

Eclética Química

Print version ISSN 0100-4670 *On-line version* ISSN 1678-4618

Eclet. Quím. vol.22 São Paulo 1997

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46701997000100012>

Determinação do íon ferro em preparações farmacêuticas através da cromatografia planar e espectrofotometria

Maria Aparecida Donnini MANCINI*

José ZUANON NETTO**

Dênia Mendes de Sousa VALLADÃO**

RESUMO: Os autores estudaram o comportamento cromatográfico de preparações farmacêuticas comerciais contendo o íon Fe (II). Utilizando celulose microcristalina/Propanol: ácido clorídrico 4 N: ácido acético concentrado: ácido nítrico concentrado: clorofórmio (40: 5: 5: 10: 10), como sistema cromatográfico e alizarina como reagente de detecção, Fe (II), Mn (II), Mg (II), Cu (II), Zn (II) e Ca (II) foram separados e identificados pela Cromatografia Planar. O Fe (II) foi determinado pela reação com a ortofenantrolina, resultando em solução adequada para quantificação colorimétrica.

PALAVRAS-CHAVE: Cromatografia Planar; CCD; íon Fe (II), cátions; preparações farmacêuticas.

Introdução

O objetivo terapêutico de preparações farmacêuticas contendo o íon Fe (II) é o de proporcionar ao organismo este íon em forma facilmente assimilável, em concentrações suficientes para corrigir a anemia ferropriva e restabelecer os índices normais de armazenamento de Fe (II) corporal.⁶ O sulfato ferroso, como se sabe, é a melhor forma absorvível de Fe (II). Frequentemente, encontramos o mesmo associado ao ácido ascórbico, cuja ação redutora facilita ainda mais o seu aproveitamento e vitaminas do complexo B, fatores condicionantes ao aumento da taxa de hemoglobina em pacientes anêmicos. Mesmo quando não associado, encontramos o referido sal veiculado em sorbitol, conhecido por incrementar a absorção intestinal de vitaminas e nutrientes.⁵ Recentemente a Cromatografia Planar tem vivenciado um renascimento na indústria farmacêutica. Entre outras, a principal vantagem da técnica é que os constituintes de amostras complexas podem ser separados,

identificados e recuperados para análise posterior por outras técnicas microanalíticas.⁸

Progressos recentes em cromatografia planar foram apresentados e discutidos no encontro promovido pela "Joint Pharmaceutical Analysis Group", juntamente com "Chromatographic Society", em março de 1995,³ aonde destacou-se que a Cromatografia em Camada Delgada é o método de escolha para estudos qualitativos, porque constituintes presentes em pequenas quantidades, são detectados por esta técnica.

Considerando que as reações de identificação de princípios ativos, são ensaios farmacopêicos imprescindíveis tanto em matérias primas como em produtos acabados,^{1,10,11} verifica-se a necessidade e a importância de métodos específicos para a detecção dos princípios ativos minerais, uma vez que o número de preparações farmacêuticas multiminerais vem crescendo a cada dia.⁵

Material e método

Padrão

A) Foram utilizadas as seguintes soluções padrão aquosas na concentração de 0,1% (m/v) em relação ao cátion durante a fase qualitativa:^{2,7} sulfatos de Fe (II), Mn (II), Mg (II), Cu (II) e Zn(II), fumarato ferroso, fosfato de cálcio dibásico, molibdato de sódio, pantotenato de cálcio, ácido ascórbico e sorbitol.

B) Durante a fase quantitativa foram utilizadas soluções padrão de sulfato ferroso e das amostras numa concentração de 0,04% (m/v) em relação ao cátion.

Amostras

1 Amostras comerciais:

a) Drágeas de três formulações diferentes, *Da*, *Db* e *Dc*, contendo respectivamente 400, 525 e 10 mg de sulfato ferroso/drágea.

b) comprimidos (formulação *d,Cd*) contendo 18 mg de fumarato ferroso/comprimido.

Obs.: Nas amostras comerciais analisadas, além de Fe (II) outros íons e vitaminas estão presentes ; uma das formulações, (*Cd*) contém 28 componentes. Em vista disso, preparamos a amostra simulada que contém os principais elementos objeto desta análise.

2 Amostra simulada (AS) ou formulação padrão (Fp)	
Sulfato ferroso	0,2000 g
Sulfato de manganês	0,0030 g
Sulfato de cobre	0,0005 g
Fosfato tricálcico	0,0100 g
Lactose	0,0300 g
Amido	0,0500 g
Estearato de magnésio	0,0060 g
Talco	0,0060 g

3 Soluções orais comerciais

SOa, *SOB* = contendo 125 mg de sulfato ferroso/mL

SOC = contendo 25 mg de sulfato ferroso/mL

4 Solução oral padrão (*SOP*) ou amostra simulada, formulação:

Sulfato ferroso	2,5 g
Sorbitol	0,280 g
Água desmineralizada q.s.p.	20 mL

Condições cromatográficas

Adsorvente e preparo das camadas

Camada de celulose microcristalina, distendida em aparelho próprio, sobre placas de vidro de 20 x 20 cm, na espessura de 300 μ , secas ao ar e ativadas por 10 minutos a 105°C.^{2,4}

Fases Móveis (FM)

1 n Butanol: HCl 2 N (1: 1)

2 n Butanol: HCl 6 N (1: 1) 3- n Butanol: HCl 10 N (1: 1)

4 n Butanol: HCl concentrado: etanol: água (6: 5: 48: 1)

5 Etanol: HCl concentrado: água (8: 1: 1)

6 HCl: metanol: água (1: 8: 1)

7 Acetona: água: HCl concentrado (80: 5: 8)

8 Propanol: HCl 4N: ácido acético concentrado: HNO₃ concentrado: clorofórmio (30: 5: 5: 10: 10)

9 Metanol: HCl concentrado (9: 1)

Soluções reveladoras

- 1 Solução etanólica de alizarina a 0,08% (m/v), seguida de exposição aos vapores de amônia⁷.
- 2 Solução etanólica de ácido fosfomolibdico a 5%.

Soluções reagentes (determinação espectrofotométrica)

Solução de ácido clorídrico a 0,1 N

Solução de citrato de sódio a 5% (m/v)

Solução de ortofenantrolina a 0,25% (m/v)

Solução de ácido ascórbico a 1% (m/v).

Preparo das amostras

A) Determinação do peso médio das drágeas e/ou comprimidos:

Foi feita uma amostragem das drágeas e/ou comprimidos, de maneira a obter o peso médio;^{1,11} em seguida, as amostras foram pulverizadas e homogeneizadas, e então tratadas com água em agitador magnético por 40 minutos e sedimentação da parte insolúvel.⁷

B) As soluções orais *a*, *b* e *d* foram preparadas por simples diluição [1,6% (v/v) *SOa*, *b* e *d*], enquanto que a solução oral *c* (*SOc*) foi diluída a 8% (v/v).

Aplicação das amostras e soluções-padrão

As amostras foram aplicadas na linha de partida localizada a 1,5 cm da borda inferior das cromatoplas e distanciadas 1,5 cm entre sí em pistas previamente demarcadas.

Padronização

Foram elaboradas duas curvas de calibração: uma, direta, a qual não passou pelo processo cromatográfico com soluções-padrão de sulfato ferroso nas concentrações de 1 a 5 mg. mL⁻¹, além do teste em branco (B) ou seja, sem conter o íon Fe (II). Todos os ensaios foram realizados em triplicata ([Tabela 1](#)).

Tabela 1- Dados experimentais obtidos das curvas de calibração de soluções contendo o complexo ferro-1, 10 - fenantrolina utilizando a espectrofotometria na região do visível

	íon Fe (II)
Faixa de concentração	0- 5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (0- 5 $\mu\text{g. } 5\mu\text{L}^{-1}$)*
Volume final (extração)	5 ml
Número de soluções	10
λ de leitura	510 nm
Equações de regressão $y = a + bx$	
(a)	- 0,00043 (-0,00067)*
(b)	0,0362 (0,0336)*
Coefficiente de regressão	0,9994 (0,9987)*

*Os valores entre parênteses se referem às curvas de calibração cromatografadas (para os complexos formados após CCD).

A outra curva-padrão obtida foi denominada *curva-padrão cromatografada* aonde soluções padrão em concentrações de 1 a 5 microgramas em 5 microlitros foram aplicadas em camadas de celulose microcristalina e em triplicata. Portanto em placas demarcadas com 7 pistas, aplicou-se a cada uma das primeiras 5 pistas, 5 mL de solução-padrão de 1 a 5 mg. 5 mL⁻¹. Uma pista foi deixada para o branco e a última, contendo o padrão foi revelada com alizarina ([Figura 2](#)), mantendo-se as demais protegidas pela superposição de uma placa de vidro ([Tabela 1](#)).

1	2	3	4	5	B	Fe(II)
						

FIGURA 1 - Esquematização da curva-padrão cromatografada 1, 2, 3, 4 e 5: Solução padrão (SP) de sulfato ferroso contendo, respectivamente, 1, 2, 3, 4 e 5 μg de Fe (II) . $5 \mu\text{L}^{-1}$, B = branco e Fe(II): solução-padrão [$2 \mu\text{g} \cdot 5 \mu\text{L}^{-1}$].

<i>Da</i>	<i>Db</i>	<i>Dc</i>	<i>Cd</i>	<i>Fp</i>	<i>SOa</i>	<i>SOb</i>	<i>SOc</i>	<i>SOd</i>	Fe(II)	Fe(II)
										

FIGURA 2: Esquemática do método apresentado no presente trabalho para separação e posterior quantificação do Fe (II) em medicamentos.

Quantificação do íon Fe (II)

A localização e retirada do cátion isolado por cromatografia foi a base para a quantificação, e foi realizada pela aplicação do agente revelador alizarina (1). Além da demarcação anterior (vertical) nesta fase, traçaram-se duas linhas horizontais a 2 e 4,5 cm acima e paralelas à linha de partida. Esta faixa é correspondente ao valor de $R_F \times 100$ do Fe (II) sem interferência de outros componentes, nas condições experimentais. A alizarina foi aplicada sempre na última pista à direita da cromatoplaça, contendo uma duplicata do padrão ([Figura 2](#)). Esta pista era revelada isoladamente, após superposição de outra placa de vidro no restante da cromatoplaça contendo as amostras e o padrão. Isso permitiu a manutenção da integridade do adsorvente contendo o Fe (II) separado de outros princípios ativos e também do padrão para ser comparado quantitativamente.

Transferiu-se a parte da camada demarcada contendo o cátion diretamente para tubos de centrífuga com tampa, com capacidade para 15 mL e, após tratamento adequado, efetuou-se a quantificação colorimétrica.⁷ A cada um dos tubos, adicionou-se, 3 mL de HCl 0,1 N, seguindo-se de homogeneização em agitador e repouso de 30 minutos.

Em seguida adicionou-se na seguinte ordem, 0,5 mL de solução de ácido ascórbico a 1% (m/v) e 0,5 mL de ortofenantrolina a 0,25% (m/v), 1 mL de solução de citrato de sódio a 25%, tendo-se o cuidado de homogeneizar a mistura após cada adição. Após repouso de 30 minutos, centrifugou-se por 5 minutos a 2.000 rpm, transferindo-se o líquido sobrenadante a cubetas de 1 cm, procedendo-se a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 510 nm.

Resultados e discussão

As formulações apresentadas foram primeiramente ensaiadas para fins qualitativos, isto é, separação e identificação de íons terapeuticamente ativos. Cuidou-se, nesta fase, de separar também ácido ascórbico e sorbitol, uma vez que a presença dos mesmos é freqüente nas formulações multiminerais. Portanto, em virtude das considerações acima, apresentamos a tabela seguinte:

Analisando a [Tabela 2](#), verificamos que a melhor separação do Fe (II) dos demais íons ocorreu com a fase móvel 8 [propanol: HCl 4 N: ácido acético glacial: HNO₃ concentrado: clorofórmio (30: 5: 5: 10: 10)]. As cromatoplasmas foram desenvolvidas num percurso de 10 cm e precedidas de lavagem com a fase móvel 9 [metanol: HCl concentrado (9: 1)] num percurso de aproximadamente 13 cm, para prevenir possível contaminação. As condições citadas acima permitiram a separação do ácido ascórbico, cujo valor de $R_F \times 100 = 51$ (cor violeta com revelador 1 e azul com revelador 2), confirmando a não interferência do mesmo, principalmente considerando-se concentração *versus* dimensão das manchas. Nas condições experimentais as formulações sólidas analisadas (*Da* e *Db*) em que o ácido ascórbico encontra-se em concentrações correspondentes a 2,26% e 3,82% da concentração de Fe (II) e 11,25% e 19,04% de sulfato ferroso, respectivamente. Mesmo na formulação *Cd* em que a concentração do Fe (II) é muito menor do que as anteriores e também menor do que a do ácido ascórbico, não houve dificuldade na separação e identificação, principalmente considerando-se que o íon ferroso está presente como fumarato, confirmando assim a especificidade do sistema cromatográfico citado para cátions, o que torna-se um fato promissor uma vez que algumas formulações recentemente lançadas,⁵ contendo o fumarato ferroso, estão sendo largamente estudadas⁹ com a finalidade de redução de efeitos secundários relacionados com a quantidade de Fe (II) ingerido. ([Figura 3](#), [Tabela 3](#)):

Tabela 2 - Valores de $R_F \times 100$ dos principais cátions contidos nas formulações estudadas, utilizando celulose microcristalina e diferentes fases móveis. Agente revelador 1

FM	Cátions $R_F \times 100$					
	Fe (II)	Mn (II)	Mg (II)	Cu (II)	Zn (II)	Ca (II)
1	32	35	34	45	63	-
2	27	28	24	38	68	41
3	65	31	25	55	75	-
4	16	18	15	55	99	-
5	25	25	24	43	99	-
6	lf	45	-	91	lf	pp
7	lf	41	-	-	lf	pp
8	32	14	pp	19	62	10

pp = ponto de partida; lf = linha de frente.

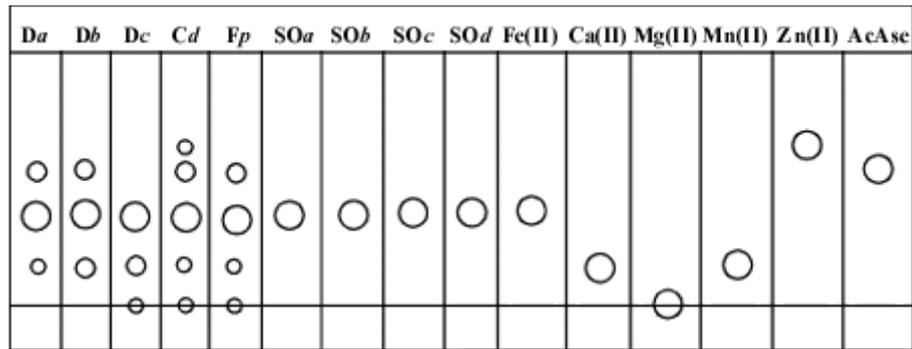


FIGURA 3 - Representação esquematizada de diversas cromatoplacas obtidas com a utilização do sistema cromatográfico: celulose microcristalina/propanol: HCl 4N: ácido acético concentrado: HNO₃ concentrado: clorofórmio. Agente revelador: alizarina 0,08% (m/v).

Tabela 3 - Valores de $R_F \times 100$ e cores das manchas das soluções padrão dos íons envolvidos e os medicamentos selecionados em cromatoplacas de celulose microcristalina / Fase Móvel (FM) 8

SP e Medicamento	Valor de $R_F \times 100$	Revelador 1	Revelador 2
Fe (II)	32	violácea	am
Ca (II)	11	roxa (ext)*	-
Zn (II)	56	violácea	-
Cu (II)	15	verm. vio	-
<i>Da</i>	11	roxa (ext)*	am
	32	violácea	
<i>Db</i>	11	roxa (ext)*	-
	33	violácea	am
<i>Cd</i>	11	roxa (ext)*	-
	31	violácea	am
	55	violácea	
<i>Fp</i>	12	roxa (ext)*	-
	16	verm. vio	-
	32	violácea	am
<i>SOa</i>	32	violácea	am
<i>SOB</i>	33	violácea	am
<i>SOc</i>	32	violácea	am
<i>SOp</i>	32	violácea	am

roxa (ext.) = a cor desaparece rapidamente; verm. vio. = vermelho violácea; SP = solução padrão; *Da* e *Db* = drágeas das formulações *a* e *b* *Cd* = comprimidos da formulação *d*; *SOa*, *SOB*, *Soc* e *SOp* = soluções orais das formulações *a*, *b*, *c* e *p*.

Com relação ao sorbitol, geralmente veiculado ao sal ferroso nas soluções orais, apresentou um R_F x 100 de aproximadamente 92, apresentou cor azul com o revelador 2, comprovando-se, a não interferência do mesmo em nossas análises.

Determinação do Fe (II) em preparações farmacêuticas

Trabalhou-se com alíquotas correspondentes a 2 microgramas de Fe (II), tanto para o padrão como os medicamentos, pois essa concentração foi ideal em relação ao tamanho das manchas dos íons nas cromatoplacas. A parte III da [Tabela 4](#) foi elaborada seguindo recomendação dos últimos códigos americanos, entre os quais USP 23^a ed., no capítulo Espectrofotometria: "em ensaios colorimétricos que indicam a preparação e uso de uma curva-padrão, é *admissível e de preferência, não se utilizar de uma curva-padrão*, mas comparar a amostra diretamente contra a mesma quantidade do Padrão de Referência e aplicando-se o mesmo tratamento".¹¹ Em vista disso, as amostras foram cromatografadas juntamente com o branco (faixa delimitada na camada sem amostra) e o padrão. As concentrações foram calculadas em função da curva-padrão direta, da curva-padrão cromatografada e da fórmula $C_A = C_P \times A_A / A_P$, em que C_A = concentração da amostra, C_P = concentração do padrão (2 microgramas em 5 microlitros), A_A = absorvância da amostra e A_P = absorvância do padrão, devidamente descontada a absorvância do branco.

Tabela 4 - Concentração de Fe (II) calculada em função da curva-padrão direta (I), Curva Padrão cromatografada (II) e da fórmula $C_A = C_P \times A_A / A_P$ (III) nas condições experimentais

Amostra	I		II		III	
	[Fe (II)]	%	[Fe (II)]	%	[Fe (II)]	%
<i>Da</i>	1,92	95,9	2,12	106,1	2,05	102,9
<i>Db</i>	1,97	98,6	2,18	109,0	2,12	105,8
<i>Fp</i>	1,89	94,5	2,09	104,5	2,02	101,5
<i>SOa</i>	1,94	97,3	2,15	107,5	2,03	101,4
<i>SOb</i>	1,89	94,5	2,09	104,5	1,97	98,5
<i>SOc</i>	1,89	94,5	2,09	104,5	1,97	98,5
<i>SOp</i>	1,92	95,9	2,12	106,1	2,03	101,5

Conclusão

Sabendo-se que as monografias oficiais estabelecem que o teor permitido de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ é de 95% a 110% para comprimidos e de 94% a 106% para soluções orais e sabendo-se também que os nossos ensaios foram elaborados em função da quantidade de Fe (II) no sulfato ferroso rotulado nas preparações farmacêuticas, verificamos que todas as formulações estudadas encontram-se dentro

destes padrões oficiais, concluindo-se que a associação da cromatografia planar e espectrofotometria nas condições citadas é perfeitamente adequada à análise de preparações farmacêuticas contendo Fe (II) como princípio(s) ativo(s).

Agradecimento

Às Senhoras Maria de Fátima Rodrigues Lopes e Maria José Trovati Frigero pela colaboração técnica prestada.

MANCINI, M. A. D., ZUANON NETTO, J., VALLADÃO, D. M. de S. Determination of ferrous ion in pharmaceutical preparations through Planar Chromatography and Spectrophotometry. *Ecl. Quím. (São Paulo)*, v.22, p.133, 1997.

ABSTRACT: The authors have studied the chromatographic behavior of pharmaceutical preparations obtained from commercial sources containing the ferrous ion. Using microcrystalline cellulose, propanol: 4 N, H Cl, acetic acid, nitric acid, chloroform mixture (40: 5: 5: 10: 10) as chromatographic system and Alyzarin as the detection reagent Fe (II), Mn (II), Mg (II), Zn (II) and Ca (II) were separated and identified by Planar Chromatography. Fe (II) cation was determined by reaction with 1, 10-Phenanthroline, resulting in an appropriate solution for colorimetric quantitation.

KEYWORDS: Planar Chromatography; TLC; Fe (II) ion; pharmaceutical preparations.

Referências Bibliográficas

- 1 *BRITISH pharmacopoeia*. London: Her Majesty's Stationery Office, 1988, v.1, 2. [[Links](#)]
- 2 CAZETTA, J. O., ZUANON NETTO, J. Determinação quali-quantitativa de Zn^{2+} por cromatografia em camada delgada. *Ecl. Quím.*, v.19, p.67-74, 1994. [[Links](#)]
- 3 CHROMATOGRAPHIC SOCIETY. Joint Pharmaceutical Analysis Group. TLC developments. *Pharm. J.*, v.255, p.99, 1995. [[Links](#)]
- 4 COLLINS, C. H. et al. *Introdução a métodos cromatográficos*. 4.ed. Campinas: Unicamp, 1990, 279p. [[Links](#)]
- 5 *DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas*. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1996-1997. [[Links](#)]
- 6 DISCHER, C. A. *Química Inorgânica Farmacêutica*. Madrid: Alhambra, 1966. 583 p. [[Links](#)]
- 7 HANAI, L. W. et al. Separação do íon Fe^{3+} , dos íons Pb^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} pela cromatografia em camada fina de celulose. *Rev. Fac. Farm. Odont. (Araraquara)*, v.8, n.2, p.145,

1974. [[Links](#)]

8 HEROD, A. A., KANDIYOTI, R. F. Fractionation by planar chromatography of a coal tar pitch for characterization by size-exclusion chromatography, UV fluorescence and direct-probe mass spectrometry. *J. Chromatog.*, v.A708, p.143-60, 1995. [[Links](#)]

9 LOBÃO, P. et al. Comprimidos antianêmicos: pré-formulação compromotores de absorção. *Rev. Port. Farm.*, v.XLV, p.3, 1995. [[Links](#)]

10 RAO, R. G., VATSA, K. The quality assurance of drugs and pharmaceuticals. *The Eastern Pharmacist*, p.55-8, May 1990. [[Links](#)]

11 *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA*. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. [[Links](#)]

Recebido em 5.3.1997.

Aceito em 4.4.1997.

* Departamento de Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - 1801-902 - Araraquara - SP - Brasil.

** Departamento de Química Analítica - Instituto de Química - UNESP - 14800-900 - Araraquara - SP - Brasil.