

(11) Número de Publicação: **PT 1540338 E**

(51) Classificação Internacional:

**G01N 33/20** (2007.10) **G01N 33/84** (2007.10)  
**G01N 31/22** (2007.10) **A61K 31/295** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2002.08.26**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2005.06.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.09.18**  
**237/2008**

(73) Titular(es):

**VIFOR (INTERNATIONAL) AG**  
**RECHENSTRASSE 37 CH-9001 ST.GALLEN CH**

(72) Inventor(es):

**MARY JANE HELENEK** US  
**RALPH A. LANGE** US  
**RICHARD P. LAWRENCE** US

(74) Mandatário:

**JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO**  
**R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA** PT

(54) Epígrafe: **TESTE DE BIOEQUIVALÊNCIA PARA FORMULAÇÕES CONTENDO FERRO**

(57) Resumo:

RESUMO

**"TESTE DE BIOEQUIVALÊNCIA PARA FORMULAÇÕES CONTENDO FERRO"**

Descreve-se um método rápido para avaliar a bioequivalência do ferro em formulações suplementadas com ferro, em especial em formulações de sacarose com ferro, a qual se baseia na cinética da redução de ferro (III) a ferro (II) numa amostra da formulação. Também são descritos métodos de controlo de qualidade e estojos associados a eles.

## DESCRIÇÃO

### "TESTE DE BIOEQUIVALÊNCIA PARA FORMULAÇÕES CONTENDO FERRO"

#### DOMÍNIO DA INVENÇÃO

A invenção diz respeito a um método rápido para se avaliar a bioequivalência de ferro em formulações de suplementos com ferro, em especial em complexos de ferro com hidratos de carbono, com base na cinética de redução de ferro (III) a ferro (II) numa amostra da formulação. A invenção também diz respeito a métodos para o controlo da qualidade e aos estojos associados a eles.

#### ESTADO DOS CONHECIMENTO À DATA DA INVENÇÃO

O ferro dextrana foi desenvolvido para o tratamento de estados de deficiência em ferro, e era originalmente administrado por injeção intramuscular a pacientes com deficiência em ferro por anemia que não conseguiam tolerar diversas formulações orais de sais de ferro. Veja-se, por exemplo, Lawrence, "Development and Comparison of Iron Dextran Products," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 52(5): 190-197 (1998). Subsequentemente, o ferro dextrana também foi administrado por via endovenosa verificando-se que dela resultavam benefícios semelhantes.

Tem sido desenvolvida uma série de formulações contendo ferro. As injeções endovenosas de preparações coloidais de hidróxido férrico, em especial de ferro sacarose, estão clinicamente indicadas para o tratamento de pacientes anémicos com deficiência em ferro submetidos a hemodiálise crônica e que recebem terapia suplementar com eritropoietina.

O ferro sacarose é formulado como suspensão coloidal e administrado a título de precursor que é absorvido pelas células do sistema reticular endotelial, que libertam ferro iônico. O ferro iônico liga-se à transferrina, que, por sua vez, o transfere para a medula óssea para a eritropoiese ou para a ferritina e para a reserva de armazenagem de ferro na medula, no baço e no fígado.

### **Fisiologia e Metabolismo do Ferro**

O corpo humano armazena ferro trivalente sob a forma de ferritina e de hemo-siderina. A ferritina é constituída por uma camada exterior de proteína contendo uma cavidade de armazenagem para um núcleo de hidróxido/fosfato férrico polinuclear com uma composição aproximada de  $[(\text{FeOOH})_8(\text{Fe})-\text{OPO}_3\text{H}_2]_n$ . A camada proteica exterior da ferritina, apoferritina, é constituída por 24 sub-unidades polipeptídicas formando a molécula de apoferritina, que tem uma massa molecular média de cerca de 440.000. A camada exterior de apoferritina tem um diâmetro

de cerca de 13 nanómetros (130 Å) com uma cavidade interior de cerca de 7 nanómetros (70 Å).

A camada exterior proteica da ferritina, apoferritina, funciona como um enzima ferroxidase na ligação e na oxidação do ferro divalente que depois armazena na sua cavidade sob a forma de um núcleo polinuclear de hidróxido/fosfato férrico. A ferritina pode conter até cerca de 4.500 iões férricos polimerizados com uma massa molecular para o conjunto da molécula na gama de entre 700.000 e 800.000. Mais do que 30 % da massa da molécula da ferritina pode ser ferro.

Quando a quantidade de ferro disponível excede a capacidade do mecanismo de armazenagem de ferro da ferritina, forma-se uma forma de ferritina agregada denominada hemo-siderina, que é um constituinte normal nos sistemas monócito-macrófago. A hemo-siderina é constituída por moléculas de ferritina, que perderam parte da sua camada proteica exterior e se agregaram. a hemo-siderina é responsável por cerca de um terço da reserva normal de ferro e acumula-se sob a forma de grânulos insolúveis nas paredes do sistema reticular endotelial.

A ferritina é solúvel em água e pode entrar para a circulação sanguínea por osmose. Os teores normais de ferritina no soro dependem do sexo/idade e encontram-se na gama de entre 40 e 160 ng/mL. Crê-se que na corrente sanguínea, a ferritina liberta lentamente ferro divalente

em conjunto com um agente redutor, tal como um mononucleótido flavínico reduzido, e em menor quantidade, ácido ascórbico. O ferro divalente volta a ser oxidado a ferro trivalente pela ceruloplasmina, e depois liga-se fortemente à proteína do sangue, apotransferrina, formando a transferrina. A massa molecular da transferrina é de cerca de 76.000 e cada molécula tem dois locais de ligação para iões férricos.

Quando se administra a um paciente, um complexo de ferro com sacarose (ou outros colóides de ferro trivalente, formulados por exemplo com gluconato, dextrana, sorbitol ou dextrina) é removido da corrente sanguínea sob a forma de uma partícula pelos macrófagos do sistema reticular endotelial e é metabolizado de modo a integrar as reservas de ferro do corpo, como hemo-siderina, ferritina e transferrina. A taxa de remoção do ferro da corrente sanguínea depende tanto da dimensão da partícula coloidal contendo hidróxido férrico como da sua composição.

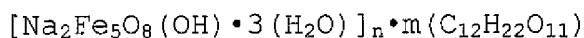
#### Síntese de Complexos de Ferro com Hidratos de Carbono

Os complexos de ferro com hidratos de carbono, tais como o ferro sacarose, são constituídos por partículas coloidais de hidróxido férrico (isto é, núcleos) complexados com sacarose. Estes núcleos de ferro são preparados pela neutralização do cloreto férrico com um álcali até um pH de 2. A este pH, a saturação dos iões

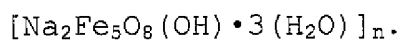
hidróxido induz a formação do hidróxido de ferro coloidal, que em seguida forma complexos *in situ* com um hidrato de carbono adequado, tal como a sacarose. A estrutura do núcleo de ferro segue uma química de coordenação clássica. Os complexos de hidratos de carbono com o núcleo de ferro formam-se quando os seus grupos hidroxilo substituem moléculas de água que estavam coordenadas à superfície exterior do núcleo de ferro.

A ligação entre o núcleo de ferro e o hidrato de carbono é por forças intermoleculares não covalentes, tais como as devidas à atracção entre a carga parcial positiva dos átomos do núcleo de ferro e as extremidades negativas dos momentos dipolares dos grupos hidroxilo do hidrato de carbono.

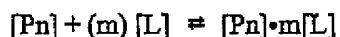
O ferro sacarose, por exemplo, tem uma massa molecular ( $M_w$ ) de entre cerca de 34.000 e 60.000 Daltons e uma fórmula molecular como se segue:



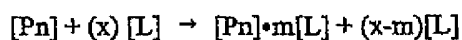
em que  $n$  é o grau de polimerização do ferro e  $m$  é o número de moléculas de sacarose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) no complexo com o núcleo polinuclear de ferro polimerizado:



Em solução, existe um equilíbrio entre um núcleo polinuclear de ferro polimerizado (Pn) e o seu ligando solubilizante (L):



Para se assegurar um complexo de ferro solúvel em água, é necessária uma quantidade em excesso do ligando solubilizante, e o equilíbrio é tal como se segue:



Um método preferido de sintetizar complexos de ferro com hidrato de carbono como estes está descrito, por exemplo, na publicação do Pedido de PCT WO 97/11.711 (1997), por Lawrence et al.

### Avaliação da Homogeneidade do Ferro Hidrato de Carbono

Os complexos de ferro com dextrana produzidos pela neutralização de cloreto férrico na presença de dextrana têm uma fórmula estrutural semelhante, mas diferem no grau de polimerização dos núcleos de hidróxido férrico. Veja-se, por exemplo, Lawrence (1998). O artigo de Lawrence também descreve métodos para se avaliar a homogeneidade das dimensões das partículas num complexo de ferro com dextrana medindo a sua cinética de redução. Depois de descrever a

avaliação de três produtos de ferro com dextrana provenientes de fabricantes diferentes, o artigo relata a existência de diferenças notáveis entre eles no que toca aos parâmetros físicos e químicos que se mediram.

#### Determinação da Bioequivalência das Partículas de Ferro Dextrana

Tal como se afirmou acima, as formulações comerciais de suplementos de ferro são suspensões coloidais complexas. Por exemplo, de acordo com a Monografia da USP para Injecção de Ferro Sacarose por Luitpold Pharmaceuticals, Inc., a publicar no 2º Suplemento da USP 25 em Julho/Agosto de 2002, uma tal formulação tem pH controlado, e contém uma quantidade controlada de material em partículas para além das componentes do ferro e da sacarose. Uma comparação entre preparações comerciais de complexos de ferro (III) com dextrina foi descrita por Erni, et al., "Chemical Characterization of Iron (III)-Hydroxide-Dextrin Complexes" *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **34**(11): 1555-1559 (1984). No artigo afirmava-se que os produtos de hidrólise do ferro (III) podem diferir enormemente no que toca às suas propriedades estruturais, morfológicas, e químicas, consoante as condições sob as quais são formados, e outros factores. Prestava-se mais atenção à natureza de tais produtos de hidrólise mais do que ao estado de oxidação do ferro, ou seja ferro (II) em comparação com ferro (III).

Erni *et al.* descrevem a análise cinética da redução do ferro (III) e relacionam-na com a distribuição de dimensões das partículas e a gama de razões entre superfície e volume é monodispersa, quando comparada com a de sistemas polidispersos. Vejam-se, por exemplo, as Secções 2.3 e 3.2 nas páginas 1.556-57. O ácido ascórbico, o ácido cítrico, o ácido fosfórico e o sorbitol foram alguns dos agentes redutores utilizados por Erni, *et al.* Também é descrita a biodisponibilidade no contexto das preparações orais; no entanto, notavelmente, estes autores concluem que apenas com testes químicos não será possível prever a biodisponibilidade, uma vez que eles não simulam o ambiente quimicamente complexo do intestino (Veja-se a página 1.559).

Outros processos conhecidos têm utilizado a distribuição de massas moleculares de um complexo para correlacionar com a sua biodisponibilidade. No entanto, este tipo de distribuição parece depender muito do método, do protocolo e dos padrões que se utilizam na análise de massas moleculares. Veja-se, por exemplo, o PCT WO97/11.711 de Lawrence, *et al.*

Podem obter-se junto da FDA linhas gerais acerca da execução de testes *in vitro* de formas orais de dosagem sólidas para libertação imediata testando a sua dissolução, em <http://www.fda.gov/cder/guidance/1713bp1.pdf>, num documento que se intitula "Guidance for Industry:

Dissolution Testing of Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms".

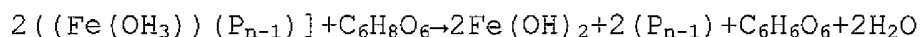
Deste modo, se por um já foi publicada lado uma avaliação das dimensões das partículas de complexos contendo ferro, com base na sua cinética de degradação por redução, na literatura não parece ter sido identificada nenhuma correlação específica entre a distribuição de dimensões e a bioequivalência. De facto, até à data não foram definidos e associados nenhuns parâmetros cinéticos específicos com a bioequivalência, tais como o T<sub>75</sub>. Aquilo cuja falta se têm feito sentir, portanto, é um método preciso e barato para medir de forma segura e consistente a bioequivalência de composições contendo ferro, bem como um padrão para controlo da qualidade aplicável a este tipo de determinação. Um tal método também permitiria a optimização de formulações de suplementos com ferro, e a comparação entre diferentes fabricos na produção.

#### **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

No corpo humano, o metabolismo e a mobilização do ferro envolve uma série de reacções de oxidação/redução nas quais o número de oxidação do ferro se altera entre os seus estados divalente e trivalente. Para controlar e para monitorizar a bioequivalência de complexos de ferro-sacarose entre diversos fabricos, foi desenvolvido um teste *in vitro* para medir a velocidade de redução do ferro trivalente a ferro divalente nos hidróxidos de ferro

coloidais. O núcleo contendo hidróxido férrico coloidal dissocia-se à medida que o ferro é reduzido, e a velocidade de dissociação do hidróxido férrico coloidal é directamente proporcional à dimensão das suas partículas. Para além disto, para núcleos de hidróxido férrico que tenham uma dimensão de partícula e uma composição uniformes (isto é, monodispersa), a velocidade da sua redução segue uma cinética de primeira ordem.

Numa concretização preferida da invenção presente, utiliza-se a adição de um excesso de ácido ascórbico em soro salino fisiológico a título de agente redutor neste teste *in vitro*. O ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ) reduz o ferro trivalente do núcleo ( $Fe^{3+}$ ) ao ião ferro divalente ( $Fe^{2+}$ ) como se segue:



O ácido ascórbico é oxidado ao ácido desidroascórbico ( $C_6H_6O_6$ ) e o hidróxido férrico ( $Fe(OH)_3$ ) é reduzido ao hidróxido ferroso ( $Fe(OH)_2$ ).

Os complexos de hidróxido férrico têm uma cor encarnado escura a castanha em solução, com uma forte banda de absorção a 450 nm. à medida que ocorre a redução a hidróxido ferroso, a cor vai desaparecendo, o que se traduz numa diminuição da absorvância. Este decaimento (ou esta dissociação) pode ser facilmente monitorizada num

espectrofotómetro de UV/Vis com temperatura controlada (a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) regulado para 450 nm.

Noutra concretização da invenção presente, utilize-se o período de tempo  $T_{75}$  para a redução do complexo com hidrato de carbono para se determinar a bioequivalência relativa, reduzindo o complexo com um agente redutor apropriado. Consegue-se um padrão de bioequivalência preferido para uma formulação de ferro-sacarose quando o período de redução  $T_{75}$  é não superior a 20 minutos e a representação da reacção em termos de "Log (% de Concentração de Ferro Trivalente)" em relação a "Tempo" é linear, com um valor absoluto do coeficiente de correlação não inferior a 0,98.

Podem verificar-se mais características, vantagens, e concretizações da invenção, que se tornam aparentes quando se leva em consideração a descrição pormenorizada que se segue bem como as reivindicações. Para além disto, deve entender-se que tanto a descrição resumida da invenção que precede como a descrição pormenorizada que se segue são exemplares, e se pretende que proporcionem uma explicação adequada sem que limitem o âmbito da invenção tal qual ele é reivindicado.

#### **DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO**

A invenção presente baseia-se, em parte, em se ter verificado que a bioequivalência do ferro em complexos

de ferro com hidratos de carbono, em especial em formulações de ferro-sacarose, pode utilmente ser determinada avaliando a cinética da degradação por redução de complexos contendo ferro (III). Os inventores presentes verificaram especificamente que o período da redução de uma preparação determinada pode ser utilmente correlacionado com a sua bioequivalência. Uma vez que a cinética da redução é uma função da distribuição de dimensões das partículas dos complexos, uma análise desta cinética permite a determinação da distribuição das dimensões das partículas. A distribuição das dimensões das partículas é utilizada por seu turno para determinar a bioequivalência. Este método diminui o tempo necessário para e fazer a análise e diminui significativamente os custos que de outra forma se encontrariam associados com a avaliação da bioequivalência de formulações de suplementos com ferro durante e após o seu fabrico.

A invenção presente diz respeito a um método para se determinar a bioequivalência relativa do ferro num complexo de ferro com hidratos de carbono, levando ao contacto o complexo com um agente redutor, determinando a cinética de redução do complexo, e comparando esta cinética com a cinética de redução de uma composição padrão com uma bioequivalência conhecida.

A invenção presente também inclui um método para se determinar a bioequivalência relativa do ferro num complexo de ferro com hidratos de carbono levando-o ao

contacto com um agente redutor e determinando o valor de  $T_{75}$  para a cinética de redução do complexo. Um valor de  $T_{75}$  inferior a cerca de 20 minutos indica um bioequivalência eficaz do ferro no complexo, quando administrado a um sujeito. Preferivelmente o  $T_{75}$  será menor do que cerca de 18 minutos, e mais preferivelmente o  $T_{75}$  será de entre cerca de 9 e cerca de 18 minutos.

Os complexos de ferro com hidratos de carbono são preferivelmente constituídos por hidratos de carbono, tais como a dextrana, a dextransa, o gluconato, o sorbitol e a sacarose, por exemplo. De preferência, o complexo de ferro com hidratos de carbono é ferro-sacarose.

Os métodos inventivos podem utilizar um grande número de agentes redutores adequados, incluindo, por exemplo, mononucleótido de flavina reduzido, ditionito, tioglicolato, hidroquinona, lactato, citrato, bicarbonato, piruvato, succinato, frutose, cisteína, sorbitol, e é especialmente preferido o ácido ascórbico. O agente redutor pode estar presente numa quantidade suficiente para levar a reacção de redução até ela se completar, ou pelo menos até ela se completar substancialmente, e preferivelmente, num excesso de cerca de 50 vezes em relação ao complexo de ferro-hidrato de carbono. É também preferida a utilização de um agente redutor que se encontre em solução e que tenha um pH ácido, e de preferência o pH da solução é de entre cerca de 1,0 e cerca de 4,0.

A invenção presente também inclui um aparelho inventivo para o controlo da qualidade por determinação da bioequivalência de complexos de ferro com hidratos de carbono. O aparelho inventivo inclui um sistema de produção monitorizado por computador que monitoriza a cinética de redução do produto de uma reacção entre um hidróxido férrico coloidal e um hidrato de carbono, em diferentes estágios da reacção.

O produto é preferivelmente reduzido com um reagente redutor, tal como o ácido ascórbico. O agente redutor estará preferivelmente presente numa quantidade suficiente para levar a reacção de redução até ao final, ou pelo menos a completar-se substancialmente. Mais preferivelmente, o agente redutor estará presente num excesso de cerca de 50 vezes em relação ao produto. Também é preferido um agente redutor que se encontre em solução e tenha um pH ácido, e é especialmente preferido um pH da solução de entre cerca de 1,0 e cerca de 4,0.

O produto é preferivelmente um complexo de ferro com um hidrato de carbono seleccionado de entre o conjunto constituído por dextrana, dextrina, gluconato, sorbitol e sacarose. É especialmente preferido que o hidrato de carbono seja a sacarose.

A invenção presente também diz respeito a um método de controlo de qualidade para identificar fabricos de complexos de ferro com hidratos de carbono que detenham

substancialmente a mesma bioequivalência. O método inclui a formulação de complexos de ferro com hidratos de carbono, utilizando-se o método acima para se determinar a cinética de redução de um determinado fabrico seleccionado de complexo de ferro com hidrato de carbono, e identificando fabricos de complexo de ferro com hidrato de carbono que cumpram a cinética de redução de uma composição padrão cuja bioequivalência seja conhecida.

Também se inclui na invenção presente um estojo para se avaliar a bioequivalência de um complexo de ferro - sacarose utilizando um contentor no qual se mantém uma amostra de complexo de ferro-sacarose, meios de determinar a cinética de redução do complexo de ferro-sacarose, e meios de relacionar a cinética de redução com a bioequivalência de um complexo padrão de ferro-sacarose.

#### Definições

"Biodisponibilidade" significa a disponibilidade fisiológica de uma determinada quantidade da componente activa de um fármaco administrado por via oral a um sujeito, sendo distinta da concentração química do fármaco ou da sua potência.

"Bioequivalência" significa um perfil de actividade substancialmente semelhante de um fármaco, em comparação com um padrão, ou com outra formulação, para esse fármaco ou para outro fármaco.

"T<sub>75</sub>" ou "período T<sub>75</sub>" ou "tempo de redução T<sub>75</sub>" significa o período de tempo (em minutos) findo o qual não menos de 75 % do hidróxido férrico inicialmente presente na solução coloidal de ferro sacarose foi reduzido (isto é, dissociado).

À luz da descrição precedente, os exemplos específicos que se apresentam adiante são apenas ilustrativos e não se pretende que limitem o âmbito da invenção. Serão aparentes outras configurações tanto genéricas como específicas aos especialistas da técnica.

#### **EXEMPLOS**

Preparam-se diariamente as soluções de partida. Prepara-se uma solução para diluição com cloreto de sódio a 0,9 % (solução A) pesando 9,00 g de cloreto de sódio num balão volumétrico de 1.000 mL, e adicionando água purificada até perfazer o volume. Mantém-se então a solução a 37°C num banho-maria.

Prepara-se uma solução de partida de ácido ascórbico (solução B) pesando cerca de 8,8 g num balão volumétrico de 50 mL, e adicionando em seguida tanta solução A quanta seja necessário. Também se mantém esta solução a 37°C.

Prepara-se uma solução de partida de ferro sacarose transferido 5,0 mL da amostra para um balão

volumétrico de 50 mL, e depois adicionando água até perfazer o volume. Também se mantém esta solução a 37°C.

O procedimento geral para se monitorizar a reacção envolve colocar-se 20,0 mL de solução A, 4,0 mL de solução B e 1,0 mL de solução de partida de ferro sacarose num balão volumétrico de 25 mL. Agita-se bem esta solução e depois transfere-se uma quantidade apropriada para uma célula de 1 cm em quartzo que se coloca num espectrofotómetro de UV/Vis com temperatura controlada regulada para 37°C. Mede-se a absorção a 450 nm a intervalos de 1 minuto durante um período total de tempo reaccional de 80 minutos. Utiliza-se como branco a solução A.

A percentagem de concentração em ferro trivalente a um determinado instante de observação é calculada utilizando a equação seguinte:

$$100 \times [(Abs. Observada - Abs. Final) / (Abs. Inicial - Abs. Final)]$$

A solução de ferro sacarose cumpre o seu padrão de bioequivalência se o período de redução  $T_{75}$  não for superior a 20 minutos e se uma representação de "Log(% da Concentração de Ferro Trivalente)" em relação ao "Tempo" ao longo de 60 minutos for linear com um coeficiente de correlação não inferior a 0,98.

**Exemplo 1: Testes In Vitro Utilizados no Controlo de Soluções Intermediárias de Ferro Sacarose:**

Leva-se ao contacto uma solução saturada de cloreto férrico com uma solução a 10 % (peso/volume) de carbonato de sódio, a um pH neutro próximo de 7. Lava-se o gel coloidal de hidróxido férrico resultante com quantidades suficientes de água purificada para se removerem todos os vestígios de cloreto de sódio, presente a título de co-produto da reacção.

Adiciona-se ao gel coloidal de hidróxido férrico uma quantidade suficiente de solução saturada de sacarose, num volume equivalente, para se obter uma solução final contendo aproximadamente 4,0 %, em peso, do elemento ferro. Ajusta-se o pH da solução a 10,7 com hidróxido de sódio e mistura-se a solução a 90°C durante 36 horas. Obtêm-se amostras do processo para Controlo de Qualidade testando-se sobre elas o pH, o conteúdo em ferro e a sua bioequivalência *in vitro*. Quando os resultados cumprem as especificações, ajusta-se o volume da solução por adição de água purificada para se obter um conteúdo final em ferro de cerca de 4,0 %, em peso, do elemento ferro, e depois filtra-se através de uma membrana de 0,2 micron.

Obtiveram-se os seguintes Resultados nos testes *in vitro* de uma solução intermediária de ferro sacarose contendo 3,7 %, em peso, do elemento ferro:

**Tabela 1: Testes In Vitro da Solução Intermediária de Ferro  
Sacarose**

Tempos (Minutos)	Absorvância. a 450 nm	LOG (% de Conc. de Ferro Trivalente)
0,0	1,5154	2,000
5,0	0,9493	1,792
10,0	0,5762	1,568
15,0	0,3369	1,320
20,0	0,2012	1,071
25,0	0,1312	0,849
30,0	0,0934	0,656
35,0	0,0708	0,479
40,0	0,0565	0,313
45,0	0,0463	0,137
50,0	0,0402	-0,018
55,0	0,0348	-0,224
60,0	0,0315	-0,425
65,0	0,0292	---
70,0	0,0276	---
75,0	0,0267	---
80,0	0,0259	---
Resultado da regressão:	Constante (b):	1,93237
	Erro Padrão na estimativa de Y:	0,05684
	R Quadrado:	0,99514
	Coefficiente de Correlação:	0,99757
	Nº. de Observações:	13

Tempos (Minutos)	Absorvância. a 450 nm	LOG (% de Conc. de Ferro Trivalente)
	Graus de Liberdade:	11
	Coefficiente de X (m):	-0,04001
	Erro Padrão do Coeficiente:	0,00084

Os valores relativos à regressão para o **Gráfico 1** demonstram que a redução do ferro trivalente é linear com um coeficiente de correlação de 0,99757, que indica que a redução desta solução de ferro sacarose, adequada para utilização como um injectável, segue uma cinética de primeira ordem. O valor de  $T_{75}$  foi calculado utilizando a equação seguinte:

$$T_{75} = (1,3979 - b) / m$$

em que "1,3979" é o Log da % da concentração de ferro trivalente no ponto de tempo que corresponde a 75 % da redução (isto é, em que a % da concentração de ferro trivalente = 25 %), "b" é a constante, e "m" é o Coeficiente de X.

Utilizando os valores de "b" e de "m" obtidos a partir da regressão linear do Gráfico 1, determina-se que o valor de  $T_{75}$  para esta solução intermediária de ferro sacarose é de 13,36 minutos.

**Exemplo 2: Utilização do Teste *In Vitro* no Controle de Soluções de Ferro Sacarose Adequadas para Utilização a Título de Injectáveis.**

Prepara-se uma solução de ferro sacarose, adequada para utilização a título de injectável, diluindo uma solução intermediária, tal como a descrita no Exemplo 1, com água para injeção, a uma concentração final do elemento ferro de 20 mg/mL. O valor do pH da solução resultante é ajustado a 10,8 com hidróxido de sódio, e em seguida agita-se a solução até estar homogênea. Transfere-se a solução por linhas de transferência em aço inoxidável e filtra-se através de dois filtros esterilizados de 0,2 micron, montados em série, para um frasco esterilizado destinado ao enchimento. Tanto o filtro como o frasco de enchimento estão montados sob um caudal laminar no interior da dependência destinada ao enchimento, sob condições constantes da classe 100.

Todo o equipamento utilizado para o enchimento está identificado, esterilizado, e é registado. As rolhas são lavadas, revestidas com silicone, tornadas isentas de pirogénios e esterilizadas. A vidraria é lavada com água desionizada sendo por último passada por água para injeção, e em seguida é tornada isenta de pirogénios.

Os dispositivos de enchimento das ampolas estão situados em posições de trabalho sob caudal laminar de classe 100 em dependências limpas e com ambiente

controlado, de classe 10.000. Os filtros HEPA directamente acima dos enchedores de ampolas proporcionam uma parede invisível de ar estéril isento de partículas para impedir a contaminação. Completado o enchimento, o produto é tratado termicamente num autoclave a 100°C durante 35 minutos.

Obtiveram-se os Resultados de teste *in vitro* seguintes para uma solução de ferro sacarose, adequada para utilização a título de injectável, contendo 20 mg/mL do elemento ferro:

**Tabela 2: Testes In Vitro de Solução Injectável de Ferro Sacarose**

Tempos (Minutos)	Absorvância. a 450 nm	LOG (% de Conc. de Ferro Trivalente)
0,0	0,9735	2,000
5,0	0,5382	1,735
10,0	0,2859	1,444
15,0	0,1650	1,179
20,0	0,1050	0,944
25,0	0,0745	0,748
30,0	0,0552	0,553
35,0	0,0432	0,364
40,0	0,0351	0,164
45,0	0,0314	0,030
50,0	0,0270	-0,215
55,0	0,0250	-0,399
60,0	0,0235	-0,617
65,0	0,0220	---
70,0	0,0215	---
75,0	0,0207	---
80,0	0,0212	---

Tempos (Minutos)	Absorvância. a 450 nm	LOG (% de Conc. de Ferro Trivalente)
Resultado da regressão:	Constante:	1,87588
	Erro Padrão na estimativa de Y:	0,06695
	R Quadrado:	0,99395
	Coefficiente de Correlação:	0,99697
	Nº. de Observações:	13
	Graus de Liberdade:	11
	Coefficiente de X:	-0,0422
	Erro padrão do coeficiente:	0,00099

Tal como no exemplo 1, os valores relativos à regressão para o Gráfico 2 demonstram que a redução do ferro trivalente é linear com um coeficiente de correlação de 0,9969, que indica que a redução desta solução de ferro sacarose, adequada para utilização como um injectável, segue uma cinética de primeira ordem. O valor de  $T_{75}$  foi calculado utilizando a equação seguinte:

$$T_{75} = (1,3979 - b) / m$$

e verificou-se ser de 11,32 minutos.

Embora a invenção presente tenha sido descrita em pormenor com referência aos exemplos acima, deve entender-se que se poderão fazer diversas modificações sem que isto represente qualquer afastamento em relação ao espírito da invenção. A invenção é portanto limitada apenas pelo âmbito das reivindicações que se seguem.

Lisboa, 21 de Novembro de 2008

## REIVINDICAÇÕES

1. Um método de avaliar o perfil de actividade do ferro num colóide contendo um complexo de ferro trivalente com um hidrato de carbono, para administração a um sujeito, em comparação com um padrão (isto é, a sua bioequivalência), incluindo:

levar-se o complexo ao contacto com pelo menos um excesso de 50 vezes de um agente redutor;

determinar-se um período de tempo (em minutos) ao fim do qual não menos de 75 % hidróxido férrico na solução coloidal de ferro com hidrato de carbono haja sido reduzido ( $T_{75}$ );

em que um valor de  $T_{75}$  inferior a 20 minutos indica uma bioequivalência do ferro trivalente no complexo, quando é administrado a um sujeito.

2. O método da reivindicação 1, no qual se obtenha além disto uma representação gráfica da reacção de redução, do Log (% de concentração de complexo colóide de ferro trivalente) em relação ao tempo, e em que uma regressão linear absoluta com um coeficiente de correlação não inferior a 0,98 indique a bioequivalência dos colóides

de ferro trivalente no complexo, quando administrado a um sujeito.

3. O método de qualquer uma das reivindicações 1 e 2, no qual o hidrato de carbono do complexo colóide de ferro trivalente com hidrato de carbono inclua pelo menos um membro seleccionado de entre o conjunto constituído por dextrana, dextrina, gluconato, sorbitol e sacarose.

4. O método das reivindicações 1, 2 ou 3, no qual o hidrato de carbono contenha sacarose.

5. O método de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, no qual o agente redutor inclua pelo menos um membro seleccionado de entre o conjunto constituído por um mononucleótido flavínico reduzido, ditionito, tioglicolato, hidroquinona, lactato, citrato, bicarbonato, piruvato, succinato, frutose, cisteína, sorbitol, e ácido ascórbico.

6. O método das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, no qual o agente redutor inclua ácido ascórbico.

7. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, no qual o agente redutor esteja em solução e tenha um pH ácido.

8. O método de acordo com a reivindicação 7, no qual a solução tenha um pH de entre 1,0 e 4,0.

9. Um método de controlo de qualidade para colóides de complexos de ferro trivalente com hidratos de carbono pela avaliação de um perfil de actividade do ferro num colóide de complexo de ferro trivalente com hidrato de carbono para administração a um sujeito, em comparação com um padrão (isto é a sua bioequivalência), que inclua:

formular-se uma porção de colóides de complexo de ferro trivalente com hidrato de carbono;

e

levar-se a cabo o método de qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

Lisboa, 21 de Novembro de 2008

Gráfico 1  
Log (% Concentração de Ferro Trivalente) em  
relação ao Tempo

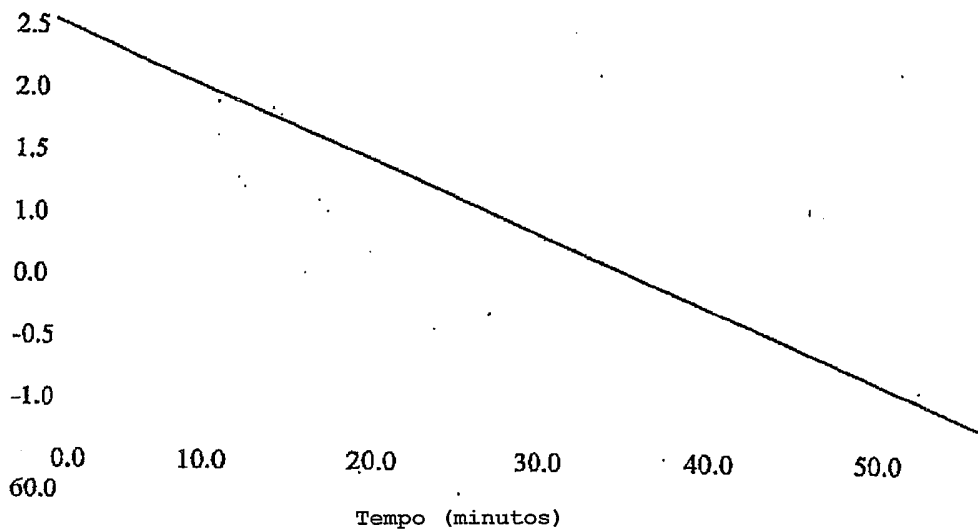


Gráfico 2  
Log (% Concentração de Ferro Trivalente) em  
relação ao Tempo

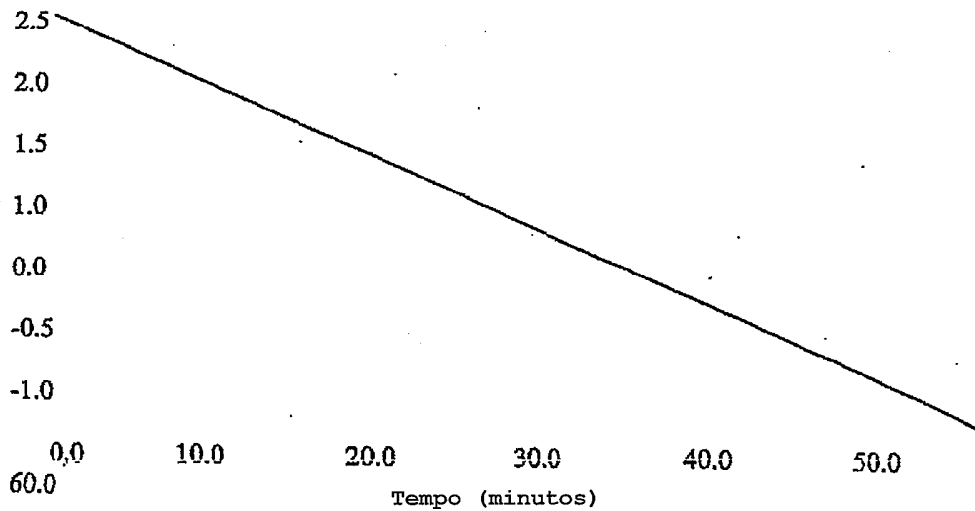


Figura 1