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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE FERRO (II) EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS DE FERRO BISGLICINADO

DANIELI CÁTIA CENI

Porto Alegre, 2009.

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE FERRO (II) EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS DE FERRO BISGLICINADO

Dissertação apresentada por ***Danieli Cátia Ceni***
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dra. Ana Maria Bergold

Porto Alegre, 2009

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19.05.2009, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Éder Cláudio Lima

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Jarbas Montanha

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

C395d Ceni, Danieli Cátia

Desenvolvimento e avaliação de métodos analíticos para determinação de ferro (II) em preparações farmacêuticas de ferro bisglicinado / Danieli Cátia Ceni – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xxii, 94p.: il ., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmacologia. 2. Validação: métodos de análise de fármacos. 3. Ferro bisglicinado. 4. Controle de qualidade. I. Lima, Éder Cláudio. II. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. III. Montanha, Jarbas. IV. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável:
Claudia da Silva Gonçalves de Leon, CRB10/1012

"Nas grandes batalhas da vida,

o primeiro passo para a vitória

é o desejo de vencer!"(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Ana Maria Bergold pela orientação, incentivo e carinho, sempre presentes.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica, onde foi realizada a maior parte deste trabalho, pela disponibilidade de materiais e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Pedro Fröehlich e Prof. Dr. Jarbas Montanha, pela atenção e colaboração com os esclarecimentos prestados.

Ao laboratório Saúde Ltda, pelo fornecimento da matéria-prima que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Batista, do Instituto de Física da UFRGS, pela atenção e auxílio na realização das análises de espectroscopia de Mössbauer.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pelo ensino de qualidade.

A todos os colegas do Laboratório de Química Farmacêutica: Sirlei, Carolina, Lisiane, Eliane, Rochele, Maria Cristina, Laura, Samuel, Andréa Adams, Marquinho, Luís, Jéferson, Leonardo, César, Andréia Pereira, Graziela, Marcela e Natália.

Ao Marcelo, meu esposo, pelo amor, companheirismo e incentivo.

Aos meus pais (Jair e Cléia), meus irmãos (Camila e Vinícius), pelo amor, carinho e apoio, fundamentais durante este período e sempre.

A Deus, por ter me acompanhado em mais esta caminhada.

A todos que mesmo não citados, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho...

RESUMO

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de Ferro (II) em preparações farmacêuticas de ferro bisglicinado

Ferro bisglicinado (Fe-bis-gli) é um aminoácido quelado, formado pela ligação de duas moléculas de glicina a uma molécula de ferro (II), utilizado para prevenção e tratamento da anemia ferropriva. Não há descrição de métodos analíticos em códigos oficiais para o controle de qualidade do ferro bisglicinado em formas farmacêuticas. É comercializado na forma de cápsulas, produzidas por farmácias magistrais e em forma oral líquida. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi a validação de métodos analíticos para o controle qualitativo e quantitativo do Fe-bis-gli em cápsulas e forma oral líquida. A identificação e caracterização do fármaco foram realizadas através da determinação dos caracteres físicos, solubilidade, aquametria, espectrofotometria na região do infravermelho (IV), reações específicas e espectroscopia de Mössbauer. Para a determinação quantitativa foram validados métodos de espectrofotometria na região do visível (VIS), ordem-zero e primeira derivada (VIS-D^1), e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise estatística demonstrou equivalência entre os métodos CLAE / VIS para a determinação do teor das cápsulas e entre os métodos CLAE / VIS-D^1 para a determinação do Fe-bis-gli na forma oral líquida.

Palavras-chave: ferro bisglicinado, controle de qualidade, validação de métodos analíticos, CLAE.

ABSTRACT

Development and validation of analytical methods for determination of Fe(II) in ferrous bisglycinate pharmaceutical preparations

Ferrous bisglicycinate (Fe-bis-gli) is an amino acid chelate which is formed by the binding of two molecules of glycine to one molecule of Fe(II), used for prevention and treatment of iron deficiency. There are no analytical methods in official codes for the quality control of Fe-bis-gli in pharmaceutical forms; however it is marketed in the form of capsules, produced by compounding pharmacies and as oral liquid form. The aim of this work was the validation of analytical methods for the qualitative and quantitative analysis of Fe-bis-gli capsules and oral liquid form. The identification and characterization of the drug were performed through the determination of physical characteristics, solubility, water, infrared (IR), specific reactions and Mössbauer spectroscopy. For the quantitative determination VIS spectrophotometry methods have been validated, zero-order and first derivative (VIS-D^1) and high performance liquid chromatography (HPLC). Statistical analysis showed that HPLC / VIS methods were equivalent to assay capsules and HPLC / VIS-D^1 methods were equivalent to assay Fe-bis-gli in oral liquid form.

Key words: Ferrous bisglycinate, quality control, validation of analytical methods, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama conceitual da relação entre deficiência de ferro e anemia em população hipotética..... 11

Figura 2- Distribuição do ferro no homem adulto..... 14

Figura 3- Fórmula estrutural do ferro bisglicinado..... 15

Figura 4- Espectro na região do infravermelho do aminoácido glicina..... 35

Figura 5- Espectro na região do infravermelho de ferro bisglicinado..... 36

Figura 6- Espectro Mössbauer para SQR de ferro bisglicinado. Condições: espectrômetro de aceleração constante, fonte radioativa ^{57}Co, atividade inicial de 50mCi, temperatura ambiente (295K)..... 40

Figura 7- Espectro Mössbauer para cápsulas de ferro bisglicinado. Condições: espectrômetro de aceleração constante, fonte radioativa ^{57}Co, atividade inicial de 50 mCi, temperatura ambiente (295K)..... 41

Figura 8- Reação entre Fe(II) e o reagente quelante ortofenantrolina..... 54

Figura 9- Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria no visível (510 nm) da solução de ferro bisglicinado SQR (A) e amostra simulada dos excipientes das cápsulas (B), na concentração de 3µg/mL..... 55

Figura 10- Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação da SQR de ferro bisglicinado, método por espectrofotometria na região do VIS a 510 nm 56

Figura 11- Espectros na região do VIS: ordem zero (I, II e III), 1ª derivada (IV). I: solução de adjuvantes e demais componentes (F.O.L). II: solução de ferro bisglicinado SQR (3µg/mL). III e IV: (A) Ferro bisglicinado SQR, (B) adjuvantes e demais componentes..... 60

Figura 12- (A) Espectro VIS-Ordem Zero / (B) Espectro VIS-1ª derivada para soluções de ferro bisglicinado SQR de 1 a 5 µg/ml..... 61

Figura 13- Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação da SQR de ferro bisglicinado, método por espectrofotometria derivada na região do VIS a 525,5 nm..... 62

Figura 14- Reação entre Fe(II) e o reagente quelante PAR..... 76

Figura 15- Cromatogramas obtidos com a solução amostra de ferro bisglicinado (cápsulas e forma oral líquida) na concentração de 1,8 µg/ml (a) e com a solução placebo (b). Condições cromatográficas: Coluna Gemini® RP-18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm); fase móvel: acetonitrila-água (28:72 *V/V*), contendo 1mM de tetrabutilamônio hidrogênio sulfato e 1% tampão fosfato (pH 8.0); fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 706 nm..... 77

Figura 16- Cromatogramas representativos dos estudos de degradação de Fe-bis-gli. (**A**) solução não submetida à degradação forçada; (**B**) Degradação térmica (80°C / 24h); (**C**) degradação fotolítica (UV 352 nm, 24h). Condições cromatográficas: Coluna Gemini® RP-18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm); fase móvel: acetonitrila-água (28:72 *V/V*), contendo 1mM de hidrogênio sulfato de tetrabutilamônio e 1% tampão..... 78

Figura 17- Representação gráfica da curva padrão de ferro bisglicinado, nas concentrações de 1,0 a 2,6 µg/ml. Condições: Coluna Gemini® RP-18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm); fase móvel: acetonitrila-água (28:72 *V/V*), contendo 1mM de tetrabutilamônio hidrogênio sulfato e 1% tampão fosfato (pH 8.0); detecção: 706 nm..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Determinação de Fe(II) por espectrofotometria no visível..... 20

Tabela 2- Determinação de Fe(II) por cromatografia líquida de alta eficiência.. 20

Tabela 3- Freqüências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para o aminoácido glicina..... 35

Tabela 4- Freqüências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para o ferro bisglicinado..... 36

Tabela 5- Reações para identificação de Fe(II)..... 37

Tabela 6- Reações para identificação de Fe(III)..... 37

Tabela 7- Preparação das soluções para realização da exatidão do método, através do teste de recuperação..... 53

Tabela 8- Valores de absorvâncias das curvas padrão de ferro bisglicinado, determinadas em 510 nm, realizadas em três diferentes dias..... 56

Tabela 9- Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas por espectrofotometria na região do VIS..... ANEXO

Tabela 10- Valores experimentais referentes à determinação de ferro bisglicinado em cápsulas por espectrofotometria no visível..... 57

Tabela 11- Exatidão do método por espectrofotometria no VIS, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções de cápsulas de Fe-bis-gli..... 58

Tabela 12- Valores de absorvâncias das curvas padrão de ferro bisglicinado, determinadas em 525,5 nm, realizadas em três diferentes dias 61

Tabela 13- Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas por espectrofotometria derivada na região do VIS..... ANEXO

Tabela 14- Valores experimentais referentes à determinação de ferro bisglicinado na forma oral líquida por espectrofotometria derivada no visível (1ª derivada, $\Delta\lambda$=5 e fator de escala de 30)..... 63

Tabela 15- Exatidão do método por espectrofotometria derivada no VIS, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções da forma oral líquida de Fe-bis-gli..... 64

Tabela 16- Condições otimizadas para execução do método por cromatografia líquida. 65

Tabela 17- Preparação das soluções para realização da exatidão do método por CLAE, através do teste de recuperação..... 73

Tabela 18- Pequenas variações realizadas para a determinação da robustez do método..... 74

Tabela 19- Resultados do estudo das degradações forçadas obtidos através de método por CLAE..... 79

Tabela 20- Áreas absolutas das curvas padrão de ferro bisglicinado, obtidas através de CLAE, realizadas em três dias..... 80

Tabela 21- Análise da variância (ANOVA) das áreas obtidas por CLAE..... ANEXO

Tabela 22- Resultados experimentais da precisão intradia e entre dias do método por CLAE, aplicado a cápsulas de Fe-bis-gli..... 82

Tabela 23- Resultados experimentais da precisão intradia e entre dias do método por CLAE, aplicado à forma oral líquida de Fe-bis-gli..... 82

Tabela 24- Exatidão do método por CLAE, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções de cápsulas de Fe-bis-gli..... 83

Tabela 25- Exatidão do método por CLAE, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções da F.O.L de Fe-bis-gli..... 84

Tabela 26- Resultados do estudo de robustez do método por CLAE aplicado a cápsulas de Fe-bis-gli..... 85

Tabela 27- Resultados do estudo de robustez do método por CLAE aplicado à forma oral líquida de Fe-bis-gli..... 85

Tabela 28- Valores percentuais obtidos no doseamento das cápsulas de ferro bisglicinado por espectrofotometria no visível e CLAE..... 87

Tabela 29- Valores percentuais obtidos no doseamento da forma oral líquida de ferro bisglicinado por espectrofotometria derivada no visível e CLAE..... 87

Tabela 30- Análise comparativa dos métodos propostos por espectrofotometria no visível e CLAE utilizando Teste *t* de *Student*..... ANEXO

Tabela 31- Análise comparativa dos métodos propostos por espectrofotometria derivada no visível e CLAE utilizando Teste *t* de *Student*.... ANEXO

LISTA DE ABREVIATURAS

AF – Anemia ferropriva

ANOVA – Análise de variância

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – Detector de arranjo de fotodiodos

DPR – desvio padrão relativo

FDA – Food and Drug Administration

Fe-bis-gli - Ferro bisglicinado

F.O.L – Forma oral líquida

PAR - 4-(2-piridilazo) resorcinol

SQR – substância química de referência

TR – Tempo de retenção

USP – Farmacopéia Americana

UV – ultravioleta

VIS – visível

VIS-D^1 – espectrofotometria derivada na região do visível (1ª ordem)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. OBJETIVOS 5

2.1 Objetivos gerais 7

2.2 Objetivos específicos...... 7

3. REVISÃO..... 9

3.1 Anemia..... 11

3.1.1 Prevalência..... 12

3.1.2 Fatores de risco..... 12

3.1.3 Consequências..... 13

3.2 Importância do ferro..... 13

3.3 Ferro Bisglicinado..... 15

3.3.1 Tratamento da anemia ferropriva..... 15

3.3.2 Farmacocinética..... 16

3.3.3 Indicações e contra-indicações..... 17

3.3.4 Efeitos adversos - toxicidade..... 18

3.3.5 Doses e administração..... 18

3.3.6 Influência do ferro bisglicinado sobre outras vitaminas..... 18

3.4 Determinação quantitativa de Fe(II)..... 19

3.5 Referências..... 21

4. ANÁLISE QUALITATIVA..... 27

4.1 Introdução..... 29

4.2 Material e métodos..... 29

4.2.1 Matéria-prima e formas farmacêuticas..... 29

4.2.2 Caracterização da matéria-prima e análise qualitativa das formas farmacêuticas..... 30

4.2.2.1 Caracteres físicos..... 30

4.2.2.2 Solubilidade..... 30

4.2.2.3 Aquametria..... 30

4.2.2.3.1 Método volumétrico (método de Karl-Fischer)..... 30

4.2.2.3.2 Método Gravimétrico..... 31

4.2.2.4 Identificação..... 31

4.2.2.4.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)..... 31

4.2.2.4.2 Reações específicas..... 31

4.2.2.4.3 Espectroscopia de Mössbauer..... 32

4.3 Resultados e discussão..... 33

4.3.1 Caracteres físicos..... 33

4.3.2 Solubilidade..... 33

4.3.3 Aquametria..... 33

4.3.3.1 Método volumétrico por Karl-Fischer..... 33

4.3.3.2 Método Gravimétrico 34

4.3.4 Identificação..... 34

4.3.4.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)..... 34

4.3.4.2 Reações específicas..... 37

4.3.4.2.1 Reações específicas para Fe (II) e Fe(III)..... 37

4.3.4.3 Espectroscopia de Mössbauer..... 38

4.4 Referências..... 42

5. ANÁLISE QUANTITATIVA..... 43

5.1 Introdução..... 45

5.2 Validação do método quantitativo por espectrofotometria na região do visível e espectrofotometria derivada na região do visível..... 47

5.2.1 Material e métodos..... 47

5.2.1.1 Matéria-prima e formas farmacêuticas..... 47

5.2.1.2 Equipamento e condições experimentais 47

5.2.1.3 Solução de ortofenantrolina 48

5.2.1.4 Solução de ácido ascórbico..... 48

5.2.1.5 Especificidade..... 48

5.2.1.6 Linearidade..... 49

5.2.1.7 Precisão..... 50

5.2.1.7.1 Preparo da solução SQR 50

5.2.1.7.2 Preparo das amostras..... 50

5.2.1.8 Exatidão..... 52

5.2.1.8.1 Preparo da solução SQR 52

5.2.1.8.2 Preparo das soluções amostra 52

5.2.1.8.3 Preparo das soluções A, R1, R2, R3 e P..... 52

5.2.1.9 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)..... 54

5.2.2 Resultados e discussão..... 54

5.2.2.1 Reagente quelante ortofenantrolina..... 54

5.2.2.2 Espectrofotometria na região do visível para cápsulas 55

5.2.2.2.1 Especificidade..... 55

5.2.2.2.2 Linearidade..... 56

5.2.2.2.3 Precisão..... 57

5.2.2.2.4 Exatidão..... 58

5.2.2.2.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)..... 58

5.2.2.3 Espectrofotometria derivada na região do visível para forma oral líquida..... 59

5.2.2.3.1 Especificidade..... 59

5.2.2.3.2 Linearidade..... 60

5.2.2.3.3 Precisão..... 62

5.2.2.3.4 Exatidão..... 63

5.2.2.3.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)..... 64

5.3 Validação do método quantitativo por cromatografia líquida de alta eficiência..... 65

5.3.1 Material e métodos..... 65

5.3.1.1 Equipamento e condições cromatográficas..... 65

5.3.1.2 Reagentes..... 66

5.3.1.3 Solução PAR..... 66

5.3.1.4 Tampão fosfato..... 66

5.3.1.5 Estudos de validação..... 66

5.3.1.5.1 Especificidade/ estudos de degradação forçada..... 66

5.3.1.5.1.1 Preparo das soluções placebo..... 67

5.3.1.5.1.2 Degradação térmica..... 67

5.3.1.5.1.3 Degradação fotolítica..... 68

5.3.1.5.2 Linearidade..... 69

5.3.1.5.3 Precisão..... 69

5.3.1.5.3.1 Preparo da solução SQR 70

5.3.1.5.3.2 Preparo das amostras 70

5.3.1.5.4 Exatidão..... 72

5.3.1.5.4.1 Preparo da solução SQR 72

5.3.1.5.4.2 Preparo das soluções amostra..... 72

5.3.1.5.4.3 Preparo das soluções A, R1, R2, R3 e P..... 72

5.3.1.5.5 Robustez..... 73

5.3.1.5.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)..... 75

5.3.1.5.7 Adequabilidade do sistema cromatográfico..... 75

5.3.2 Resultados e discussão..... 75

5.3.2.1 Reagente quelante PAR / Reagente de pareamento iônico..... 76

5.3.2.2 Especificidade/ estudos de degradação forçada..... 76

5.3.2.2.1 Soluções placebo..... 77

5.3.2.2.2 Degradação Térmica / Degradação Fotolítica..... 78

5.3.2.3 Linearidade..... 79

5.3.2.4 Precisão..... 81

5.3.2.5 Exatidão..... 83

5.3.2.6 Robustez..... 84

5.3.2.7 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)..... 86

5.4 Análise estatística comparativa dos métodos..... 87

5.4.1 Comparação de métodos: VIS e CLAE..... 87

5.4.2 Comparação de métodos: VIS-D^2 e CLAE..... 87

5.5 Referências..... 88

6. CONCLUSÕES..... 91

ANEXOS

- Tabelas de resultados da análise estatística dos métodos quantitativos

- Tabelas de resultados da análise comparativa dos métodos quantitativos

- Artigo publicado

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a anemia ferropriva (AF) é a deficiência de micronutrientes mais prevalente no mundo, afetando populações de quase todos os países, inclusive os desenvolvidos, onde mais de dois bilhões de indivíduos sofrem dessa deficiência. Diversos estudos, em diferentes regiões do mundo, registraram a ocorrência da anemia como problema de saúde pública (UNICEF/MI, 2004). O UNICEF, em 2004, declarou que na maioria dos países em desenvolvimento a deficiência de ferro em crianças é mais a regra do que a exceção.

A Organização Panamericana de Saúde (OPAS) aponta o Peru como o país com maior prevalência de anemia em toda América Latina, seguido do Caribe (57%) e do Brasil com 35% de casos entre um e cinco anos de idade, correspondendo a um total de cinco milhões de crianças. No Brasil, os dados para prevalência de anemia variam de 22,7 a 77% conforme as diferentes regiões do país, sendo esta discrepância relacionada aos fatores socioeconômicos locais (DEVINCENZI *et al*, 2000; FERREIRA *et al*, 2002; CARABOLANTE & FERRIANE, 2003).

Os grupos populacionais mais atingidos são crianças de 4 a 24 meses de idade, escolares, adolescentes, gestantes e nutrizes (ACC/SCN, 2000). As altas necessidades de ferro desses grupos populacionais associadas à baixa biodisponibilidade desse mineral em grande parte dos alimentos de origem vegetal, à ocorrência de infecções e de infestações parasitárias, ao abandono precoce do aleitamento materno, à prematuridade e ao baixo peso ao nascer, tornam praticamente impossível suprir as necessidades deste mineral apenas através das dietas tradicionais (RODRIGUES, 1999).

Efeitos adversos como náuseas, constipação, dores abdominais e diarréia são apontados como os fatores principais para o abandono do tratamento com fármacos à base de sulfato ferroso. Formulações de ferro bisglicinado têm mostrado superior biodisponibilidade e maior adesão ao tratamento pela isenção de efeitos gastrintestinais (MOYA e ARDÖN, 2008).

Na literatura científica pesquisada constam trabalhos publicados sobre estudos de farmacocinética, segurança e eficácia terapêutica do Fe-bis-gli (ASHMEAD, 2001; ALLEN, 2002; STUIJVENBERG *et al*, 2006). Entretanto, não existem métodos oficiais (farmacopéicos) descritos para determinação qualitativa e quantitativa do fármaco.

Dessa forma, a validação de métodos analíticos, utilizados para avaliar a qualidade das preparações farmacêuticas de ferro bisglicinado, garante que se atendam às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; ICH 2005, USP 31, 2008), demonstrando a importância do desenvolvimento deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar, segundo normas da Internacional Conference on Harmonisation (ICH), métodos analíticos para o controle qualitativo e quantitativo do ferro bisglicinado em cápsulas e na forma oral líquida.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Determinação dos caracteres físicos, solubilidade e aquametria da matéria-prima de ferro bisglicinado;
- ✓ Identificação da matéria-prima mediante reações específicas para Fe(II) e Fe(III), espectroscopia de Mössbauer e espectrofotometria na região do infravermelho (IV);
- ✓ Identificação do Fe(II) nas formas farmacêuticas (cápsulas e forma oral líquida) através de reações específicas para Fe(II) e Fe(III) e espectroscopia de Mössbauer;
- ✓ Desenvolver e validar método por espectrofotometria no visível (VIS) para determinação quantitativa de ferro bisglicinado em cápsulas;
- ✓ Desenvolver e validar método por espectrofotometria derivada no visível (VIS-D) para determinação quantitativa de ferro bisglicinado na forma oral líquida (F.O.L);
- ✓ Desenvolver e validar método por CLAE para determinação quantitativa de ferro bisglicinado em cápsulas e na F.O.L.

3. REVISÃO

3.1 Anemia

A anemia é definida como a condição na qual o conteúdo de hemoglobina no sangue está abaixo do esperado, sendo evidenciada pela redução da qualidade ou quantidade de células vermelhas no sangue, como resultado da carência de um ou mais nutrientes essenciais, seja qual for a causa desta deficiência. A anemia ferropriva é apontada como a determinante causal principal da maioria dos casos de anemia, sendo considerada o estágio final de um longo período de balanço negativo do ferro. A deficiência de ferro e anemia ferropriva resulta do desequilíbrio no balanço entre a quantidade de ferro biodisponível absorvido na dieta e a necessidade do organismo, ou seja, quando o suprimento de ferro é insuficiente para a síntese normal de componentes que dependem deste mineral (COOK, 1983; OMS/OPAS, 2001). A Figura 1 apresenta o diagrama conceitual entre a relação de deficiência de ferro, anemia e anemia ferropriva em uma população hipotética.

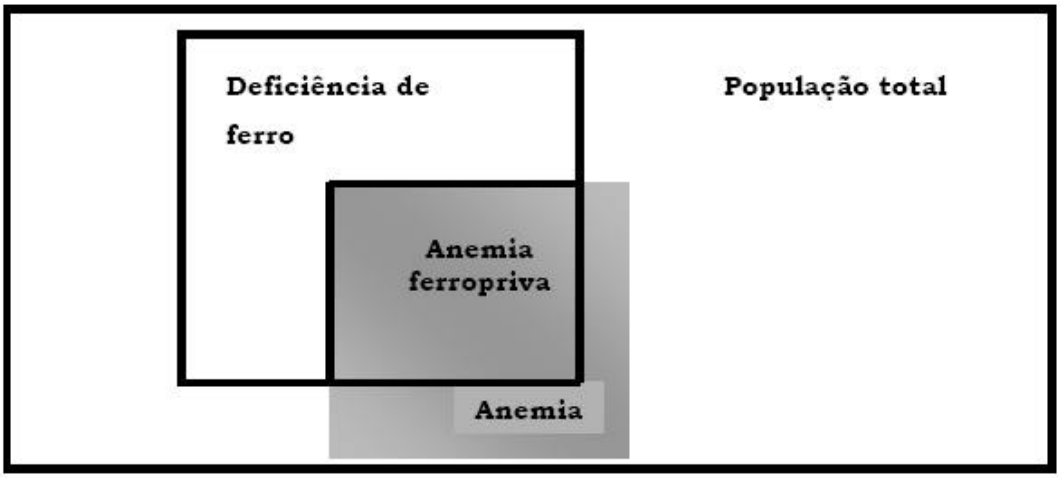

Figura 1. Diagrama conceitual da relação entre deficiência de ferro e anemia em população hipotética (WHO, 2001).

3.1.1 Prevalência

A deficiência de ferro é o mais comum e generalizado distúrbio nutricional do mundo, o qual atinge mais de dois bilhões de pessoas, (40% da população mundial) tanto em países subdesenvolvidos quanto em países desenvolvidos. Os principais grupos de risco para esta carência são as gestantes e crianças em idade pré-escolar (GILLESPIE, 1998).

A prevalência média entre os grupos populacionais específicos é estimada em:

- Mulheres grávidas, lactentes e crianças (1 – 2 anos)--- 50%
- Crianças em idade pré-escolar---25%
- Adolescentes---30-55%
- Não-gestantes---35%

Estes valores médios mascaram o fato de que a anemia por deficiência de ferro é ainda mais prevalente em algumas partes do mundo, especialmente na Índia e África onde, por exemplo, até 90% das mulheres se tornam anêmicas durante a gravidez (WHO, 2006).

3.1.2 Fatores de risco

Os principais fatores de risco para anemia por deficiência de ferro são: baixa ingestão de ferro heme (presente em carnes, aves e peixes); ingestão insuficiente de vitamina C (encontrada em frutas e hortaliças); pouca absorção de ferro devido a dietas ricas em fitatos (presentes em legumes e cereais) e compostos fenólicos (encontrados, por exemplo, no café e nos chás); maiores necessidades de ferro em períodos de crescimento e durante a gravidez; grandes

perdas sanguíneas resultantes do período menstrual, infecções e parasitoses (WHO, 2001).

Torna-se relevante comentar que a deficiência de outros micronutrientes como a vitamina A, a vitamina B12, o folato e a riboflavina também diminui a concentração de hemoglobina, aumentando o risco de desenvolvimento da anemia ferropriva (ALLEN e CASTERLINE-SABEL, 2000)

3.1.3 Consequências

As consequências da anemia incluem alterações na capacidade de trabalho físico, prejuízos no desenvolvimento mental e psicomotor das crianças, aumento da mortalidade materna e infantil, baixo peso da criança ao nascer, parto prematuro e redução da resistência às infecções. A anemia ferropriva também altera a função tireoidiana, a produção e o metabolismo das catecolaminas e de outros neurotransmissores, além de aumentar, nos indivíduos anêmicos a capacidade de absorção de metais pesados tóxicos (WHO, 2001; OLIVARES e WALTER, 2003; TUMA *et al*., 2003).

3.2 Importância do Ferro

O ferro é um mineral vital para a homeostase celular. É necessário em pequenas quantidades e disponível na dieta, principalmente em vegetais verdes, trigo, coração, fígado, gema de ovo e carne (FUCHS e WANNMACHER, 1998). Apesar de a maioria do ferro do organismo se encontrar na hemoglobina, ele também é armazenado em diferentes tecidos, tanto na forma de ferritina como de hemossiderina. A ferritina encontra-se presente em praticamente todas as células do organismo, assim como em fluidos biológicos; a hemossiderina é uma molécula hidrofóbica que está presente, em sua maioria, no sistema fagocítico mononuclear (monócitos e macrófagos da medula óssea, fígado e baço). A mioglobina,

constituída por um grupo heme ligado a uma cadeia polipeptídica, está presente em pequenas quantidades em todas as células dos músculos esqueléticos e cardíaco e contém cerca de 300mg do total de ferro do organismo humano. Ademais, o ferro está presente nos diferentes tecidos na forma de citocromos e de outras enzimas que contém ferro (ZAGO *et al*., 2001). A Figura, a seguir, ilustra a distribuição do ferro no organismo.

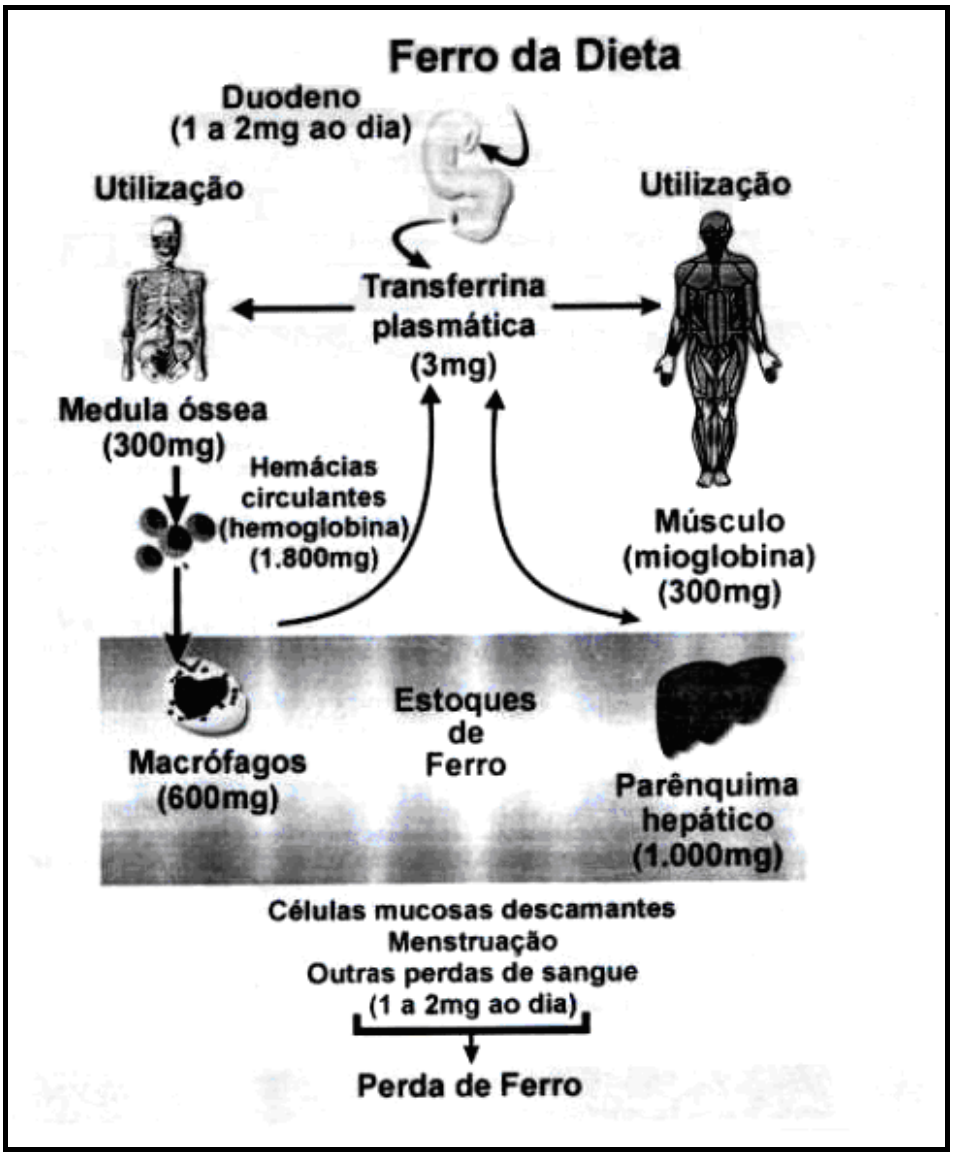

Figura 2. Distribuição do ferro no homem adulto (ZAGO *et al*., 2001).

As necessidades de ferro são determinadas por perdas fisiológicas obrigatórias e pelas exigências impostas pelo crescimento. Desta forma, o homem adulto precisa em torno de 1,0 mg de ferro por dia, a mulher que menstrua requer 2,0 mg por dia, já nos últimos três meses de gestação e em bebês a exigências aumentam para 5,0 a 6,0 mg diários (GOODMAN e GILMAN, 2003).

3.3 Ferro Bisglicinado

Ferro bisglicinado consiste de uma molécula de Fe^{2+} covalentemente ligada a duas moléculas de glicina (Fig. 3). O Fe^{2+} liga-se ao grupo carboxil e ao grupo amino da glicina por ligações coordenadas covalentes, formando dois anéis heterocíclicos (ATKINS e BERAN, 1992; MCMURRY e FAY, 1995).

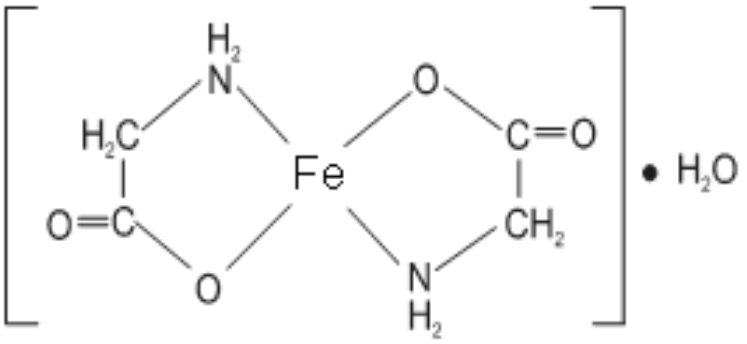

Figura 3. Fórmula estrutural do ferro bisglicinado

3.3.1 Tratamento da anemia ferropriva

Em geral, os sais de ferro (sulfato ferroso, fumarato ferroso) são pobremente absorvidos e grandemente afetados pela dieta consumida. Estudos

têm mostrado que a biodisponibilidade do Fe-bis-gli é de duas a quatro a encontrada para o sulfato ferroso, fato esse que justifica sua eficácia no tratamento da anemia ferropriva (BOVELL-BENJAMIN *et al*., 2000; LAYRISSE *et al.,* 2000; OLIVARES e PIZARRO, 2001).

A proporção 1:2 (metal: ligante) limita a reação com inibidores da absorção do ferro, neutraliza a valência do íon ferroso e protege a superfície gastrintestinal da irritação causada pelo ferro. Essa proteção da mucosa gástrica confere maior adesão ao tratamento da anemia ferropriva por não causar efeitos adversos como náuseas, constipação, dores abdominais e diarréia, comumente observados pela administração de outros compostos à base de ferro (JEPPSEN, 2001; ALLEN, 2002; MOYA e ARDÓN, 2008).

3.3.2 Farmacocinética

O ferro é um constituinte normal da dieta e do corpo e sua absorção pelo trato gastrintestinal vai depender de sua apresentação na forma heme ou não-heme. O ferro-heme, obtido de alimentos de origem animal, é facilmente absorvido pela mucosa intestinal com pouca interferência de fatores dietéticos (INACG, 1993; IOM, 2001). Já o ferro não-heme, derivado de hortaliças e produtos lácteos, tem sua absorção grandemente afetada pela presença de interferentes alimentícios como ácido ascórbico, fitatos e polifenóis (COOK *et al*., 1972; INACG, 1993; IOM, 2001; MACPHAIL, 2001).

A estabilidade do quelato ferro bisglicinado faz com que ele não sofra hidrólise ao passar pelo pH ácido estomacal. Ao chegar à luz intestinal é absorvido intacto pela via dos dipeptídeos, sendo posteriormente hidrolisado na mucosa intestinal em seus respectivos componentes ferro e glicina (ASHMEAD, 2001). Após a hidrólise, o organismo regula a distribuição do ferro pelo organismo para evitar excesso e toxicidade. Ele é distribuído, através de ligação à transferrina, para fazer parte de proteínas como hemoglobina e mioglobina, armazenamento na

forma de ferritina e hemossiderina, além de estar presente em diferentes tecidos na forma de citocromos e enzimas que contém ferro (IOM, 2001; MACPHAIL, 2001). Já a glicina é utilizada normalmente em processos metabólicos, sendo essencial na biossíntese de ácidos nucléicos, aminoácidos, assim como proteínas, colágeno e elastina (LODISH et al., 1995; SILVERTHORN, 1998).

Estudos evidenciam que a absorção de ferro a partir de ferro bisglicinado é regulada fisiologicamente pelas reservas daquele no organismo (BOVELL-BENJAMIN *et al*., 2000; ASHMEAD, 2001; LYNCH *et al*., 2007). A biodisponibilidade do ferro a partir de solução aquosa de ferro bisglicinado foi estudada em um grupo de 14 mulheres não-grávidas, saudáveis, com idades entre 27 e 51 anos. A biodisponibilidade obtida para a solução aquosa de ferro bisglicinado foi de 34,6% para mulheres com reservas normais de ferro e 46,3% nas voluntárias com baixas reservas de ferro (baixos valores séricos de ferritina). A correlação inversa entre valores séricos de ferritina e absorção de ferro bisglicinado sugere a regulação da absorção de ferro pelas reservas desse mineral (OLIVARES e PIZARRO, 2001).

3.3.3 Indicações e contra-indicações

O ferro bisglicinado possui eficácia clínica não só no tratamento e prevenção de anemia ferropriva, mas também em casos de baixa resistência imunológica, déficit de crescimento, déficit de desenvolvimento mental, fadiga e suplementação para atletas. Está contra-indicado para pessoas com hemocromatose e hemossiderose. Pessoas com antecedentes de doenças renais, intestinais, úlcera péptica, enterite, colite, pancreatite, hepatite e doenças cardíacas devem procurar um médico antes de iniciar a suplementação com ferro (ALBITECH, 2002).

3.3.4 Efeitos adversos – toxicidade

Segundo estudos de toxicidade realizados por JEPPSEN (2001), não foram observados efeitos adversos para administrações de ferro bisglicinado até a concentração de 500 mg/ kg de rato. Os efeitos adversos encontrados para doses acima desse valor foram: postura curvada, hipoatividade, hipotermia, prostração, má coordenação e diarréia.

3.3.5 Doses e administração

Ferro bisglicinado é utilizado no tratamento da anemia ferropriva em adultos e crianças acima de três anos na dose de 30 mg por dia durante 4 - 6 semanas. Para as gestantes com anemia ferropriva as doses recomendadas são de 60 mg por dia, considerando-se a necessidade de 30 mg para as necessidades basais, acrescida de 30 mg para o desenvolvimento fetal. Para crianças menores de três anos utilizam-se doses de 3 mg Fe/kg/dia. A dose profilática é de 5 mg Fe/dia ou 30 mg Fe/semana (ALBITECH, 2002).

3.3.6 Influência do ferro bisglicinado sobre vitaminas

Segundo dados da literatura a adição de ferro bisglicinado a preparações multivitamínicas não afeta a estabilidade das vitaminas. A estabilidade das vitaminas e de minerais foi testada em estudo que durou 17 meses, no qual a uma preparação multivitamínica contendo as vitaminas A, B, C, D e E, foram adicionados aminoácidos quelados à base de ferro, cobre, manganês e zinco (ASHMEAD & ASHMEAD, 1995). A estabilidade foi demonstrada pela falta de interação entre os metais aminoácido-quelados e qualquer um dos componentes das cápsulas, incluindo as vitaminas, que mantiveram, durante os estudos, níveis especificados pela Farmacopéia Americana.

3.4 Determinação quantitativa de Fe(II)

Não foram encontrados métodos para determinação do ferro bisglicinado em formas farmacêuticas. Entretanto, a literatura apresenta alguns trabalhos relativos à determinação de Fe(II), através da formação de quelatos com determinados reagentes, por espectrofotometria na região do visível e por cromatografia líquida de alta eficiência (Tabelas 1 e 2). Esses trabalhos auxiliaram na escolha do reagente quelante mais apropriado para os métodos desenvolvidos neste trabalho.

Tabela 1 - Determinação de Fe(II) por espectrofotometria no VIS.

QUANTIFICAÇÃO	DETECÇÃO	l	REFERÊNCIAS
Ferro (II) em multivitamínicos	Detecção do ferro (II) através da reação com derivados do Pirocatecol	490 nm 560 nm 600 nm	ZAREBA & HOPKALA, 1995
Zinco (II), manganês (II) e ferro (II) em preparações farmacêuticas	Intensa coloração devido à reação do ferro (II) com reagente cromogênico 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR)	499 nm 539 nm 537 nm	KARPINSKA & KULIKOWSKA , 2002
Ferro (II) e ferro total em produtos farmacêuticos	Formação de complexo com cor devido à reação do ferro (II) com 1,10-fenantrolina	512 nm	TESFALDET et al., 2004

Tabela 2 - Determinação de Fe(II) por CLAE.

COLUNA	FASE MÓVEL	QUANTIFICAÇÃO	DETECÇÃO	REFERÊNCIAS
Microsorb® C_{18}	Metanol: água: Acetonitrila (60:39:1)	Cobalto (II), Cobalto (III), Ferro (II) em preparações farmacêuticas	270 nm	KHUHAWAR & LANJWANI, 1994
Microsorb® C_{18}	Acetonitrila: água (40:60) contendo 10^{-2} brometo de tetrabutilamônio e 10^{-3} M tampão fosfato	Ferro (II), cobalto (II) e níquel (II) através de quelação com 2-(2-piridilazo)-1-naftol (PAN)	400-800 nm	NIWA et al., 1997
C_{18}	Metanol: água (60:40)+ 0,02M bromidrato de tetrametilamônio	Ferro (II), Cobre (II) por quelação com 4,7-difenil-1,10 fenantrolina dissulfonato	280nm	MUDASIR et al., 1997
C_{18}	Metanol:água:acetonitrila (80:18:2)	Ferro, cobalto, cobre e platina em preparações farmacêuticas utilizando reagente complexante salicilaldeído tetrametiletilenodiamina (BIS)	270 nm	KHUHAWAR & LANJWANI, 1998
Peek C_{18}	Acetonitrila: água (90:10)	Ferro (II) e ferro (III) em água através de quelação com 2-(5-Bromo-2piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP)	555 e 585 nm	OSZWALDOWSKI & AGNIESZKA, 2002
X Terra MS C_{18}	Tampão Tris-HCl: acetonitrila (gradiente)	Ferro total em matrizes biológicas através de quelação com desferrioxamina (DFO)	214 e 430 nm	TESORO et al., 2005
Novapack RP-C_8	Acetonitrila e solução tampão (35:65) + 1% Trietilamina	Ferro (II) e ferro (III) em preparações farmacêuticas através do complexo de inclusão entre Terpy e ciclodextrinas	318 e 552nm	MYTIDES et al., 2006

3.5 Referências

ACC/SN Administrative Committee on Coordination, Sub-Committee on Nutrition. *Fourth report on the World Nutrition Situation: nutrition throughout the life cycle*. Geneva: ACC/SCN in collaboration with IFPRI, 2000.

ALBITECH Nutritionals. Ferrochel® (ferro bisglicinado quelado), 2002. Disponível em <http://www.mase.com.br/pdf/LAMINAS_Ferro.pdf. Acesso em: 20.02.2009.

ALLEN, L. H; CASTERLINE-SABEL, J. E. Prevalence and causes of nutritional anemias. In: Ramakrishnan U, ed. *Nutritional Anemias*. Boca Raton, FL, CRC Press, 2000: p. 17–21.

ALLEN, L. H. Advantages and limitations of iron amino acid chelates as iron fortificants. *Nutrition Reviews,* v. 60, p. S18–S21, 2002.

ASHMEAD, S. D. The chemistry of ferrous bis-glycinate chelate. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 51, p. 7–12, 2001.

ASHMEAD, H.; ASHMEAD, S. Albion research: Past, present and future. *Proceedings of the Albion Laboratories, Inc. International Conference on Human Nutrition.* January 21–22, Salt Lake City, Utah, USA, pp. 1–8, 1995.

ATKINS, P. W; BERAN, J. A. *General chemistry*, 2nd Ed., Annotated instructor's version. New York: WH Freeman, 1992. p. 804–809.

BOVELL-BENJAMIN, A. C.; VITERI, F. E; ALLEN, L. H. Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. *American Journal of clinical nutrition*, v. 71, p. 1563–1569, 2000.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

CARABOLANTE A. C.; FERRIANE, M. G. C. O crescimento e desenvolvimento de crianças na faixa etária de 12 a 48 meses em creches na periferia da cidade de Ribeirão Preto, SP. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 5, p. 28-34, 2003.

COOK, J. D.; LAYRISSE, M.; MARTINEZ-TORRES, C.; WALKER, R.; MONSEN, E. R; FINCH, C. A. Food iron absorption measured by an extrinsic tag. *Journal of Clinical Investigation,* v. 51, p. 805–815, 1972.

COOK, J. D. Determinants of non-heme iron absorption in man. *Food technology*, v. 198, p. 124-126, 1983.

DEVINCENZI, M. U.; RIBEIRO, L. C.; SIGULEM, D. M. Anemia ferropriva na primeira infância. *Compacta*-Temas em Nutrição e Alimentação, v. 1, p. 5-17, 2000.

FERREIRA, S.H.; ASSUNÇÃO, M.L.; VASCONCELOS, V.S.; MELO, F.P. Saúde de populações marginalizadas: desnutrição, anemia e enteroparasitoses em crianças de uma favela do "Movimento dos Sem Teto". *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 2, p.177-185, 2002.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia Clínica-Fundamentos da Terapêutica Racional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 493-495.

GILLESPIE, S. Major issues in the control of iron deficiency. New York: The micronutrient initiative/ United Nations Children´s Fund, 1998. 104 p.

GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1647 p.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Harmonised Tripartite Guideline. *International Conference on Harmonization*, 2005.

INACG- International Nutritional Anemia Consultative Group. Iron EDTA for food fortification. Washington: Nutrition Foundation Inc, 1993.

IOM - Institute of Medicine. Food and nutrition board, dietary reference intakes for vitamin A, Vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington: National Academy Press, 2001. p. 290–393.

JEPPSEN, R. B. Toxicology and safety of ferrous bisglycinate chelate and other iron amino acid chelates. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, v. 51, p. 26–34, 2001.

KARPINSKA, J.; KULIKOWSKA, M. Simultaneous determination of zinc (II), manganese (II) and iron (II) in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis*, v. 29, p. 153-158, 2002.

KHUHAWAR, M. Y; LANJWANI, S. N. High-performance liquid chromatographic separation and determination of cobalt (II), cobalt (III) and iron (II) using bis(salicylaldehyde)tetramethylethylenediimine. *Journal of Chromatography A*, v. 695, p. 132-135, 1994.

KHUHAWAR, M. Y; LANJWANI, S. N. High-performance liquid chromatographic separation and UV determination of cobalt, copper, iron and platinum in pharmaceutical preparations using BIS (isovalerylacetone)ethylenediimine as complexing reagent. *Mikrochimica Acta*, v. 129, p. 65-70, 1998.

LAYRISSE, M.; GARCÍA-CASAL, M. N.; SOLANO, L.; BARÓN, M. A.; ARGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMÍREZ, J.; LEETS, I.; TROPPER, E. *Journal of Nutrition*, v. 130, p. 2195–2199, 2000.

LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P; DARNELL, J. Molecular Cell Biology, 3rd Ed. New York: Scientific American Books, 1995. p. 54, 966–967; 1128.

LYNCH, M. F; GRIFFIN, I. J; HAWTHORNE, K. M; CHEN, Z.; HAMZO, M. G.; ABRAMS, S. A. Iron absorption is more closely related to iron status than to daily iron intake in 12- to 48 –Mo-old children. *The journal of nutrition*, v. 137, p. 88-92, 2007.

MACPHAIL, A. P. Iron deficiency and the developing world. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 51, p. 2–6, 2001.

MCMURRY, J; FAY, R. C. *Chemistry*. New Jersey: Prentice Hall, 1995. p. 812–817.

MOYA, A.; ARDÓN, S. J. S. Estudio Comparativo de hierro aminoquelado vs sulfato ferroso más ácido fólico en el tratamento de anemia ferropénica en el embarazo. *Revista Médica de los Post Grados de Medicina*, v. 11, p. 42-48, 2008.

MUDASIR; ARAI, M.; YOSHIOKA, N.; INOUE, H. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of iron (II) and copper (II) chelates with 4,7 diphenyl-1,10-phenanthroline disulfonate. *Journal of Chromatography A*, v. 799, p. 171-176, 1997.

MYTIDES, P.; ROZOU, S.; BENAKI, D.; VYZA, E. A. 2,2': 6', 2''-Terpyridine[hydroxypropyl-cyclodextrin] 1:3 complex used as chelating agent for the determination of iron with a sensitive, selective and fast liquid chromatographic method. *Analytica Chimica Acta*, v. 566, p. 122-129, 2006.

NIWA, H. N.; YASUI, T.; YUCHI, A.; YAMADA, H.; WADA, H. Reversed-phase ion-pair high-perfomance liquid chromatography of metal chelates with sulfonated 2-(2-pyridylazo)-1-naphthols. *Analytical Sciences*, v. 13, p. 137-140, 1997.

OLIVARES, M.; PIZARRO, F. Bioavailability of iron bis-glycinate chelate in water. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 51, p. 22–25, 2001.

OLIVARES G. M.; WALTER K. T. Consecuencias de la deficiencia de hierro. *Revista Chilena de Nutrición*, v. 30, n.3, p.226-233, 2003.

OMS/OPAS. Iron fortification: Guidelines and Recommendations for Latin America and the Caribbean, Washington, 2001. Disponível em <http:// www.who.int/topics/anaemia/en>. Acesso em 25.2.2009.

OSZWALDOWSKI, A.; AGNIESZKA, P. Reversed-phase liquid chromatographic simultaneous determination of iron (III) and iron (II) as complexes with 2-(5- bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. Determination of iron (III) and iron (II) in water samples and ultrasound field effect on distribution of iron (III) and iron (II) in micellar solution. *Talanta*, v. 58, p. 773-783, 2002.

RODRIGUES, J. E. F. G. Ferro e Anemia Ferropriva. *Albitech Nutritionals*, 1999. Disponível em <http: // www.albitech.com.br> .Acesso em 20.03.2009.

SILVERTHORN, D. U. Human Physiology*: An* Integrated Approach. New Jersey: Prentice Hall, 1998. p. 226; 250.

STUIJVENBERG, M. E.; SMUTS, C. M.; WOLMARANS, P.; LOMBARD, C. J.; DHANSAY, M. A. The efficacy of ferrous bisglycinate and electrolytic iron as fortificant in bread in iron-deficient school children. *British Jounal of Nutrition*, v. 95, p. 532-538, 2006.

TESFALDET, Z. O.; STADEN, J. F.; STEFAN, R. I. Sequential injection spectrophotometric determination of iron as Fe (II) in multi-vitamin preparations using 1,10-phenantroline as complexing agent. *Talanta***,** v. 64, p. 1189-1195, 2004.

TESORO, A.; NOVAKOVIC, J.; THIESSEN, J. J.; SPINO, M. Validated HPLC assay for iron determination in biological matrices based on ferrioxamine formation. *Journal of chromatography B*, v. 823, p. 177-183, 2005.

TUMA, R. B.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; MARQUES, H. O. Impacto da farinha de mandioca fortificada com ferro aminoácido quelato ao nível de hemoglobina de pré-escolares. *Revista de Nutrição*, v. 16, n.1, p.29-39, 2003.

UNICEF/ MI. Vitamin & mineral deficiency: a global progress report. Ottawa, New York: UNICEF/MI, 2004. Disponível em < http:// www.micronutrient.org/reports/reports/Full_e.pdf >. Acesso em 25.02.2009.

USP. Validation of Compendial Methods <1225> *The United States Pharmacopoeia*. 31th. ed. Rockville: Unites States Pharmacopoeial Convention, p. 683-687, 2008.

WHO- World Health Organization. Iron Deficiency Anaemia. Assessment, Prevention and Control. Geneva: WHO, 2001. Disponível em < http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/WHO_NHD_01.3/en/index.html >. Acesso em 15.1.2009.

WHO- World Health Organization. Guidelines on food fortification with micronutrients, 2006. Disponível em < http://www.who.int/nutrition/publications/guide_food_fortification_micronutrients.pdf >. Acesso em 25.2.2009.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. Hematologia-Fundamentos e Aplicação. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. 214 p.

ZAREBA, S.; HOPKALA, H. Spectrophotometric determination of Fe (II) in pharmaceutical multivitamin preparations by azo dye derivatives of pyrocatecol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 14, p.1351-1354, 1995.

4. ANÁLISE QUALITATIVA

4.1 Introdução

A pureza das substâncias de referência é de fundamental importância para a validação de métodos analíticos. De acordo com o FDA, existem duas categorias de substâncias de referência: compendiais e não compendiais. As substâncias de referência compendiais são aquelas adquiridas comercialmente de fontes como a USP e não necessitam de caracterização posterior. As substâncias de referência não compendiais são aquelas com elevado teor de pureza, entretanto necessitam ser cuidadosamente caracterizadas (SWARTZ e KRULL, 1998). Métodos adequados de identificação são de fundamental importância, pois permitem caracterizar a substância utilizada como referência.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Matéria-prima e formas farmacêuticas

Utilizou-se como SQR a matéria-prima de ferro bisglicinado, com teor declarado de 22,1% de ferro, identificado pelo lote n° 00495/2006, fornecida pelo Laboratório Saúde LTDA (Brasil). Foram utilizadas as seguintes formas farmacêuticas: - cápsulas contendo 30 mg de ferro bisglicinado, manipuladas em farmácia magistral, lote 427303, fabricação 12/03/2008 e validade 10/06/2008. Os excipientes presentes são: amido e aerosil; - forma oral líquida (F.O.L) contendo 2mg/mL de ferro bisglicinado, gentilmente doado pelo fabricante, lote 00076/2007, fabricação 03/2007 e validade 03/2009. Demais componentes da fórmula: cloridrato de piridoxina, nicotinamida, citrato de cafeína, ácido cítrico e veículo* (* = corante Bordeaux, sacarose, metilparabeno, sacarina sódica, sorbitol e água).

4.2.2 Caracterização da matéria-prima e análise qualitativa das formas farmacêuticas

4.2.2.1 Caracteres físicos

A substância química de referência foi avaliada sensorialmente quanto ao aspecto, cor e odor.

4.2.2.2 Solubilidade

O ensaio de solubilidade foi realizado conforme descrito na F. Bras. IV (1988). Os solventes utilizados foram água, metanol, etanol, acetato de etila, NaOH 0,1M e HCl 0,1M. O teste de solubilidade foi conduzido à temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Adicionaram-se volumes crescentes de cada solvente sobre o fármaco, mediante agitação, até a sua completa solubilização. A classificação de solubilidade foi determinada de acordo com a F. Bras.IV (1988).

4.2.2.3 Aquametria

Foram testados e comparados os resultados dos dois métodos descritos a seguir.

4.2.2.3.1 Método volumétrico (método de Karl-Fischer)

O equipamento utilizado foi o DL 37 Mettler Toledo, com detecção coulométrica do ponto final. Pesaram-se exatamente cerca de 150 mg da substância em cada análise. Determinou-se o teor de água em triplicata, e em três

dias diferentes. Paralelamente, procedeu-se um ensaio em branco, com a finalidade de descontar o volume de titulante correspondente à água presente no ar do ambiente de análise.

4.2.2.3.2 Método Gravimétrico

Conforme o procedimento geral descrito na F. Bras IV (1988) para a determinação da perda por dessecação, cada ensaio foi efetuado por secagem em estufa até peso constante. Determinou-se o teor de água da matéria-prima em triplicata, e em três dias diferentes.

A condição que forneceu resultados reprodutíveis e coerentes com o método volumétrico foi 150 °C por 3 horas.

4.2.2.4 Identificação

4.2.2.4.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

O espectro de infravermelho da matéria-prima de ferro bisglicinado foi obtido através da dispersão da mesma em brometo de potássio e posterior obtenção da pastilha. Foi utilizado espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu FTIR 8101.

4.2.2.4.2 Reações específicas

As reações para identificação de Fe^{2+} e Fe^{3+} foram realizadas para matéria-prima e formas farmacêuticas (DUNBAR e HEINTZ, 1997; USP 31, 2008).

Reações específicas para Fe(II)

- Fe(II) com ferrocianeto de potássio forma precipitado azul escuro, insolúvel em HCl, mas decomposto por NaOH. $3\ K_4Fe(CN)_6$

$$3Fe^{2+} + 2[\ Fe(CN)_6\ ]^{-3} \rightarrow Fe_3\ [\ Fe(CN)_6\ ]_2(s)$$

- Fe(II) com hidróxido de sódio forma precipitado verde-esbranquiçado; a cor desse precipitado, com agitação, muda rapidamente para verde e depois para marrom.

$$Fe^{2+} + 2OH^- \rightarrow Fe\ (OH)_2(s)$$

Reações específicas para Fe(III)

- Fe(III) com excesso de hidróxido de sódio produz precipitado marrom-avermelhado de hidróxido férrico.

$$Fe^{3+} + 3OH^- \rightarrow Fe\ (OH)_3(s)$$

- Fe(III) com tiocianato de amônio forma cor vermelha intensa não destruída por ácidos minerais.

$$Fe^{3+} + SCN^- \rightarrow Fe\ (SCN)^{2+}$$

4.2.2.4.3 Espectroscopia de Mössbauer

O experimento de espectroscopia de Mössbauer para identificação da matéria-prima e formas farmacêuticas foi realizado no Instituto de Física (UFRGS). Os espectros de Mössbauer foram obtidos através de espectrômetro de

aceleração constante, utilizando fonte radioativa ^{57}Co em matriz Rh, com atividade inicial de 50mCi na geometria de transmissão. A velocidade foi calibrada com uma lâmina de ferro metálico e o deslocamento isomérico foi medido em relação ao ferro metálico. Os espectros foram ajustados pelo método dos mínimos quadrados, supondo linhas lorentzianas; as medidas foram realizadas à temperatura ambiente (298K).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracteres físicos

O fármaco apresenta-se como pó fino, de cor cinza-esverdeado e cheiro levemente metálico.

4.3.2 Solubilidade

O fármaco apresentou-se muito solúvel em água, pouco solúvel em hidróxido de sódio 0,1 M e ácido clorídrico 0,1 M e insolúvel em metanol, etanol, acetato de etila.

4.3.3 Aquametria

4.3.3.1 Método Volumétrico por Karl-Fischer

O valor encontrado para o teor médio de água durante os três dias de análise foi de 5,95%, com DPR de 0,93%.

4.3.3.2 Método Gravimétrico

O teor médio de água encontrado pelo método gravimétrico (5,97%), com DPR de 1,19%, está em concordância com o obtido pelo método de Karl Fischer.

4.3.4 Identificação

4.3.4.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A espectrofotometria na região do infravermelho fornece uma impressão digital, única para cada composto. Quase todos os compostos que possuem ligações covalentes, sejam inorgânicos ou orgânicos, absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região dos raios infravermelho do espectro eletromagnético. Certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente do tipo de molécula. No entanto, considerando duas moléculas, com o mesmo grupamento, em cada estrutura a mesma ligação estará em ambiente diferente, não havendo possibilidade de duas moléculas terem o mesmo espectro de infravermelho. Por essa razão, é um dos métodos mais empregados para identificação de fármacos, pois é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais (PAVIA *et al.*, 2001; WATSON, 2005).

Até o momento, o espectro infravermelho do ferro bisglicinado não foi localizado na literatura. Dessa forma, com o objetivo de identificação da matéria-prima, foram observados e comparados os espectros de infravermelho do aminoácido glicina e do ferro bisglicinado.

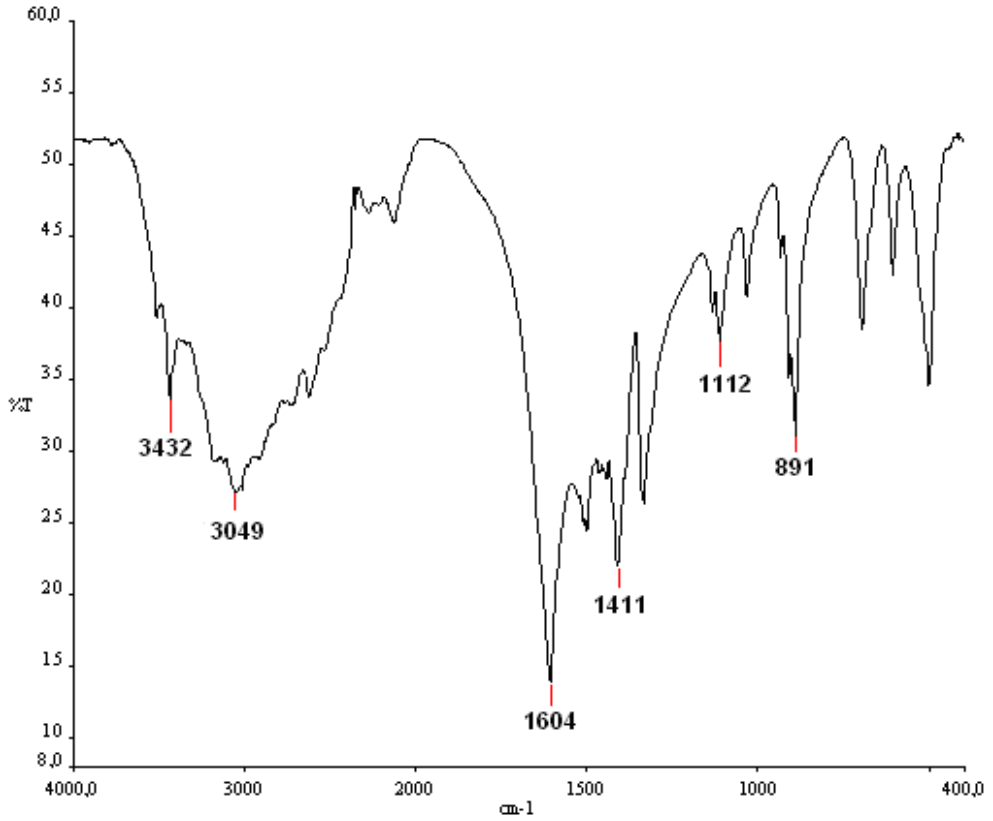

Figura 4. Espectro na região do IV do aminoácido glicina.

Tabela 3 - Frequências de absorção das principais bandas no IV e suas respectivas atribuições para o aminoácido glicina.

Frequência (cm^{-1})	Atribuições
3432	Deformação axial N-H[a]
3049	Deformação axial O-H[a]
1604	Deformação axial de C=O do ácido carboxílico[d]
1411	Deformação angular de CH_2[c]
1112	Deformação axial C-O[b]
891	Deformação axial C-C-N[d]

[a](PAVIA *et al.*, 2001), [b](SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000), [c] (NAKANISHI e SOLOMON, 1977), [d](NAKAMOTO, 1997).

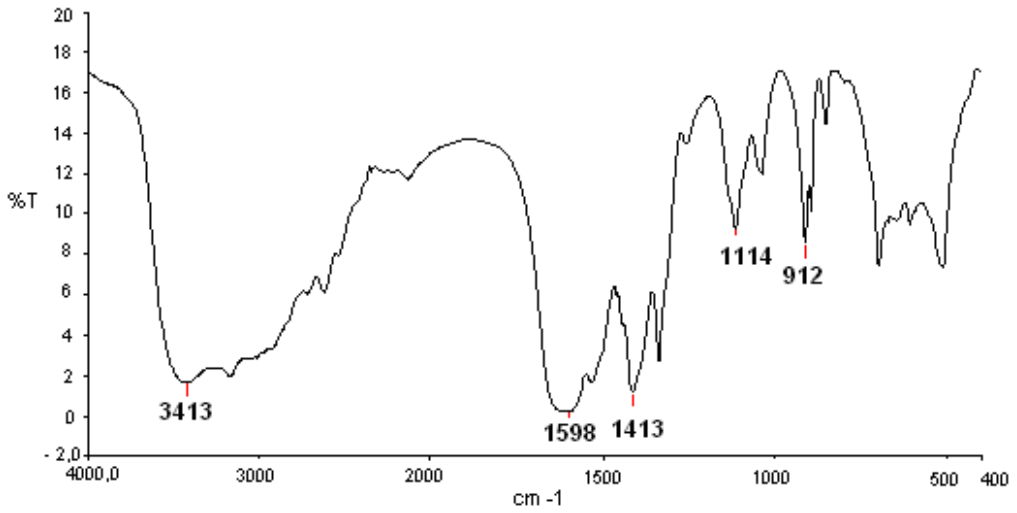

Figura 5. Espectro na região do IV de ferro bisglicinado.

Tabela 4 - Freqüências de absorção das principais bandas no IV e suas respectivas atribuições para o ferro bisglicinado.

Frequência (cm^{-1})	Atribuições
3413	Deformação axial N-H[a]
1598	Deformação axial de C=O do ânion carboxilato[d]
1413	Deformação angular de CH_2[c]
1114	Deformação axial C-O[b]
912	Deformação axial C-C-N[d]

[a](PAVIA *et al.*, 2001), [b](SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000), [c] (NAKANISHI e SOLOMON, 1977), [d](NAKAMOTO, 1997).

Através do espectro de IV da glicina se observa em 3432 cm^{-1} a deformação axial do N-H de aminas primárias, enquanto que em 3049 cm^{-1} a deformação axial referente à ligação O-H. Em 1604 cm^{-1} é possível observar a banda atribuída a deformação axial de C=O do ácido carboxílico, enquanto que em 1411 cm^{-1} refere-se à deformação angular de CH_2. As bandas de deformação axial de C-O e C-C-N aparecem em 1112 cm^{-1} e em 891 cm^{-1}, respectivamente. Analisando o espectro IV do ferro bisglicinado observa-se em 3413 um alargamento da banda referente à deformação axial de N-H, possivelmente por se tratar de amina substituída que faz parte da constituição do quelado. Em 1598 cm^{-1} é possível observar a banda atribuída a deformação axial de C=O do ânion carboxilato, enquanto que em 1413 cm^{-1} refere-se à deformação angular de CH_2. As bandas de deformação axial de C-O e C-C-N aparecem em 1114 cm^{-1} e em 912 cm^{-1}, respectivamente.

4.3.4.2 Reações específicas

4.3.4.2.1 Reações específicas para Fe (II) e Fe(III)

Os resultados para identificação de Fe(II) e Fe(III) na matéria-prima e formas farmacêuticas de ferro bisglicinado estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Reações para identificação de Fe(II).

Reação	Resultado
Fe^{+2} com Ferrocianeto de potássio forma precipitado azul escuro/ insolúvel HCl/ decomposto em NaOH	SQR ⇒ positivo Cápsulas ⇒ positivo FOL ⇒ positivo
Fe^{+2} com hidróxido de sódio forma precipitado verde esbranquiçado→ verde→marrom	SQR ⇒ positivo Cápsulas ⇒ positivo FOL ⇒ positivo

Tabela 6. Reações para identificação de Fe(III).

Reação	Resultado
Fe^{+3} com Ferrocianeto de potássio forma precipitado azul escuro	SQR ⇒ positivo Cápsulas ⇒ positivo FOL ⇒ positivo
Fe^{+3} com excesso hidróxido de sódio forma precipitado marrom avermelhado	SQR ⇒ negativo Cápsulas ⇒ negativo FOL ⇒ negativo
Fe^{+3} com tiocianato de amônio forma cor vermelha profunda (intensa) não destruída por ácidos minerais	SQR ⇒ negativo Cápsulas ⇒ positivo FOL⇒ negativo

Os testes oficiais de identificação para Fe(II) e Fe(III) são técnicas simples e que podem ser aplicadas ao controle de qualidade da matéria-prima e formas farmacêuticas que contêm ferro.

As duas reações de identificação de Fe(II), descritas na Tabela 5, confirmam a presença do mesmo tanto na matéria-prima quanto nas preparações farmacêuticas. Já quanto à identificação de Fe(III), duas das três reações confirmaram que também o íon férrico estaria presente nas amostras analisadas. Esses resultados serão melhor avaliados através da espectroscopia de Mössbauer, a qual dirá as porcentagens correspondentes a Fe(II) e a Fe(III) nas amostras de ferro bisglicinado.

4.3.4.3 Espectroscopia de Mössbauer

A Espectroscopia Mössbauer é técnica bastante útil na caracterização de compostos organometálicos de ferro, visto que dela são extraídas informações relevantes sobre a ligação química e estrutura molecular. É uma técnica experimental de grande precisão sendo utilizada nos mais diversos campos da ciência, desde a pesquisa fundamental em Física até o estudo de tecidos biológicos (MURAOKA *et al,* 2004).

Pelo fato de fornecer resultados sobre o estado de oxidação ou a valência dos átomos pode ser utilizada para identificação de ferro (II). A técnica envolve emissão e absorção ressonante de raios gama (γ) pelos núcleos de alguns elementos, sendo, portanto considerada espectroscopia nuclear, fornecendo uma poderosa ferramenta para o estudo estrutural, químico e magnético da matéria. A partir de um espectro Mössbauer, podem-se obter informações sobre: ***deslocamento isomérico*:** resulta da diferença da densidade de elétrons no núcleo entre a fonte e o absorvente, esta diferença resulta num deslocamento d do espectro; esse parâmetro nos dá informações sobre o estado de carga do íon absorvente; ***desdobramento quadrupolar:*** parâmetro relacionado com o potencial eletrostático local dos átomos, obtendo-se informações sobre a simetria local do íon; **desdobramento magnético*:*** obtêm-se informações sobre a estrutura magnética e a presença de ferro metálico (FABRIS , 2007).

Os espectros Mössbauer para SQR e cápsulas contendo ferro bisglicinado estão representados pelas Figuras 6 e 7. As amostras da forma oral líquida não foram analisadas devido à dificuldade de absorção ressonante por amostras no estado líquido.

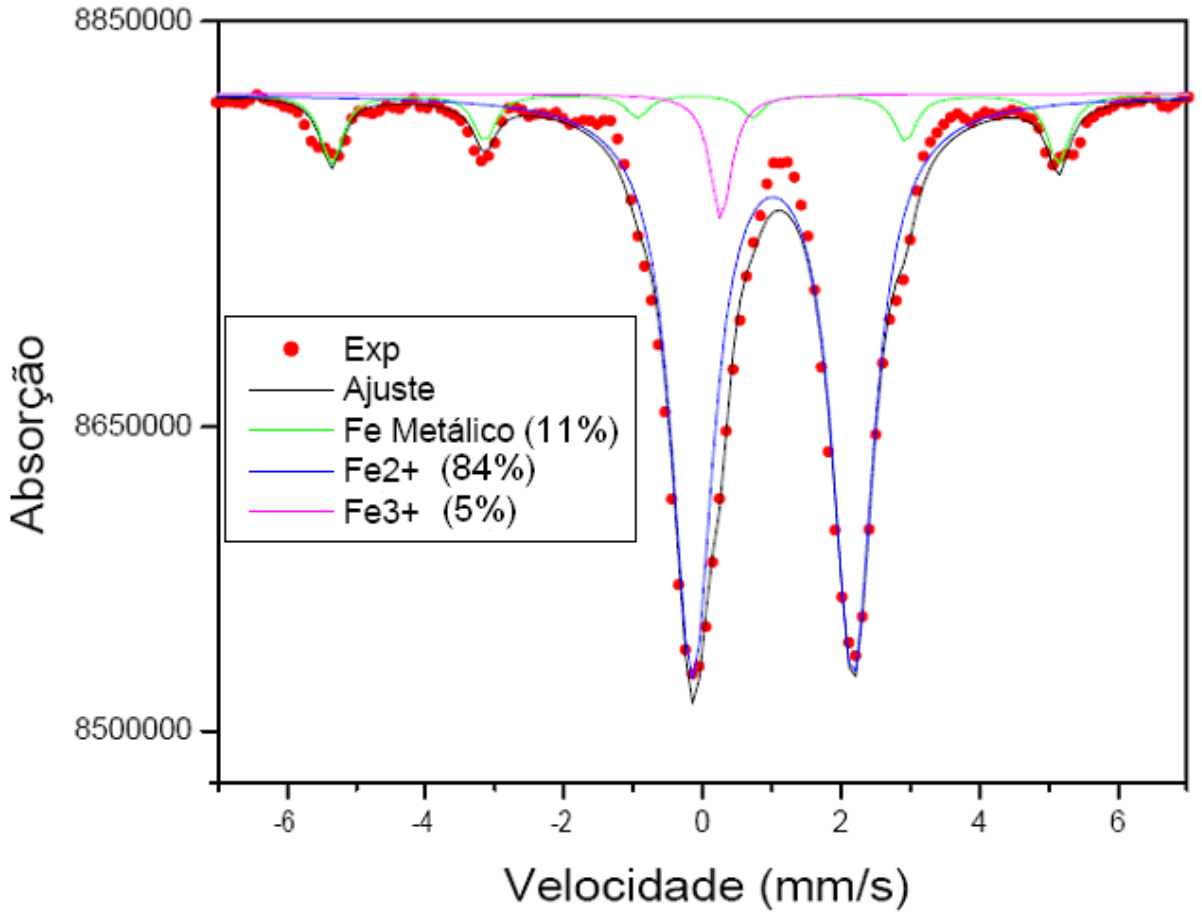

Figura 6. Espectro Mössbauer para SQR de ferro bisglicinado. Condições: espectrômetro de aceleração constante, fonte radioativa ^{57}Co, atividade inicial de 50mCi, temperatura ambiente (298K).

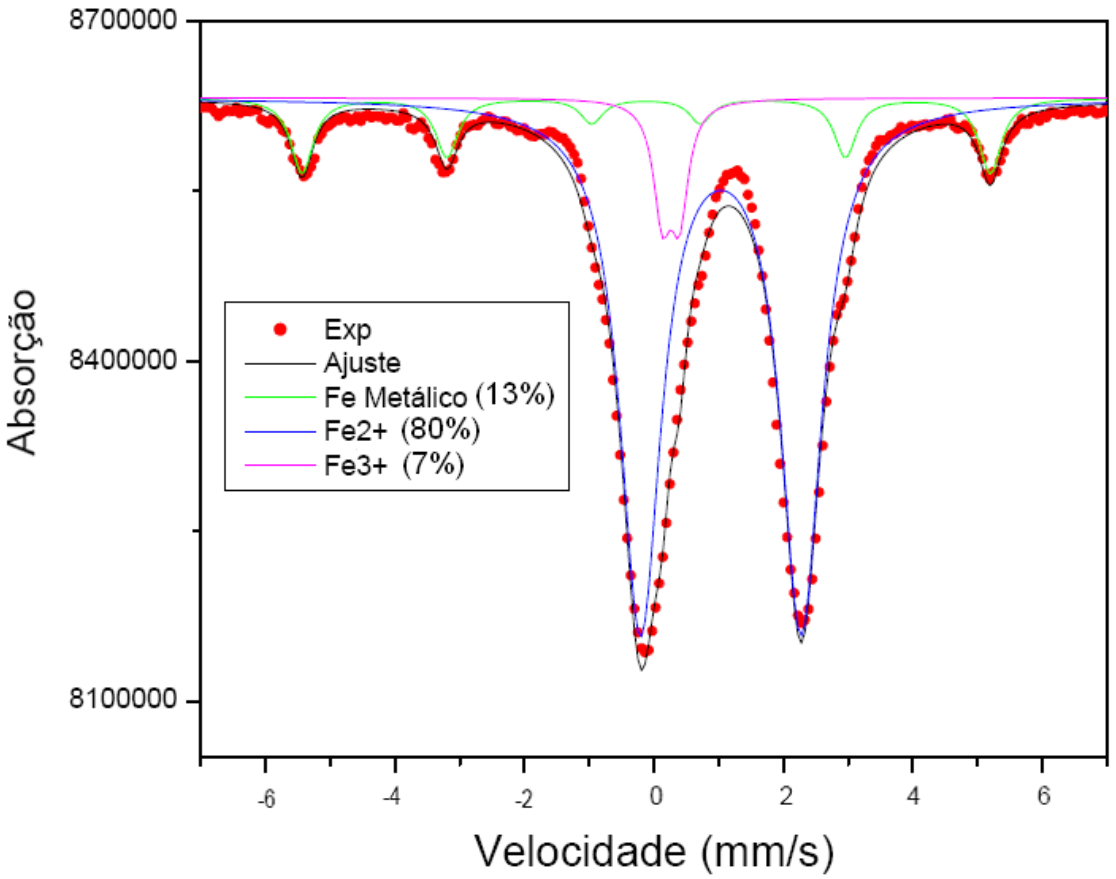

Figura 7. Espectro Mössbauer para cápsulas de ferro bisglicinado. Condições: espectrômetro de aceleração constante, fonte radioativa ^{57}Co, atividade inicial de 50mCi, temperatura ambiente (298K).

O espectro de SQR mostrou predominância de Fe^{+2} (84%) e uma pequena porcentagem de impureza Fe^{+3} (5%). O significativo deslocamento quadrupolar (?) confirma essa prevalência do componente ferroso. Os 11% de ferro metálico são verificados pelos seis picos presentes na parte superior do espectro (referentes aos possíveis desdobramentos magnéticos).

O espectro Mössbauer para cápsulas se mostrou semelhante ao padrão. O componente ferroso foi predominante (80%) com baixa porcentagem de impureza Fe^{+3} (7%) e 13% de ferro metálico. A partir desses resultados pode-se confirmar a qualidade tanto da SQR quanto das cápsulas. As baixas porcentagens de Fe^{+3} e o predomínio de Fe^{+2} garantem a eficácia terapêutica dessa formulação.

4.4 Referências

DUNBAR, K. R.; HEINTZ, R. A. *Chemistry of Transition Metal Cyanide Compounds: Modern Perspectives*, *Progress in Inorganic Chemistry*, 1997, volume 45, p. 283-391.

FABRIS, J. D. Espectroscopia Mössbauer- Técnica espectroscópica nuclear. *Internet Eletronic* Journal, v. 5, N° 2, p. 1047-1072, 2007.

F. BRAS. FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

MURAOKA, T. K.; ZUTIN, K.; ANANIAS, S. R.; MAURO, A. E.; NOGUEIRA, V. M.; RECHENBERG, H. R. Investigação por espectroscopia Mössbauer de compostos de ferro (0) contendo dissulfeto de carbono. *Eclética Química*, v. 29, p. 27-31, 2004.

NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. 3ed. New York, 1997, Part III, p.305-312.

NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. *Infrared absorption spectroscopy*. 2nd ed. San Francisco: Holden-Day, 1977, Cap. 2, p.10-57.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. 3rd ed. Melbourne: Brooks/Cole, 2001, Cap.2, p. 13-101.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000, Cap. 3, p. 67-135.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, p. 12 – 20, 1998.

USP. Validation of Compendial Methods <1225>. *The United States Pharmacopoeia*. 31th. ed. Rockville: Unites States Pharmacopoeial Convention, 2008.

WATSON, D. G.. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. 2th. ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

5. ANÁLISE QUANTITATIVA

5.1 Introdução

A espectrofotometria na região do UV/VIS é um método muito utilizado no controle de qualidade de produtos farmacêuticos pelo potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões. O método apresenta uma série de aplicações na quantificação de fármacos em produtos farmacêuticos onde não existe a interferência dos excipientes, determinação de pKa, liberação do fármaco em ensaios de dissolução, monitoramento da cinética de degradação e identificação de fármacos através do comprimento de absorção máxima em determinado solvente. Apresenta uma série de vantagens, pois é de fácil implantação, fornece rápidos resultados e é de baixo custo. Por outro lado, apresenta como desvantagem, a moderada seletividade, além de não ser diretamente aplicável à análise de misturas (WATSON, 2005).

A espectrofotometria derivada consiste na diferenciação ou transformação do espectro normal. Os espectros derivados são obtidos utilizando apenas as informações contidas no espectro clássico. Deste modo, a diferenciação não aumenta o conteúdo de informações, entretanto, ela individualiza melhor os constituintes devido a pequenas mudanças na inclinação e curvatura. Estas mudanças sutis permitem a quantificação de um componente, pois eliminam a deformação da curva causada pela presença de substâncias indesejáveis. Além disso, a diferenciação remove as bandas largas de absorção e melhora a detectabilidade das pequenas características espectrais, como os “ombros” (HACKMANN *et al*., 1991; OJEDA e ROJAS, 2004; WATSON, 2005).

O uso da espectrofotometria derivada tornou-se mais prático com o aumento do poder de resolução dos equipamentos analíticos e o fácil acesso aos microcomputadores com programas adequados, os quais permitem a geração quase instantânea dos espectros derivados (EL-SAYED e EL-SALEM, 2005). O método não requer a separação prévia dos componentes, está acessível à grande

maioria dos laboratórios de análise e pesquisa, é de baixo custo, fácil execução e constitui uma alternativa menos dispendiosa se comparada ao método CLAE (OJEDA e ROJAS, 2004). Além disso, torna as bandas largas mais finas, individualizando melhor os constituintes da mistura e eliminando a interferência de produtos indesejáveis, como excipientes e produtos de degradação (HACKMANN *et al*., 1991).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais comumente utilizada para a quantificação de fármacos em suas formulações. Apresenta inúmeras aplicações e vantagens, possibilitando alta eficiência de separação. A combinação da CLAE com detectores na região ultravioleta/visível viabiliza métodos quantitativos para análise de produtos farmacêuticos com exatidão, precisão e robustez. A CLAE é o método quantitativo que apresentou o maior desenvolvimento nos últimos anos, principalmente em relação às inovações em colunas e *softwares* de controle dos equipamentos. Por essa razão, é o método de escolha da Indústria Farmacêutica para a realização do controle de qualidade de seus produtos e o método mais preconizado pelos Códigos Oficiais (WATSON, 2005).

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, por estudos laboratoriais, que as características de desempenho do método cumprem os requisitos para a aplicação analítica a que se destina. O desenvolvimento correto de uma série bem definida de experimentos de validação é exigido para garantir que todos os dados obtidos através do uso de um procedimento analítico, sejam realmente confiáveis. Além disso, a validação de um método analítico é um passo importante para o requerimento de registro de fármacos novos (BRITTAIN, 1998; ERMER, 2001; USP 31, 2008).

Para a validação de método analítico não descrito em farmacopéias ou formulários oficiais, o método será considerado validado, desde que sejam avaliados os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 31, 2008). É responsabilidade do analista identificar os

parâmetros relevantes para o desempenho do processo analítico e desenvolver protocolos próprios de validação incluindo critérios de confiabilidade. Cada método validado indica que o mesmo foi avaliado estatisticamente e demonstra adequabilidade para o seu propósito (ERMER, 2001).

5.2 Validação do método quantitativo por espectrofotometria na região do visível e espectrofotometria derivada na região do visível

5.2.1 Material e métodos

5.2.1.1 Matéria-prima e formas farmacêuticas

A matéria-prima utilizada como SQR, bem como as formas farmacêuticas utilizadas encontram-se descritas no Capítulo 4, item 4.2.1.

5.2.1.2 Equipamento e condições experimentais

Os espectros foram obtidos na região do visível, entre 400 e 800 nm, utilizando espectrofotômetro de varredura Shimadzu modelo UV1601 PC, duplo feixe, banda espectral de 2 nm e cubetas de quartzo de um centímetro de caminho óptico. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do programa UVPC 39. As soluções da SQR e das amostras (cápsulas e F.O.L) de ferro bisglicinado foram preparadas empregando água como diluente e os comprimentos de onda utilizados foram 510 nm e 525 nm.

5.2.1.3 Solução de ortofenantrolina

Pesaram-se 100 mg de ortofenantrolina, transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml, adicionaram-se aproximadamente 50 ml de álcool etílico e colocou-se em banho de ultrassom por 5 minutos. Completou-se o volume com álcool etílico, obtendo-se a concentração de 1 mg/mL.

5.2.1.4 Solução de ácido ascórbico

Pesaram-se 80 mg de ácido ascórbico, que foram transferidos para balão volumétrico de 20 ml; adicionaram-se aproximadamente 10 ml de água e colocou-se em banho de ultrassom por 5 minutos. Completou-se o volume com água, obtendo-se a concentração de 4 mg/mL.

5.2.1.5 Especificidade

Avaliou-se a possível interferência dos excipientes das cápsulas e da F.O.L na determinação do ferro bisglicinado. As soluções placebo foram comparadas com a solução amostra quanto aos perfis dos espectros obtidos.

• Preparo das soluções placebo

Cápsulas: Pesou-se quantidade de pó dos excipientes equivalente a 2,5 mg de ferro bisglicinado e 50 mg de ácido ascórbico, transferindo-os posteriormente para balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se aproximadamente 25 ml de água e colocou-se em banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com água, homogeneizou-se e filtrou-se a solução. Alíquota de 3,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, adicionaram-se 5 ml de

ortofenantrolina, agitou-se por 30 segundos e completou-se o volume com água. A leitura foi feita após 20 minutos.

F.O.L: Transferiu-se para balão volumétrico de 20 ml, volume da solução dos excipientes equivalente a 1,0 mg de ferro bisglicinado e 5 ml de uma solução de ácido ascórbico 4 mg/ml, completou-se o volume com água, homogeneizou-se e filtrou-se a solução. Alíquota de 3,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, adicionaram-se 5 ml de ortofenantrolina, agitou-se por 30 segundos e completou-se o volume com água. A leitura foi feita após 20 minutos.

5.2.1.6 Linearidade

Para o preparo da curva analítica padrão pesou-se o equivalente a 2,5 mg de ferro bisglicinado e 50 mg de ácido ascórbico, transferindo-os para um balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se aproximadamente 25 ml de água e colocou-se em banho de ultrassom por 5 minutos. Completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 50,0 µg/ml. Foram transferidas alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ml, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 50 ml. Adicionaram-se 5 ml de ortofenantrolina, agitou-se por 30 segundos e completou-se o volume com água. A leitura foi feita após 20 minutos.

As curvas foram preparadas em três dias diferentes, sendo que cada ponto foi lido em triplicata. Com as médias das absorvâncias obtidas nos diferentes dias, construiu-se um gráfico plotando absorvância X concentração de ferro bisglicinado (µg/ml). A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) da curva padrão foram determinados através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e analisados através da análise de variância (ANOVA).

5.2.1.7 Precisão

A precisão do método analítico foi avaliada em dois níveis diferentes: repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre dias). Para a repetibilidade, avaliou-se o DPR obtido da análise de seis amostras independentes, em um mesmo dia. Para a precisão intermediária calculou-se o DPR de um total de 18 análises (n = 6/dia, 3 dias diferentes).

5.2.1.7.1 Preparo da solução SQR

Pesou-se o equivalente a 2,5 mg de ferro bisglicinado e 50 mg de ácido ascórbico, transferindo-os para balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se aproximadamente 25 ml de água e colocou-se em banho de ultrassom por 5 minutos. Completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 50,0 µg/ml. Alíquota de 3,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, adicionaram-se 5 ml de ortofenantrolina, agitou-se por 30 segundos e completou-se o volume com água, obtendo-se a concentração de 3 µg/ml. A leitura foi feita após 20 minutos.

5.2.1.7.2 Preparo das amostras

Cápsulas: determinou-se o peso médio de 20 cápsulas, sendo seus conteúdos misturados homogeneamente. Pesou-se, exatamente, o equivalente a 2,5 mg de ferro bisglicinado e 50 mg de ácido ascórbico, transferindo-os quantitativamente para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 25 ml de água. A solução foi mantida em ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com água, a solução filtrada, obtendo-se uma concentração de 50 µg/ml. Transferiu-se uma alíquota de 3 ml dessa solução para balão volumétrico de 50 ml, adicionaram-se 5 ml de ortofenantrolina, agitou- se por 30 segundos e completou-

se o volume com água, obtendo-se a concentração de 3 μg/ml de ferro bisglicinado.

Forma oral líquida: Para balão volumétrico de 20 ml foi transferido exatamente, o volume correspondente a 1,0 mg de ferro bisglicinado e 5 ml de uma solução de ácido ascórbico 4 mg/ml. O volume foi completado com água e a solução filtrada, obtendo-se uma concentração de 50 μg/ml de ferro bisglicinado. Transferiu-se uma alíquota de 3 ml dessa solução para balão volumétrico de 50 ml, adicionou-se 5 ml de ortofenantrolina, agitou- se por 30 segundos e completou-se o volume com água, obtendo-se a concentração de 3 μg/ml de ferro bisglicinado.

- Cálculos

A concentração de ferro bisglicinado nas amostras foi obtida através da seguinte equação:

$$C_A = (A_A . C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

C_A = Concentração de ferro bisglicinado na amostra

A_A = Absorvância da solução amostra de ferro bisglicinado

C_{SQR} = Concentração da solução de ferro bisglicinado SQR

A_{SQR} = Absorvância da solução de ferro bisglicinado SQR

O valor percentual de ferro bisglicinado nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A \% = (C_A . 100) / C_T$$

Onde:

C_A% = Concentração da amostra em percentagem

C_A = Concentração de ferro bisglicinado encontrada na amostra

C_T = Concentração teórica de ferro bisglicinado na amostra

5.2.1.8 Exatidão

Para avaliação da exatidão do método, realizou-se o teste de recuperação. Quantidades crescentes de SQR foram adicionadas à solução amostra, cuja concentração foi constante, sendo o percentual de recuperação da SQR calculado ao final do processo. A preparação das soluções é descrita a seguir:

5.2.1.8.1 Preparo da solução SQR

A partir da solução de SQR 50 µg/ml (descrito no item 5.2.1.7.1) foi preparada uma solução contendo 25 µg/ml de ferro bisglicinado.

5.2.1.8.2 Preparo das soluções amostra

O preparo das soluções amostra na concentração de 50 µg/ml está descrito no item 5.2.1.7.2.

5.2.1.8.3 Preparo das soluções A, R1, R2, R3 e P

Transferiram-se alíquotas de 1,0 ml da solução amostra (cápsulas e F.O.L) de ferro bisglicinado para balões volumétricos de 50 ml, os quais foram denominados **A**, **R1**, **R2** e **R3**. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas de 2,0,

4,0 e 6,0 ml da solução de ferro bisglicinado SQR (25 µg/ml) nos balões denominados **R1**, **R2** e **R3**, respectivamente, em triplicata. Uma alíquota de 2,0 ml da solução SQR foi transferida para um balão volumétrico de 50 ml, o qual foi denominado **P**. Aos balões identificados por **A, R1**, **R2** e **R3 e P** acrescentaram-se 5 ml de ortofenantrolina, agitou-se por 30 segundos e completou-se o volume com água. A Tabela 7 exemplifica a preparação das soluções acima.

Tabela 7. Preparação das soluções para realização da exatidão do método, através do teste de recuperação.

Balão volumétrico de 50 mL	Volume (ml) de solução amostra (50 µg/mL)	Volume (ml) da solução SQR (25 µg/mL)	Concentração (µg/ml)
A	1,0	-	1,0
R1	1,0	2,0	2,0
R2	1,0	4,0	3,0
R3	1,0	6,0	4,0
P	-	2,0	1,0

O teor recuperado de ferro bisglicinado SQR (R%) foi calculado a partir da equação que segue:

$$R\% = [(C_R - C_A) / C_{SQR}]. 100$$

Onde:

C_R = concentração da solução amostra (µg/ml) adicionada de ferro bisglicinado SQR.

C_A = concentração da solução amostra de ferro bisglicinado (µg/ml);

C_{SQR} = concentração da solução de ferro bisglicinado SQR (µg/ml).

5.2.1.9 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram calculados a partir das fórmulas descritas no ICH (2005), baseadas no desvio padrão do intercepto (s) e na inclinação da curva padrão (IC). O cálculo foi realizado baseado nos dados das três curvas padrão, segundo as equações a seguir:

$$LD = 3{,}30\,s / IC \qquad LQ = 10\,s / IC$$

5.2.2 Resultados e discussão

5.2.2.1 Reagente quelante ortofenantrolina

A ortofenantrolina é um composto orgânico de fórmula molecular $C_{12}H_8N_2$, solúvel em água, álcool etílico e solventes orgânicos. Em contato com Fe^{2+} forma um complexo de coloração vermelho-alaranjada, $[Fe\ (C_{12}H_8N_2)_3]^{2+}$ (UENO *et al*., 1982). A ortofenantrolina originou um complexo estável ao reagir com o ferro bisglicinado, sendo utilizada durante a validação para quantificação das formas farmacêuticas. Outros reagentes quelantes como 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) e 4,7 difenil-1,10 fenantrolina (BPS) também foram testados, porém não foram obtidos resultados satisfatórios.

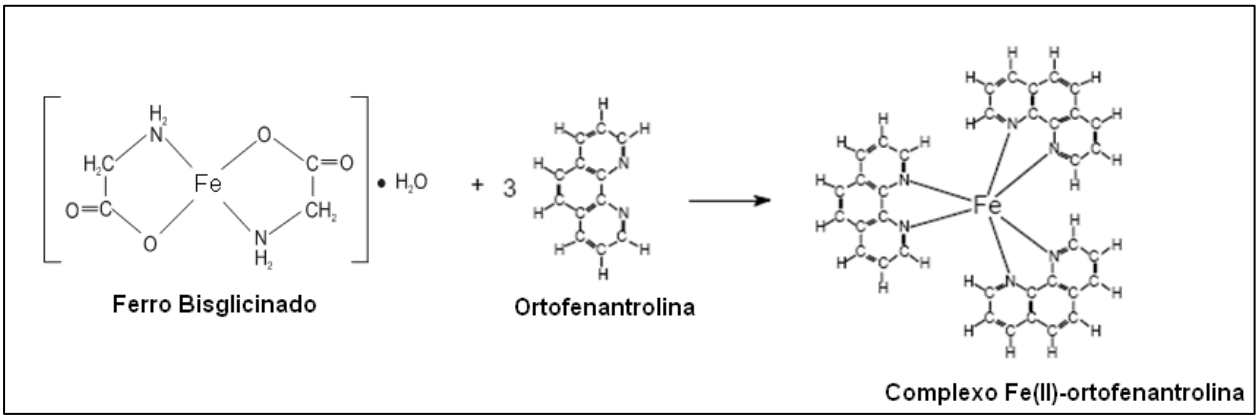

Figura 8. Reação entre Fe(II) e o reagente quelante ortofenantrolina.

5.2.2.2 Espectrofotometria na região do visível para cápsulas

5.2.2.2.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da varredura do espectro no visível, de solução contendo os excipientes das cápsulas. Na Figura 9 estão representados os espectros de absorção no visível das soluções preparadas com a amostra simulada de excipientes e ferro bisglicinado SQR.

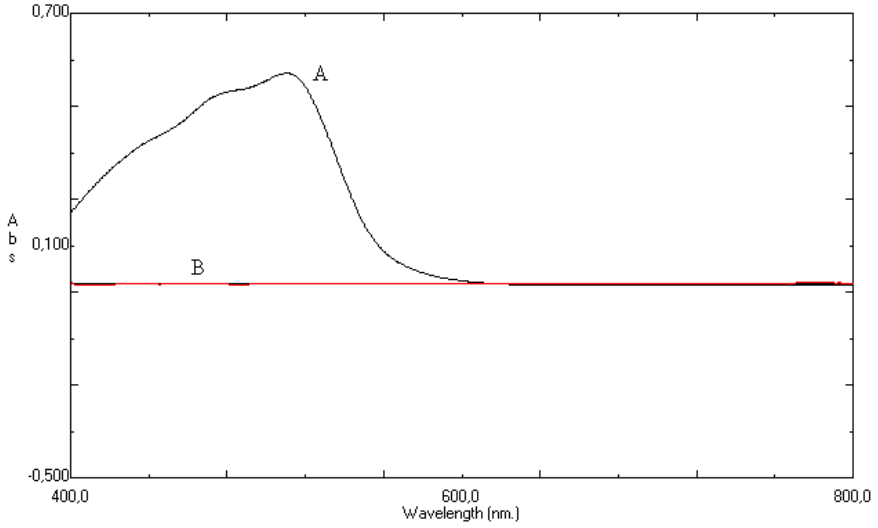

Figura 9: Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria no visível (510 nm) da solução de ferro bisglicinado SQR (A) e amostra simulada dos excipientes das cápsulas (B), na concentração de 3µg/mL.

O espectro de absorção da solução placebo das cápsulas na região do visível, na faixa de 400 a 800 nm, constatou que não houve interferência dos excipientes na quantificação de ferro bisglicinado cápsulas, em 510 nm, demonstrando a especificidade do método.

5.2.2.2.2 Linearidade

Na Tabela 8 são apresentados os valores de absorvância observados para soluções da SQR de ferro bisglicinado, em concentrações de 1,0 a 5,0 µg/ml. A curva padrão para o método foi construída a partir das cinco concentrações analisadas em três dias diferentes. A Figura 10 representa a curva padrão e a equação da reta, obtida por regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

Tabela 8. Valores de absorvâncias das curvas padrão de ferro bisglicinado, determinadas em 510 nm, realizadas em três diferentes dias.

Concentração (µg/mL)	Absorvâncias*			Média	DPR
	1º dia	2º dia	3º dia		
1,0	0,1746	0,1763	0,1750	0,1753	0,51
2,0	0,3563	0,3578	0,3571	0,3571	0,21
3,0	0,5355	0,5450	0,5339	0,5381	1,12
4,0	0,7192	0,7271	0,7339	0,7267	1,01
5,0	0,8992	0,9092	0,8984	0,9023	0,67

* Resultado de três determinações

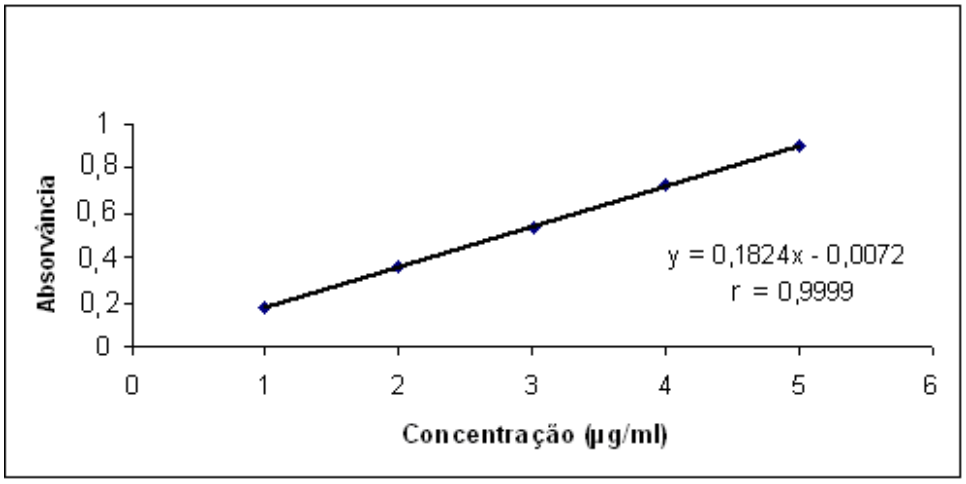

Figura 10. Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação da SQR de ferro bisglicinado, método por espectrofotometria na região do VIS a 510 nm.

O coeficiente de correlação (r) de 0,9999 está de acordo com as especificações e indica adequada correlação, entre concentração e a absorvância. A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos (Tabela 9 do anexo) demonstrou que não houve desvio de linearidade e a regressão foi significativa (ρ=0,05).

5.2.2.2.3 Precisão

Os valores experimentais obtidos no doseamento das cápsulas de ferro bisglicinado, referentes à precisão do método, encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores experimentais referentes à determinação de ferro bisglicinado em cápsulas por espectrofotometria no visível (leitura em 510 nm)

Amostra	Repetibilidade (% do teor declarado)			Precisão Intermediária
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
1	97,22	96,57	97,84	97,71
2	96,73	96,00	97,80	
3	97,53	96,87	98,45	97,15
4	98,63	97,07	96,38	
5	99,02	98,25	96,83	97,58
6	97,15	98,13	98,15	
Média (%)	97,71	97,15	97,58	97,48
DPR	0,93	0,91	0,82	0,87

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (interdias). Os valores dos DPRs em ambos os casos foram menores que 1,0%, confirmando que o método desenvolvido foi preciso.

5.2.2.2.4 Exatidão

A Tabela 11 apresenta os resultados do estudo de exatidão do método analítico por espectrofotometria na região do visível, realizado através do método de adição de padrão, para cápsulas de ferro bisglicinado.

Tabela 11. Exatidão do método por espectrofotometria no VIS, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções de cápsulas de Fe-bis-gli.

Amostras	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração Recuperada (%)*	Média (%)	DPR
R1	1,0	100,90	101,08	0,25
R2	2,0	101,37		
R3	3,0	100,98		

(R1, R2 e R3): amostras acrescidas de SQR

A exatidão do método analítico foi determinada através do teste de recuperação. As porcentagens médias de recuperação estiveram na faixa de 100,90% a 101,98%, demonstrando a exatidão do método proposto.

5.2.2.2.5 Limite de detecção e Limite de quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do ferro bisglicinado no sistema empregado. Os valores obtidos para o LD e o LQ foram, de acordo com o calculado, 0,0076 e 0,0230 µg/ml, respectivamente. Esses valores foram considerados baixos, demonstrando a boa sensibilidade do método

para determinação e quantificação do fármaco nas condições do método descritas.

5.2.2.3 Espectrofotometria derivada na região do visível para forma oral líquida

5.2.2.3.1 Especificidade

Testes preliminares, utilizando soluções de ferro bisglicinado SQR (3 µg/ml) e mistura dos excipientes da forma oral líquida, foram realizados para selecionar a ordem de derivação mais conveniente, o comprimento de onda analítico (?) mais adequado, o delta lambda (△?) com a melhor relação sinal/ruído e o fator de escala em que seriam registradas as derivadas. Os espectros da derivada primeira foram calculados e visualizados a partir de seus espectros de ordem zero utilizando-se o programa do equipamento.

A condição mais adequada, em que se conseguiu absorvância nula para o espectro dos excipientes e a determinação quantitativa do ferro bisglicinado, foi através da derivada primeira, ? = 525,5 nm, △? = 5 e fator de escala igual a 30 A figura 11 representa os espectros obtidos através da especificidade do método.

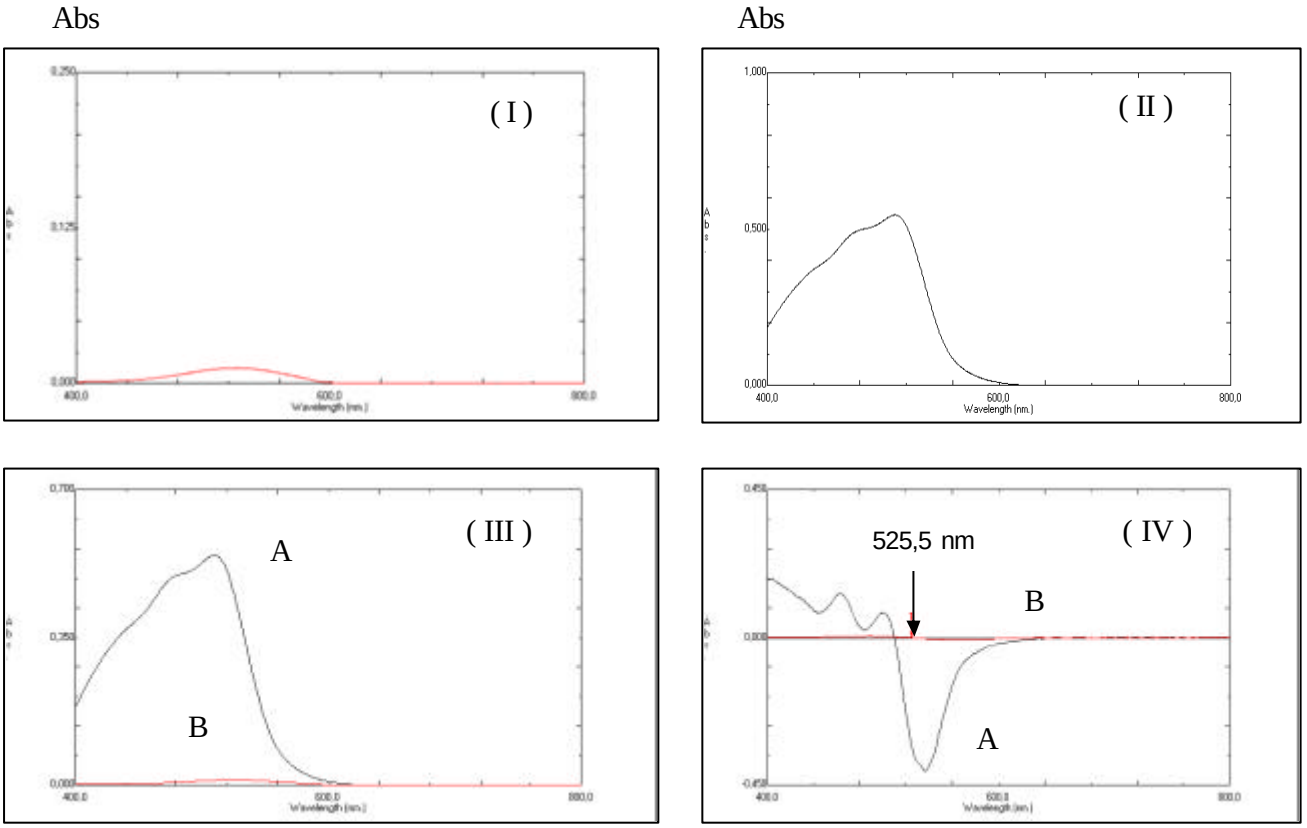

Figura 11. Espectros na região do VIS: ordem zero (I, II e III), 1ª derivada (IV). I: solução de adjuvantes e demais componentes (F.O.L). II: solução de ferro bisglicinado SQR (3µg/mL). III e IV: (A) Ferro bisglicinado SQR, (B) adjuvantes e demais componentes.

A partir da avaliação dos espectros da Figura 11 foi confirmada a especificidade para o fármaco frente aos demais componentes da fórmula o que tornou possível a quantificação do ferro bisglicinado na forma oral líquida.

5.2.2.3.2 Linearidade

A partir das soluções da SQR de ferro bisglicinado, em concentrações de 1,0 a 5,0 µg/ml foram construídas três curvas padrão (Figura 12).

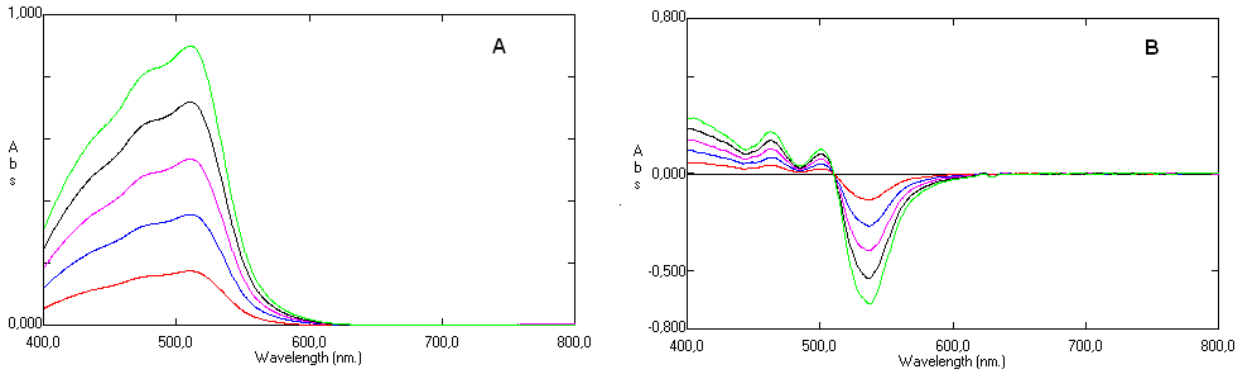

Figura 12. (A) Espectro VIS-Ordem Zero / (B) Espectro VIS-1ª derivada para soluções de ferro bisglicinado SQR de 1 a 5 µg/ml.

A Tabela 12 apresenta os valores de absorvância obtidos para cada concentração da curva padrão. A curva padrão foi construída a partir das cinco concentrações analisadas em três dias diferentes e está representada na Figura 13 juntamente com a equação da reta (obtida por regressão linear através do método dos mínimos quadrados) e o coeficiente de correlação (r).

Tabela 12. Valores de absorvâncias das curvas padrão de ferro bisglicinado, determinadas em 525,5 nm, realizadas em três diferentes dias.

Concentração (µg/mL)	**Absorvâncias***			**Média**	**DPR**
	1º dia	**2º dia**	**3º dia**		
1,0	0,1096	0,1117	0,1112	0,1108	0,99
2,0	0,2145	0,2174	0,2225	0,2181	1,86
3,0	0,3233	0,3271	0,3329	0,3278	1,48
4,0	0,4306	0,4368	0,4434	0,4369	1,46
5,0	0,5484	0,5552	0,5546	0,5527	0,68

* Resultado de três determinações

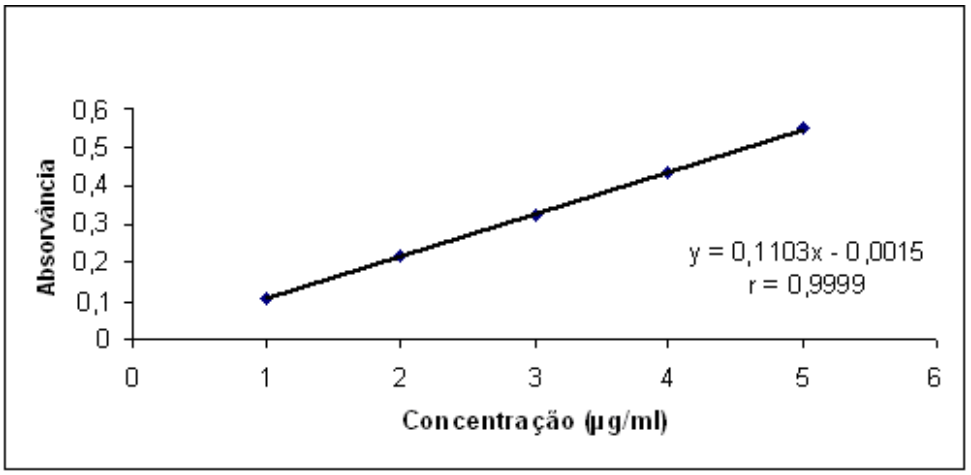

Figura 13. Representação gráfica da curva padrão, da equação da reta e do coeficiente de correlação da SQR de ferro bisglicinado, método por espectrofotometria derivada na região do VIS a 525,5 nm.

O coeficiente de correlação (r) de 0,9999 está de acordo com as especificações e indica adequada correlação, entre concentração e a absorvância. A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos (Tabela 13 do anexo) demonstrou que não houve desvio de linearidade e a regressão foi significativa (ρ=0,05).

5.2.2.3.3 Precisão

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos da forma oral líquida (F.O.L) de ferro bisglicinado, referentes à precisão do método, encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14- Valores experimentais referentes à determinação de ferro bisglicinado na forma oral líquida por espectrofotometria derivada no visível (1ª derivada, $\Delta\lambda$=5 e fator de escala de 30).

Amostra	Repetibilidade (% do teor declarado)			Precisão Intermediária
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
1	103,91	103,39	103,91	104,45
2	104,40	103,64	102,50	
3	104,04	103,01	102,59	103,20
4	104,31	103,19	102,41	
5	104,67	103,49	102,51	102,86
6	105,39	102,47	103,25	
Média (%)	104,45	103,20	102,86	103,50
DPR	0,51	0,41	0,58	0,83

Os valores obtidos para precisão intra-dia foram de 104,45%, 103,20% e 102,86%. Na precisão intermediária obteve-se um teor médio de 103,50% e o DPR de 0,83. Os desvios padrão relativos obtidos foram inferiores a 2,0%, conforme preconiza a literatura, indicando a precisão do método analítico em termos de repetibilidade e precisão intermediária.

5.2.2.3.4 Exatidão

A Tabela 15 apresenta os resultados do estudo de exatidão, realizado através do método de adição de padrão, do método analítico por espectrofotometria na região do visível para forma oral líquida de ferro bisglicinado.

Tabela 15. Exatidão do método por espectrofotometria derivada no VIS, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções da F.O.L de Fe-bis-gli.

Amostra	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração Recuperada (%)	Média (%)	DPR
R1	1,0	100,18	99,65	1,10
R2	2,0	100,37		
R3	3,0	98,39		

(R1, R2 e R3): amostras acrescidas de SQR

A exatidão do método analítico foi determinada através do teste de recuperação. As porcentagens médias de recuperação estiveram na faixa de 98,39% a 100,37%, o que demonstrou a exatidão do método proposto.

5.2.2.3.5 Limite de detecção e Limite de quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do ferro bisglicinado no sistema empregado. Os valores obtidos para o LD e o LQ foram, de acordo com o calculado, 0,0355 e 0,1076 µg/ml, respectivamente. Esses valores foram considerados baixos, demonstrando a boa sensibilidade do método para determinação e quantificação do fármaco nas condições do método descritas.

5.3 Validação do método quantitativo por cromatografia líquida de alta eficiência

5.3.1 Material e métodos

5.3.1.1 Equipamento e condições cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando cromatógrafo em fase líquida Shimadzu constituído de bomba LC-20AT, detector de arranjo de diodos (PDA) SPD-10AV-VP, controladora do sistema CBM-20A, desgaseificador DGU-20A3, auto-injetor SIL-20A. A aquisição e a análise dos dados foram efetuadas pelo programa CLASS-VP, versão 6.1.

As condições experimentais estabelecidas para análise de ferro bisglicinado, através do método por CLAE, encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16. Condições otimizadas para execução do método por cromatografia líquida.

Parâmetros	Descrição
Coluna	Gemini® RP-18 (150 mm x 4.6 mm d.i.) 5µm
Fase móvel	acetonitrila-água (28:72 *V/V*) contendo 1 mM tetrabutilamônio hidrogênio sulfato e 1% tampão fosfato (pH 8.0).
Vazão	1,0 ml/min
Comprimento de onda	706 nm
Volume de injeção	20 µl

As amostras de Fe-bis-gli SQR e formas farmacêuticas de Fe-bis-gli, descritas no capítulo 1, item 1.2.1, foram utilizadas para a análise. A coluna foi previamente estabilizada, através da vazão da fase móvel a 1,0 ml/min, durante 30 minutos. Para o estudo de robustez do método foi utilizada uma coluna MN® RP-18 (150 mm x 4.6mm d.i., 5 µm).

5.3.1.2 Reagentes

Foram empregados solventes de grau CLAE e água obtida por sistema Millipore.

5.3.1.3 Solução PAR

A solução PAR 5 mM foi obtida pesando-se a quantidade correspondente do reagente e dissolvendo-se a mesma em água.

5.3.1.4 Tampão fosfato

O tampão fosfato pH 8,0 foi preparado através de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 M; posteriormente o pH foi ajustado com hidróxido de sódio.

.5.3.1.5 Estudos de validação

Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez e limites de detecção e de quantificação, de acordo com as normas (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2008).

5.3.1.5.1 Especificidade/ estudos de degradação forçada

A avaliação da interferência dos excipientes das formulações no método CLAE para quantificação de ferro bisglicinado foi realizada através da análise das soluções placebo do conteúdo das cápsulas e da forma oral líquida.

A interferência de potenciais produtos de degradação foi investigada através de testes de degradação forçada. Soluções amostra de ferro bisglicinado

cápsulas foram expostas à degradação térmica e à fotólise, por 24 horas. Para cada condição de estresse, foram preparadas três amostras, um branco (solução sem adição da amostra submetida à degradação) e uma solução de ferro bisglicinado SQR mantida sob condições normais, para comparação dos resultados. Com o propósito de avaliar a pureza dos picos cromatográficos, utilizou-se detector de arranjo de diodos (DAD).

5.3.1.5.1.1 Preparo das soluções placebo

Cápsulas: pesou-se quantidade de pó dos excipientes equivalente a 2,25 mg de ferro bisglicinado e 45 mg de ácido ascórbico, transferindo-os para balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se aproximadamente 25 ml de água, colocou-se em banho de ultrassom por 10 minutos e completou-se o volume com água. Alíquota de 1,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato e 500 µl da solução PAR. Esta solução permaneceu durante 30 minutos em banho-maria a 50°C. Completou-se o volume com água, homogeneizou-se e filtrou-se a solução em papel filtro.

F.O.L: Transferiu-se para balão volumétrico de 20 ml, volume da solução dos excipientes equivalente a 900 µg de ferro bisglicinado e 3 ml de uma solução de ácido ascórbico 6 mg/ml, completando-se o volume com água. Alíquota de 1,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato e 500 µl da solução PAR. Esta solução permaneceu durante 30 minutos em banho-maria a 50°C. Completou-se o volume com água, homogeneizou-se e filtrou-se a solução.

5.3.1.5.1.2 Degradação térmica

A degradação térmica foi avaliada a partir de uma solução de ferro bisglicinado com concentração de 1 mg/ml. Alíquota de 2,0 ml dessa solução foi

transferida para balão volumétrico de 20 ml. Completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 0,1 mg/ml. A amostra foi colocada em estufa mantida a 80 °C por 24 horas. Após a degradação, o volume foi reajustado com água. Alíquota de 0,45 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato e 500 µl da solução PAR. Esta solução permaneceu durante 30 minutos em banho-maria a 50°C, logo após se completou o volume com água, obtendo-se a concentração de 1,8 µg/ml.

5.3.1.5.1.3 Degradação fotolítica

Esses estudos foram realizados em câmara de UV espelhada internamente (1,0 × 0,17 × 0,17 m) e equipada com lâmpada blacklight blue UV-A 352 nm (ORION, 30W, 130V, 1,26 × 10-3 Watts cm^{-2}). Soluções amostra de ferro bisglicinado na concentração de 1 mg/ml foram transferidas para cubetas de quartzo, sendo colocadas na câmara para exposição à luz UV, a uma distância de 15 cm da lâmpada, durante 24 horas. Após transcorrido o tempo descrito, o conteúdo da cubeta foi transferido para balão volumétrico de 20 ml, sendo o volume completado com água, obtendo-se concentração final de 50 µg/ml. Alíquota de 0,90 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato e 500 µl da solução PAR. Esta solução permaneceu durante 30 minutos em banho-maria a 50°C; logo após se completou o volume com água, obtendo-se a concentração de 1,8 µg/ml.

Cubetas contendo as amostras e protegidas da luz foram também colocadas na câmara para avaliar os efeitos da temperatura sobre as mesmas. A temperatura da câmara foi monitorada durante os estudos com termômetro de máxima e mínima.

5.3.1.5.2 Linearidade

Para o preparo da curva padrão pesou-se o equivalente a 2,5 mg de ferro bisglicinado SQR e 50 mg de ácido ascórbico, transferindo-os para balão volumétrico de 50 ml, completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 50 µg/ml. Transferiram-se 10 ml dessa solução para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com água. A partir dessa solução, alíquotas de 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; e 6,5 ml foram transferidas, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 25 ml. Acrescentaram-se 1 ml de tampão fosfato e 500 µl da solução PAR em cada balão. Estas soluções permaneceram durante 30 minutos em banho-maria a 50°C. Completaram-se os volumes com água, obtendo-se soluções com concentrações de 1,0; 1,4; 1,8; 2,2 e 2,6 µg/ml, respectivamente.

A curva padrão foi realizada em três diferentes dias, sendo que cada ponto da curva foi injetado em triplicata. A partir das médias das áreas obtidas nos diferentes dias, construiu-se um gráfico plotando área média X concentração de ferro bisglicinado (µg/ml). A equação da reta foi obtida através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e sua validade estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA).

5.3.1.5.3 Precisão

A precisão do método analítico foi avaliada através da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (entre dias). Para a repetibilidade, avaliou-se o DPR obtido dos resultados intra-dia (n = 6) e a precisão intermediária foi avaliada através do DPR dos resultados dos 3 dias (n = 18, DPR entre dias).

5.3.1.5.3.1 Preparo da solução SQR

Para o preparo de uma solução estoque de Fe-bis-gli na concentração de 45 µg/ml, pesou-se o equivalente a 2,25 mg de ferro bisglicinado e 45 mg de ácido ascórbico, transferindo-os para balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se aproximadamente 25 ml de água, colocou-se em banho de ultrassom por 5 minutos e completou-se o volume com água. Alíquota de 1,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, adicionaram-se 1 ml de tampão fosfato e 500 µl da solução PAR. Esta solução permaneceu durante 30 minutos em banho-maria a 50°C; logo após completou-se o volume com água, obtendo-se a concentração de 1,8 µg/ml.

5.3.1.5.3.2 Preparo das amostras

Cápsulas: determinou-se o peso médio de 20 cápsulas, sendo seus conteúdos misturados. Pesou-se desse pó o equivalente a 2,25 mg de Fe-bis-gli e 45 mg de ácido ascórbico, transferindo-os para balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se aproximadamente 25 ml de água, colocou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com água e a solução filtrada, obtendo-se uma concentração de 45 µg/ml. Alíquota de 1,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, adicionaram-se 1 ml de tampão fosfato e 500 µl da solução PAR. Esta solução permaneceu durante 30 minutos em banho-maria a 50°C; logo após se completou o volume com água, obtendo-se a concentração de 1,8 µg/ml.

Forma oral líquida: transferiu-se para balão volumétrico de 20 ml volume correspondente a 900 µg de Fe-bis-gli e 3 ml de uma solução de ácido ascórbico 6 mg/ml. O volume foi completado com água e a solução filtrada, obtendo-se uma concentração de 45 µg/ml. Alíquota de 1,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, adicionaram-se 1 ml de tampão fosfato e 500 µl da solução PAR. Esta solução permaneceu durante 30 minutos em banho-maria a

50°C; logo após completou-se o volume com água, obtendo-se a concentração de 1,8 µg/ml.

- Cálculos

A concentração de ferro bisglicinado nas amostras foi obtida através da seguinte equação:

$$\mathbf{C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}}$$

Onde:

C_A = Concentração de ferro bisglicinado na amostra

A_A = Área média da solução amostra (média de 3 injeções)

C_{SQR} = Concentração da solução de ferro bisglicinado SQR (µg/ml)

A_{SQR} = Área média da solução SQR (média de 3 injeções)

O valor percentual de ferro bisglicinado nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$\mathbf{C_A\,\% = (C_A \cdot 100) / C_T}$$

Onde:

C_A% = Concentração da amostra em percentagem

C_A = Concentração de ferro bisglicinado encontrado na amostra

C_T = Concentração teórica de ferro bisglicinado na amostra

5.3.1.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação. Quantidades crescentes de SQR foram adicionadas à solução amostra, cuja concentração foi constante, sendo o percentual de recuperação da SQR calculado ao final do processo. A preparação das soluções é descrita a seguir:

5.3.1.5.4.1 Preparo da solução SQR

A partir da solução de SQR 45 µg/ml (descrito no item 5.3.1.5.3.1) foi preparada uma solução contendo 10 µg/ml de ferro bisglicinado.

5.3.1.5.4.2 Preparo das soluções amostra

Prepararam-se soluções amostra (cápsulas e forma oral líquida) na concentração de 45 µg/ml (descrito no item 5.3.1.5.3.2). A partir dessa solução foram feitas soluções amostra na concentração de 25 µg/ml.

5.3.1.5.4.3 Preparo das soluções A, R1, R2, R3 e P

Transferiram-se alíquotas de 1,0 ml da solução amostra (cápsulas e F.O.L) de ferro bisglicinado para balões volumétricos de 25 ml, os quais foram denominados **A**, **R1**, **R2** e **R3**. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas de 1,0, 2,0 e 3,0 ml da solução de ferro bisglicinado SQR (10 µg/ml) nos balões denominados **R1**, **R2** e **R3**, respectivamente, em triplicata. Uma alíquota de 2,5 ml da solução SQR foi transferida para um balão volumétrico de 25 ml, o qual foi denominado **P**. Aos balões identificados por **A, R1**, **R2** e **R3 e P** acrescentaram-se 1 ml de tampão fosfato e 500 µl de PAR. Estas soluções permaneceram durante

30 minutos em banho-maria a 50°C; logo após o volume foi completado com água. A Tabela 17 exemplifica a preparação das soluções acima.

Tabela 17. Preparação das soluções para realização da exatidão do método por CLAE, através do teste de recuperação.

Balão volumétrico de 25 mL	Volume (ml) de solução amostra (25 µg/mL)	Volume (ml) da solução SQR (10 µg/mL)	Concentração (µg/ml)
A	1,0	-	1,0
R1	1,0	1,0	1,4
R2	1,0	2,0	1,8
R3	1,0	3,0	2,2
P	-	2,5	1,0

O teor recuperado de ferro bisglicinado SQR (R%) foi calculado a partir da equação que segue:

$$R\% = [(C_R - C_A) / C_{SQR}]. 100$$

Onde:

C_R = concentração da solução amostra (µg/ml) adicionada de ferro bisglicinado SQR.

C_A = concentração da solução amostra de ferro bisglicinado (µg/ml);

C_{SQR} = concentração da solução de ferro bisglicinado SQR (µg/ml).

5.3.1.5.5 Robustez

A solução de ferro bisglicinado SQR e as soluções obtidas com as cápsulas e a F.O.L foram preparadas de acordo com o descrito nos itens 5.5.1.5.3.1 e 5.5.1.5.3.2.

A robustez do método CLAE foi avaliada através da verificação do seu desempenho após pequenas variações nos seguintes fatores:

- Composição da fase móvel
- Colunas de diferentes marcas
- Vazão da fase móvel

As alterações realizadas e as condições normais de análise estão descritas na Tabela 18.

Tabela 18. Pequenas variações realizadas para a determinação da robustez do método.

Condições normais de análise	Modificações avaliadas
Vazão da Fase móvel	
1 ml/min	0,8 e 1,2 ml/min
Proporções da fase móvel: Água: acetonitrila	
(72:28)	(70:30) e (74:26)
Coluna cromatográfica	
Coluna Phenomenex C18 (150X 4,6 mm, 5µm)	Coluna MN C18 (150X 4,6 mm, 5µm)

Para avaliar a influência desses fatores sobre o método, realizou-se a análise dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção, número de pratos teóricos, assimetria e fator de capacidade), do teor e dos DPR das determinações quantitativas.

5.3.1.5.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Os LD e LQ foram calculados a partir das fórmulas descritas no ICH (2005), baseadas no desvio padrão do intercepto (s) e na inclinação da curva padrão (IC). O cálculo foi realizado baseado nos dados das três curvas padrão, segundo as equações a seguir:

$$LD = 3{,}30s / IC \qquad LQ = 10s / IC$$

5.3.1.5.7 Adequabilidade do sistema cromatográfico

A adequabilidade do sistema foi verificada durante a validação do método através dos seguintes parâmetros: eficiência da coluna (N), assimetria (T) e a repetibilidade das injeções, (FDA, 1994; SNYDER, 1997; USP 31, 2008).

5.3.2 Resultados e discussão

Os parâmetros cromatográficos avaliados para determinação das condições analíticas foram: assimetria do pico, número de pratos teóricos, fator de capacidade e tempo de retenção. Diferentes fases móveis e colunas (C8 e C18) foram testadas a fim de desenvolver um método cromatográfico para análise das cápsulas e da forma oral líquida de ferro bisglicinado. A melhor condição foi obtida utilizando uma coluna Gemini C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex) e fase móvel composta por acetonitrila-água (28:72, *V/V*) contendo 1mM de tetrabutilamônio hidrogênio sulfato e 1% de tampão fosfato, sem ajuste de pH. A vazão da fase móvel foi de 1,0 ml/minuto.

5.3.2.1 Reagente quelante PAR / Reagente de pareamento iônico

O reagente 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR) é um composto fenólico com um anel piridina em sua estrutura que reage em meio alcalino com Fe (II) produzindo um complexo intensamente corado, tendo como vantagem sua alta solubilidade em água (MARCZENKO e BALCERZAK, 1998). Normalmente, o reagente PAR forma quelatos aniônicos com os metais, na proporção metal-ligante 1:2 (KARIPCIN e KABALCILAR, 2007).

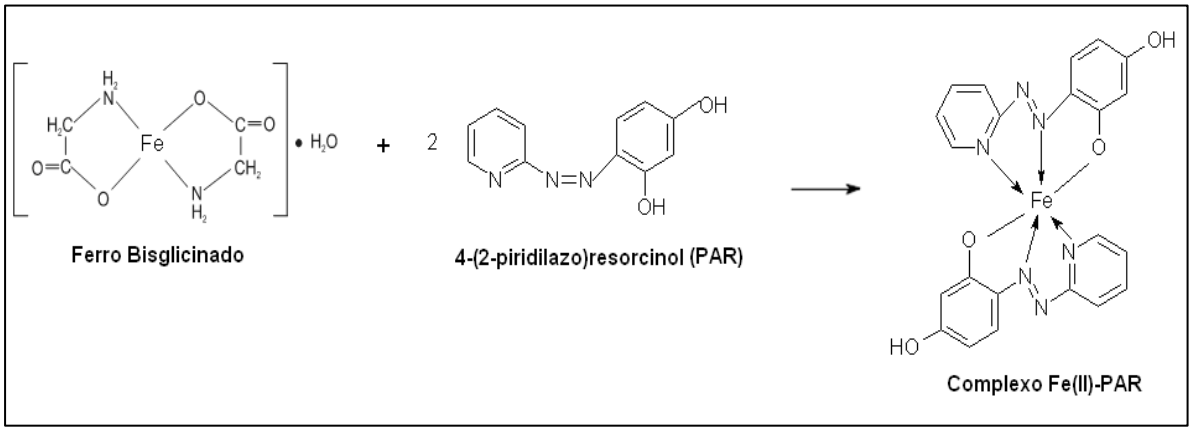

Figura 14. Reação entre Fe(II) e o reagente quelante PAR.

A cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa associada à detecção UV-VIS tem sido empregada com sucesso na determinação de íons metálicos, sendo observada melhor resolução quando se utilizam reagentes de pareamento iônico (HOSHINO *et al*., 1990; KANECO *et al*., 1991; UEHARA *et al*., 1991; XU *et al*., 1991); Optou-se pelo reagente de pareamento catiônico tetrabutilamônio hidrogênio sulfato, pela sua capacidade de neutralizar espécies aniônicas, como os quelatos formados pela ligação do PAR - metais.

5.3.2.2 Especificidade/ estudos de degradação forçada

Para ser considerado específico, um método analítico deve demonstrar ser capaz de separar e quantificar o analito de interesse em meio a excipientes e produtos de degradação (ICH, 2005). A especificidade foi determinada pela

análise de solução contendo os excipientes e pelos testes de degradação forçada. Dessa forma, o detector de arranjo de diodos (DAD) tem grande importância, pois determina a pureza dos picos. Quanto mais próximo de 1,0 for o índice de pureza, mais puro é o pico cromatográfico.

5.3.2.2.1 Soluções placebo

A Figura 15 apresenta os cromatogramas sobrepostos das soluções placebo e amostra das cápsulas e da forma oral líquida de ferro bisglicinado por CLAE.

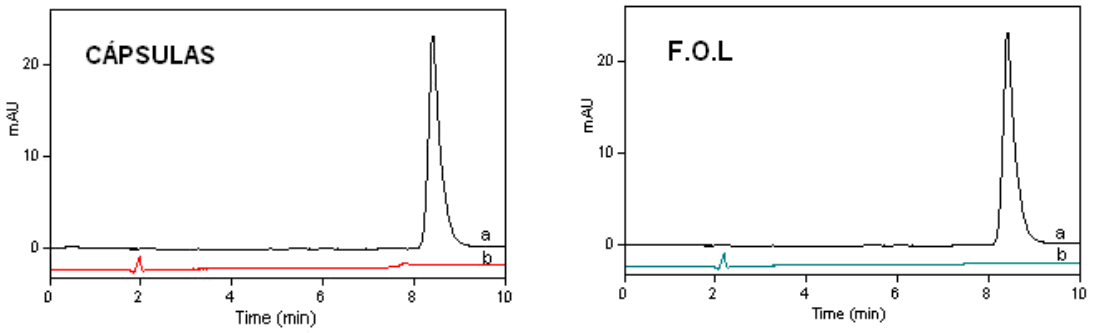

Figura 15 - Cromatogramas obtidos com a solução amostra de ferro bisglicinado (cápsulas e forma oral líquida) na concentração de 1,8 µg/ml (a) e com a solução placebo (b). Condições cromatográficas: Coluna Gemini® RP-18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm); fase móvel: acetonitrila-água (28:72 *V/V*), contendo 1mM de tetrabutilamônio hidrogênio sulfato e 1% tampão fosfato (pH 8.0); fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 706 nm.

A análise da Figura 15, na qual são apresentados os cromatogramas obtidos com as soluções amostra (a= cápsulas e forma oral líquida) e solução dos excipientes (b), indicou que os excipientes não interferem na quantificação de ferro bisglicinado, sendo comprovada a especificidade através do detector de diodos (DAD), que não indicou presença de impurezas no pico do fármaco.

5.3.2.2.2 Degradação Térmica / Degradação Fotolítica

A Figura 16 apresenta os cromatogramas da solução de Fe-bis-gli não submetida à degradação forçada e das soluções de Fe-bis-gli submetidas à degradação térmica e à degradação fotolítica.

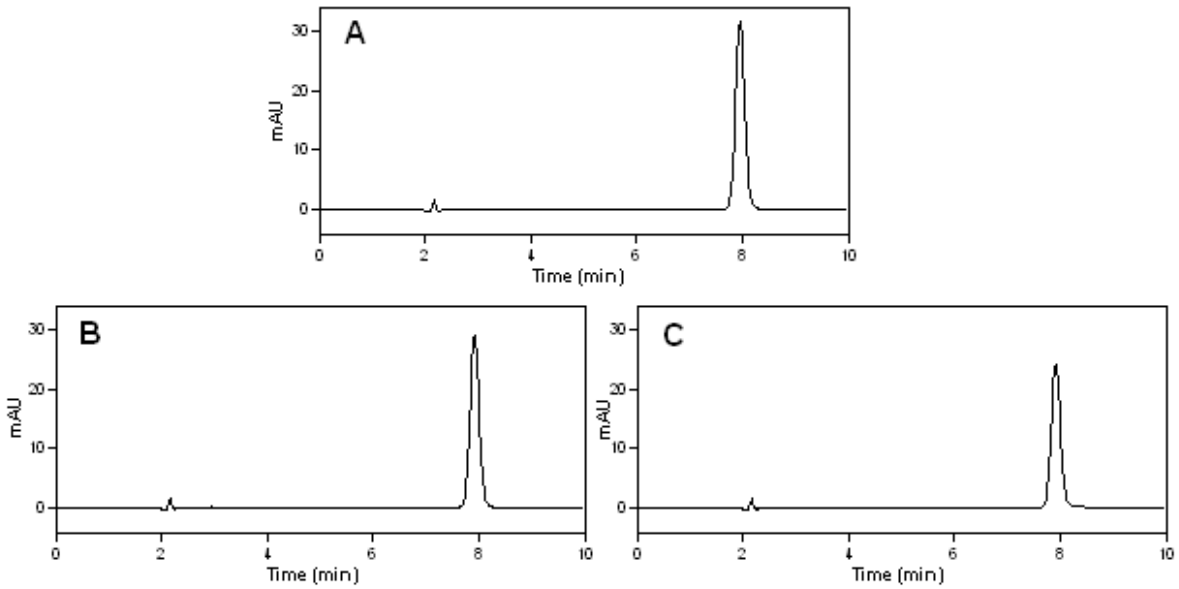

Figura 16 - Cromatogramas representativos dos estudos de degradação de Fe-bis-gli. (**A**) solução não submetida à degradação forçada; (**B**) Degradação térmica (80°C / 24h); (**C**) degradação fotolítica (UV 352 nm, 24h). Condições cromatográficas: Coluna Gemini® RP-18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm); fase móvel: acetonitrila-água (28:72 *V/V*), contendo 1mM de hidrogênio sulfato de tetrabutilamônio e 1% tampão fosfato (pH 8.0); fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 706 nm;

Os resultados obtidos das degradações forçadas são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados do estudo das degradações forçadas obtidos através de método por CLAE

Condição	Degradação (%)	Pureza do pico[a]
Amostra controle	Não houve degradação	1.00000
Degradação térmica (80°C, 24h)	4.65	0.99999
Degradação fotolítica (UV 352 nm /24h)	25.0	0.99999

[a] Valores de pureza de pico na faixa de 0.99999-1.0000 indicam homogeneidade do pico

A exposição do fármaco à condição térmica induziu a uma leve degradação de 4,65%, entretanto não foram observados picos adicionais no cromatograma. A degradação forçada em luz ultravioleta de 352 nm demonstrou que as soluções de ferro bisglicinado (Figura 16-C) degradam em condições fotolíticas. A degradação foi de 25%, não sendo observados picos adicionais nos cromatogramas. As degradações observadas originaram produtos não detectados em 706 nm, tratando-se provavelmente da degradação do aminoácido glicina.

5.3.2.3 Linearidade

O estudo da linearidade do método foi realizado na faixa de 1,0 a 2,6 μg/ml, a partir da análise de três curvas padrão. Na Tabela 20 são apresentados os valores das áreas observadas para soluções da SQR de ferro bisglicinado. A partir das áreas absolutas médias foi construída a curva padrão, que originou a equação da reta, estabelecida através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, bem como o coeficiente de correlação, representados na Figura 17.

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a curva padrão foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), cujo resultado é apresentado na Tabela 21 do anexo.

Tabela 20. Áreas absolutas das curvas padrão de ferro bisglicinado, obtidas através de CLAE, realizadas em três dias.

Concentração (mg/ml)	Área absoluta*	Área absoluta média	DPR (%)
1,0	242220 236448 239976	239548	1,21
1,4	330016 323631 335354	329667	1,78
1,8	419709 412648 423747	418701	1,34
2,2	515091 503007 514369	510822	1,33
2,6	611544 595772 605695	604337	1,32

* cada valor representa a média de três injeções, sendo o DPR entre injeções ≤ 2%.

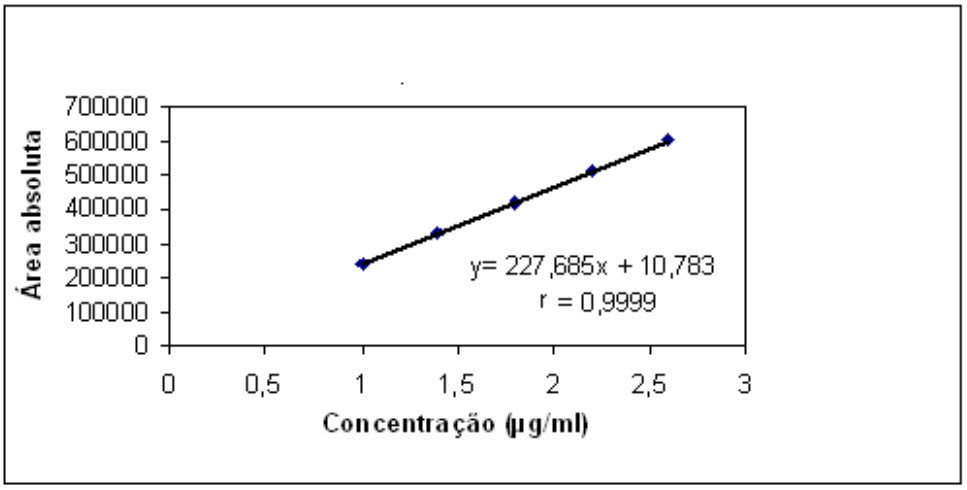

Figura 17. Representação gráfica da curva padrão de ferro bisglicinado, nas concentrações de 1,0 a 2,6 µg/ml. Condições: Coluna Gemini® RP-18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm); fase móvel: acetonitrila-água (28:72 *V/V*), contendo 1mM de tetrabutilamônio hidrogênio sulfato e 1% tampão fosfato (pH 8.0); detecção: 706 nm;

A equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (y = 227,685x + 10,783) e o valor do coeficiente de correlação (r = 0,9999) indicaram a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração da SQR de ferro bisglicinado, ou seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003). Os resultados das absorvâncias obtidas avaliados por ANOVA demonstram que a regressão foi significativa e que não ocorreu desvio da linearidade na faixa de concentração estudada (ρ=0,05).

5.3.2.4 Precisão

Os resultados experimentais obtidos nos doseamentos das cápsulas e da forma oral líquida de Fe-bis-gli, referentes à precisão do método, encontram-se nas Tabelas 22 e 23, respectivamente.

Tabela 22. Resultados experimentais da precisão intradia e entre dias do método por CLAE, aplicado a cápsulas de Fe-bis-gli.

Amostra	% do teor declarado		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	97,65	97,14	97,25
2	96,83	97,19	96,74
3	96,96	99,53	96,89
4	98,33	97,12	99,17
5	98,19	98,30	97,89
6	98,39	99,84	99,09
Média intra-dia	97,72	98,19	97,84
DPR intra-dia (%)	0,71	1,27	1,10
Média entre dias (n=18)	97,92		
DPR entre dias (%)	1,01		

Tabela 23. Resultados experimentais da precisão intradia e entre dias do método por CLAE, aplicado à forma oral líquida de Fe-bis-gli.

Amostra	% do teor declarado		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	103,49	102,47	103,84
2	103,62	101,18	103,40
3	103,08	102,90	103,75
4	104,33	101,31	104,33
5	103,97	103,17	104,68
6	103,77	100,49	104,82
Média intra-dia	103,71	101,92	104,14
DPR intra-dia (%)	0,41	1,06	0,54
Média entre dias (n=18)	103,26		
DPR entre dias (%)	1,17		

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intradia) e da precisão intermediária (interdias). Os valores experimentais obtidos para a determinação quantitativa do fármaco nas cápsulas, durante os três dias de

análise, foram 97,72%, 98,19% e 97,84%. Na precisão intermediária obteve-se um teor médio de 97,92% e DPR de 1,01%. Para a forma oral líquida, os valores obtidos para precisão intradia foram 103,71%, 101,92% e 104,14%. Na precisão intermediária obteve-se um teor médio de 103,26% e DPR de 1,17%. Os desvios padrão relativos obtidos foram inferiores a 2,0%, indicando a precisão do método analítico em termos de repetibilidade e precisão intermediária.

5.3.2.5 Exatidão

Os resultados do estudo de exatidão, realizado através do teste de recuperação, estão descritos nas Tabelas 24 e 25.

Tabela 24. Exatidão do método por CLAE, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções de cápsulas de Fe-bis-gli.

Amostra	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração Recuperada (%)	Média (%)
R1	0,4	102,75 101,09 101,22	101,69
R2	0,8	99,98 98,02 99,97	99,32
R3	1,2	99,29 98,75 101,32	99,79
Recuperação média (%) = 100,27; DPR (%) = 1,47			

(R1, R2 e R3): amostras acrescidas de SQR

Tabela 25. Exatidão do método por CLAE, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções da F.O.L de Fe-bis-gli.

Amostra	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração Recuperada (%)	Média (%)
R1	0,4	100,53 99,68 99,67	99,96
R2	0,8	98,92 99,90 101,08	99,97
R3	1,2	100,33 101,22 102,48	101,34
Recuperação média (%) = 100,42; DPR (%) = 1,05			

(R1, R2 e R3): amostras acrescidas de SQR

A exatidão do método analítico foi determinada através do teste de recuperação. As percentagens médias de recuperação estiveram na faixa de 98,02% a 102,75% para as cápsulas (Tabela 24) e 98,92% a 102,48% para a F.O.L (Tabela 25), o que demonstrou a exatidão do método proposto.

5.3.2.6 Robustez

Os resultados obtidos na determinação de ferro bisglicinado nas cápsulas e na forma oral líquida, através de pequenas alterações nas condições cromatográficas, podem ser observados nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26. Resultados do estudo de robustez do método por CLAE aplicado a cápsulas de Fe-bis-gli.

Parâmetro	TR (min)	Assimetria	Pratos teóricos	Fator de capacidade	Teor (%)
Método Proposto[a]	8,40	1,65	5649	6,20	97,92
Vazão (0.8 mL/min)	10,53	1,78	5919	7,63	96,87
Vazão (1.2 mL/min)	7,10	1,60	5248	5,16	97,40
Acetonitrila (26%)	10,81	1,48	6291	8,46	97,33
Acetonitrila (30%)	6,58	1,89	5081	4,28	97,69
Coluna MN® RP-18 (150X4,6; 5µm)	8,70	1,35	2785	6,52	97,60
DPR					0,37

[a] Fase móvel :acetonitrila-água (28:72 *V/V*), contendo 1mM de tetrabutilamônio hidrogênio sulfato 1% tampão fosfato (pH 8.0), coluna analítica Gemini® RP-18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm).

Tabela 27. Resultados do estudo de robustez do método por CLAE aplicado à forma oral líquida de Fe-bis-gli.

Parâmetro	TR (min)	Assimetria	Pratos teóricos	Fator de capacidade	Teor (%)
Método Proposto[a]	8,30	1,60	5658	6,19	103,26
Vazão (0.8 mL/min)	10,54	1,75	5961	7,64	102,85
Vazão (1.2 mL/min)	7,10	1,59	5272	5,16	100,09
Acetonitrila (26%)	10,83	1,48	6299	8,48	101,88
Acetonitrila (30%)	6,58	1,89	5098	4,28	100,39
Coluna MN® RP-18 (150X4,6; 5µm)	8,70	1,35	2820	6,52	102,38
DPR					1,28

[a] Fase móvel :acetonitrila-água (28:72 *V/V*), contendo 1mM de tetrabutilamônio hidrogênio sulfato 1% tampão fosfato (pH 8.0), coluna analítica Gemini® RP-18 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm).

O estudo da robustez do método tem por objetivo demonstrar a confiabilidade da análise quando o método é submetido a pequenas e deliberadas variações, sendo que deve ser considerado durante o desenvolvimento da metodologia. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas

condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Os fatores considerados na determinação da robustez por CLAE foram: variação na composição da fase móvel, variação do pH da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A análise cromatográfica das diferentes condições analíticas foi realizada separadamente. Na avaliação dos resultados obtidos no teste de robustez verificou-se que, após alterações na proporção da fase orgânica da fase móvel, coluna e fluxo da fase móvel, os parâmetros cromatográficos estiveram de acordo com as recomendações vigentes e que não houve discrepância entre os valores observados. A coluna analítica MN aumentou o tempo de retenção, diminuiu a assimetria e o número de pratos teóricos, mostrando menor eficiência da coluna.

5.3.2.7 Limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade do método por CLAE foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do ferro bisglicinado no sistema empregado. Os valores obtidos para o LD e LQ foram, de acordo com o calculado, 0,04 e 0,14 µg/ml, respectivamente. Os resultados indicam que o método apresenta boa sensibilidade com valores reduzidos de limites de detecção e de quantificação.

O método quantitativo desenvolvido e validado por CLAE originou a seguinte publicação que será apresentada no Anexo 1:

CENI, D. C.; MARTINS, L. A.; PEREIRA, A. G.; FROEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. An LC Ion-Pairing Method for the determination of Fe(II) in Ferrous Bisglycinate Pharmaceutical Formulation. *Chromatographia*, v. 69, S189-S194, 2009.

5.4 Análise estatística comparativa dos métodos

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para a quantificação de ferro bisglicinado em cápsulas e na forma oral líquida, realizou-se a análise estatística comparativa entre os resultados obtidos da repetibilidade para os métodos propostos, utilizando o Teste *t* de *Student*, presumindo variâncias equivalentes.

5.4.1 Comparação de métodos: VIS e CLAE

Tabela 28. Valores percentuais obtidos no doseamento das cápsulas de ferro bisglicinado por espectrofotometria no visível e CLAE

	VIS n=18	CLAE n=18
Teor médio (%)	97,48	97,92
DPR	0,87	1,01

5.4.2 Comparação de métodos: VIS-D^2 e CLAE

Tabela 29. Valores percentuais obtidos no doseamento da forma oral líquida de ferro bisglicinado por espectrofotometria derivada no visível e CLAE

	VIS-D^2 n=18	CLAE n=18
Teor médio (%)	103,50	103,26
DPR	0,83	1,17

Os resultados do Teste *t* de *Student*, presumindo variâncias equivalentes e $p<0,05$ (tabelas 30 e 31 do anexo), demonstraram não haver diferença significativa entre os métodos propostos por espectrofotometria na região do visível e por

CLAE (|t| calculado = 1,42 < t crítico = 2,03), para quantificação de ferro bisglicinado em cápsulas e por espectrofotometria derivada na região do visível e por CLAE (t calculado = 0,71 < t crítico = 2,03) para quantificação da F.O.L, ou seja, os métodos podem ser considerados equivalentes.

5.5 Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 899, de 20 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasilia, DF, 2. jun. 2003.

BRITTAIN, H. G. Validação de Métodos analíticos não cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, n. 3, p. 4-9, 1998.

EL-SAYED, A. A.; EL-SALEM, N. A. Recent development of derivative spectrophotometry and their analytical applications. *Analytical Sciences*, v. 21, p. 595-614, 2005.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrate approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, p. 755-767, 2001.

FDA - Reviewer Guidance. Validation for Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research. *Food and Drug Administration*, 1994.

HACKMANN, E. R. M.; BENETON, S. A.; SANTORO, M. I. R. M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos e medicamentos. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. XLI, n. 1, p. 7-13, 1991.

HOSHINO, H.; NAKANO, K.; YOTSUYANAGI, T. 2,2`-Dihydroxyazobenzene derivatives as reagents for trace metal determination by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. *Analyst*, v. 115, p. 133-137, 1990.

ICH - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Harmonised Tripartite Guideline. *International Conference on Harmonization*, 2005.

KANECO, E.; HOSHINO, H.; YOTSUYANAGI, T.; GUNJI, N.; SATO, M. *Analytical Chemistry*, v. 63, p. 2219, 1991.

KARIPCIN, F.; KABALCILAR, E. Spectroscopic and thermal studies on solid complexes of 4-(2-pyridylazo) resorcinol with some transition metals. *Acta Chimica Slovenica*, v. 54, p. 242-247, 2007.

MARCZENKO Z.; BALCERZAK M. *Spectrophotometric methods in inorganic analysis*, WNPWN, Warsaw, 1998.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, n. 518, p. 1-24, 2004.

SHABIR, G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57-66, 2003.

SNYDER, L. G.; KIRLAND, J. J., GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. USA: John Willey & Sons, p. 21-57, 1997.

USP - Validation of Compendial Methods <1225>. The United States Pharmacopoeia. 31th. ed. Rockville: Unites States Pharmacopoeial Convention, 2008

UEHARA, N.; MORIMOTO, K.; SHIJO, Y. Determination of titanium(IV) in river water by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography with 4,4`-diantipyrylmethane. *Analyst*, v. 116, p. 27-29, 1991.

UENO, K.; IAMAMURA, T.; Cheng, K. L. *Handbook of Organic Analytical Reagents*. CRC Press, Florida, 1982. 313p.

XU, X.; ZHANG, H.; ZHANG, C.; CHENG, J. *Analytical Chemistry*, v. 63, p. 2529, 1991.

WATSON, D. G. *Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists.* 2th ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. p. 221-233.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A avaliação dos caracteres físicos, solubilidade e aquametria da matéria-prima permitiram a caracterização do fármaco.
- ✓ A identificação da matéria-prima foi possível através das reações específicas para Fe(II) e Fe(III), espectroscopia de Mössbauer e espectrofotometria na região do infravermelho (IV).
- ✓ A presença do fármaco nas formas farmacêuticas foi assegurada através da identificação do ferro bisglicinado pelos métodos e reações específicas para Fe(II) e Fe(III) e espectroscopia de Mössbauer.
- ✓ O método desenvolvido por espectrofotometria no visível (VIS) demonstrou ser específico, linear, preciso e exato para a análise quantitativa do ferro bisglicinado cápsulas.
- ✓ O método desenvolvido por espectrofotometria derivada na região do visível (VIS-D) foi validado dentro das condições estabelecidas, demonstrando ser linear, específico, preciso e exato para a análise quantitativa do ferro bisglicinado na forma oral líquida.
- ✓ O método desenvolvido por CLAE para determinação quantitativa do ferro bisglicinado cápsulas e forma oral líquida, demonstrou ser específico, linear, sensível, preciso, exato e robusto, para a análise quantitativa do ferro bisglicinado nos produtos analisados.
- ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos VIS e CLAE demonstrou não haver diferença estatística significativa entre eles, indicando a equivalência entre os mesmos para a determinação quantitativa das cápsulas de ferro bisglicinado, nas condições estabelecidas.
- ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos VIS-D e CLAE demonstrou não haver diferença estatística significativa entre eles, indicando a equivalência entre os mesmos para a determinação quantitativa da forma oral líquida de ferro bisglicinado, nas condições estabelecidas.

ANEXOS

Tabela 9. Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas por espectrofotometria na região do VIS.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	0,99774	0,24944	9766,97*	3,48
regressão linear	1	0,99766	0.99766	39064,49*	4,96
desvio da linearidade	3	0,00009	0.00003	1,13	3,71
DENTRO (resíduo)	10	0,00026	0,00003		
Total	14	0.99800			

* Significativo para $p < 0,05$.

Tabela 13. Análise da variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas por espectrofotometria derivada na região do VIS.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	0,36479	0,09120	4743,56*	3,48
regressão linear	1	0,36472	0,36472	18970,70*	4,96
desvio da linearidade	3	0,00007	0,00002	1,18	3,71
DENTRO (resíduo)	10	0,00019	0,00002		
Total	14	0,36498			

* Significativo para $p < 0,05$.

Tabela 21. Análise da variância (ANOVA) das áreas obtidas por CLAE.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	$2,4836 \times 10^{11}$	$6,2090 \times 10^{10}$	1698,12*	3,48
regressão linear	1	$2,4834 \times 10^{11}$	$2,4834 \times 10^{11}$	6791,94*	4,96
desvio da linearidade	3	$2,0226 \times 10^{7}$	$6,7420 \times 10^{6}$	0,18	3,71
DENTRO (resíduo)	10	$3,6564 \times 10^{8}$	$3,6564 \times 10^{7}$		
Total	14	$2,4873 \times 10^{11}$			

* Significativo para $p < 0,05$.

Tabela 30. Análise comparativa dos métodos propostos por espectrofotometria no visível e CLAE utilizando Teste *t* de *Student*

	Variável 1	**Variável 2**
Média	97,48	97,92
Variância	0,72	0,98
Observações	18	18
Variância agrupada	0,85	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	34	
Stat t	1,42	
t crítico bi-caudal	2,03	

Tabela 31. Análise comparativa dos métodos propostos por espectrofotometria derivada no visível e CLAE utilizando Teste *t* de *Student*

	Variável 1	**Variável 2**
Média	103,50	103,26
Variância	0,74	1,46
Observações	18	18
Variância agrupada	1,10	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	34	
Stat t	0.71	
t crítico bi-caudal	2,03	

Artigo

CENI, D. C.; MARTINS, L. A.; PEREIRA, A. G.; FROEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. An LC Ion-Pairing Method for the determination of Fe(II) in Ferrous Bisglycinate Pharmaceutical Formulation. *Chromatographia*, v. 69, S189-S194, 2009.