

Artigo

Permanganimetria para a Determinação de Estrôncio e Ranelato de Estrôncio em Formulação Farmacêutica para Tratamento da Osteoporose Pós-Menopausa

Povoa, M. N.; Carvalho, R. C.; Pereira Netto, A. D.; Marques, F. F. C.*

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (6), 2124-2138. Data de publicação na Web: 9 de julho de 2015

<http://www.uff.br/rvq>

Permanganometry for the Determination of Strontium and Strontium Ranelate in Pharmaceutical Formulation for the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis

Abstract: Strontium ranelate is the active agent of a medicine developed for postmenopausal osteoporosis treatment. According to the literature, there are no reports of analytical methods for the determination of strontium in this matrix. Low doses of strontium have important pharmacological effects on bone; however, high doses of this element may cause toxic effects as skeletal abnormalities, rickets and defective bone mineralization.

Because of this, it is important to quantify strontium in new pharmaceutical formulation. Therefore, the current study aims to develop and apply a classical analytical method based on the oxidation-reduction volumetry (specifically permanganometry), for simple, fast and low cost quantification. In addition, quality drug control, specifically the dosing test, which quantifies the amount of strontium ranelate in the medicine, may be indirectly carried out using the suggested method for determining strontium. The method was validated according to the following analytical parameters: linearity, limit of quantification, limit of detection, precision, accuracy and robustness.

Keywords: Osteoporosis; strontium ranelate; strontium; oxidation-reduction volumetry; permanganometry.

Resumo

O ranelato de estrôncio é o princípio ativo de um medicamento desenvolvido para o tratamento da osteoporose pós-menopausa e ainda não há, na literatura, relatos de métodos analíticos para a determinação de estrôncio nessa formulação farmacêutica. Baixas doses de estrôncio exercem efeitos farmacológicos importantes nos ossos, no entanto, altas doses deste elemento podem provocar efeitos indesejáveis, como anormalidades esqueléticas, raquitismo e deficiência na mineralização óssea.

Devido a isso, torna-se importante a quantificação de estrôncio na formulação farmacêutica e, sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e aplicar um método analítico clássico, baseado na volumetria de oxidação-redução (especificamente a permanganimetria), para uma quantificação simples, rápida e de baixo custo. Além disso, o controle de qualidade físico-químico do medicamento, especificamente o ensaio de doseamento ou potência, que visa quantificar o teor de ranelato de estrôncio no medicamento, pode ser realizado de forma indireta com o método proposto, através da determinação de estrôncio. O método proposto foi validado com sucesso atendendo aos seguintes parâmetros analíticos: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão, exatidão e robustez.

Palavras-chave: Osteoporose; ranelato de estrôncio; estrôncio; volumetria de oxidação-redução; permanganimetria.

* Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Campus do Valonguinho, CEP 24020-150, Niterói-RJ, Brasil.

✉ flaviamarques@vm.uff.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150125](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150125)

Permanganimetria para a Determinação de Estrôncio e Ranelato de Estrôncio em Formulação Farmacêutica para Tratamento da Osteoporose Pós-Menopausa

Mayara N. Pova, Renata C. de Carvalho, Annibal D. Pereira Netto, Flávia F. C. Marques*

Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Campus do Valonguinho, CEP 24020-150, Niterói-RJ, Brasil.

* flaviamarques@vm.uff.br

Recebido em 19 de novembro de 2014. Aceito para publicação em 7 de julho de 2015

1. Introdução

2. Permanganimetria

3. Metodologia

3.1. Reagentes, soluções e materiais

3.2. Preparo das soluções padrão e da amostra

4. Resultados e discussão

4.1. Determinação indireta de estrôncio em medicamento, por permanganimetria

4.2. Validação do método analítico

4.3. Aplicação do método em amostras comerciais

5. Conclusões

1. Introdução

A osteoporose, uma doença que representa um problema de saúde pública no Brasil, está se tornando cada vez mais relevante com o envelhecimento da população, sendo mais frequente em mulheres, principalmente na pós-menopausa.¹ Em 2010, um estudo epidemiológico realizado no Brasil, apresentou moderada incidência de fraturas em mulheres acima de 50 anos com osteoporose. Segundo esse estudo, a

prevalência de fraturas de todos os tipos variou entre 11% e 24%, e a mortalidade após as fraturas, variou entre 22% e 30%, além de estarem associadas a altas taxas de incapacidade física, piora da qualidade de vida e excessivo impacto sobre o sistema de saúde.² No Brasil, os gastos com o tratamento e a assistência no Sistema Único de Saúde (SUS) em 2010 foram de aproximadamente R\$ 81 milhões para a atenção ao paciente portador de osteoporose e vítima de quedas e fraturas.³

A osteoporose pós-menopausa é causada pela deficiência de estrogênio, após cessar a

função ovariana, sendo caracterizada por alterações na remodelação óssea, com excessiva reabsorção (remoção do osso mineralizado) e inadequada formação óssea, resultando em diminuição da densidade mineral óssea e aumento do risco de fraturas.^{4,5}

Dentre os principais agentes utilizados para o tratamento da osteoporose pós-menopausa estão os bifosfonatos,

principalmente alendronato de sódio e risedronato de sódio (Figura 1), porém há relatos de reações adversas associadas ao uso prolongado destes agentes, como por exemplo, a fibrilação atrial e a osteonecrose de mandíbula.⁶ Além disso, apesar destes fármacos serem potentes inibidores da reabsorção, não exercem efeito na formação óssea.⁷

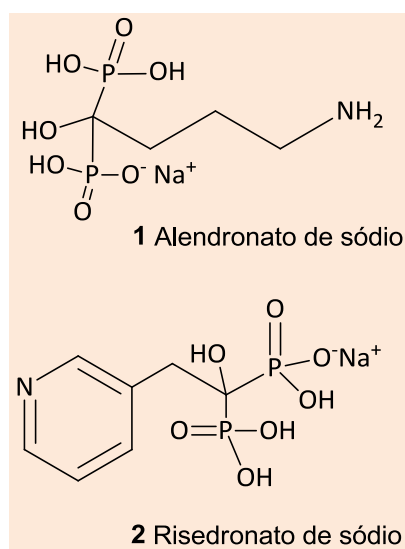


Figura 1. Estrutura molecular do alendronato de sódio (1) e do risedronato de sódio (2)

Sendo assim, em busca de novos medicamentos mais seguros e com maior eficácia, alguns estudos *in vivo* e *in vitro* foram realizados e atestaram que baixas doses de estrôncio não só inibem a reabsorção, como também estimulam a formação óssea, levantando a hipótese de que os sais de estrôncio poderiam ter aplicações terapêuticas no tratamento da osteoporose.⁸⁻¹²

O ranelato de estrôncio, quimicamente designado como 5-[bis(carboximetil)-amino]-4-ciano-3-tiofenoacetato de diestrôncio, foi aprovado em 2004 pela European Medicines Agency¹³, e em 2005 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹⁴, como princípio ativo de um medicamento oral desenvolvido para o tratamento da

osteoporose pós-menopausa. O ranelato de estrôncio possui dois átomos de estrôncio e um ligante denominado ácido ranélico (Figura 2).

Esta substância foi escolhida, em estudos clínicos e farmacológicos, entre diversos sais de estrôncio por apresentar melhores características físico-químicas (solubilidade e estabilidade) e farmacocinéticas (biodisponibilidade), além de apresentar ação específica sobre as células ósseas.¹⁵ O ácido ranélico não é metabolizado, tem baixa ligação às proteínas plasmáticas, não se acumula no organismo humano e é rapidamente eliminado por via renal, deixando os dois átomos de estrôncio livres, responsáveis pelo mecanismo de ação do fármaco.¹⁶

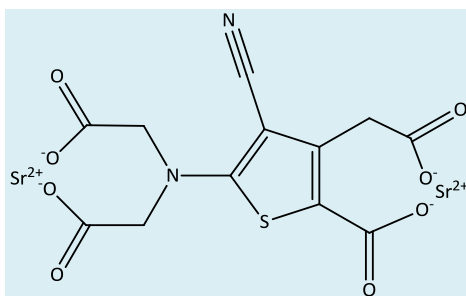


Figura 2. Estrutura molecular do ranelato de estrôncio

Estudos farmacológicos em animais e estudos experimentais em células ósseas *in vitro* mostraram que o ranelato de estrôncio atua através de um duplo mecanismo de ação, induzindo a formação de osteoblastos (células responsáveis pela formação de nova matriz óssea) e aumentando a síntese de colágeno (o principal componente da matriz orgânica do osso).¹⁷ Além disso, o agente

ativo diminui a reabsorção óssea, induzindo a apoptose (morte celular) dos osteoclastos (células responsáveis pela remoção de osso mineralizado). Em ratos normais, o ranelato de estrôncio induziu a formação óssea e a redução da reabsorção óssea, aumentando a densidade mineral óssea.^{9-12,17} Portanto, o ranelato de estrôncio é pró-formador e antirreabsortivo (Figura 3).

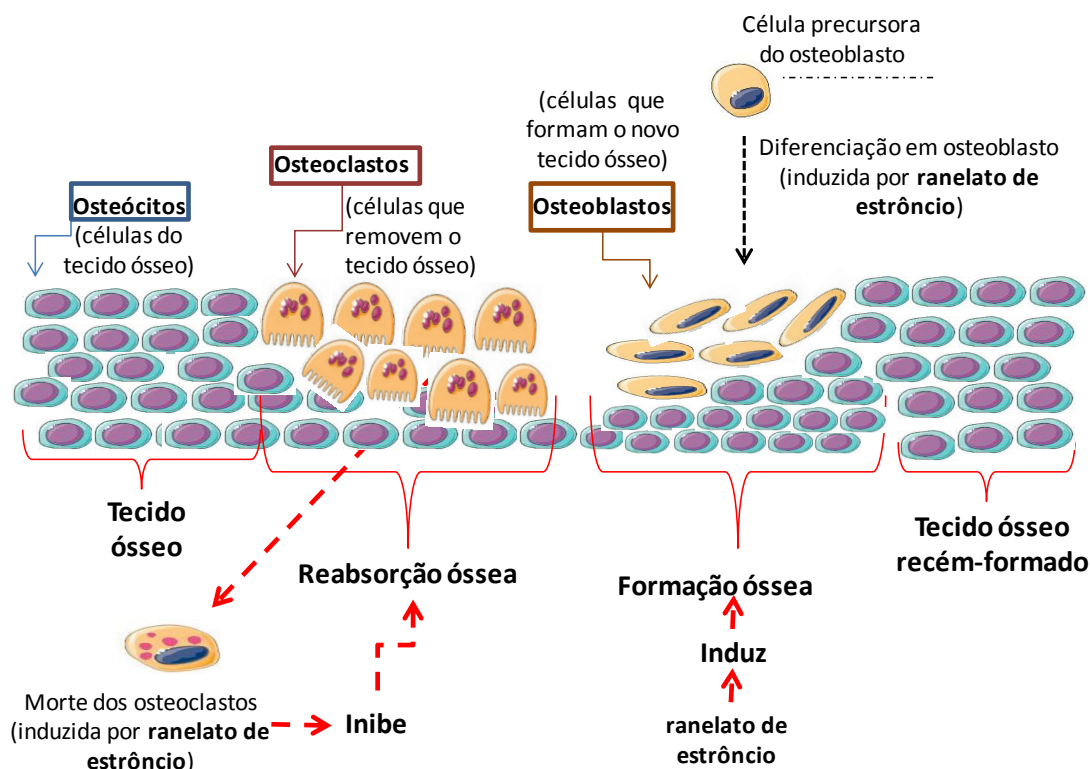


Figura 3. Ciclo de remodelação óssea e a ação do fármaco ranelato de estrôncio (adaptado de Rang e colaboradores)¹⁸

O efeito do estrôncio nos ossos depende da concentração utilizada. Baixas doses de

estrôncio ($\leq 4 \text{ mmol Sr Kg}^{-1}$ de peso corpóreo) exercem efeitos farmacológicos importantes

para o tratamento da osteoporose, conforme descrito anteriormente. No entanto, elevadas doses de estrôncio podem induzir anormalidades esqueléticas, raquitismo e deficiência na mineralização óssea.⁸ Alguns estudos mostraram que altas concentrações de estrôncio diminuem a atividade da enzima D3 hidroxilase, que ativa a vitamina D3.^{8,16,19} A vitamina D3 hidroxilada aumenta a absorção intestinal de cálcio. Logo, a redução da forma ativa desta vitamina pode levar o osso à osteomalácia, caracterizada pela diminuição da mineralização do osso cortical e trabecular, com acúmulo de tecido osteoide não mineralizado ou pouco mineralizado.¹⁹

Portanto, devido aos efeitos tóxicos provocados por altas concentrações de estrôncio, torna-se importante a quantificação deste elemento na formulação farmacêutica desenvolvida para o tratamento da osteoporose pós-menopausa.

Ademais, o controle de qualidade físico-químico do medicamento, especificamente o ensaio de doseamento ou potência, que visa quantificar o teor de ranelato de estrôncio no medicamento, pode ser realizado de forma indireta através da determinação de estrôncio. Atestar que a informação em relação à dose do princípio ativo disposta no rótulo corresponde ao conteúdo do medicamento, é imprescindível para que o produto seja aprovado no controle de qualidade e garanta a eficácia e segurança do medicamento, uma vez que concentrações excessivas de ranelato de estrôncio e, conseqüentemente de estrôncio, podem provocar numerosos efeitos indesejáveis.

Os métodos analíticos de doseamento podem ser subdivididos em métodos clássicos (volumétricos e gravimétricos) e métodos instrumentais.²⁰ Na área de química analítica, ainda são raros os estudos com relação ao ranelato de estrôncio e, particularmente, com relação ao estrôncio no medicamento de interesse, sendo encontrada na literatura apenas a determinação do primeiro pelos métodos analíticos instrumentais de espectroscopia na região do ultravioleta visível²¹, cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE)^{22,23} e eletroforese capilar, que será adotado como método de referência para fins de comparação com este trabalho.¹⁷ Obviamente, os métodos instrumentais se destacam pela maior sensibilidade. Porém, os métodos clássicos ainda são apontados como os oficiais em um número significativo de doseamentos descritos em farmacopeias, o que é justificado pela maior simplicidade, baixo custo dos reagentes necessários e boa precisão e robustez.²⁰

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo adotar e aplicar a volumetria de oxirredução, especificamente a permanganimetria, para a determinação de estrôncio e, conseqüentemente, de ranelato de estrôncio, na formulação farmacêutica desenvolvida para o tratamento da osteoporose pós-menopausa, resgatando assim a química analítica clássica. A escolha deste método clássico de doseamento pode ser uma alternativa rápida, simples e de baixo custo para o controle de qualidade do medicamento, já que o estrôncio pode ser quantificado na matriz de análise por permanganimetria, não sendo necessária a utilização de métodos instrumentais com maior sensibilidade e de custos mais altos.

2. Permanganimetria

A volumetria é dividida em quatro classes: (i) ácido-base, (ii) de precipitação, (iii) de complexação e (iv) de oxirredução. Esta última classe envolve a presença de um agente oxidante e um agente redutor para que ocorra a reação de oxidação-redução, em que os elétrons são transferidos de uma espécie química para outra.²⁴

Os métodos de volumetria de oxirredução recebem nomes específicos, dependendo da substância utilizada para as determinações, como é o caso da permanganimetria, que utiliza o permanganato de potássio (KMnO₄), um forte oxidante, como titulante.²⁵ Neste trabalho, o agente redutor utilizado foi o íon oxalato (C₂O₄²⁻) e a determinação de

estrôncio foi feita de forma indireta.

Em geral, as titulações permanganométricas são realizadas em meio ácido para facilitar a oxidação da substância

em análise, pois o permanganato (MnO_4^-) apresenta três processos redox básicos, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Semirreações de processos redox do íon MnO_4^-

Semirreação	Meio	$E^\circ(\text{V})$
$\text{MnO}_4^- + 8\text{H}^+_{(\text{aq})} + 5\text{e}^- \rightleftharpoons \text{Mn}^{2+}_{(\text{aq})} + 4\text{H}_2\text{O}$	Fortemente ácido	1,51
$\text{MnO}_4^- + 2\text{H}_2\text{O} + 3\text{e}^- \rightleftharpoons \text{MnO}_2 + 4\text{OH}^-$	Neutro ou fortemente alcalino	1,68
$\text{MnO}_4^- + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{MnO}_4^{2-}_{(\text{aq})}$	Fortemente alcalino	0,56

A semirreação mostrada para os íons permanganato, com a formação de íons Mn^{2+} , ocorre somente em soluções de ácidos fortes de concentração $\geq 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em meio menos ácido, o produto pode ser o Mn^{3+} , Mn^{4+} ou Mn^{6+} , dependendo das condições experimentais.^{25,26}

A reação entre o íon permanganato e o íon oxalato se processa lentamente sob temperatura ambiente. Portanto, é necessário que a solução padrão de permanganato seja adicionada a uma solução a quente (cerca de $70 \text{ }^\circ\text{C}$) de íon oxalato para que a reação de oxidação-redução ocorra mais rapidamente.^{24,26}

A escolha da permanganometria para a realização deste trabalho foi baseada nas vantagens deste método clássico de doseamento: (i) simplicidade, (ii) baixo custo e (iii) dispensa o uso de indicadores, pois a coloração violeta intensa do íon permanganato indica o ponto final da titulação, funcionando como autoindicador, ao contrário de outras titulometrias, as quais utilizam indicadores químicos, redox e específicos para a visualização dos pontos finais.²⁵

3. Metodologia

3.1. Reagentes, soluções e materiais

A água ultrapurificada (resistividade $> 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), utilizada para o preparo de todas as soluções aquosas, foi obtida a partir do sistema de osmose reversa (Rios D3, Millipore, EUA), seguido por sistema de purificação de água Simplicity (Millipore, EUA).

O tampão acetato ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0) foi preparado em balão volumétrico de 250,00 mL, através da mistura de 34,0 g de acetato de sódio tri-hidratado com 25,80 mL de ácido acético glacial (ambos Vetec, Brasil), completando o volume com água ultrapurificada.

As soluções padrão de estrôncio, com concentrações na faixa compreendida entre $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($175,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $876,2 \text{ mg L}^{-1}$), foram preparadas em tampão acetato ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0), medindo massas apropriadas de nitrato de estrôncio (Vetec, Brasil) em balança analítica (GR-202, AND, Japão). Estas soluções foram utilizadas para a obtenção da curva analítica.

A solução de oxalato de amônio $0,05 \text{ mol}$

L⁻¹, usada para a precipitação do estrôncio na forma de oxalato de estrôncio, foi preparada medindo 0,7 g de oxalato de amônio monohidratado (Vetec, Brasil) e dissolvendo em 100,00 mL de água ultrapurificada. As centrifugações destas soluções após precipitação do oxalato de estrôncio foram realizadas em centrífuga BENFER (Brasil).

A solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹, utilizada para solubilizar o precipitado de oxalato de estrôncio, foi preparada a partir da diluição de 0,8 mL da solução HCl 37% em 100,00 mL de água ultrapurificada. O aquecimento prévio destas soluções a 70 °C antes da titulação foi realizado em banho-maria termostático, modelo BM-02, Kacil (Recife, Brasil).

A solução de permanganato de potássio 0,001 mol L⁻¹ (titulante) foi preparada por diluição, em água ultrapurificada, da solução estoque 0,02 mol L⁻¹, previamente padronizada com oxalato de sódio (padrão primário).

As amostras do medicamento, cujo princípio ativo é o ranelato de estrôncio, foram adquiridas em farmácias localizadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, RJ - Brasil. A formulação farmacêutica se apresenta como pó granulado para suspensão oral e é comercializada em embalagens contendo 14, 28 ou 56 sachês. Cada sachê contém uma massa total de 4 g, sendo 2 g de ranelato de estrôncio e 2 g de excipientes.

Os grânulos do medicamento foram retirados do sachê e, após a homogeneização, uma massa de 0,1896 g foi precisamente medida em balança analítica e solubilizada em 25,00 mL de tampão acetato (1,0 mol L⁻¹, pH 5,0). Desta forma, preparou-se a solução da amostra farmacêutica com

concentração teórica equivalente a 0,005 mol L⁻¹ de estrôncio.

3.2. Preparo das soluções padrão e da amostra

Em tubos Falcon de polipropileno foram adicionados 5,00 mL das soluções padrão de nitrato de estrôncio (concentrações de estrôncio entre 0,002 mol L⁻¹ e 0,01 mol L⁻¹), utilizadas para a construção da curva analítica, e 5,00 mL da solução de oxalato de amônio 0,05 mol L⁻¹. Essas soluções foram agitadas em vórtex por 1 min e, em seguida, centrifugadas à 6000 rpm por 20 min, obtendo, assim, o precipitado de oxalato de estrôncio (Figura 4A).

O sobrenadante foi retirado e, ao tubo falcon contendo o precipitado de oxalato de estrôncio, foram adicionados 10,00 mL de água ultrapurificada. Em seguida, o procedimento de agitação em vórtex e centrifugação descrito acima foi novamente realizado (Figura 4B). O precipitado de oxalato de estrôncio lavado, obtido nesta etapa, foi então dissolvido em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (Figura 4C). Esta solução foi levada ao aquecimento em banho-maria a 70 °C por 10 min e, em seguida, titulada, ainda quente e sob constante agitação, com permanganato de potássio 0,001 mol L⁻¹ (Figura 4D). Todo o procedimento descrito acima foi realizado em triplicatas autênticas ou verdadeiras, para cada ponto da curva.

Para as soluções das amostras (preparo descrito na Seção 3.1), os mesmos procedimentos descritos acima foram realizados em seis replicatas autênticas para cada amostra.

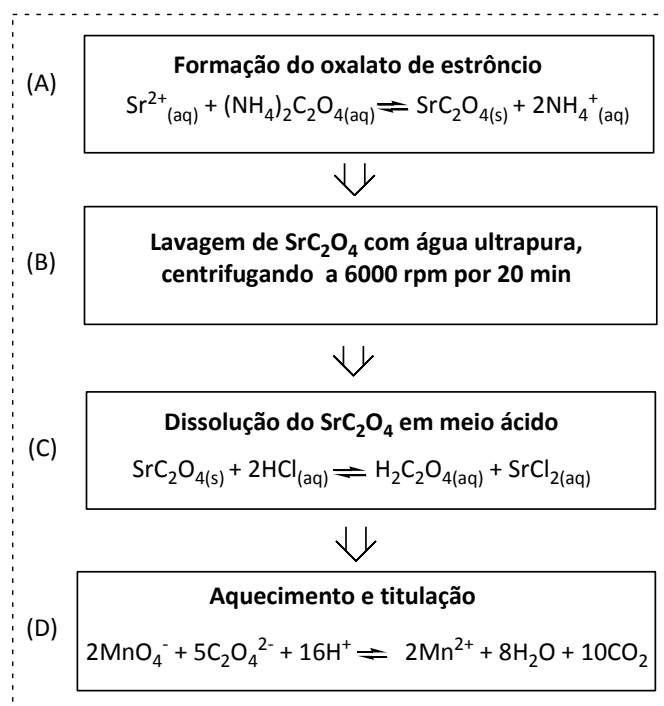


Figura 4. Diagrama simplificado das etapas envolvidas no processo de titulação do Sr^{2+} com KMnO_4

4. Resultados e discussão

4.1. Determinação indireta de estrôncio em medicamento, por permanganimetria

Para solubilizar o oxalato de estrôncio, formado pela reação do estrôncio com o oxalato de amônio, foram testados os ácidos sulfúrico e clorídrico nas concentrações de 6,0; 4,0; 1,2 e 0,1 mol L⁻¹. O ácido sulfúrico não solubilizou o oxalato de estrôncio obtido, enquanto que o ácido clorídrico foi capaz de solubilizar completamente o sal nas concentrações estudadas. Com isso, a concentração de HCl 0,1 mol L⁻¹ foi escolhida, pois além de ter sido suficiente para solubilizar o sal (Figura 4C), também permite que ocorra a redução do permanganato à Mn^{2+} (reação mostrada na Tabela 1), evitando que haja formação de Mn^{3+} , Mn^{4+} e Mn^{6+} .

Após a escolha do ácido para a solubilização do oxalato de estrôncio

(SrC_2O_4), foi realizada a titulação utilizando a solução de permanganato de potássio (previamente padronizada) como solução titulante. Durante a titulação, o íon $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ é oxidado enquanto acontece a redução do íon MnO_4^- , conforme mostra a reação indicada na Figura 4D.

A velocidade da reação entre o íon permanganato e o íon oxalato é baixa e por isso a boa repetibilidade dos resultados é obtida somente em condições previamente estabelecidas e controladas. Uma dessas condições é a utilização de aquecimento controlado a 70 °C para que a velocidade de reação seja suficientemente alta, conforme já explicado na Seção 2.

A determinação de estrôncio foi feita indiretamente através da determinação quantitativa do oxalato, já que para cada mol de oxalato tem-se um mol de estrôncio e, como o produto da reação é o Mn^{2+} (incolor), o ponto final foi visualizado com o aparecimento de um rosa pálido, devido ao primeiro traço de excesso de permanganato em solução, o qual funciona como um

autoindicador.

A Tabela 2 mostra um resumo das condições experimentais empregadas para aplicação da permanganimetria na

determinação indireta de estrôncio e, conseqüentemente, de ranelato de estrôncio, no medicamento desenvolvido para o tratamento da osteoporose pós-menopausa.

Tabela 2. Condições experimentais empregadas para a determinação de estrôncio em medicamento por permanganimetria

Fatores	Condições
Titulante (agente oxidante)	KMnO ₄ 0,001 mol L ⁻¹
Solução do agente redutor	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ 0,05 mol L ⁻¹
Ácido	HCl 0,1 mol L ⁻¹
Autoindicador em meio ácido	KMnO ₄ 0,001 mol L ⁻¹
Temperatura de aquecimento da solução de C ₂ O ₄ ²⁻ (Figura 4D)	70 °C

4.2. Validação do método analítico

Os parâmetros analíticos para a validação do método de doseamento em questão foram obtidos de acordo com os seguintes documentos: *International Conference on Harmonisation ICH Q2(R1)*²⁷; Resolução (RE) n°899 da ANVISA (considerando que este trabalho encontra-se classificado na Categoria I da Tabela 2)²⁸, e DOQ-CGCRE-008 ("Orientação sobre validação de métodos analíticos") do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).²⁹ Após a implementação das condições experimentais (Tabela 2), o método de doseamento desenvolvido neste trabalho foi validado através da avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação (embora não seja uma exigência para métodos volumétricos), precisão, exatidão e robustez.

4.2.1. Linearidade

A faixa linear do método foi verificada através de três curvas analíticas obtidas a partir de soluções padrão de nitrato de estrôncio em diferentes concentrações preparadas em tampão acetato (1,0 mol L⁻¹,

pH 5,0). As medições foram realizadas em triplicata para cada um dos cinco níveis de concentração). O comportamento linear na faixa de concentração (expressa em massa de Sr²⁺ titulada) de 0,25 a 3,71 mg de estrôncio foi observado em todas as curvas analíticas, sendo uma das curvas representada pela equação $Y = 192,48 X + 131,68$ (Equação 1), a qual corresponde à concentração (mg L⁻¹) de Sr(NO₃)₂ = 192,48*massa Sr²⁺ titulada na alíquota de 10 mL + 131,68 (Figura 5).

O comportamento linear das curvas analíticas foi indicado pelo valor de coeficiente de determinação (r^2), que foi superior a 0,99, valor mínimo aceitável como critério de linearidade, segundo a ANVISA.²⁸ O comportamento homocedástico dos resultados foi mostrado através do gráfico de resíduos (Figura 6) e a sua distribuição normal confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk (nível de confiança de 95%), que foi calculado através da seguinte equação: $W = b^2 / (n-1) * s^2$. Nesta equação, $b = \sum [a_i (X_{(n+1)-i} - X_i)]$, sendo a_i as constantes geradas pelas médias, variâncias e covariâncias das estatísticas de ordem de uma amostra de tamanho n de uma distribuição normal, e X_i os valores da amostra ordenados (X_1 é o menor). O valor de $W_{\text{calculado}} = 43,170$, acima do valor crítico tabelado (0,762), demonstrou a aleatoriedade dos resíduos ao longo da melhor reta.³⁰

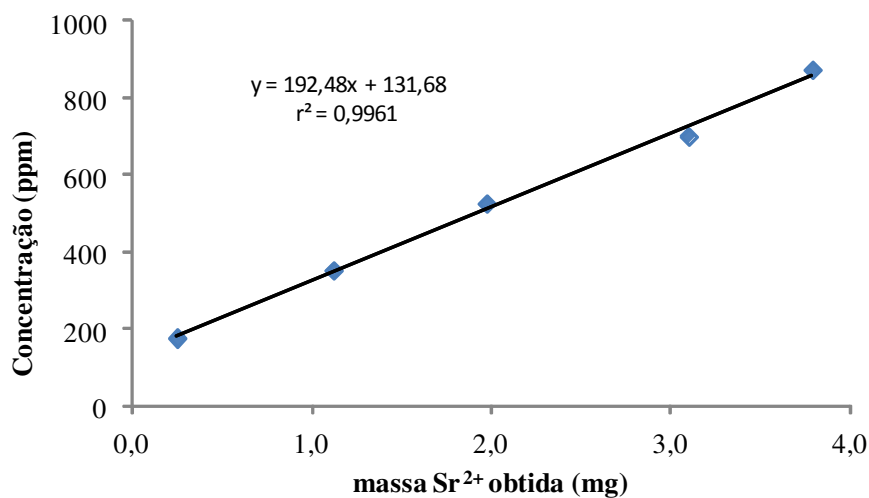


Figura 5. Curva representativa do método proposto

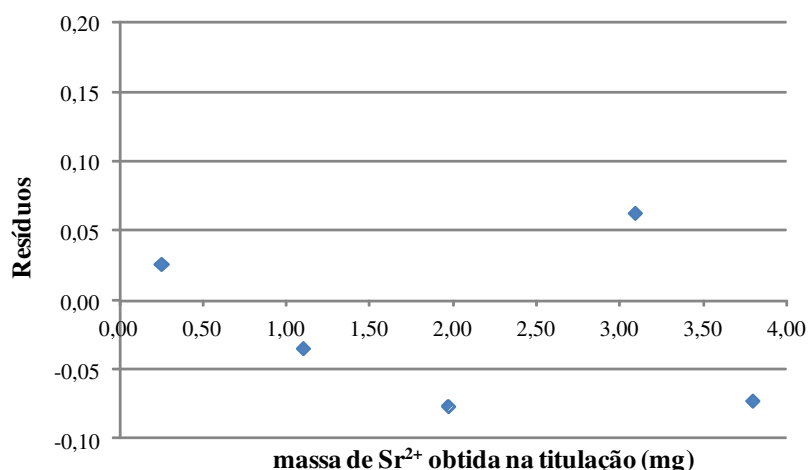


Figura 6. Gráfico de resíduos mostrando o comportamento homocedástico dos resultados obtidos

4.2.2. Limites de detecção e quantificação

A sensibilidade de um método é definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).³¹ Para o caso em questão, o primeiro ponto da curva analítica foi considerado como LQ. Para o LD, o valor do LQ foi dividido por 3,33. Obtiveram-se assim os valores de LD (0,08 mg Sr²⁺) e LQ (0,25 mg Sr²⁺), o que está bastante satisfatório para as condições implementadas na técnica utilizada.

4.2.3. Precisão

A precisão foi avaliada através da repetitividade e da precisão intermediária, embora esta última não seja necessária segundo Resolução (RE) n°899 da ANVISA (Categoria I da Tabela 2).²⁸ A repetitividade foi estimada através do desvio padrão relativo (DPR) baseado em seis titulações consecutivas, sob as mesmas condições analíticas e mesmo analista, realizadas a partir de soluções padrão de nitrato de estrôncio 438,1 mg L⁻¹ (equivalente a 1,59 mg

de Sr^{2+} em 10 mL de solução, segundo a Equação 1). Para os volumes (mL) de titulante (solução de permanganato de potássio 0,001 mol L^{-1}) gastos nas titulações, o desvio padrão

relativo foi de 3,1 % (Tabela 3), sendo este valor considerado satisfatório, pois é menor que o valor máximo permitido (5 %).^{27,28}

Tabela 3. Precisão do método em termos de repetitividade

Replicatas	Volume (mL) de titulante (KMnO_4 0,001 mol L^{-1})
1	8,00
2	8,15
3	7,85
4	8,60
5	8,10
6	8,10
Média	8,13
DPR (%)	3,10

A precisão intermediária do método foi demonstrada através de seis titulações independentes, a partir de soluções padrão de nitrato de estrôncio 438,1 mg L^{-1} (equivalente a 1,59 mg de Sr^{2+} em 10,00 mL de solução, segundo a Equação 1), realizadas

no mesmo dia, sob as mesmas condições, porém por analistas diferentes. Os valores de DPR para os volumes de titulantes gastos nas titulações foram todos inferiores a 4,6% (Tabela 4), sendo o resultado considerado satisfatório.

Tabela 4. Desvio padrão relativo de cada analista para estudo da precisão intermediária do método

Analista	Volume médio (mL) de titulante (n = 6)	DPR (%)
1	8,13 \pm 0,25	3,1
2	7,15 \pm 0,32	4,5

O teste F-Snedecor foi aplicado para verificar se as médias dos volumes de titulante gastos na titulação, realizada por diferentes analistas, são homocedásticas (quando as variâncias associadas às médias são estatisticamente equivalentes) ou heterocedásticas (quando as variâncias associadas às médias não são estatisticamente equivalentes). Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ (1,29) obtido foi menor que o de $F_{\text{crítico}}$ (7,146), a hipótese nula deve ser aceita, ou seja, as médias são consideradas homocedásticas. A partir desse resultado,

presumindo que as médias apresentam variâncias equivalentes, o teste t-Student (nível de confiança de 95%) foi usado para comparar as médias dos volumes de titulante gastos na titulação realizada por diferentes analistas. Neste caso, o valor de $t_{\text{calculado}}$ (1,106) foi menor que o valor de $t_{\text{crítico}}$ (1,812), de forma que a hipótese nula deve ser aceita, ou seja, as médias obtidas pelos diferentes analistas são iguais. Portanto, pode-se afirmar que o método desenvolvido neste trabalho apresentou boa precisão intermediária.³⁰

4.2.4. Ensaios de recuperação e comparação com método de referência

A exatidão do método foi avaliada através de testes de recuperação, nos quais seis replicatas autênticas de soluções da amostra foram fortificadas com concentração teórica de nitrato de estrôncio 438,1 mg L⁻¹ (equivalente a 1,59 mg de Sr²⁺ em 10,00 mL de solução, segundo a Equação 1). Amostras não fortificadas também foram analisadas concomitantemente. Os testes foram realizados em triplicata e as recuperações calculadas segundo a Equação 2: Recuperação = [(C₁-C₂)/C₃]*100, onde C₁ é a concentração do analito na amostra fortificada; C₂ é a concentração do analito na amostra não fortificada e C₃ é a concentração do analito adicionado na amostra. Todas as concentrações foram obtidas a partir das curvas analíticas. Após as titulações realizadas nas condições implementadas (Tabela 2), o valor médio da exatidão foi de 98,7 ± 3,2%, mostrando que o método desenvolvido é exato o suficiente para a determinação de Sr²⁺, e conseqüentemente de ranelato de estrôncio, no medicamento.

As mesmas amostras (n=6) utilizadas para os testes de recuperação descritos acima, foram também analisadas em triplicatas autênticas e comparadas com os resultados obtidos por um método considerado como referência, baseado em eletroforese capilar.¹⁷ A recuperação média calculada por

eletroforese capilar foi de 102,1 ± 1,8% e a comparação das recuperações obtidas por ambos os métodos através de teste *t-Student* (95% de confiança) apresentou valor de $t_{\text{calculado}}$ (0,707) menor que o valor de $t_{\text{crítico}}$ (2,110), de forma que a hipótese nula deve ser aceita, ou seja, as médias obtidas pelos diferentes métodos são iguais.

4.2.5. Robustez

A robustez do método foi avaliada levando em consideração a variação da temperatura de aquecimento da alíquota durante a titulação. A variação da temperatura, na faixa de 65 a 70 °C, mostrou que não houve diferença significativa nos resultados obtidos, com desvio padrão relativo entre as medidas menor que 5%. Logo, é possível dizer que o método é robusto com relação a esta faixa de variação de temperatura.

A Tabela 5 apresenta um resumo dos parâmetros analíticos avaliados para a validação do método analítico. O método desenvolvido foi considerado validado, pois atendeu a todos os parâmetros exigidos pela Resolução (RE) nº899 da ANVISA²⁸, *International Conference on Harmonisation ICH Q2(R1)*²⁷ e pelo documento DOQ-CGCRE-008 ("Orientação sobre validação de métodos analíticos") do INMETRO.²⁹

Tabela 5. Parâmetros analíticos de validação

Condições da medição	Resultados
Equação da curva ^a	Y= 192,48X + 131,68
r ²	0,9961
Limite de Detecção	0,08 mg Sr ²⁺ em 10 mL
Limite de Quantificação	0,25 mg Sr ²⁺ em 10 mL
Repetitividade (DPR%, n = 7)	3,1 % (volume de titulante)
Precisão intermediária (DPR%, n = 6)	$t_{\text{calculado}}$ (1,106) < $t_{\text{crítico}}$ (1,812)
Exatidão (recuperação, n = 6)	98,7 ± 3,2%

^a Y é a concentração (mg L⁻¹) de Sr(NO₃)₂ e X é a massa de Sr²⁺ titulada na alíquota de 10 mL (segundo procedimento descrito na Seção 3.2).

4.3. Aplicação do método em amostras comerciais

A aplicabilidade do método foi verificada em três amostras (diferentes lotes) da formulação farmacêutica de interesse (composição descrita na Seção 3.1), sendo cada amostra analisada em triplicatas autênticas. Conforme mostra a Tabela 6, as concentrações de ranelato de estrôncio (em massa; g), calculadas a partir das concentrações de Sr^{2+} encontradas através

das titulações por permanganimetria, estão em boa concordância com o valor esperado conforme o rótulo do fabricante (2 g de ranelato de estrôncio em 4 g do sachê). O teste *t-Student* (nível de confiança de 95%), neste caso usado para comparação de um valor medido com um valor conhecido, apresentou valor de $t_{\text{calculado}}$ (0,50) menor que o valor de t_{tabelado} (2,30), demonstrando que a hipótese nula foi aceita, ou seja, o valor medido pelo método proposto não é considerado significativamente diferente do valor conhecido.

Tabela 6. Aplicação do método na formulação farmacêutica

	Massa de ranelato de estrôncio (g)					
	Replicata			Média	Desvio padrão	Média do erro relativo*
	1	2	3			
Lote 1	2,3	2,2	2,2	2,2	0,06	11,7%
Lote 2	2,1	1,8	2,0	2,0	0,15	-1,7%
Lote 3	1,7	1,9	2,1	1,9	0,20	-5,0%
Média (n = 9)				2,03	0,20	1,7%

*Foi considerado como valor verdadeiro, 2 g de ranelato de estrôncio, que é a massa reportada no rótulo do fabricante, contida em 4 g do sachê.

5. Conclusões

A técnica de permanganimetria (volumetria de oxidação-redução) foi aplicada no desenvolvimento de um método analítico clássico simples para a determinação indireta de estrôncio em um medicamento aprovado para o tratamento da osteoporose pós-menopausa. O método desenvolvido pode ser utilizado no controle de qualidade físico-químico do medicamento, através da quantificação do princípio ativo (ranelato de estrôncio), que pode ser realizado de forma indireta através da determinação de estrôncio. A simplicidade e o baixo custo do método proposto são as principais vantagens em relação ao método recentemente desenvolvido por eletroforese capilar (usado para fins de comparação com este trabalho) para a determinação de ranelato de estrôncio na formulação

farmacêutica. No entanto, sua baixa sensibilidade impede que o método seja aplicado em outros tipos de amostras, tais como sangue, saliva ou urina, nas quais as concentrações de estrôncio e ranelato estarão muito reduzidas.¹⁷

A metodologia utilizou solução de permanganato de potássio $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ como titulante, agente oxidante e indicador; solução de oxalato de amônio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ como agente redutor, e solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para a dissolução do oxalato de estrôncio e para tornar o meio suficientemente ácido para reduzir o MnO_4^- a Mn^{2+} .

Os parâmetros analíticos de validação foram avaliados e mostraram que o método proposto apresentou boa precisão, exatidão, robustez e faixa linear entre as concentrações de 0,25 a 3,71 mg de estrôncio, com coeficiente de determinação maior que 0,99.

Sendo assim, o método clássico implementado pode ser uma boa alternativa para a determinação de estrôncio e, consequentemente de ranelato de estrôncio, na nova formulação farmacêutica para tratamento da osteoporose. Além disso, pode ser estendido para aplicações em análise de rotina farmacêutica, no controle de qualidade físico-químico do medicamento (ensaio de doseamento), através da quantificação do princípio ativo (ranelato de estrôncio).

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPERJ (processo E-26/111.891/2012) pelo apoio financeiro. Agradecimentos também ao CNPq pela bolsa concedida.

Referências Bibliográficas

- ¹ Lane, N. E. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* **2006**, *194*, S3. [CrossRef][PubMed]
- ² Pinheiro, M. M.; Eis, S. R. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: what we have and what we need. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **2010**, *54*, 164. [CrossRef]
- ³ Brasil. Prevenção à osteoporose deve começar na infância. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/2743/162/prevencao-a-osteoporose-deve-comecar-na-infancia.htm>>. Acesso em: 8 fevereiro 2015.
- ⁴ Bonnelye, E.; Chabadel, A.; Saltel, F.; Jurdic, P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*. *Bone* **2008**, *42*, 129. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Khajuria, D. K.; Razdan, R.; Mahapatra, D. R. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. *Revista Brasileira de Reumatologia* **2011**, *51*, 365. [CrossRef]
- ⁶ Sambrook, P. N.; Ebeling, P. Osteonecrosis of the jaw. *Current Rheumatology Reports* **2008**, *10*, 97. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ Fleisch, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocrine Reviews* **1998**, *19*, 80. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Marie, P. J.; Amman, P.; Boivin, G.; Rey, C. Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Strontium in Bone. *Calcified Tissue International* **2001**, *69*, 121. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Barbara, A.; Delannoy, P.; Denis, B. G.; Marie, P. J. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. *Metabolism – Clinical and Experimental* **2004**, *53*, 532. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Baron, R.; Tsouderos, Y. In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *European Journal of Pharmacology* **2002**, *450*, 11. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Canalis, E.; Hott, M.; Delofree, P.; Tsouderos, Y.; Marie, P. J. The Divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation *in vitro*. *Bone* **1996**, *18*, 517. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Takahashi, N.; Sasaki, T.; Tsouderos, Y.; Suda, T. S 12911-2 Inhibits osteoclastic bone resorption *in vitro*. *Journal of Bone and Mineral Research* **2003**, *18*, 1082. [CrossRef]
- ¹³ European Medicines Agency. Resumo das Características do medicamento Protos. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_Product_Information/human/000560/WC500045525.pdf>. Acesso em: 4 julho 2015.
- ¹⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Saúde e Economia. Brasília, DF. **2011**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f1e83280478cfd835abf11eefca640/Saude_e_Economia_Epilepsia_Edicao_n_5_de_abril_2011_cartas.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 04 julho 2015.

- ¹⁵ Neuprez, A.; Hiligsmann, M.; Scholtissen, S.; Bruyere, O.; Reginster, J. Y. Strontium ranelate: the first agent of a new therapeutic class in osteoporosis. *Advances in Therapy* **2008**, *25*, 1235. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Souza, M. P. G. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. *Revista Brasileira de Ortopedia* **2010**, *45*, 220. [CrossRef]
- ¹⁷ Carvalho, R. C.; Pereira Netto, A. D.; Marques, F. F. C. Simultaneous determination of strontium ranelate and aspartame in pharmaceutical formulation for the treatment of postmenopausal osteoporosis by capillary zone electrophoresis. *Microchemical Journal* **2014**, *117*, 214. [CrossRef]
- ¹⁸ Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; *Farmacologia*, 6a. ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.
- ¹⁹ Mechica, J. B. Raquistismo e Osteomalacia. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* **1999**, *43*, 457. [CrossRef]
- ²⁰ Gil, E. S.; *Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos*, 3a. ed., Pharmabooks: São Paulo, 2010.
- ²¹ Mythili, K.; Gayatri, S.; Kumar, E. M.; Reddy, T. A.; Chitra, K. Reddy, C. U. M. Development and Validation of UV Spectrophotometric Method for the Estimation of Strontium Ranelate in Sachet Formulation. *Research Journal of Pharmacy and Technology* **2011**, *4*, 1468. [Link]
- ²² Swami, A. S.; Pishawikar, S. A.; More, H. N. Forced Degradation Study of Strontium Ranelate (anti-osteoporetic drug). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2012**, *12*, 22. [Link]
- ²³ Mythili, K.; Gayatri, S.; Teja, K. R.; Chitra, K.; Reddy, C. Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of strontium ranelate in sachet. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2011**, *2*, 258. [Link]
- ²⁴ Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. *Fundamentos de Química Analítica*, 8a. ed. Thomson Learning Ltda: New York, 2006.
- ²⁵ Moura, E. M.; *Permanganimetria e Iodometria*. Universidade Federal do Alagoas. Maceió, 2013. Disponível em: <<http://share.pdfonline.com/88a1c3eeac9844e38761f19eafb870ef/analitica.htm>>. Acesso em: 24 abril 2013.
- ²⁶ Vogel, A. R. *Análise Química Quantitativa*, 6a. ed. LTC: São Paulo, 2002.
- ²⁷ International Conference on Harmonisation (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, **2005**. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em: 7 julho 2013.
- ²⁸ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 899, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 7 julho 2013.
- ²⁹ Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Documento de caráter orientativo. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 7 julho 2013.
- ³¹ Miller, J. C.; Miller, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*, 3a. ed. Chichester: UK, 1993.
- ³² Ribeiro, F. A. L.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S. C.; Silva, L. R.; Schneider, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova* **2008**, *31*, 164. [CrossRef]