



## Determinação de cobamamida em produtos farmacêuticos por espectrofotometria no visível

### Determination of cobamamida in pharmaceuticals by visible spectrophotometry

Recebido em 20/10/2011

Aceito em 07/03/2012

Flavia Carine Viana Silva Ieggli<sup>1\*</sup>, Fernanda de Oliveira Daltrozo<sup>2</sup>, Gabriel de Moraes Reis<sup>2</sup>, Mayara Dobler Malheiros<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Curso de Farmácia, BR 472, km 585, Uruguaiiana, CEP 97500-970, RS, Brasil

<sup>2</sup> Universidade de Cruz Alta, Centro de Ciências da Saúde, 98.020-290, Cruz Alta, RS, Brasil

#### RESUMO

A cobamamida, coenzima B12 ou adenosilcobalamina, faz parte de uma família de compostos denominados genericamente de cobalaminas. Esta substância possui ações antianêmica, neurotrófica e neuroregeneradora, além de ação anabolizante ativando a síntese protéica. Embora esteja disponível comercialmente em solução parenteral, xarope, comprimidos e cápsulas manipuladas, as farmacopéias não contemplam métodos oficiais para determinação da cobamamida. A espectrofotometria UV/Vis é um método frequentemente utilizado na rotina de laboratórios de controle de qualidade, por ser de fácil execução e ter custo relativamente baixo. Assim, este trabalho objetivou o desenvolvimento de um método simples que permitisse a determinação de cobamamida em matéria-prima e em formas farmacêuticas. Os máximos de absorção da cobamamida em solução aquosa foram em 350 nm e 530 nm, sendo que a absorvidade molar aparente calculada, em água a 350 nm, foi de  $109 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . O método foi avaliado em termos de linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade. O método apresentou linearidade no intervalo de 10 a 60  $\mu\text{g/mL}$ . Os limites de detecção e de quantificação foram 2,04  $\mu\text{g/mL}$  e 6,19  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A repetibilidade do método apresentou desvio padrão relativo (DPR) menor que 5,93 em todas as amostras e a precisão intermediária apresentou DPR de 3,93% ( $n=3$ ). A exatidão do método avaliada por ensaios de recuperação apresentou valores variando de 98,6 a 106,6%. O método apresentado mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser usado tanto para fins de determinação do teor de matéria-prima quanto para quantificação de cobamamida em formas farmacêuticas.

**Palavras-chave:** Cobamamida, Espectrofotometria, Comprimidos, Controle de qualidade, Química Analítica

#### ABSTRACT

The cobamamide, adenosylcobalamin or coenzyme B12, is part of a group of compounds known generically as cobalamins. This substance has actions antianemics, and neurotrophic neuroregeneradora, besides action anabolic activating protein synthesis. Although it's commercially available in parenteral solution, syrup, tablets and compounded capsules, the pharmacopoeias do not include official methods for determining the cobamamide. Spectrophotometry UV / Vis is a method frequently used in routine of quality control laboratories, because it is easy to perform and have low cost. Thus, this study aimed to develop a simple method that allows the determination of bulk cobamamide and in its dosage forms. The cobamamide absorption maxima in aqueous solution were at 350 nm and 530 nm, and the apparent molar absorptivity calculated in water at 350 nm was  $109 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . The method was evaluated in terms of linearity, precision, accuracy and sensitivity. The method was linear in the range of 10 to 60  $\text{mg} / \text{mL}$ . The limits of detection and quantification were 2.04  $\text{mg} / \text{mL}$  and 6.19  $\text{mg} / \text{mL}$ , respectively. The method repeatability had a standard deviation (RSD) less than 5.93 in all samples and intermediate precision showed RSD of 3.93% ( $n = 3$ ). The accuracy evaluated by recovery assays showed values ranging from 98.6 to 106.6%. The method showed to be adequate, featuring simplicity, linearity, precision and accuracy, can be used for tenor determining of bulk material and to quantify the cobamamide dosage forms.

**Keywords:** Cobamamide, Spectrophotometry, Tablets, Quality Control, Analytical Chemistry

\* Contato: Carine Viana Silva Ieggli, UNIPAMPA), Curso de Farmácia, BR 472, km 585, Uruguaiiana, CEP 97500-970, RS, Brasil, e-amil: carineviana@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

A cobamamida, coenzima B12 ou adenosilcobalamina, faz parte de uma família de compostos denominados genericamente de cobalaminas. É hidrossolúvel, sintetizada exclusivamente por microrganismos, encontrada fisiologicamente em praticamente todos os tecidos animais, sendo estocada primariamente no fígado. A fonte natural na dieta humana são alimentos de origem animal, especialmente leite, carne e ovos (Glusker, 1997).

Todas as cobalaminas são compostas por um anel tetrapirrólico que circunda um átomo central de cobalto, um grupo nucleotídico, que consiste na base 5,6-dimetilbenzimidazol e numa ribose fosforilada esterificada com 1-amino, 2-propanol (Figura 1). Seus nomes são dados de acordo com os diferentes radicais ligados ao cobalto: metil (metilcobalamina), hidroxil (hidroxilcobalamina), água (aquacobalamina), cianeto (cianocobalamina) e desoxiadenosila (adenosilcobalamina) (Paniz et al., 2005).

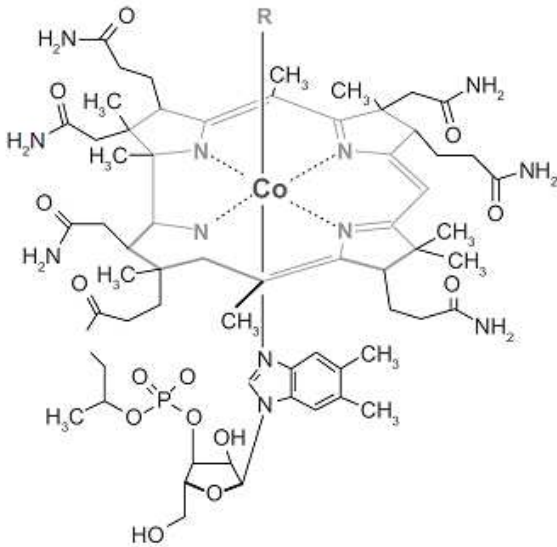


Figura 1. Estrutura das cobalaminas

De uma maneira geral, os medicamentos contendo cobalaminas são clinicamente úteis como antianêmicos. Entretanto, a cobamamida possui ação anabolizante ativando a síntese protéica, tornando positivo o balanço nitrogenado, favorecendo o uso de glicídios e lipídios. Também tem efeito sobre o sistema hematopoiético com ação antianêmica, além de agir no sistema nervoso central e periférico com ações neurotrófica e neuroregeneradora (Randaccio et al., 2010). Devido às atividades da cobamamida ocorre seu emprego como anabolizante alternativo por quem deseja o efeito de síntese protéica e consumo lipídico.

Industrialmente, a cobamamida é comercializada em formas farmacêuticas para uso via oral e via intramuscular, com os nomes comerciais: Enzicoba®, Cobavital®, Cronobê®. No entanto, este fármaco é também disponível em farmácias magistrais, sendo manipulado principalmente na forma de cápsulas. A determinação do teor destes produtos farmacêuticos requerem procedimentos analíticos com boa performance, contudo

as farmacopéias não contemplam métodos oficiais para determinação da cobamamida, tanto em matéria-prima quanto em formas farmacêuticas.

As cobalaminas têm sido determinadas em diversos tipos de matrizes analíticas, inclusive formas farmacêuticas, através de métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, quimioluminescência, fluorimetria, eletroforese capilar, espectrometria de absorção atômica, além de métodos microbiológicos. Todavia, métodos envolvendo espectrofotometria na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) são escassos, principalmente em formas farmacêuticas (Kumar et al., 2010).

Não foi encontrada metodologia por espectrofotometria de absorção no visível de leitura direta para a determinação isolada da cobamamida como substância pura ou veiculada em comprimidos. Cabe salientar também que este fármaco não possui método oficial inserido em nenhuma farmacopéia. Assim, este trabalho objetivou apresentar um método simples que permitisse a determinação de cobamamida em matéria-prima e em formas farmacêuticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Equipamento

Espectrofotômetro UV/Vis, Milton-Roy Genesys 2; com cubetas de quartzo de 10 mm de espessura.

### Reagentes e solventes

A substância química de referência com pureza declarada de 99,80% foi adquirida da empresa Galena (Brasil). Os comprimidos foram adquiridos comercialmente, com teor declarado de 1mg de Cobamamida e apresentavam os seguintes excipientes: lactose, amido, polivinilpirrolidona, sacarina, ciclamato, bióxido de silício, estearato de magnésio e essência de cereja.

### Padronização do método

Preparo da solução estoque de SQR: Foi pesado analiticamente, quantidade da SQR, correspondente a 125,0 mg de cobamamida a qual foi transferida para balão volumétricos de 50 mL. Após solubilização, o volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração de 2500,0 µg/mL. A partir desta solução foram preparadas soluções para construção dos espectros de absorção e curvas de calibração.

Espectros de absorção: Os espectros de absorção das soluções da SQR e dos comprimidos foram traçados no comprimento de onda de 350nm, utilizando soluções contendo 30,0 µg/mL de cobamamida preparadas em água destilada.

### Validação do método

Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados na validação dos métodos propostos para a determinação de teor de cobamamida em comprimidos:

Linearidade: Três curvas de calibração foram preparadas, cada uma com seis níveis de concentração. As curvas foram obtidas a partir de uma solução aquosa da SQR com concentração de 2500 µg/mL, foram transferidas alíquotas de 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 µL para balões volu-

métricos de 50 mL. Os volumes foram completados com água, obtendo-se soluções com concentrações de 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. As leituras foram realizadas em 244 nm, utilizando etanol como branco. Com os valores das absorvâncias em função da concentração de cobamamida foram calculados os coeficientes de correlação e as equações das retas padrões. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ): Foram calculados, conforme ICH, a partir do desvio padrão da resposta e da inclinação das curvas de calibração obtidas por regressão linear.

**Precisão:** Para determinação da repetibilidade foram preparadas e analisadas, no mesmo dia, seis amostras de comprimidos na mesma concentração (30,0  $\mu\text{g/mL}$ ). Na determinação da precisão intermediária foram preparadas e analisadas, em três diferentes dias, três amostras de comprimidos na mesma concentração (30,0  $\mu\text{g/mL}$ ). A precisão foi expressa como coeficiente de variação percentual (CV%). Para análise das amostras foi determinado o peso médio de 20 comprimidos, os quais foram posteriormente triturados. Pesaram-se quantidades equivalentes a 1,5 mg de cobamamida as quais foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, com auxílio de água destilada. Após banho de ultra-som durante 5 min, os volumes foram completados com água destilada, obtendo-se soluções com concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$ , as quais foram filtradas. As leituras de absorvâncias foram efetuadas nos comprimentos de onda citados anteriormente.

**Exatidão:** Para o teste de recuperação foram pesados o equivalente a 1,5 mg de cobamamida e transferidos para balões volumétricos de 50 mL, os quais foram denominados A, R1, R2 e R3. Aos balões R1, R2 e R3 foram adicionadas alíquotas de 200, 400 e 600  $\mu\text{L}$  da solução estoque de SQR contendo 2500  $\mu\text{g/mL}$ . O volume final foi completado com água para obter as concentrações teóricas finais de 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ; respectivamente para A, R1, R2 e R3. Simultaneamente, foi preparada uma solução de cobamamida SQR contendo 30  $\mu\text{g/mL}$  denominada P.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a legislação brasileira, o fabricante é responsável pela qualidade dos medicamentos produzidos, devendo assegurar que seus produtos sejam adequados para os fins aos quais se destinam. Assim, deve garantir a qualidade por meio de todas as providências adotadas, afim de que os medicamentos estejam dentro dos padrões exigidos (Brasil, 2010). Por sua vez, o controle de qualidade está relacionado, dentre outros, à garantia de que ensaios necessários e relevantes sejam executados e que não haja liberação de produtos para venda ou fornecimento, até que a qualidade dos mesmos seja considerada satisfatória (Bueno et al., 2011).

Para análise de fármacos em controle de qualidade é desejável método mais simples e mais rápido possível. Os métodos espectrofotométricos são amplamente utilizados com esta finalidade, além de serem de fácil execução, possuem baixo custo operacional e de manutenção (Gil, 2010).

O desempenho do procedimento analítico escolhido de-

ve ser demonstrado através da sua validação, a qual confirma se o mesmo é adequado para a análise pretendida. Segundo a Resolução 899 (Brasil, 2003), a qual dispõe um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Na espectrofotometria UV/Vis, o primeiro passo é investigar o espectro de absorção do fármaco para definir as bandas de absorção máxima e suas intensidades e, assim, escolher o comprimento de onda de trabalho. A cobamamida é solúvel em água e seus máximos de absorção em solução aquosa foram, respectivamente, 350 nm e 530 nm, conforme pode ser observado na Figura 2. Os espectros de absorção obtidos para cobamamida SQR apresentaram semelhança com aqueles obtidos para os comprimidos (Figura 3). A intensidade de uma banda de absorção no UV/Vis é usualmente expressa como absorvância molar a uma absorção máxima,  $\epsilon$  máximo ou  $\log \epsilon$  máximo. A absorvância molar aparente calculada da cobamamida, em água a 350 nm, foi de  $109 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

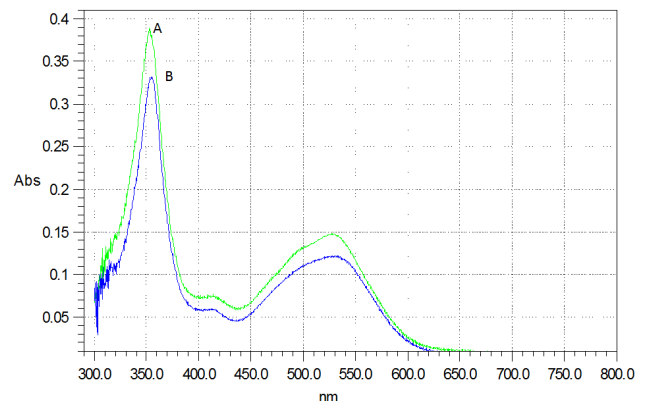


Figura 2. Espectros de absorção (A) Cobamamida SQR (30  $\mu\text{g/mL}$ ); (B) Comprimidos de Enzicoba®

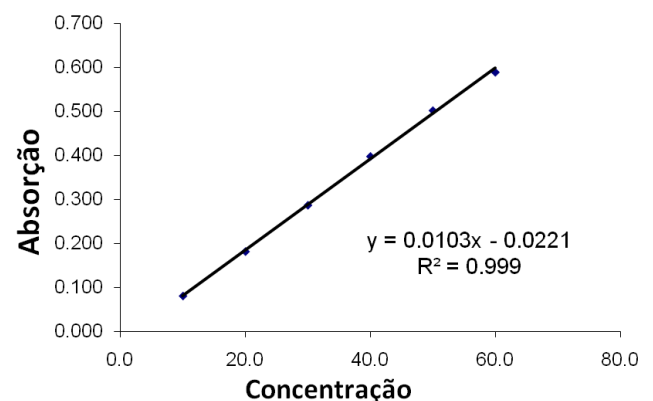


Figura 3. Representação gráfica da curva padrão média de cobamamida obtida através de espectrofotometria a 350 nm, em água (n=3)

O método espectrofotométrico proposto no presente estudo foi influenciado pelo comportamento físico-químico do fármaco. Após definição do solvente e do máximo de absorção, iniciou-se a validação do método de

acordo com os códigos oficiais. Idealmente, um método analítico deve ser exato para fornecer o valor ideal, preciso para fornecer no maior número de ensaios esse valor real ser seletivo para que a exatidão não desvie com interferentes potenciais, ser sensível ou capaz de determinar concentrações menores possíveis e responder de forma proporcionalmente linear, ao longo da faixa de concentração (Machado et al., 2011).

Para avaliação da linearidade do método foram desenvolvidas três curvas, sendo calculadas as absorvâncias médias obtidas para traçar uma curva padrão, conforme Figura 2. Os resultados apresentaram boa correlação linear entre as absorvâncias obtidas e concentração de cobamamida SQR. A equação da reta para o método foi:  $y = 0,0103 x - 0,0221$ ; onde  $x$  é a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  e  $y$  é a absorção no UV, com coeficiente de correlação de 0,999. A Tabela 1 apresenta as absorvâncias médias correspondentes da cobamamida, relativas a cada uma das diluições da SQR. O coeficiente de variação médio percentual foi de 5,71%. A Tabela 2 resume os parâmetros das curvas padrões. Os dados da linearidade foram validados pela análise de variância (ANOVA) que demonstrou significativa regressão linear e nenhum desvio significativo da linearidade significativo ( $P < 0,05$ ). Os resultados obtidos conferem a validade do método desenvolvido em termos de linearidade.

Tabela 1. Absorvâncias obtidas para elaboração da curva padrão de cobamamida por espectrofotometria UV a 350 nm em água.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvâncias			Média $\pm$ e.p.m	DPR
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
10	0,093	0,074	0,074	0,080 $\pm$ 0,011	13,66
20	0,187	0,181	0,176	0,181 $\pm$ 0,005	3,04
30	0,286	0,270	0,304	0,286 $\pm$ 0,017	5,93
40	0,410	0,379	0,404	0,398 $\pm$ 0,016	4,13
50	0,504	0,503	0,499	0,502 $\pm$ 0,002	0,53
60	0,606	0,619	0,542	0,589 $\pm$ 0,041	7,00

Embora para testes quantitativos não haja necessidade de determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) (Brasil, 2003; USP 34, 2011), a determinação destes parâmetros é um bom indicativo da sensibilidade do método. Os LD e LQ foram 2,04  $\mu\text{g/mL}$  e 6,19  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Assim, os baixos valores indicaram a boa sensibilidade do método.

A precisão foi demonstrada pela repetibilidade dos resultados obtidos através de várias reproduções dos métodos, nas mesmas condições, no mesmo dia. Os valores experimentais obtidos na determinação de cobamamida nos comprimidos estão apresentados na Tabela 3. Os baixos valores obtidos para DPR em todas as amostras indicam boa precisão demonstrando a repetibilidade do método. A precisão intermediária do método foi realizada em três dias diferentes e avaliada utilizando o DPR e teste F. O DPR foi de 3,93% e os valores de F registrados foram 1,91 (valor de F tabelado: 4,26), não indicando nenhuma diferença significativa entre

os resultados obtidos em dias diferentes ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2. Resultados da análise de regressão dos dados para a quantificação de cobamamida por espectrofotometria UV/Vis.

Parâmetros	Resultados <sup>a</sup>
Faixa de concentração linear	10 – 60 ( $\mu\text{g/mL}$ )
Inclinação $\pm$ desvio padrão	0,0103 $\pm$ 0,00016
Intercepto $\pm$ desvio padrão	- 0,0221 $\pm$ 0,006
Limite de confiança da inclinação <sup>b</sup>	0,0099 a 0,0108
Limite de confiança do intercepto <sup>b</sup>	- 0,040 a - 0,004
Coefficiente de Correlação (r)	0,999
Análise de variância	
Regressão linear <sup>c</sup>	1391,73 (4,75)
Desvio da Linearidade <sup>c</sup>	0,35 (3,26)

<sup>a</sup> Dados obtidos a partir de 3 curvas padrões

<sup>b</sup> Limite de confiança 95%

<sup>c</sup> Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de F para  $P < 0,05$

Tabela 3. Resultados obtidos na análise do teor de cobamamida em comprimidos por espectrofotometria UV/Vis a 350 nm, em diferentes dias.

Amostra	Dia	mg/cpr	Precisão intra-dia			Precisão inter-dias	
			Teor (%)	DP	DPR	DPR	
Encicoba®	1	1,05	105,39 <sup>a</sup>	4,39	5,93	102,89 $\pm$ 4,04	3,93
	2	1,00	99,86 <sup>b</sup>	3,37	3,37		
	3	1,01	101,33 <sup>b</sup>	4,51	4,45		

<sup>a</sup> média de seis determinações

<sup>b</sup> média de três determinações

Os valores de recuperação obtidos, representados na Tabela 4, encontram-se dentro da faixa de 98,6 a 106,6%. A exatidão do método foi avaliada usando o teste t Student para cada nível (10,0; 20,0 e 30,0). Os valores calculados para todas as amostras foram mais baixos que o valor de t tabelado de 2,78 ( $P < 0,05$ ), não indicando nenhuma diferença significativa entre a quantidade adicionada e a quantidade encontrada.

Tabela 4. Valores experimentais obtidos do teste de recuperação de cobamamida, através de espectrofotometria UV a 350 nm

Produto	Quantidade de SQR		% Recuperação $\pm$ Límite de confiança
	Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>*</sup>	
Encicoba®	10	10,7	106,6 $\pm$ 5,01
	20	20,3	101,5 $\pm$ 4,51
	30	29,7	98,9 $\pm$ 4,13

<sup>\*</sup> Cada valor é a média de três determinações

## CONCLUSÃO

A espectrofotometria é uma ferramenta analítica consolidada no controle de qualidade de fármacos por

apresentar baixo custo de manutenção, simplicidade de execução e sensibilidade compatível com as necessidades. Entretanto, sua impossibilidade de diferenciar produtos de degradação ou compostos relacionados deve ser salientada. Para contornar esta questão, esta técnica pode ser complementada com outras, tais como, cromatografia em camada delgada ou cromatografia líquida de alta eficiência, que permitem verificar a presença de produtos de degradação ou impurezas relacionadas. O método espectrofotométrico apresentado mostrou-se adequado, apresentando linearidade, precisão e exatidão adequadas. Este método apresenta características que permitem seu aproveitamento em vários estágios da tecnologia e controle da qualidade de produtos farmacêuticos contendo cobamamida. Sua aplicação é viável desde o processo de produção, bem como para analisar o teor do produto acabado, para avaliar a uniformidade de conteúdo dos comprimidos, ou mesmo, em testes para avaliar o perfil de dissolução do fármaco. Além disso, seu impacto ambiental também é pequeno, o que contribui para a comunidade local.

## REFERÊNCIAS

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no 899 de 2003. Guia para validação de métodos Analíticos.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no 17 de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos.

Bueno CS, Weber D, Moreira AC. Avaliação da qualidade de quatro especialidades farmacêuticas contendo hidroclorotiazida. *Rev. Bras. Farm.* 91(3): 126-32, 2010.

Gil ES. Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos, 3ªed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

Glusker JP. Vitamin B12 in Principles of Medical Biology. Molecular and Cellular Pharmacology. Madison: JAI Press Inc, 1997. cap. 45, p. 897-917.

Kumar SS, Chouhan RS, Thakur MS. Trends in analysis of vitamin B12. *Anal. Biochem.* 398: 139-149, 2010.

Machado JB, Boff V, Dallegrove A, Mendez ASL, Garcia CV. Desenvolvimento de método analítico por polarimetria para doseamento de manitol em matéria-prima e solução injetável aplicado à indústria farmacêutica. *Rev. Bras. Farm.* 92(3): 203-207, 2011.

Paniz C, Grotto D, Schmitt GC, Valentini J, Schott KL, Pomblum VJ, Garcia SC. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 41(5): 323-34, 2005.

Randaccio L, Geremia S, Demitri N, Wuerges J. Vitamin B12: unique metalorganic compounds and the most complex vitamins. *Molecules.* 15(5): 3228-3259, 2010.

USP 34 - The United States Pharmacopeia. Rockville: United States Convention Inc, 2011.