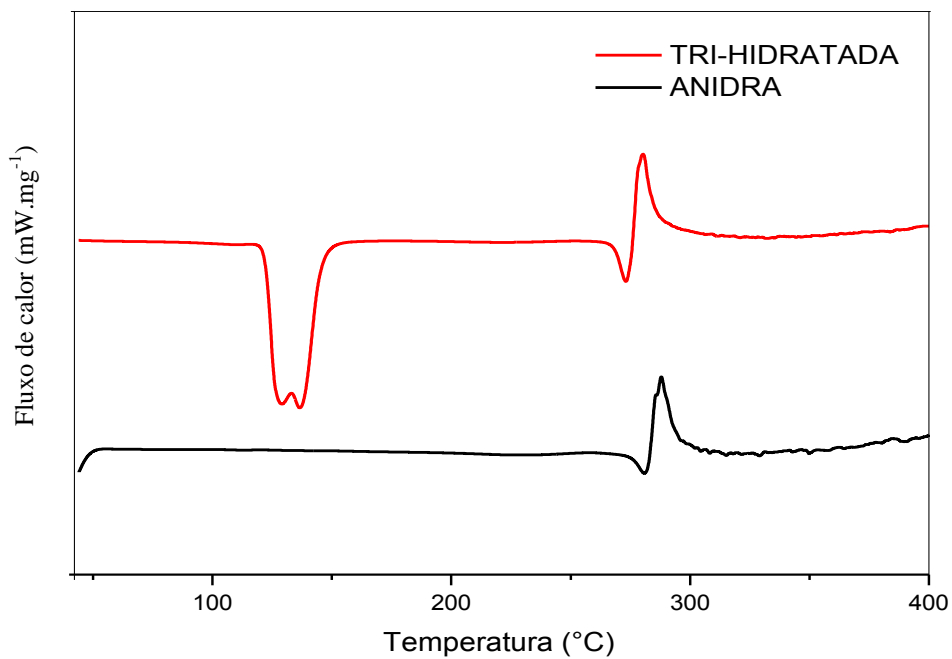


FONTE: DO AUTOR.

4.4 ANÁLISES TÉRMICAS (DSC, TG/DTA) DAS FORMAS ANIDRA (RECRISTALIZADA) E TRIIDRATADA (MATÉRIA-PRIMA) DE ALENDRONATO DE SÓDIO

A curva DSC da forma triidratada mostra que houve dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro (em torno de 130 a 140°C) referente à perda da água presente na molécula. Os resultados diferem ligeiramente dos resultados obtidos por ASNANI et al. (2009) que relatam a presença de um único sinal endotérmico fino a ~126 °C. A presença de duplo pico pode ser decorrente a saída inicial das duas águas de cristalização e posteriormente a saída da água coordenada ao Na⁺ seguido da transformação de um polímero de coordenação 1-D para 2-D (discutido na seção 4.4), observado cristalograficamente para as formas triidratada e anidra, respectivamente. Como esperado o evento endotérmico atribuído à transição da forma triidratada para a anidra não foi observado na curva DSC da forma anidra. Um segundo evento ocorre a entre 260 a 270°C para ambas as amostras, o qual se refere à fusão/decomposição do alendronato de sódio (Figura 10).

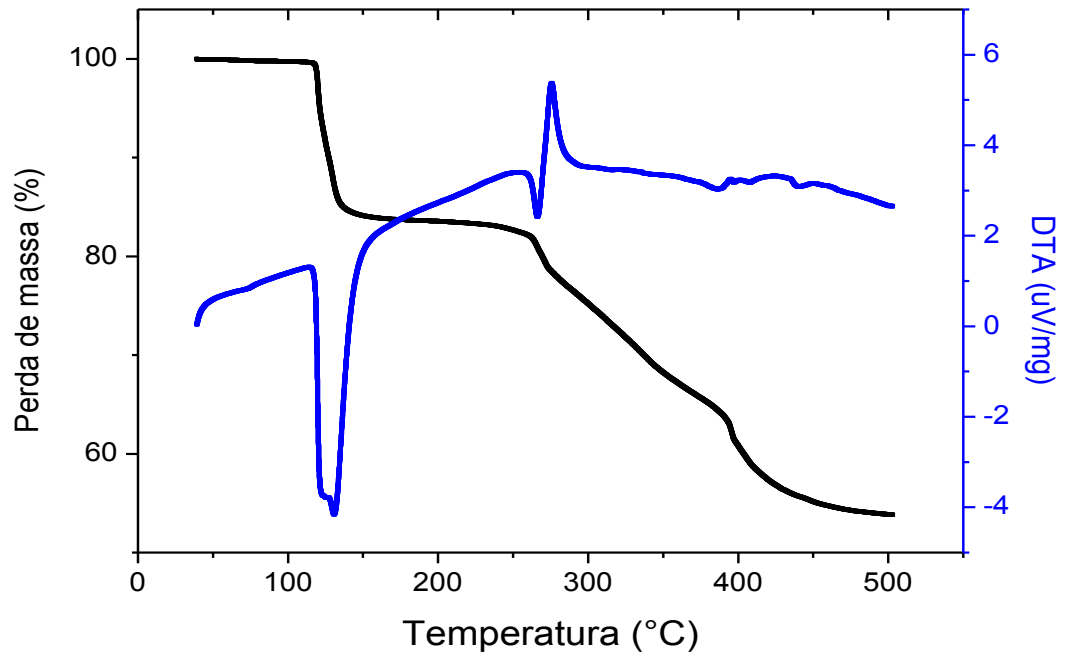
Figura 10 - Curva de DSC das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

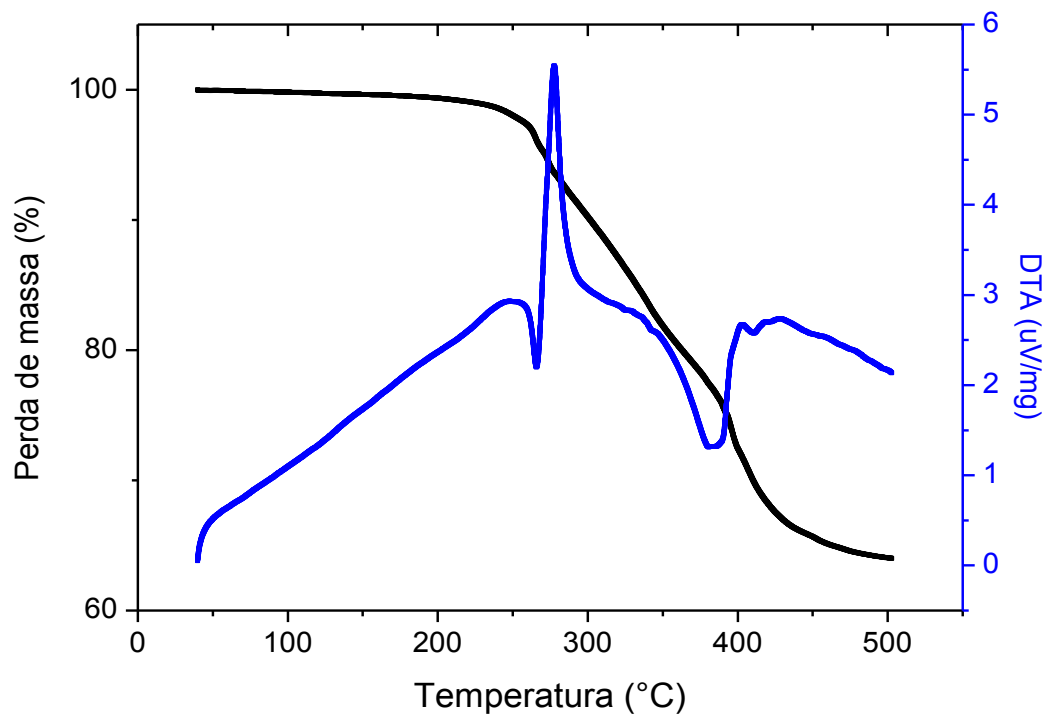
Nas curvas TG/DTA pôde-se verificar que a perda de água da forma triidratada ocorre entre 130 e 140°C (Figura 11) temperaturas concordantes com a curva DSC (Figura 10). A perda de massa foi de 16,5% a qual concorda com o valor calculado (53,74g) com a saída de 3 moléculas de água. Esse resultado está de acordo com o obtido por ASNANI et al. (2009) que encontrou um valor de 16,6%. A curva DTG também mostra que as águas presentes na estrutura saem em temperaturas próximas. Como esperado, nenhuma perda de massa é observada nesse intervalo de temperatura para a amostra anidra (Figura 12). A fusão/decomposição de ambas as amostras começa a partir de 260°C. A semelhança das curvas após a perda da água confirma a transformação da forma triidratada na forma anidra entre 130 e 140°C

Figura 11 – Curvas de TG/DTA da forma triidratada de alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

Figura 12 - Curvas de TG/DTA da forma anidra de alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

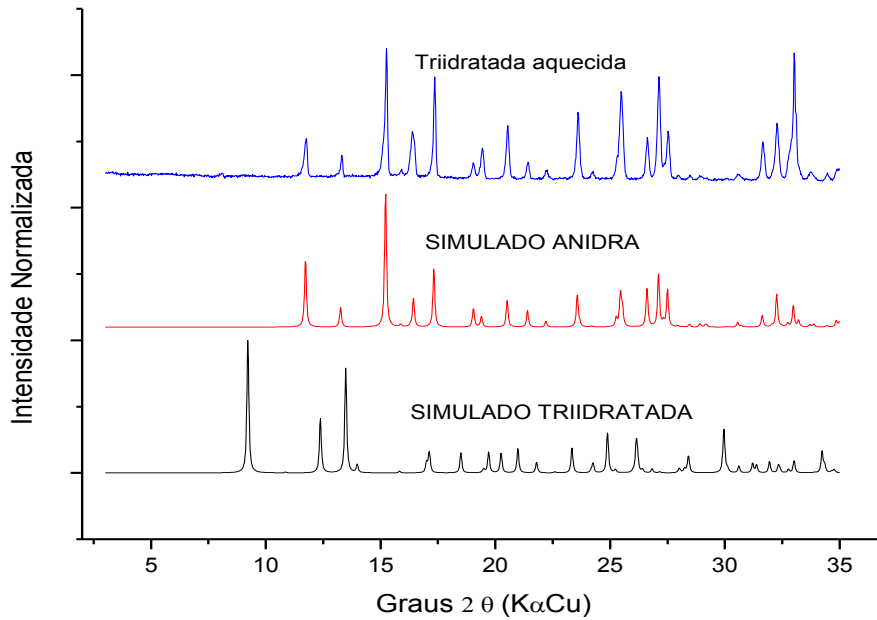
Pode-se concluir que é possível caracterizar e diferenciar as formas anidra e triidratada do alendronato de sódio por meio das curvas TG/DTA e DSC e também afirmar que há uma conversão de fases entre as formas em estudo.

4.5 ANÁLISES DOS ESTUDOS DE INTERCONVERSÃO DAS FORMAS SÓLIDAS DE ALENDRONATO DE SÓDIO.

O padrão experimental de DRXP gerado após o aquecimento da forma triidratada a 150°C por 1h foi comparado com os simulados das formas: anidra e triidratada, o que demonstrou a completa conversão da forma triidratada em anidra (Figura 13).

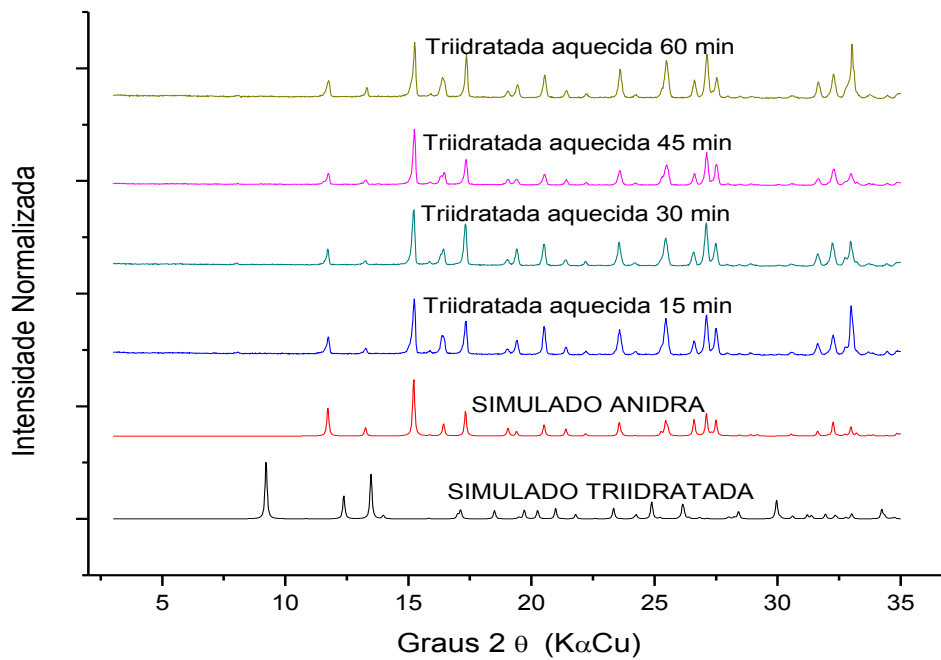
Em outro experimento foi avaliado o tempo de conversão da forma triidratada na forma anidra (Figura 14). Os difratogramas coletados após o aquecimento da forma triidratada a 150°C por 15, 30, 45 e 60 minutos mostram que ocorre a completa conversão da forma hidratada para a forma anidra em todos os tempos de aquecimento. Ou seja, a conversão já ocorre com 15 minutos de aquecimento, demonstrando neste estudo que a conversão ocorreu em um tempo menor do que o relatado (aquecimento a 150°C por 1h) na literatura (ASNANI et al, 2009).

Figura 13 - Difratoograma demonstrando a completa conversão da forma triidratada em forma anidra de alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

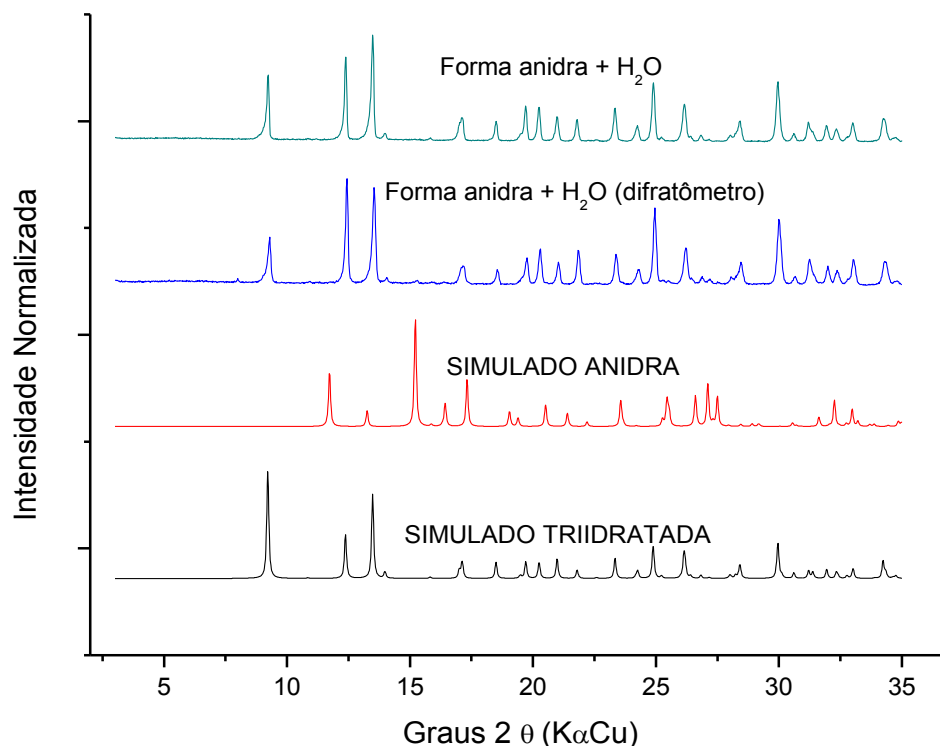
Figura 14 - Difratoogramas da forma triidratada aquecida a 150°C por 15, 30, 45 e 60 minutos comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

Visando estudar a reversibilidade da desidratação e/ou transformação de fase cristalográfica, realizou-se um experimento para verificar a conversão da forma anidra em triidratada. Observou-se que o contato direto com a água faz com que a forma anidra se converta instantaneamente em triidratada, o que pode ser comprovado pela análise de DRXP do sólido em equilíbrio com a solução (Figura 15).

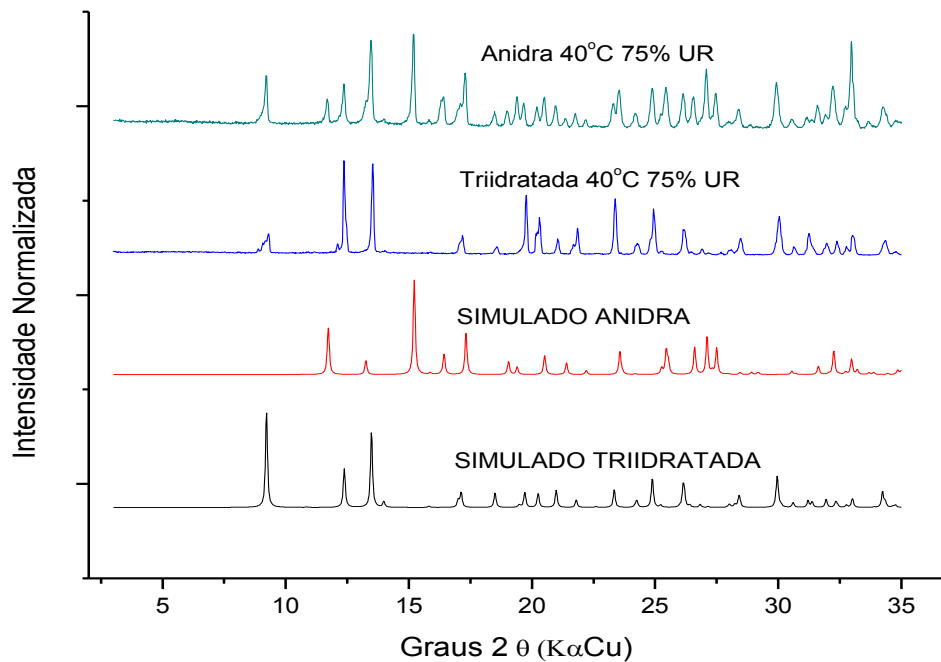
Figura 15 - Difrátogramas da forma anidra com adição de H₂O 50μL (vidro de relógio) e diretamente no porta amostra do difratômetro comparadas com os simulados das formas: anidra e triidratada de alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

O experimento em que as amostras das duas formas cristalinas (anidra e triidratada) do alendronato de sódio foram acondicionadas em uma câmara climática com temperatura de 40°C e 75%UR por 12h buscou verificar os seus comportamentos frente a temperaturas e umidades elevadas. O difratograma experimental da forma triidratada após o tratamento manteve, como esperado, os picos correspondentes ao simulado da forma triidratada (2θ 9,20; 2θ 12,38; 2θ 13,44) (Figura 16). O padrão experimental de DRXP da forma anidra após a incubação demonstrou que a exposição a uma umidade mais elevada já é suficiente para que haja sua conversão parcial na forma triidratada (anidra: (2θ 11,68; 2θ 13,22; 2θ 15,20) e triidratada: (2θ 9,20; 2θ 12,38; 2θ 13,44)) (Figura 16).

Figura 16 - Difratogramas experimentais das formas anidra e triidratada após incubação a 40°C, 75% UR por 12h, comparados com seus respectivos difratogramas simulados.



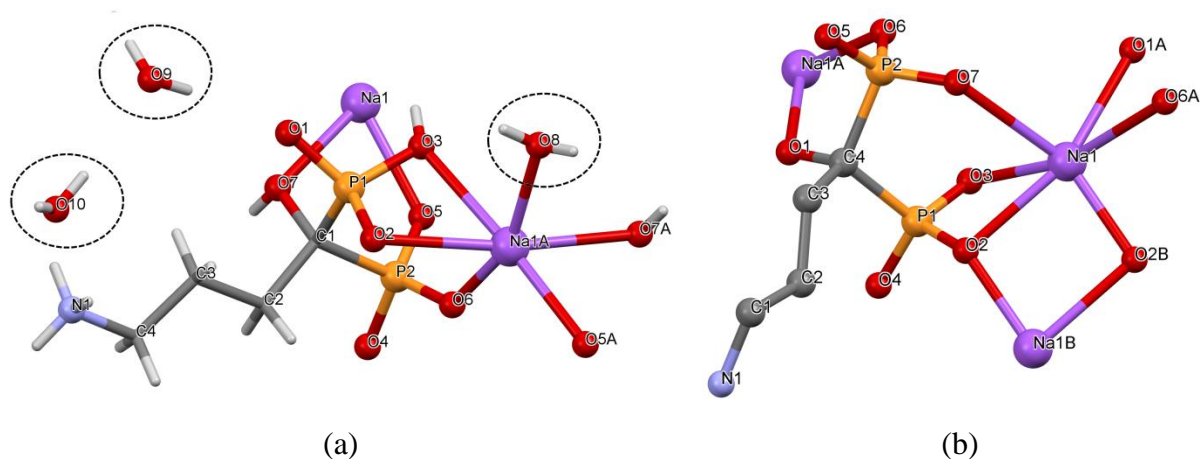
FONTE: DO AUTOR.

4.6 PROPOSTA MECANÍSTICA DE TRANSIÇÃO DE FASE CRISTALINA ENTRE AS FORMAS ANIDRA E TRIIDRATADA DO ALENDRONATO DE SÓDIO

As estruturas cristalográficas da forma anidra (VEGA et al., 1996) e da forma triidratada (ASNANI et al., 2009) do alendronato de sódio foram determinadas por grupos de pesquisa independentes e com um intervalo de tempo de mais de uma década. Inicialmente foi determinada a estrutura da forma triidratada, a comercialmente preconizada, utilizando-se de técnicas de difração de raios X por monocristal (VEGA et al., 1996). Treze anos mais tarde, ASNANI et al. (2009) mostrou, utilizando de DRXP, DSC-TG/DTA e microscopia “*hot-stage*” que a forma triidratada perde suas três moléculas de água a ~130 °C (confirmado nesse trabalho de dissertação), fenômeno acompanhado de uma transição de fase cristalográfica para uma forma anidra. No mesmo estudo, esses autores determinaram a estrutura da forma anidra a partir de dados de DRXP obtidos em Laboratório Síncrotron. Para tanto, utilizaram da técnica de otimização de espaço direto para a resolução da estrutura, seguido de refinamento pelo método de Rietveld. Na Tabela 3 são comparados os parâmetros de cela das

duas fases. A Figura 17 compara as unidades assimétricas das duas formas cristalinas do alendronato de sódio. Observa-se que, das três moléculas de água da forma triidratada, duas são de cristalização e uma de coordenação (ligada ao Na^+). Destaca-se também, que nas duas fases, o Na^+ possui coordenação octaédrica distorcida. Para a forma triidratada, a coordenação é estabelecida por um oxigênio hidroxílico, quatro oxigênios fosfóricos e um oxigênio de água. Para a forma anidra a coordenação é estabelecida por um oxigênio hidroxílico e cinco oxigênios fosfóricos.

Figura 17 - Representação Mercury das unidades assimétricas da forma (a) triidratada e da (b) forma anidra do Alendronato de Sódio. As representações foram geradas a partir dos CIF (TEHWOS e UTOKAQ) depositados para as duas estruturas no CSD. Para a forma triidratada as águas de cristalização e coordenação são destacadas.



FONTE: DO AUTOR.

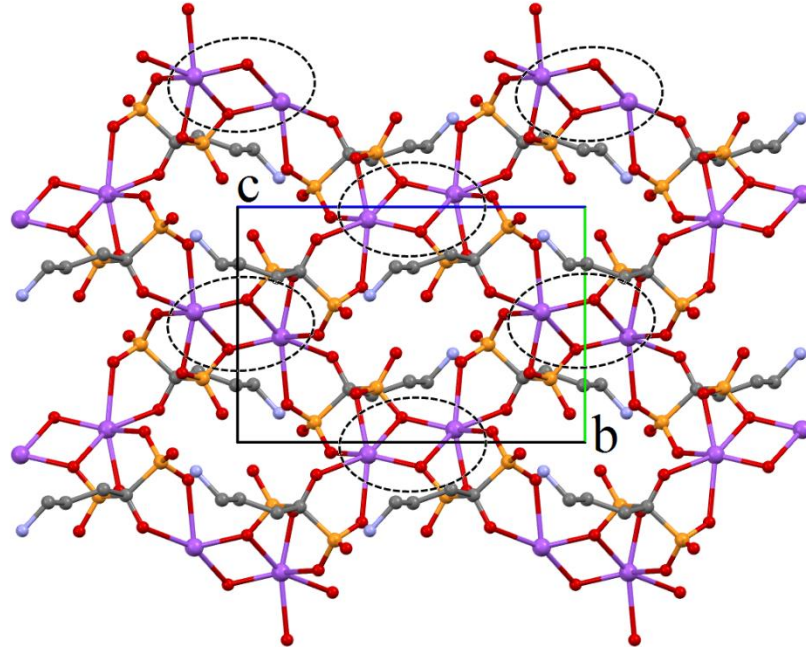
Tabela 3 - Comparação dos parâmetros de Celas das formas anidra e triidratada do Alendronato de Sódio.

	Forma anidra (ASNANI et al., 2009)	Forma triidratada (VEGA et al., 1996)
Grupo Espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n
Parâmetro de Rede	$a = 7,6298(6) \text{ \AA}$	$a = 7,275(1) \text{ \AA}$
	$b = 9,1458(7) \text{ \AA}$	$b = 9,002(2) \text{ \AA}$
	$c = 14,457(1) \text{ \AA}$	$c = 19,503(4) \text{ \AA}$
	$\beta = 112,6(1)^\circ$	$\beta = 100,61(1)^\circ$
Volume	$931,4(2) \text{ \AA}^3$	$1255,4(4) \text{ \AA}^3$
Densidade	$1,933 \text{ mg cm}^{-3}$	$1,720 \text{ mg cm}^{-3}$
Z	4	4

FONTE: DO AUTOR.

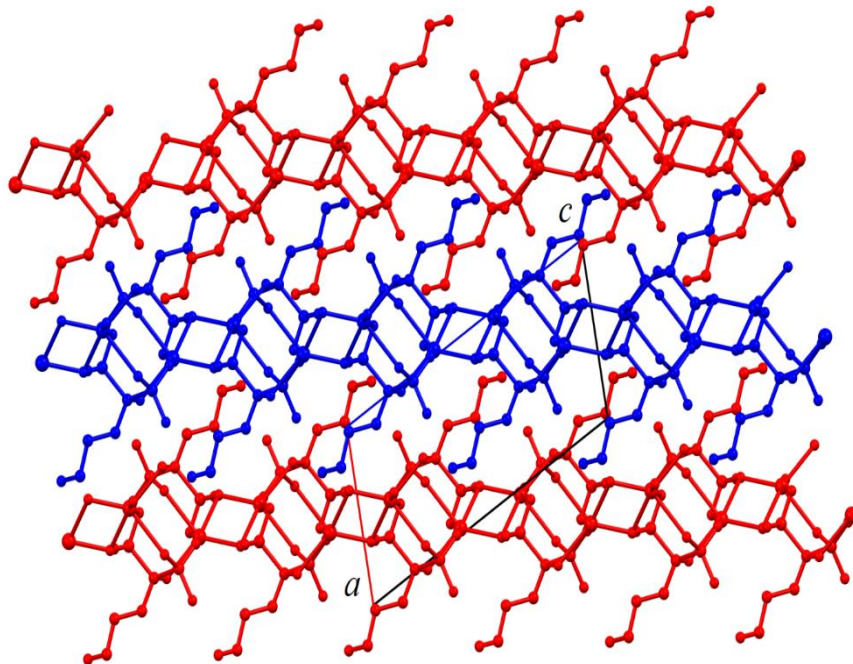
Apesar de apresentarem o mesmo grupo espacial e parâmetros de cela semelhantes, principalmente os dos eixos cristalográficos a e b , as estruturas das duas formas apresentam diferenças significativas. A estrutura cristalina da forma anidra é construída por octaedros de NaO_6 compartilhando arestas ou ligados em ponte pelo ânion alendronato, gerando um polímero de coordenação 2D (Figura 18) com camadas paralelas ao plano cristalográfico (-101) (Figura 19). Já a forma triidratada tem o empacotamento estabilizado pela formação um polímero de coordenação 1D do tipo cadeia em zig-zag ao longo da direção [010], com os aníons alendronato “em ponte” para octaedros de NaO_6 adjacentes (Figura 20). Na Figura 21 é mostrado que cadeias paralelas que crescem ao longo do eixo b estão interconectadas ao longo das direções [100] e [101]. Os contatos inter-cadeias são estabilizadas por interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio envolvendo, principalmente, as moléculas de água. A Figura 21 mostra também que as águas de cristalização ocupam túneis ocorrentes ao longo do eixo b . Maiores detalhes acerca da comparação das estruturas das duas formas aqui abordadas podem ser encontrados em ASNANI et al. (2009). Entretanto, destaca-se que esses autores descreveram de forma equivocada que a cadeia 1D é formada por compartilhamento de vértices octaedros de NaO_6 adjacentes.

Figura 18 - Representação do Mercury do polímero de coordenação 2D formado para a forma anidra do alendronato de sódio visto normal ao eixo cristalográfico a (plano (100)). (Esquema de cores: Sódio = lilás, oxigênio = vermelho, carbono = cinza, fosforo = laranja, Nitrogênio = azul). Hidrogênios não mostrados para melhor clareza das representações. Os octaedros compartilhando arestas são destacados por círculos pontilhados.



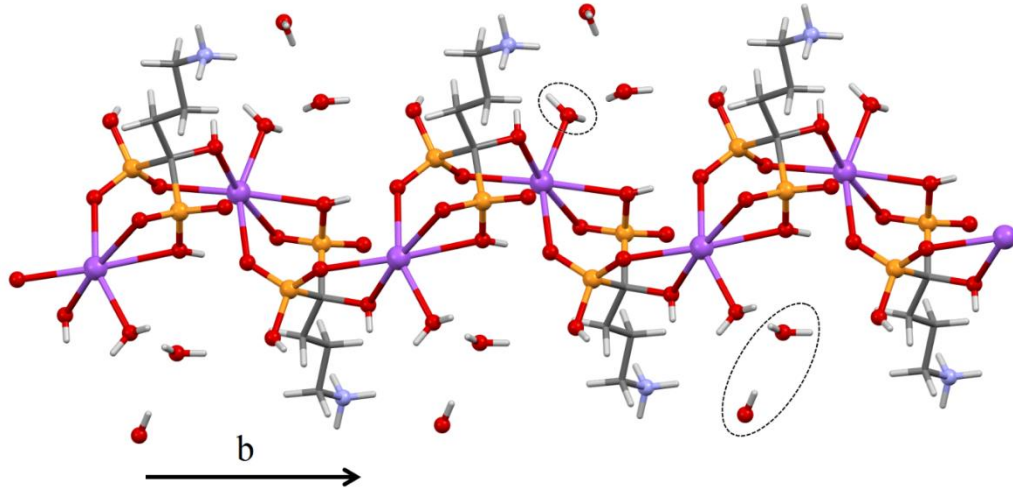
FONTE: DO AUTOR.

Figura 19 - Representação do Mercury de três camadas do polímero de coordenação 2D formado para a forma anidra do alendronato de sódio visto normal ao eixo cristalográfico b (plano (010)). A representação ilustra que as camadas, alternadas em vermelho e azul para melhor ilustração, são paralelas ao plano (-101).



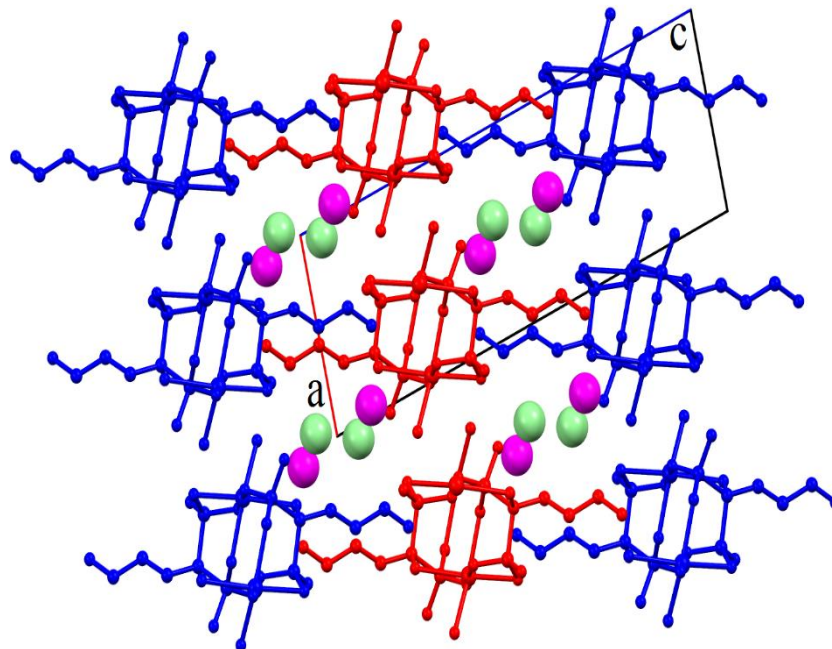
FONTE: DO AUTOR.

Figura 20 - Representação Mercury mostrando o polímero de coordenação 1D formado no empacotamento cristalino da forma triidratada do Alendronato de Sódio. As águas presentes na estrutura são destacadas. (Esquema de cores: Sódio = lilás, oxigênio = vermelho, carbono = cinza, fosforo = laranja, Nitrogênio = azul).



FONTE: DO AUTOR.

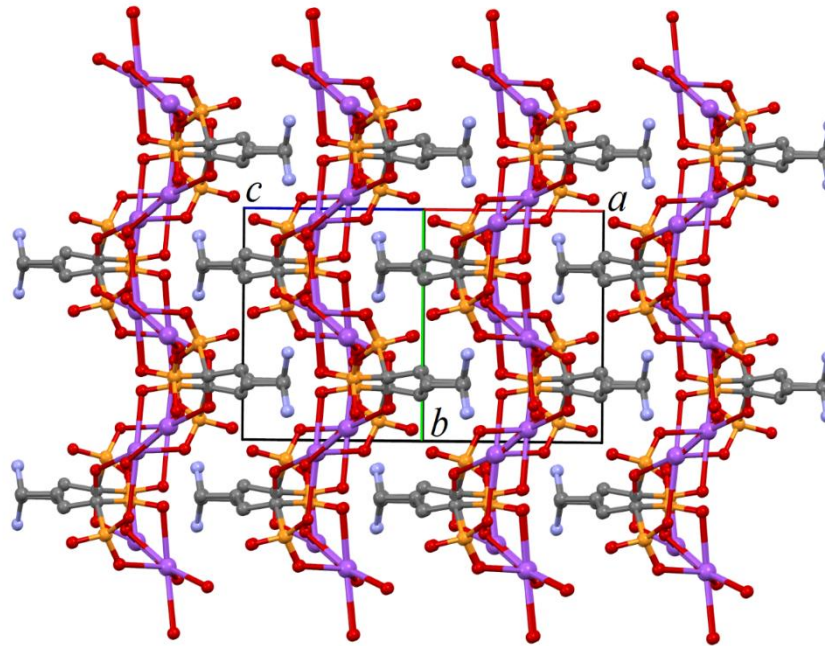
Figura 21 - Representação Mercury do empacotamento cristalino mostrado normal ao plano cristalográfico (101) mostrando a disposição inter-cadeias (vermelho e azul) e a localização das moléculas de água (verde e rosa).



FONTE: DO AUTOR.

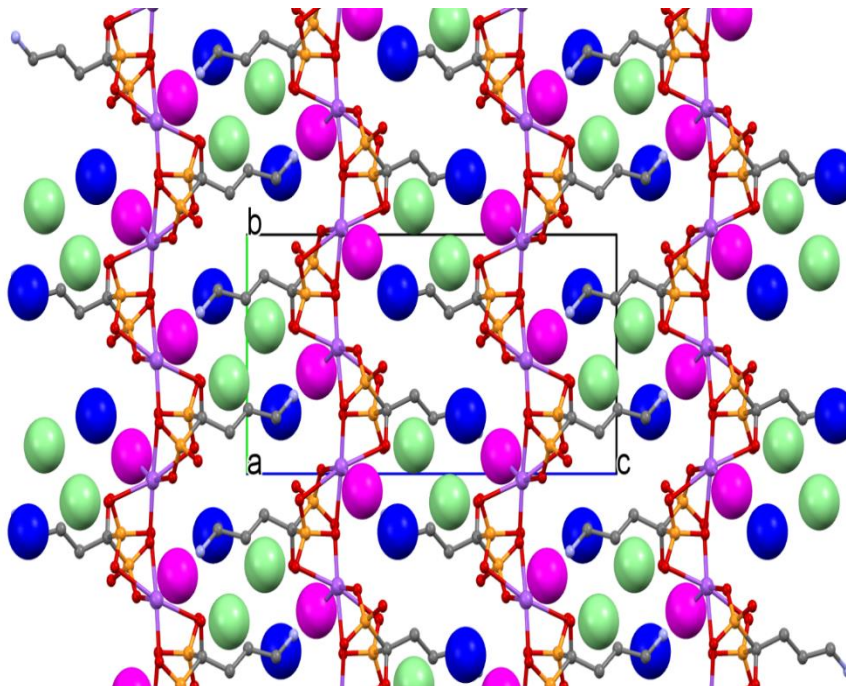
Destaca-se que uma proposta mecanística de transição de fase cristalográfica da forma triidratada para anidra ou vice-versa não foi abordado por ASNANI et al. (2009) e, até onde se tem conhecimento, em nenhum trabalho subsequente até o presente momento. Portanto, será apresentada a seguir uma proposta de mecanismo para a transição de fase cristalina anidra/triidratada do alendronato de sódio. Analisando o empacotamento visto ao longo do plano (101) para a forma anidra e ao longo do plano (100) para a forma triidratada mostrados, respectivamente, nas Figuras 22 e 23 é possível destacar algumas semelhanças estruturais. As estruturas têm em comum, ao longo dos seus respectivos eixos *b*, uma disposição do tipo zig-zag dos grupos fosfatos e das cadeias orgânicas alifáticas; bem como um alinhamento dos cátions Na^+ (linear para a triidratada e ondulada para a anidra). Considerando que ao longo da direção [110] para a fase anidra (direção normal ao plano mostrado na Figura 22), as cadeias estão ligadas covalentemente, formando o polímero 2D (Figuras 18 e 19); e que ao longo da direção [100] para a fase triidratada (direção normal ao plano mostrado na Figura 23) as cadeias não estão ligadas covalentemente (Figura 23), pode-se concluir: A transformação da forma triidratada para a forma anidra ocorre com a saída das moléculas de água entre as cadeias mostradas na Figura 23, concomitante à fusão (ligações coordenadas) das cadeias paralelas ao longo de seu eixo cristalográfico *a* (ou direção [100]). A Figura 24 mostra esquematicamente o processo de saída das águas e a direção (duplas setas cheias em preto) onde ocorrem as fusões de cadeias paralelas. Além disso, ocorre uma mudança da posição relativa dos cátions Na^+ na rede cristalina (Figura 25). Observa-se que, para a forma triidratada, há um empilhamento ao longo do eixo *a* das cadeias zig-zag formando um arranjo do tipo “escama de peixe” onde as mesmas encontram-se alinhadas ao longo do eixo *a*. Com a saída das águas através dos poros paralelos à direção [010], a qual é facilitada pela adoção de uma estrutura de camadas (Figuras 21 e 25) o arranjo das cadeias zig-zag da forma triidratada é perturbado, havendo o deslocamento da cadeia central (para a direita do eixo *b*, Figura 25), o que faz com que cátions de Na^+ inter-cadeias mais próximos ficassem próximos o suficiente para compartilhar oxigênios de seus octaedros (arestas – vide Figura 18) ligando-se covalentemente e assim formando o polímero 2D observado para a forma anidra. Um processo inverso ocorre quando a forma anidra é exposta à água. Ou seja, a água penetra entre as camadas hidrofílicas do polímero de coordenação 2D da fase anidra, rompendo as ligações dos octaedros que compartilham arestas (destacados por círculos pontilhados na Figura 18), restaurando o polímero de coordenação 1D característico da forma triidratada.

Figura 22 - Representação do Mercury do polímero de coordenação 2D formado para a forma anidra do Alendronato de Sódio visto normal ao plano (101). (Esquema de cores: Sódio = lilás, oxigênio = vermelho, carbono = cinza, fosforo = laranja, Nitrogênio = azul).



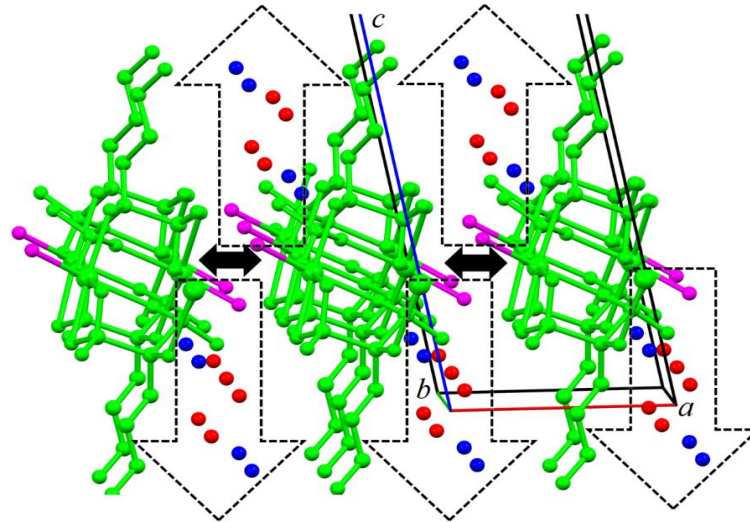
FONTE: DO AUTOR.

Figura 23 - Representação do Mercury do polímero de coordenação 2D formado para a forma triidratada do Alendronato de Sódio visto normal ao plano (100). (Esquema de cores: Sódio = lilás, oxigênio = vermelho, carbono = cinza, fosforo = laranja, Nitrogênio = azul). As moléculas de água de cristalização são mostradas em azul e verde. A molécula de água coordenada ao Na^+ é mostrada em rosa.



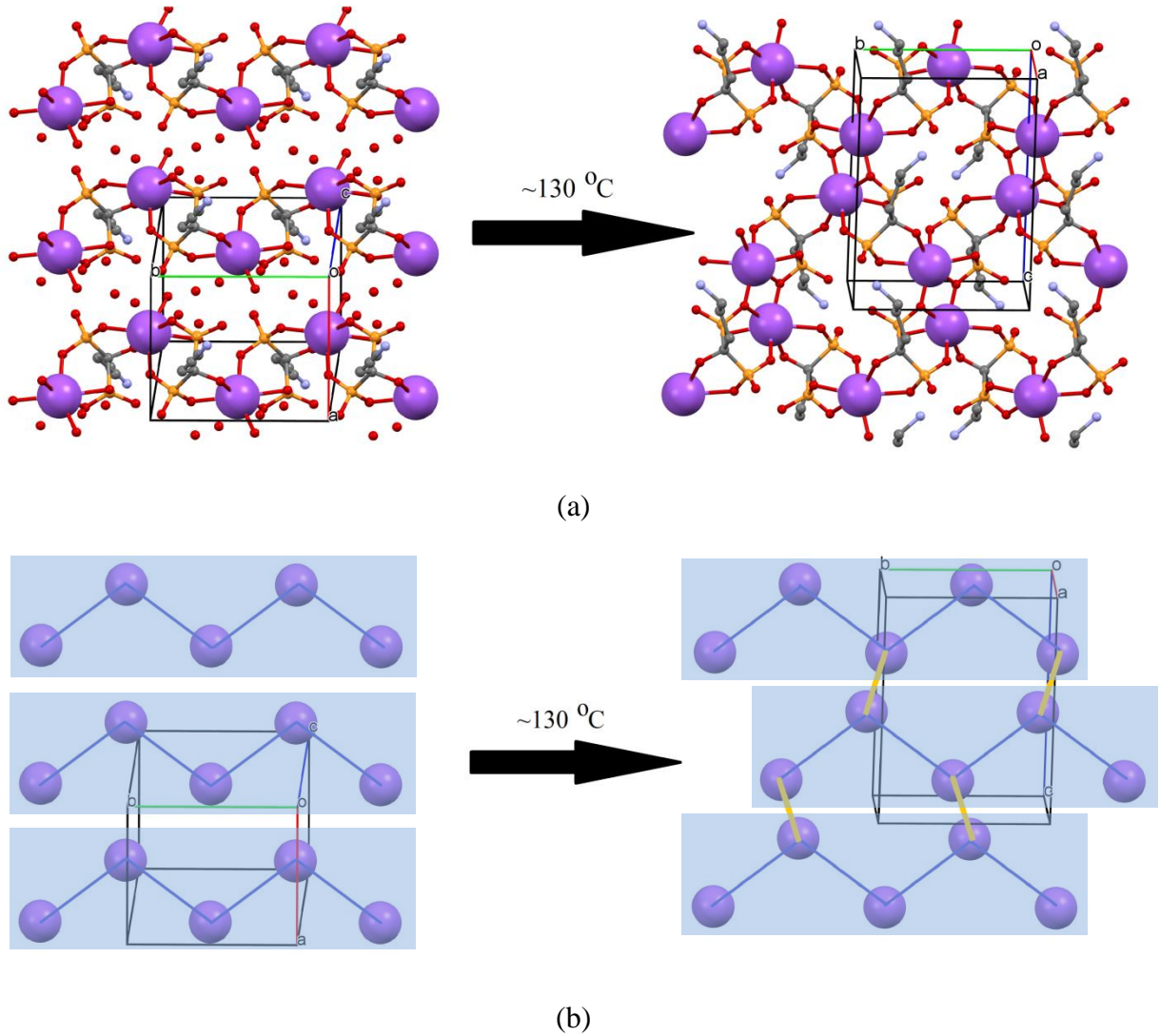
FONTE: DO AUTOR.

Figura 24 - Representação do Mercury do empacotamento parcial da forma triidratada do Alendronato de Sódio visto normal ao plano (010). (Esquema de cores: alendronato e Na^+ = verde, oxigênio das águas de cristalização = vermelho e azul, oxigênio da água de coordenação = magenta). A dupla seta em preto mostra a direção em que as cadeias paralelas da forma anidra (direção cristalográfica a da fase triidratada) se fundem para forma o polímero de coordenação 2D da forma anidra. As grandes setas pontilhadas mostram esquematicamente a saída das águas.



FONTE: DO AUTOR.

Figura 25 - Representação do Mercury da supraestrutura contendo os cátions Na^+ (lilás). Em (a) os demais átomos da estrutura estão presentes. Em (b) são mantidos apenas os cátions Na^+ sendo a parte orgânica representada por segmentos de reta. As retas em azul representam as pontes de fosfato que ligam as cadeias em comum as duas fases que ocorre ao longo do eixo b. As setas em laranja representam os oxigênios dos octaedros que compartilham suas arestas, o qual ocorre apenas para a fase anidra.



FONTE: DO AUTOR.

4.7 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DO ALENDRONATO DE SÓDIO POR FOTOMETRIA DE CHAMA

A seguir serão apresentados os resultados do desenvolvimento e validação do método de doseamento do alendronato de sódio de forma indireta por fotometria de chama.

4.7.1 Método de quantificação do alendronato de sódio

O método complementar de quantificação de alendronato de sódio de forma indireta por fotometria de chama se mostrou adequado, rápido, sem a necessidade de derivatização da amostra e de baixo custo para as finalidades pretendidas: o estudo de solubilidade e a dissolução intrínseca das formas anidra e triidratada do alendronato de sódio. Porém deve se ter o cuidado com sua utilização devido ao doseamento ser indireto, baseado na dosagem da quantidade de sódio presente. Deve-se lembrar de que muitos dos excipientes utilizados para a fabricação de medicamentos contêm sódio e isto pode levar a um falso resultado na quantificação de alendronato, baseado na quantidade de sódio.

4.7.2 Validação analítica

A seguir serão apresentados os resultados da validação analítica do método complementar de doseamento indireto do alendronato de sódio.

4.7.2.1 Linearidade

As respostas obtidas são apresentadas na Tabela 4.

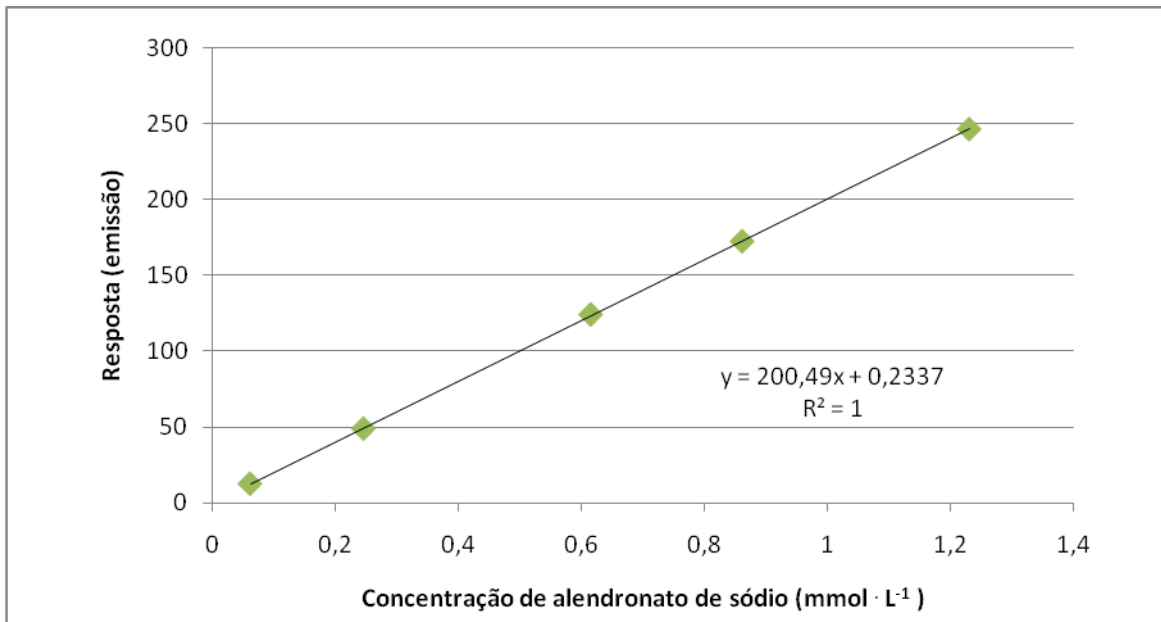
Tabela 4 - Avaliação da linearidade do método de quantificação de alendronato de sódio por fotometria de chama.

Concentração preparada (mmol · L ⁻¹)	Resposta (mmol · L ⁻¹ de Na ⁺)	Concentração (mmol · L ⁻¹ de alendronato)	Média (mmol · L ⁻¹)	Desvio Padrão (mmol · L ⁻¹)	Coefficiente de variação (%)
	12	0,060			
0,0615	13	0,065	0,0633	0,00289	4,56
	13	0,060			
	49	0,245			
0,246	50	0,250	0,2483	0,00289	1,16
	48	0,240			
	124	0,620			
0,615	126	0,630	0,6217	0,00764	1,23
	123	0,615			
	174	0,870			
0,861	172	0,860	0,863	0,00577	0,66
	172	0,860			
	248	1,240			
1,230	247	1,235	1,233	0,00764	0,62
	245	1,225			

FONTE: DO AUTOR.

A curva analítica gerada estava de acordo com o preconizado pela ANVISA ($r^2 = 0,99$) e também pelo FDA ($r^2 = 0,999$), conforme Figura 26.

Figura 26 - Curva analítica do alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

Os testes realizados para a avaliação da linearidade do método de quantificação de alendronato de sódio por fotometria de chama estão de acordo com o determinado pela resolução número 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA 2003).

4.7.2.2 Precisão

As respostas a avaliação da precisão da metodologia em validação e os cálculos de DPR % intra e interdias são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação da precisão do método de quantificação de alendronato de sódio por fotometria de chama.

	Concentração (mmol · L ⁻¹)	Valores calculados (mmol · L ⁻¹)	INTRADIA (repetibilidade) %	INTERDIAS (intermediária) %
		0,605		
		0,610		
Dia 1	0,615	0,605	0,73 (n = 6)	
		0,615		
		0,610		
		0,615		
		0,615		
		0,615		0,65 (n=12)
		0,605		
Dia 2	0,615	0,610	0,62 (n = 6)	
		0,610		
		0,615		
		0,610		

FONTE: DO AUTOR.

Os resultados obtidos mostram que a avaliação da precisão está de acordo com o determinado pela resolução número 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA 2003).

4.7.2.3 Exatidão

As respostas à avaliação da exatidão da metodologia em validação, como as medidas do equipamento, a média das medidas, o CV% e a recuperação (%E) estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Avaliação da exatidão do método de quantificação de alendronato de sódio por fotometria de chama.

Concentração (mmol · L ⁻¹)						
Branco (água ultrapura)	Adicionada	Medida no equipamento	Calculada	Média	Coefficiente de variação (%)	Recuperação (%)
0	0,0615	12	0,060	0,0617	4,68	100,3
		12	0,060			
		13	0,065			
0	0,615	121	0,605	0,608	0,47	98,9
		122	0,610			
		122	0,610			
0	1,23	245	1,225	1,223	0,24	99,4
		245	1,225			
		244	1,220			

FONTE: DO AUTOR.

A avaliação da exatidão está de acordo com o determinado pela resolução número 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA 2003).

4.7.2.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em relação às soluções de cloreto de lítio e cloreto de potássio em água ultrapura nas mesmas concentrações da curva analítica produzida para o ensaio de linearidade (0,0615 a 1,23 mmol · L⁻¹ de Li e K). Como esperado, o equipamento não quantificou esses íons, mostrando-se seletivo ao íon sódio.

4.7.2.5 Limite de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

As leituras das 10 replicatas do branco, suas respostas e seus desvios padrão constam na Tabela 7.

Tabela 7 - Avaliação do LD e LQ do método de quantificação de alendronato de sódio por fotometria de chama.

LEITURA	Resposta do equipamento (mmol · L ⁻¹)	Resposta calculada (mmol · L ⁻¹)	DESVIO PADRÃO (mmol · L ⁻¹)
1	0	0	
2	0	0	
3	0	0	
4	1	0,005	0,0021
5	0	0	
6	0	0	
7	1	0,005	
8	0	0	
9	0	0	
10	0	0	

FONTE: DO AUTOR.

De acordo com os cálculos realizados para o LD e LQ do método em validação os resultados foram:

$$LD = 2,03 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$LQ = 6,77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Como é aplicado um fator de 200 na leitura do equipamento, os valores reais de LD e LQ são: 0,01015 mmol · L⁻¹ e 0,03385 mmol · L⁻¹, respectivamente.

O método de fotometria de chama foi validado e atendeu as especificações requeridas na RDC 899/2003 da ANVISA para quantificação indireta de alendronato de sódio presente em matéria-prima. Por se tratar de um método indireto, outras técnicas de caracterização do alendronato de sódio devem ser utilizadas em associação para que identifiquem a presença de alendronato de sódio tais como o infravermelho e DRXP.

4.7.2.6 Aplicação do método

Solubilidade em equilíbrio:

Para o ensaio de solubilidade, as amostras foram diluídas em um fator de 200, por se tratar de amostras concentradas em relação à quantidade de sódio.

Dissolução intrínseca discriminatória:

Para o ensaio de dissolução intrínseca, as soluções foram injetadas diretamente no equipamento por se tratarem de soluções muito diluídas considerando a faixa de trabalho do equipamento.

4.8 ESTUDOS DE SOLUBILIDADE DE EQUILÍBRIO

Os estudos de solubilidade em equilíbrio foram realizados para verificar a diferença nas propriedades físicas e químicas entre as formas anidra e triidratada de alendronato de sódio.

Os resultados obtidos mostram o valor absoluto da solubilidade de equilíbrio da forma anidra é superior ao da forma triidratada para todos os meios testados, mas apresenta diferença significativa apenas no tampão acetato pH 6,0 (Figura 27). Este meio foi considerado discriminatório entre as formas cristalinas do alendronato e foi utilizado como meio teste para os estudos de dissolução intrínseca. As médias das repetições do estudo de solubilidade em equilíbrio das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio e o desvio padrão relativo entre elas estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Média das repetições do teste de solubilidade em equilíbrio das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio e desvio padrão relativo entre as formas.

Meio teste	Média das repetições da forma anidra (g · L ⁻¹)	Média das repetições da forma triidratada (g · L ⁻¹)	Desvio padrão relativo entre as formas anidra e triidratada (%)
H ₂ O	36,191	35,866	0,64
HCl 0,01M	43,668	35,974	13,66
T pH 3,5	95,354	78,450	13,75
T pH 6,0	64,039	41,826	29,67
T pH 7,2	45,835	38,467	12,36

FONTE: DO AUTOR.

Os pHs dos meios testes foram verificados após os estudos de solubilidade em equilíbrio e estão representados na Tabela 9. Não houve diferença de pH das soluções em equilíbrio com as formas anidra e triidratada quando na presença de um mesmo meio de dissolução. Comparando os pHs dos diferentes meios antes e após o estabelecimento do equilíbrio com as formas sólidas, observa-se que para as soluções tamponadas não ocorreu variação significativa dos pHs das soluções tampões após contato com as formas sólidas. Para a água houve um ligeiro decréscimo do pH e para o meio HCl 0,01 M (pH_{inicial} = 2) houve um aumento do pH_{final} para 4,0.

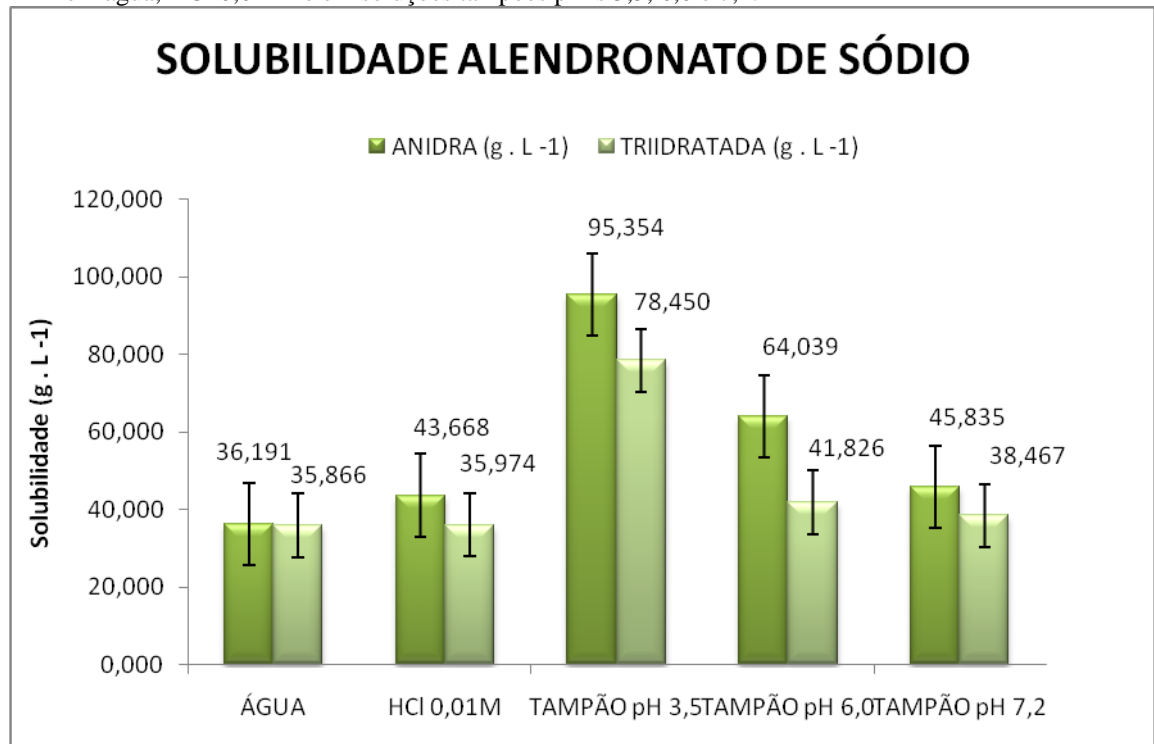
Tabela 9 - pHs dos meios teste após os estudos de solubilidade em equilíbrio.

MEIOS TESTE	FORMA ANIDRA	FORMA TRIIDRATADA
H ₂ O	pH 5,0	pH 5,0
HCl 0,01M	pH 4,0	pH 4,0
T pH 3,5	pH 3,0	pH 3,0
T pH 6,0	pH 7,0	pH 7,0
T pH 7,2	pH 8,0	pH 8,0

FONTE: DO AUTOR.

A faixa de pH em estudo demonstrou que em pH mais ácido (Tampão pH 3,5 / pH_{final} = 3,0) houve uma maior solubilização tanto da forma anidra quanto da forma triidratada (Figura 27). Isto se deve ao comportamento anfótero, visto que sua estrutura possui características ácidas (dois grupos fosfóricos) e básicas (grupo amina) apresentando várias constantes de dissociação (pKa₁ = 2,72 ± 0,05; pKa₂ = 8,73 ± 0,05; pKa₃ = 10,5 ± 0,1; pKa₄ = 11,6 ± 0,1) (THE MERCK INDEX, 2007). Levando-se em consideração que as espécies moleculares são menos solúveis que as espécies ionizadas em meio aquoso e considerando a constante de dissociação (pka) 2,72, explica-se o fato da solubilidade maior das duas formas em tampão pH 3,5, pois o pH está ~1 unidade acima do pka das formas em análise.

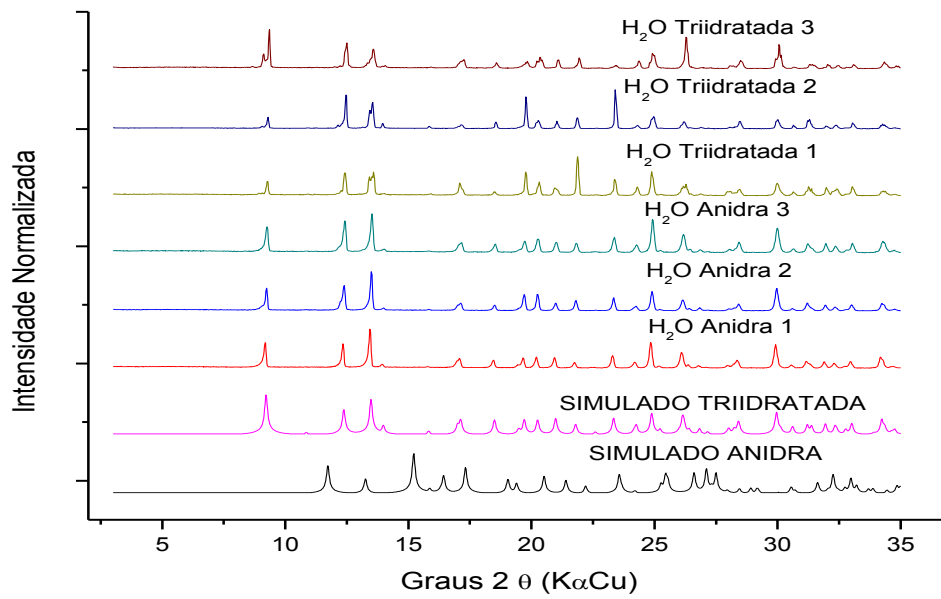
Figura 27 - Histograma do estudo de solubilidade dos polimorfos anidro e tri-hidratado de alendronato de sódio em água, HCl 0,01 M e em soluções tampões pH's 3,5, 6,0 e 7,2.



FONTE: DO AUTOR.

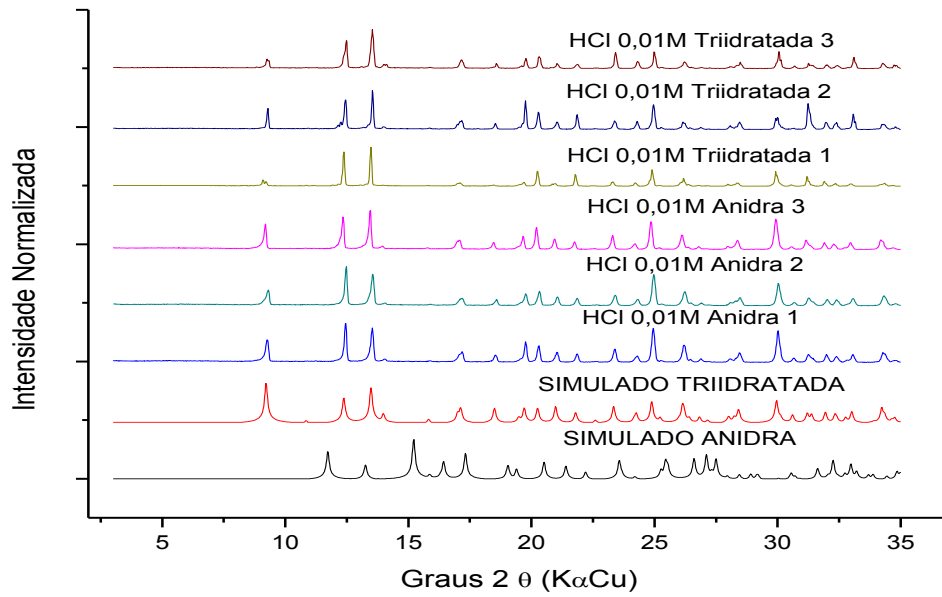
As análises por DRXP do sólido em equilíbrio com a solução após os estudos de solubilidade nos diferentes meios estudados são apresentados nas Figuras 28 a 32. Observa-se que a forma sólida em equilíbrio com a solução é a triidratada para todos os meios testados, inclusive para aqueles em que forma sólida inicial utilizada para o experimento foi a anidra. Esse resultado mostra que ocorreu, como esperado (item 4.3), a total conversão da forma anidra, em todos os meios de dissolução, para a forma triidratada, a qual é mais termodinamicamente estável. Portanto, a solubilidade de equilíbrio apresentada para a forma anidra não pode ser considerado um valor real. Porém em todos os meios, as concentrações de equilíbrio preparadas a partir da forma anidra foram aumentadas em comparação com as preparadas a partir da forma triidratada. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato da forma anidra poder ser supersaturada em relação à forma triidratada devido efeitos de nucleação e/ou crescimento de cristal durante inter-conversão em meio aquoso. Há relatos de comportamentos similares, a exemplo da doxiciclina (BORGADUS, J. B.; BLACKWOOD, R. 1979 (a e b); SANTOS et al., 2014).

Figura 28 - Difrátogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de H₂O.



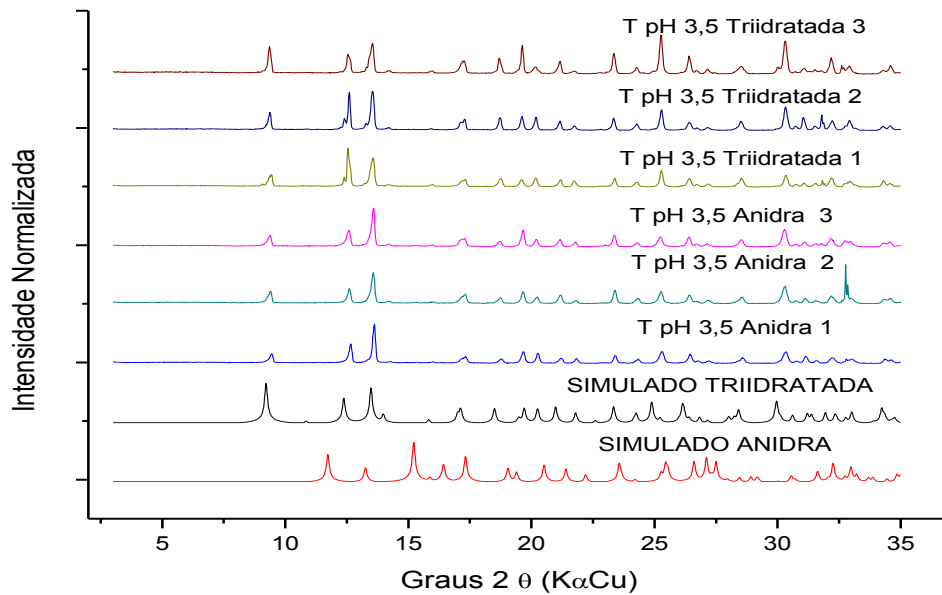
FONTE: DO AUTOR.

Figura 29 - Difratomogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de HCl 0,01M.



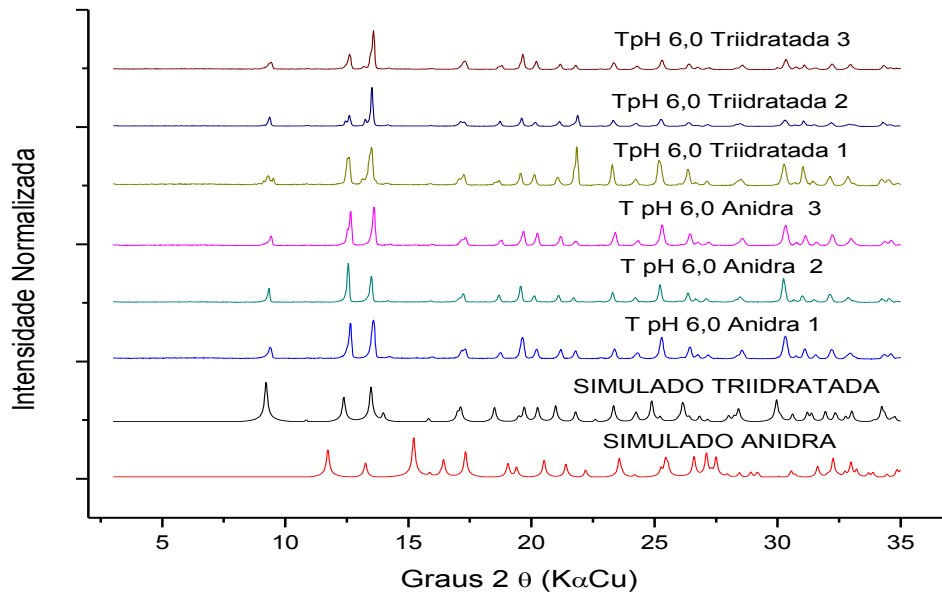
FONTE: DO AUTOR.

Figura 30 - Difratomogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de tampão acetato pH 3,5.



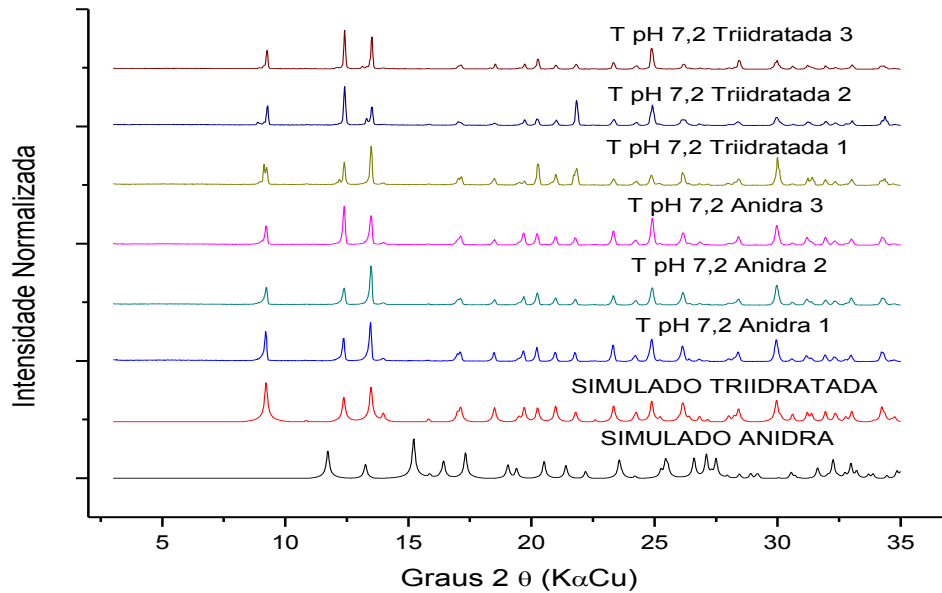
FONTE: DO AUTOR.

Figura 31 - Difratomogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de tampão acetato pH 6,0.



FONTE: DO AUTOR.

Figura 32 - Difratomogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após estudos de solubilidade no meio de tampão acetato pH 7,2.

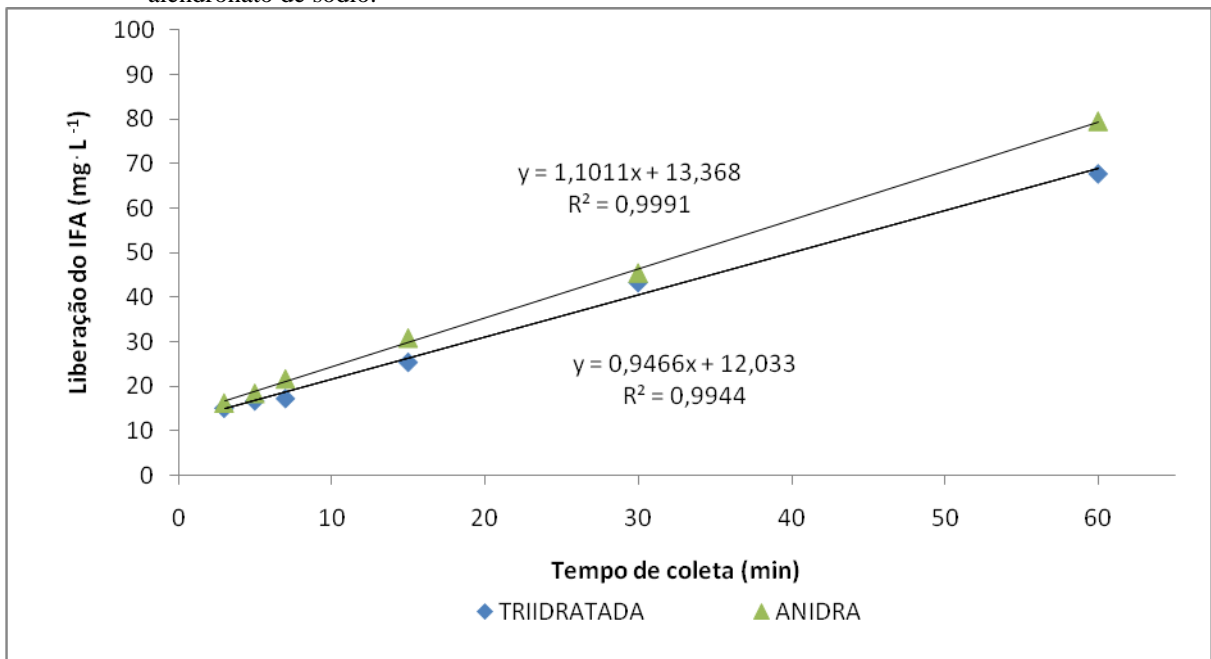


FONTE: DO AUTOR.

4.9 ESTUDO DE DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA DISCRIMINATÓRIA (DID)

O estudo de dissolução intrínseca discriminatória (DID) foi realizado apenas em meio tampão acetato pH 6,0, uma vez que foi nessas condições que observou-se diferença significativa das solubilidades em equilíbrio quando as duas formas do alendronato foram comparadas. Acompanhando os resultados de solubilidade de equilíbrio, observa-se que a DID também aponta para uma maior velocidade de dissolução da forma anidra em comparação a forma triidratada (Figura 33). Observa-se que a liberação da forma anidra foi superior a triidratada em todos os tempos de coleta do experimento de DID. Para calcular a taxa de dissolução intrínseca (TDI), utilizou-se o coeficiente angular da reta da curva de quantidade acumulada de fármaco dissolvido em função do tempo (Figura 33). Obtém-se o valor da TDI dividindo-se o esse coeficiente angular pela área superficial do compactado (USP 34, 2012), que nesse estudo foi $0,5 \text{ cm}^2$. Portanto os valores calculados são de $1,1011 \cdot 0,5^{-1} = 2,2022$ e $0,9466 \cdot 0,5^{-1} = 1,8932 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ para as formas anidra e triidratada, respectivamente. Esse resultado comprova que há diferença significativa na taxa de dissolução entre as formas anidra e tri-hidrata de alendronato de sódio.

Figura 33 - Gráfico do perfil de dissolução intrínseca discriminatória das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

Além disso, quando se trata de estudar o comportamento de dissolução discriminatório de um material no qual a conversão de fase sólida pode ocorrer, e ou qualquer conversão de um menos estável para a forma mais estável necessita de monitorização (HULSE, GRAY, FORBES, 2012).

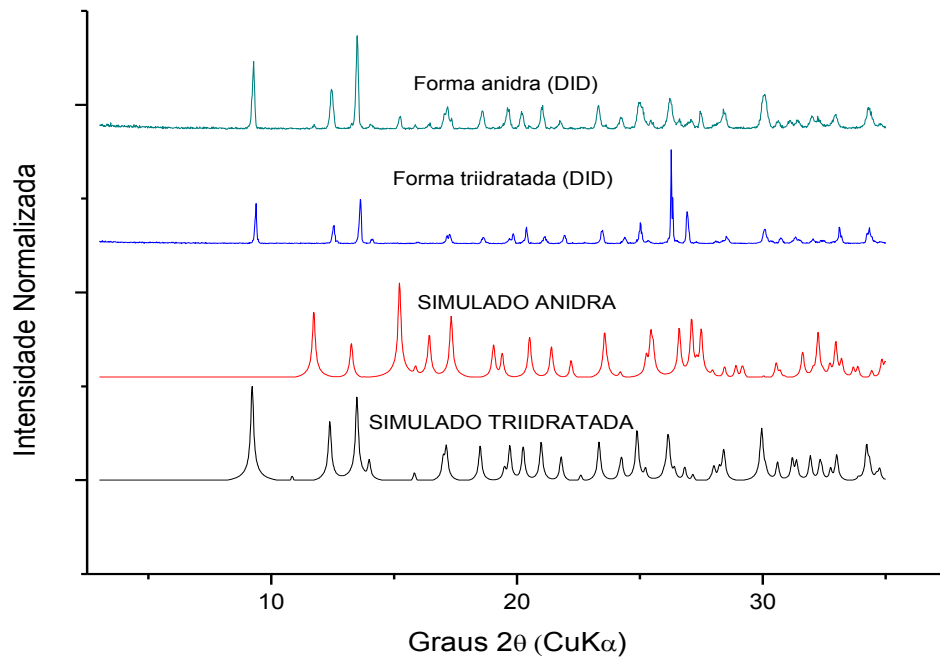
O resultado das médias e os desvios padrões relativos do estudo de dissolução intrínseca discriminatória das três análises estão representados na Tabela 10. As análises de DRXP do sólido residual após os estudos de DID mostrou que houve uma conversão quase total da forma anidra para a triidratada pelos motivos apontados anteriormente (Figura 34). A remanência de parte da forma triidratada se deve ao fato da pastilha utilizada para o estudo não ter toda sua superfície em contato com o meio de dissolução (Figura 34).

Tabela 10 - Média (\bar{x}) de liberação em mg das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio e desvio padrão relativo (DPR) entre os 3 estudos de DID.

TEMPOS DE COLETA	\bar{x} FORMA ANIDRA (mg)	\bar{x} FORMA TRIIDRATADA (mg)	DPR ENTRE OS 3 ESTUDOS DE DID FORMA ANIDRA (%)	DPR ENTRE OS 3 ESTUDOS DE DID FORMA TRIIDRATADA (%)
3 min	16,25	15,17	1,88	0,86
5 min	18,42	16,79	0,98	0,93
7 min	21,67	17,33	1,75	1,14
15 min	30,87	25,46	1,63	2,29
30 min	45,50	43,33	2,23	1,97
60 min	79,63	67,71	2,13	1,45

FONTE: DO AUTOR.

Figura 34 - Difratomogramas das formas anidra e triidratada de alendronato de sódio após o estudo de DID comparados com os simulados das formas: anidra e triidratada do alendronato de sódio.



FONTE: DO AUTOR.

5 CONCLUSÃO

Com as técnicas de recristalização empregadas foi possível obter monocristais, porém os monocristais obtidos foram da forma triidratada, já com estrutura determinada. A obtenção de policristais da forma anidra de alendronato de sódio foi possível seguindo a metodologia descrita no artigo da literatura (ASNANI et al. 2009).

Com a obtenção da forma anidra pôde-se caracterizar e comparar com a forma triidratada (comercial). As técnicas de espectroscopia no infravermelho (IV), as análises térmicas (DSC e TG/DTA) e a difratometria de raios X por pó (DRXP) foram técnicas que puderam caracterizar e diferenciar as duas formas cristalinas em estudo.

As formas farmacêuticas disponíveis no mercado (referência, genérico e similar) e as matérias-primas A e B foram analisadas por DRXP e demonstraram que a forma polimórfica presente estava de acordo com o descrito na USP 34, a forma triidratada de alendronato de sódio. A DRXP foi uma técnica capaz de determinar a fase cristalina do insumo facilmente mesmo na presença dos excipientes no caso dos medicamentos. E também o fato de que a identificação do insumo pode ser feita diretamente no comprimido não sendo necessária sua trituração. E ainda demonstrou que não há presença aparente da forma anidra do alendronato de sódio nas amostras estudadas.

Por meio da técnica de DRXP foi possível avaliar a interconversão de fases entre as formas anidra e triidratada de alendronato de sódio, verificando que o tempo de conversão da forma triidratada em anidra ocorre em um tempo de 15 minutos, o qual é menor do que o sugerido na literatura (ASNANI et al, 2009). A conversão da forma anidra em triidratada ocorre de maneira instantânea quando em presença de água.

Os estudos realizados mostraram que o processo reversível de hidratação ou desidratação é acompanhado também por uma transição de fase cristalográfica reversível. Assim, foi proposto nesse trabalho, por meio de uma detalhada análise do empacotamento cristalino das duas formas, um mecanismo de transição de fase.

Nos estudos de solubilidade em equilíbrio, a forma anidra de alendronato de sódio demonstrou ser mais solúvel que a forma triidratada em tampão acetato pH 6,0.

Os estudos de perfil de dissolução intrínseca discriminatória demonstrou uma liberação maior da forma anidra do que a hidratada durante todos os tempos de coleta do perfil.

Um método complementar de fotometria de chama foi validado e atendeu as especificações requeridas na RDC 899/2003 da ANVISA para quantificação indireta de alendronato de sódio.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, J. et al. Solid form screening – a review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 71, n. 1, p. 23-37, 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Resolução RE nº 37, de 05 fev. 2004. Dispõe sobre medicamentos genéricos. Disponível em:< <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/lista/resolucao.htm>>. Acesso em: 14 out. 2014.
- ALLESØ, M. et al. Solvent diversity in polymorph screening. *J. Pharm. Sci.*, v. 97, p. 2145-59, 2008.
- AMIDON, G.L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.*, v. 12, n. 3, p. 413–20, 1995.
- AMIDON, G.L. HIGUCHI W.I., HO NF. Theoretical and experimental studies of transport of micelle-solubilized solutes. *J. Pharm. Sci.*, v. 71; p. 77-84, 1982.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/referencia/lista_sum.pdf>. Acesso em: 14 out. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Disponível em:< http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8ca559804e5f54a09761dfd762e8a5ec/Registros_por_ordem_alfabetica_DCB.pdf?MOD=AJPERES >. Acesso em: 14 out. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Disponível em:< <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/referencia/lista.pdf> >. Acesso em: 14 out. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect_2003. Acesso em:> Acesso em: 17 out. 2014.
- ASNANI, M. et al. Initio Structure Determination of Anhydrous Sodium Alendronate from Laboratory Powder X-Ray Diffraction. *J.Pharm.Sci.*, v. 98, p. 2113, 2009.
- BALDERAS, M. M. S. et al. Los cocristales farmacéuticos: conceptos generales. *An. Real Acad. Farm.* v. 80, n. 2, p. 265-273, 2014.
- BAUER, J. et al. *Pharm. Res.*, v. 18, p. 859–866, 2001.
- BILTON, C. et al. When is a polymorph not a polymorph? Helical trimeric O-H...O synthons in trans-1,4-diethynylcyclohexane-1,4-diol. *Chem. Commun.*, v. 17, p. 1675-6, 1999.
- BORGADUS, J. B.; BLACKWOOD, R. B., Jr. Dissolution rates of doxycycline free base and hydrochloride salts. *J. Pharm. Sci.*, v. 68, p. 1183(a), 1979.

BORGADUS, J. B.; BLACKWOOD, R. B., Jr. Solubility of doxycycline in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.*, v. 68, p. 188 (b), 1979.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de jun. 2003.

BRITTAİN, H. G. Polymorphism in pharmaceutical solids. 2.ed. New York: *Informa Healthcare*, 2009.

BYRN, S. R.; GRANT, D.J.W. A timely re-examination on drug polymorphism in pharmaceutical development and regulation. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 56, nº 3, p. 237-9, 2004.

CHIENG, N. et al. Physical characterization and stability of amorphous indomethacin and ranitidine hydrochloride binary systems prepared by mechanical activation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 71, n. 1, p. 47-54, 2009.

CIPLA KURKUMBH; Finished Product Specification. Test and methods. Alendronate sodium trihydrate, 1999.

CREMERS, S.; PAPAPOULOS, S.; Pharmacology of bisphosphonates, *Elsevier Inc., Bone*. v. 49, p. 42-49, 2011.

DEACON, G. B. et al. *J.Coord.Chem.*, v. 64, p. 179, 2011.

DEMORO, B. et al. *Dalton Trans.*, v. 41, p. 6468, 2012.

DESIRAJU, G. R. Chemistry beyond the molecule. *Nature*, v. 412, n. 397, p. 400, 2001.

DESIRAJU, G. R. Polymorphism: the same and not quite the same. *Cryst. Growth Des.*, v. 8, n. 1, p. 3-5, 2008.

DESIRAJU, G. R. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering — A New Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 34, n. 21, p. 2311-27, 1995.

DUFAU, C. et al. Phosphorus,Sulfur,Silicon,Relat.Elem., v. 107, p. 145, 1995.

ÉPSHTEIN, N. A. Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis. *J. P. Chemistry*, v. 38, p. 212 -228, 2004.

EUROPEAN. *Pharmapoeia*. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe; v. 1, p. 649, 2008.

ETTER, M. C.; MACDONALD, J.C.; BERNSTEIN, J. Graph-set analysis of hydrogen-bond patterns in organic crystals. *Acta Crystallogr. B*, v. 46, p. 256-62, 1990.

FDA. Guidance for Industry, ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism. Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. US Department of Health and Human Services,

Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Washington, DC, 2007b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>>. Acesso em: 2013.

FDA. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Washington, DC, 2007a. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>>. Acesso em: 2013.

FINKELSTEIN, N.; LIDOR-HADAS, R.; ARONHIME, J.; Hydrate forms of alendronate sodium, processes for manufacture thereof, and pharmaceutical compositions thereof; *TEVA Pharmaceutical Industries, Ltd., Tigva (IL)*; v. 09, p. 756-898, 2001.

GOODMAN; GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica/revisão de conteúdo Almir Lourenço da Fonseca. 11 ed. Rio de Janeiro: *MacGraw-Hill Interamericana do Brasil*, 2006.

GUYTON, A. C. *Fisiologia Humana*. 6. ed. Rio de Janeiro. *Guanabara Koogan*. cap. 36, 1988.

HAGE, D. S. Química analítica e análise quantitativa/ David S. Hage e James D. Carr; tradução Midori Yamamoto; revisão técnica Edison Wendler. 1. ed. São Paulo: *Pearson Prentice Hall*, p. 460, 2012.

HANCOCK, B. C.; PARKS, M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharmacol. Res.*, v. 17, n. 4, p. 397-404, 2000.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 6. ed. 2005.

HILFIKER, R.; BLATTER, F.; RAUMER, M. Relevance of Solid-state Properties for Pharmaceutical Products. In: HILFIKER, R. *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*. Alemanha: *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, cap 1, p. 1-19, 2006.

HUANG, L. F.; TONG, W. Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv. Drug Deliver Rev.*, v. 56, p. 321-324, 2004.

HULSE, W. L.; GRAY, J.; FORBES, R.T. A discriminatory intrinsic dissolution study using UV area imaging analysis to gain additional insights into the dissolution behaviour of active pharmaceutical ingredients; *I. J. of Pharmaceutics*, v. 434; p. n. 1-2, p. 133-139, 2012.

IBRAHIM, H. G.; PISANO, F.; BRUNO, A. Polymorphism of phenylbutazone: Properties and compressional behavior of crystals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 66, n. 5, p. 669-673, 1977.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH Q6A) - Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. Geneva: ICH, 06 Out. 1999. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/qualityguidelines.html>>. Acesso em: 2013.

JIMIDAR, M. ILIAS; HEYLEN, P.; SMET, M. Method validation. HPL C Method Development for Pharmaceuticals. Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development, A Division of Janssen Pharmaceutica N.V., Turnhoutseweg 30, B- 2340 Beerse, Belgium, 2007.

KARPINSKI, P. H. Polymorphism of active pharmaceutical ingredients. *Chem. Eng. Technol.*, v. 29, n. 2, p. 233-7, 2006.

KIECZYKOWSKI, G. R. et al. *J. Org. Chem.*, v. 60, p. 8310, 1995.

KIECZYKOWSKI, G. R. et al. *Merck Co., Inc., Rahway, N.J.*; p. 363,820; 1989.

LEE, A. Y.; ERDEMIR, D.; MYERSON, A. S. Crystal polymorphism in chemical process development. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, v. 2, p. 80-259, 2011.

LEROUX, Y. et al. Phosphorus,Sulfur,Silicon,Relat.Elem. v. 63, p. 181, 1991.

LLINÀS, A.; GOODMAN, J.M. Polymorph control: past, present and future. *Drug Discov. Today*, v. 13, n.. 5-6, p. 198-210, 2008.

MARCUS, R. et al. Em As Bases Farmacológicas da Terapêutica; eds.; 9. ed., *McGraw-Hill*: Rio de Janeiro, cap. 61, 1996.

MARTINS, F.T.; Química supramolecular de fármacos antirretrovirais inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa: novas formas cristalinas e alteração de propriedades de estado sólido; 2010.

MCCRONE, W. C. Polymorphism. In: FOX, D.; LABES, M. M.; WEISSBERGER, A. P. *and C. of the Organic Solid State*. EUA: Wiley-Interscience, v. 2, p. 725–767, 1965.

MOULTON, B.; ZAWOROTKO, M. J. From molecules to crystal engineering: supramolecular isomerism and polymorphism in network solids. *Chem. Rev.*, v. 101, n. 33, p. 1629-58, 2002.

NEVES, P. P.; Polimorfismo em sólidos farmacêuticos; 2008.

NUNN, T.; WILLIAMS, J. Formulation of medicines for children. *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, v. 59, n. 6, p. 674–6, 2005.

OHANESSIAN, J. et al. Phosphorus,Sulfur,Silicon,Relat.Elem. v. 129, p. 99, 1997.

PARFITT, K.; MARTINDALE. The complete drug reference, 32. ed., Pharmaceutical Press: London, 1999.

- PUROHIT, R.; VENUGOPALAN, P. Polymorphism: *An Overview. Reson.*, v. 14, n. 9, p. 93-882, 2009.
- RATH, S. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, v. 31, p. 1190-1198, 2008.
- RAVICHANDRAN, V. et al. Validation of analytical methods – Strategies & importance. *I. J. of Pharmacy and Pharmaceutical S.*, v. 2, n. 3, p. 18-22, 2010.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROSA T.C.C., Dissolução intrínseca de hidroclorotiazida de diferentes granulometrias e sua relação com a dissolução do ativo em comprimidos. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ; 2005.
- SAIFEE, M. et al. Drug Polymorphism: A Review. *Int. J. Health Res.*, v. 2, n. 4, p. 291- 306, 2009.
- SANTOS, O. M.. M. et al. Protonation Pattern, Tautomerism, Conformerism, and Physicochemical Analysis in New Crystal Forms of the Antibiotic Doxycycline; dx.doi.org/10.1021/cg500877z | *Cryst. Growth Des.*, v. 14, p. 3711–3726, 2014.
- SANTOS, O. M.. M. et al. Polymorphism: an evaluation of the potential risk to the quality of drug products from the Farmácia Popular Rede Própria; *B. J. of Pharmaceutical Sciences*; v. 50, n. 1, 2014.
- SARMA, B.; Chen, J.; His, H. Y.; Myerson A.S. Solid forms of pharmaceuticals: Polymorphs, salts and cocrystals. *Korean J. Chemical Eng.*, v. 28, n. 2, p. 315-22, 2011.
- SHINGAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 56, n. 3, p. 335-7, 2004.
- SIUD P. M. et al. *Polyhedron*, v. 25, p. 1017, 2006.
- SIENKIEWICZ, B. et al. Solid-State form of alendronate sodium and preparation thereof; PLIVA-Research and development Ltd. Zagreb (HR); v. 10, p. 406,964; 2004.
- TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S. Y. Preparation of enteric coated microcapsules for tableting by spray drying technique and in vitro simulation of drug release from the tablet in GI tract. *J. P. Sciences*, v. 69, p. 1388-1392, 1980.
- THE MERCK INDEX. *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*; 14. ed., p. Merck e Co. Inc.: Whitehouse Station, New Jersey, 2007.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA - National Formulary (USP34- NF29). 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, v. 2 e 3, 2011.
- USP 34, NF 29; United States Pharmacopeia - National Formulary (USP34- NF29). 34. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention.. v. 2, p. 1782, 2011.

VADE-MÉCUM, P.R; Edição: 2002/2003, Ed. Metha: São Paulo, (CD-ROOM), 2002.

VEGA, D.; BAGGIO, R.; GARLAND, M.T.; *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* v. 52, p. 2198, 1996.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v. 48, n. 1, p. 3-26, 2001.

VOGT, F.G.; KORD, A.S. Development of Quality-By-Design Analytical Methods. *J. P. Sciences*, v. 100, p. 797-812, 2011.

VON RAUMER, M.; DANNAPPEL, J.; HILFIKER, R. Polymorphism, salts, and crystallization. The relevance of solid-state development. *Solvias*. Disponível em: <<http://abstracts.aapspharmaceutica.com/ExpoAAPS09/Data/EC/Event/Exhibitors/232/productBrochure1.pdf>>. Acesso 2013.

WÄTZIG, H. Validation of analytical methods using capillary electrophoresis. *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*, v. 9, p. 225-244, 2008.

YORK, P. Solid-state properties of powders in the formulation and processing of solid dosage forms. *I. J. of Pharmaceutics*, v. 14, p. 1-28, 1983.

YU, L.; REUTZEL, S. M.; STEPHENSON, G.A. Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. *Pharm. Sci. Technol. To.*, v. 1, n. 3, p. 118-27, 1998.

YU, L. X. et al. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *I. J. Pharm.*, v. 270, p. 221-227, 2004.

YU, L. X. et al. Scientific Considerations of Pharmaceutical Solid Polymorphism in Abbreviated New Drug Applications. *Pharmaceut. Res.*, v. 20, n. 4, p. 531-6, 2003.