

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

NATÁLIA ELISA TURRA DE  
CASTRO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA A  
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO EM INSUMO  
FARMACÊUTICO ATIVO DE RADIOFÁRMACOS**

Porto Alegre, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

NATÁLIA ELISA TURRA DE CASTRO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA A  
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO EM INSUMO  
FARMACÊUTICO ATIVO DE RADIOFÁRMACOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Química Industrial

Prof. Dr. Morgana Bazzan Dessuy

Eng. Gabriela Pasa Panesso

Porto Alegre, 2024

### CIP - Catalogação na Publicação

Castro, Natália Elisa Turra de  
Desenvolvimento de método colorimétrico para a  
determinação do teor de ácido fítico em insumo  
farmacêutico ativo de radiofármacos / Natália Elisa  
Turra de Castro. -- 2024.

46 f.

Orientadora: Morgana Bazzan Dessuy.

Coorientadora: Gabriela Pasa Panesso.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Química, Curso de Química Industrial, Porto Alegre,  
BR-RS, 2024.

1. ácido fítico. 2. radiofármaco. 3. método  
analítico. 4. espectrometria de absorção molecular no  
UV-Vis. I. Dessuy, Morgana Bazzan, orient. II.  
Panesso, Gabriela Pasa, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Natália Elisa Turra de Castro

### **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO EM INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO DE RADIOFÁRMACOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial à  
obtenção do título de bacharel em Química  
Industrial do Instituto de Química da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Morgana Bazzan  
Dessuy  
Co-orientadora: Eng. Gabriela Pasa Panesso

**Aprovada em:**Porto Alegre, 9 de janeiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA:

---

Dr<sup>a</sup> Morgana Bazzan Dessuy  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Marco Flores Ferrão  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr<sup>a</sup> Eliana W. Menezes  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr<sup>a</sup> Lívia Streit  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a minha mãe, Elizabete Turra, que sempre incentivou o estudo e nunca mediu esforços para proporcionar o melhor dentro das nossas possibilidades. Agradeço ao restante de minha família, por todo o apoio e por permanecerem ao meu lado, mesmo quando minhas escolhas fugiram do óbvio ou contrariaram expectativas.

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Morgana Bazzan Dessuy, por toda troca, orientações e compreensão. Tua ajuda e teu conhecimento foram primordiais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao setor de controle de qualidade, em especial a coordenadora e coorientadora deste trabalho Gabriela Pasa Panesso, por apresentar-me a temática e confiar em minha capacidade de desenvolvê-la, além de permitir o desenvolvimento do trabalho nas dependências da empresa. Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Controle de Qualidade, por compreender o momento vivido e por todos os conselhos e trocas ao longo do caminho.

Agradeço ao meu namorado, Caio Galvão de Souza, por se fazer presente ao longo de toda a trajetória, por tornar mais fácil meu dia-a-dia, por oferecer ouvidos atentos e por ser sempre ponto de conforto e segurança.

E por último, a meus amigos, por compreenderem a minha ausência e por todo esforço em se fazerem presentes, mesmo quando eu não fui capaz de comparecer. A consciência de meus amigos sempre torceram pelo meu êxito foi uma importante motivação ao longo desta jornada.

## RESUMO

Encontrado majoritariamente em estruturas de origem vegetal, o ácido fítico é um composto orgânico que se destaca por suas características químicas e, principalmente, pela sua capacidade de formar complexos bastante estáveis com cátions multivalentes. Em virtude dessa propriedade, o ácido fítico é utilizado como molécula ligante em preparações farmacêuticas, tal como o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato, utilizado em exames de linfocintilografia. O fármaco em questão é comercializado na forma de *kit* frio, no qual o ácido fítico desempenha a função de insumo farmacêutico ativo. Posteriormente, o *kit* frio é destinado para a marcação com o pertecnetato de sódio radioativo, para produzir o radiofármaco final. Com o emprego do ácido fítico como insumo farmacêutico ativo surge, dentro das indústrias farmacêuticas especializadas em radiofármacos, a necessidade de métodos analíticos adequados para quantificar o composto, e assim garantir a qualidade do insumo utilizado nos produtos fabricados. Na literatura, são encontrados diversos métodos que utilizam técnicas analíticas distintas, buscando quantificar o composto, principalmente em alimentos de origem vegetal. O presente trabalho tem por objetivo desenvolver um método analítico para a determinação do teor de ácido fítico na matéria-prima utilizada em uma indústria de radiofármacos, utilizando a técnica de espectrometria de absorção molecular no UV-Vis e explorando a capacidade do ácido fítico de formar complexos estáveis com íons metálicos, em especial o Fe(III). Para desenvolver o método, foram analisados os espectros de absorbância dos reagentes utilizados, tanto isoladamente como em conjunto. Foi observado que o aumento do pH e a precipitação do complexo Fe-fitato ao longo do tempo diminuem o valor de absorbância em 465 nm. A presença do íon fosfato em solução não teve efeito sobre absorbância. O método mostrou-se linear e com boa sensibilidade, porém encontrou-se uma concordância 94,5 % entre o resultado obtido para a amostra em relação ao método comparativo empregado, evidenciando a necessidade de mais estudos visando a otimização do método.

**Palavras-chave:** ácido fítico; radiofármaco; método analítico; espectrometria de absorção molecular no UV-Vis

## ABSTRACT

Predominantly found in structures of plant, phytic acid is an organic compound notable for its chemical properties and, particularly, for its ability to form highly stable complexes with multivalent metallic cations. Due to this property, phytic acid is used as a chelating molecule in pharmaceutical preparations, such as the  $^{99m}\text{Tc}$ -phytate complex, utilized in lymphoscintigraphy examinations. The drug in question is marketed in the form of a cold kit, in which phytic acid act as the active pharmaceutical ingredient. Subsequently, the cold kit is intended for labeling with radioactive sodium pertechnetate to produce the final radiopharmaceutical. The use of phytic acid as an active pharmaceutical ingredient creates a need within pharmaceutical industries specializing in radiopharmaceuticals for suitable analytical methods to quantify the compound and thus ensure the quality of the ingredient used in the manufactured products. The literature reports various methods employing distinct analytical techniques to quantify the compound, mainly in plant-based foods. This study aims to develop an analytical method for determining the phytic acid content in raw materials used in a radiopharmaceutical industry, using molecular absorption spectrometry in the UV-Vis range and leveraging phytic acid's ability to form stable complexes with metal ions, particularly Fe(III). To develop the method, the absorbance spectra of the reagents were analyzed, both individually and in combination. It was observed that an increase in pH and the precipitation of the Fe-phytate complex over time decreased the absorbance value at 465 nm. The presence of phosphate ions in the solution had no effect on absorbance. The method proved to be linear and showed good sensitivity; however, a 94.5% agreement was found between the result obtained for the sample and the comparative method used, highlighting the need for further studies to optimize the method.

**Palavras-chave:** phytic acid; radiopharmaceutical; analytical method; UV-Vis molecular absorption spectrometry

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura do ácido fítico

FIGURA 2 – Métodos para determinação de ácido fítico por categoria.

FIGURA 3 – Espectros de absorvância na região do UV-Vis das soluções utilizados na preparação da curva de calibração em comparação com espectro do padrão de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico.

FIGURA 4 – Espectro da solução Branco 2, com  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico, sem a adição de cloreto férrico.

FIGURA 5 – Espectros de absorvância da solução padrão de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico em diferentes faixas de pH.

FIGURA 6 – Espectros de absorvância da solução padrão de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  ao longo do tempo.

FIGURA 7 – Sensibilidade relativa da solução padrão de ácido fítico  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  ao longo do tempo.

FIGURA 8 – Espectros de absorvância da solução padrão de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico (preto) e da solução padrão de  $62 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico na presença de  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$  de fosfato (vermelha).

FIGURA 9 – Espectros de absorvância dos pontos da curva e do branco entre 190 nm e 1100 nm.

FIGURA 10 – Espectros de absorvância dos pontos da curva e do branco entre 250 nm e 600 nm.

FIGURA 11 – Curva de calibração para o ácido fítico, em 465 nm.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	8
2	OBJETIVOS .....	9
2.1	OBJETIVO GERAL .....	9
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
3.1	ÁCIDO FÍTICO.....	10
3.2	RÁDIOFÁRMACOS.....	11
3.2.1	Uso de ácido fítico como radiofármaco.....	12
3.3	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO .....	14
3.3.1	Métodos Colorimétricos .....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1	REAGENTES E EQUIPAMENTOS .....	19
4.2	PREPARO DE SOLUÇÕES .....	19
4.3	ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO.....	21
4.4	INFLUÊNCIA DO pH .....	21
4.5	SELETIVIDADE FRENTE A FOSTATO .....	22
4.6	CURVA DE CALIBRAÇÃO .....	22
4.7	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	22
4.8	ATIVIDADE EXTENSIONISTA.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	24
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	24
5.2	INFLUÊNCIA DO pH.....	26
5.3	ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES.....	28
5.4	SELETIVIDADE FRENTE A FOSTATO .....	30
5.5	CURVA ANALÍTICA .....	31
5.6	APLICAÇÃO DO MÉTODO .....	36
6	IMPACTO NA CADEIA TECNOLÓGICA.....	38
7	AVALIAÇÃO DO IMPACTO ECONÔMICO E AMBIENTAL DA PROPOSTA 39	
8	IMPACTOS DA ATIVIDADE EXTENSIONISTA .....	40
9	CONCLUSÕES .....	42
10	ETAPAS FUTURAS .....	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

O ácido fítico ( $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ) é uma molécula orgânica encontrada em estruturas vegetais, principalmente sementes e grãos, que representa um grande estoque de fósforo e inositol. Em ambiente biológico, o ácido fítico é encontrado na forma de fitatos, principalmente como sais mistos de cálcio, magnésio e potássio. A presença de seis grupamentos fosfato na molécula confere propriedades químicas únicas ao composto, como alta capacidade de interagir com cátions multivalentes, formando complexos altamente estáveis.

Dentre as aplicações do ácido fítico, destaca-se seu uso como molécula ligante em radiofármacos, principalmente o complexo com tecnécio radioativo,  $^{99m}Tc$ -fitato. O complexo se mostra valioso no ramo da medicina nuclear, sendo utilizado como agente de imagem de patologias hepáticas e esplênicas, bem como para a realização do exame de linfocintilografia, que tem papel fundamental no diagnóstico precoce de câncer.

Juntamente com a utilização de ácido fítico como ingrediente ativo em formulações farmacêuticas, surge a necessidade de métodos analíticos precisos para quantificar o composto dentro de indústrias de radiofármacos, como forma de garantir a dosagem correta e a qualidade dos produtos. Ao longo dos anos, foi desenvolvida uma grande variedade de métodos analíticos com objetivo de quantificar o ácido fítico, principalmente em matrizes vegetais e em alimentos. Por não possuir espectro de absorvância molecular característico, apresentar propriedades químicas desafiadoras e devido a grande quantidade de interferentes, típicos de matrizes de amostras de origem vegetal, a quantificação de ácido fítico se mostra uma tarefa complexa.

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um método específico para determinação de ácido fítico em insumo farmacêutico, de forma a atender uma demanda da indústria de radiofármacos. Para tanto, pretende-se investigar potenciais complexos com metais de transição que possam ter aplicação na determinação colorimétrica do ácido fítico, resultando em um método simples, robusto e economicamente viável.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico para determinação do teor de ácido fítico em matéria-prima, utilizada como insumo farmacêutico ativo atípico em uma indústria de radiofármacos, utilizando a técnica de espectrometria de absorção molecular no UV-Vis.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

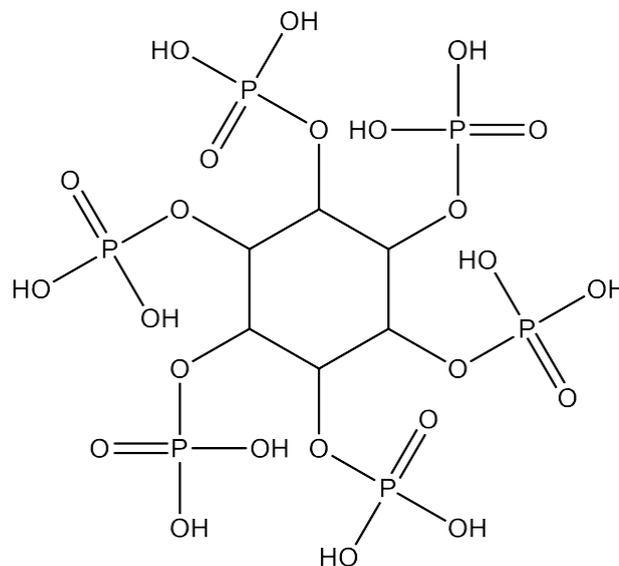
- a) Realizar revisão da literatura para identificar e comparar os métodos analíticos utilizados para determinação e quantificação de ácido fítico, bem como suas vantagens e desvantagens.
- b) Avaliar a instrumentação disponível na empresa que pretende implementar o método analítico e a viabilidade econômica.
- c) Investigar possíveis complexos com metais de transição para determinação de ácido fítico por espectrometria de absorção molecular no UV-Vis.
- d) Desenvolver e otimizar o método analítico, ajustando as condições experimentais.
- e) Determinar os parâmetros de mérito do método.
- f) Transferir o conhecimento para a empresa, visando a implementação do método analítico na rotina do laboratório de controle de qualidade.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ÁCIDO FÍTICO

O ácido fítico ( $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ), é um composto orgânico que possui seis grupos fosfato ligados à estrutura do mio-inositol, conforme ilustrado na Figura 1, resultando em uma molécula de massa molecular  $660,04 \text{ g mol}^{-1}$  (CHEN; XU, 2023). Este composto apresenta doze hidrogênios ionizáveis, permitindo a formação de íons com carga variando de -1 a -12. Devido a essa característica, o ácido fítico apresenta uma forte afinidade por cátions multivalentes, com os quais interage através dos grupamentos fosfato, formando diversos complexos estáveis (VASCA et al., 2002).

Figura 1: Estrutura do ácido fítico



Fonte: AUTORA, 2024

Quando desprotonado, o ácido fítico apresenta-se na sua forma salina, formando os chamados fitatos. Os fitatos são encontrados em sementes, grãos, legumes e outras estruturas de origem vegetal. Geralmente, apresentam-se como sais mistos de cálcio, magnésio e potássio, também chamados de fitinas (SCHLEMMER et al. 2009). Grandes teores de fitatos são encontrados em sementes e grãos, onde representam a principal fonte de inositol e fósforo,

representando entre 60 % e 90 % do fósforo total. Os fitatos também representam um estoque natural de cátions e de grupos fosforila de alta energia, que desempenham papel fundamental na fosforilação em ambientes bioquímicos (MAROLT; KOLAR, 2020).

Os fitatos foram descobertos na Alemanha, entre 1855 e 1856, quando Hartig observou pequenas partículas esféricas em sementes, semelhantes a partículas de amido presentes em batatas. Quando realizado o teste do iodo, se percebeu que não se tratava de amido e deduziu-se que as partículas serviam de estoque de nutrientes utilizados durante a germinação. Em estudos posteriores, descobriu-se que o material era composto por fósforo, cálcio e magnésio, sendo a ele atribuído o nome de fitinas. Diversos estudos mostraram que a hidrólise das fitinas levava a formação de fosfato e inositol, porém, ainda não era possível elucidar a estrutura do composto. Em 1914, Anderson propôs a estrutura atualmente aceita e já confirmada por diversos métodos analíticos modernos (SCHLEMMER et al. 2009).

### 3.2 RÁDIOFÁRMACOS

Segundo a 6ª Edição da Farmacopeia Brasileira, radiofármacos são caracterizados como “preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos”. Na Farmacopeia Internacional, da Organização Mundial da Saúde (OMS), os radiofármacos são divididos em quatro categorias, sendo elas:

1. Preparação radiofarmacêutica: produto médico pronto para uso contendo um ou mais radionuclídeos.
2. Gerador de radionuclídeo: sistema no qual um radionuclídeo filho, de meia-vida curta, é separado, geralmente por eluição, de um radionuclídeo pai, de meia vida longa, para, posteriormente, ser utilizado em uma preparação radiofarmacêutica.
3. Precursores radiofarmacêuticos: radionuclídeos produzidos para o processo de radiomarcção de uma substância, que resulta em preparação radiofarmacêutica.
4. *Kits* para preparação radiofarmacêutica: preparação que não contém radiação para ser reconstituída e/ou combinada com radionuclídeo para formar a preparação radiofarmacêutica final,

geralmente logo antes da administração. Usualmente, os *kits* vêm em forma de *vials* multidose, que podem requerer passos adicionais, como aquecimento, filtração ou tamponamento.

Em geral, os radiofármacos possuem duas partes: o radionuclídeo, que emite partículas que podem ser detectadas por um equipamento externo, e uma molécula não radioativa denominada carreador ou ligante, que possui afinidade biológica por um órgão ou sistema. Desta forma, o ligante define a biodistribuição da molécula no organismo, enquanto o radionuclídeo permite a detecção da localização exata, através da emissão de radiação (VITAL, 2019).

Para radionuclídeos que possuem tempo de meia-vida curto, exigindo que a preparação seja feita imediatamente antes da utilização, o ligante é geralmente comercializado em formas farmacêuticas liofilizadas, estéreis e apirogênicas chamadas de “*kits* frios”. Estes *kits* possuem uma combinação de reagentes não radioativos que quando reconstituídos e combinados com um radionuclídeo, formam o radiofármaco final (OLIVEIRA, 2006).

Conforme a RDC nº 738/2022, que dispõe sobre o registro, notificação, importação e controle de qualidade de radiofármacos, o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) em componentes não radioativos para marcação é a parte da formulação destinada a carregar ou ligar o radionuclídeo. Ou seja, nos *kits* frios a molécula que atua como parte ligante no radiofármaco é considerada a molécula ativa na formulação.

### **3.2.1 Uso de ácido fítico como radiofármaco**

Uma das aplicações do ácido fítico é como molécula ligante em preparações radiofarmacêuticas. De acordo com a bula do medicamento RPHLIMPHA (2020) o ácido fítico é combinado com o pertecnetato de sódio radioativo ( $\text{Na}^{99\text{mTc}}$ ), formando o radiofármaco pronto para uso. Inicialmente, foi proposto o uso do complexo  $^{99\text{mTc}}$ - fitato como agente de imagem do sistema reticuloendotelial e como agente de imagem de fígado e baço (SUBRAMANIAN, 1973). Mais tarde, o radiofármaco também se mostrou efetivo para capturar imagens do sistema linfático e para pesquisa de linfonodo sentinela (ALAVI et al.1978).

Atualmente, conforme a bula do medicamento RPHLIMPHA, o  $^{99\text{mTc}}$ -fitato tem indicação como agente de imagem de patologias hepáticas e esplênicas, bem

como para a linfocintilografia, que permite a visualização dos canais linfáticos regionais e linfonodos. A linfocintilografia permite a observação e o diagnóstico de diversas condições que afetam o sistema linfático, além de pesquisa e monitoramento de linfonodo sentinela (SAPIENZA et al., 2004).

O radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato geralmente é preparado momentos antes do uso, através da reconstituição do *kit* frio contendo o ácido fítico e outros excipientes, como o cloreto estanoso, que atua como agente redutor, convertendo  $^{99m}\text{Tc}$  para o estado de oxidação +3, ideal para a formação do complexo (FERNANDES et al., 2015). Desta forma, por ser o ingrediente da formulação do *kit* que se destina a ligar-se com o radionuclídeo, o ácido fítico é considerado o IFA da preparação (RDC nº 738/2022).

No Brasil, a fabricação do *kit* frio contendo ácido fítico, deve seguir a RDC nº 658 de 30 de março de 2022, que dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos. O artigo nº 181 da resolução em questão estabelece os itens para aprovação e manutenção de fornecedor de matéria-prima para a fabricação de insumos farmacêuticos ativos. Observa-se que para atender os requisitos, o fabricante do IFA deve seguir as boas práticas de fabricação para insumos farmacêuticos, bem como boas práticas de distribuição. Estes processos são detalhados na RDC nº 359 de 27 de março de 2020, que institui o Dossiê de Insumo Farmacêutico Ativo (DIFA) e a Carta de Adequação de Dossiê de Insumo Farmacêutico Ativo (CADIFA).

Com exceção da utilização em formulações destinadas ao uso radiofarmacêutico, o ácido fítico não é usualmente utilizado para fabricação de medicamentos. Por esse motivo, não se encontra no mercado a matéria-prima ácido fítico comercializada em grau farmacêutico. Para estes casos, a RDC nº 658/2022 traz o conceito de insumo farmacêutico ativo atípico (IFA atípico). Nesta circunstância, a indústria farmacêutica pode utilizar o reagente de maior qualidade encontrado no mercado, desde que realize gerenciamento de risco e verifique até que ponto as boas práticas de fabricação são seguidas no processo produtivo do IFA.

O fato do ácido fítico não ser comumente utilizado como insumo farmacêutico acarreta a ausência do composto em farmacopeias ou compêndios oficiais. Desta forma, fica a cargo do fabricante da formulação farmacêutica o desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade do IFA.

### 3.3 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO

A determinação e quantificação do ácido fítico não é uma tarefa trivial. Usualmente, os métodos encontrados na literatura são desenvolvidos para a quantificação de ácido fítico em matrizes vegetais, as quais, em geral, contam com outros tipos de fosfatos de inositol, que se apresentam como interferentes, além de fosfatos inorgânicos (THOMPSON et al. 1982) (KAHRIMAN et al. 2020). Além disso, o ácido fítico não apresenta espectro característico de absorção e tem propriedades químicas desafiadoras, já que sua estrutura é facilmente modificada frente a variações de pH, além da interação com metais e outros cátions presentes na matriz da amostra.

No artigo de revisão “*Analytical Methods for Determination of Phytic Acid and Other Inositol Phosphates: A Review*”, (MAROLT; KOLAR, 2020) os métodos de análise do ácido fítico são separados em 4 categorias: métodos clássicos, métodos de separação, métodos espectroscópicos e sensores. No esquema da Figura 2 é possível verificar a compilação dos métodos de cada categoria.

Figura 2 - Métodos para determinação de ácido fítico por categoria.

Métodos clássicos	Métodos de separação	Métodos Espectroscópicos	Sensores
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precipitação</li> <li>• Titulação potenciométrica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HPLC</li> <li>• IC</li> <li>• GC</li> <li>• TLC</li> <li>• Eletroforese</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UV-Vis</li> <li>• Fluorescência</li> <li>• RMN</li> <li>• ICP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biossensores eletroquímicos</li> <li>• Nano sondas de fluorescência</li> </ul>

Fonte: Adaptado de MAROLT E KOLAR, 2020.

Os métodos clássicos abrangem métodos de precipitação, que se baseiam na capacidade do ácido fítico formar complexos pouco solúveis com íons metálicos, principalmente ferro. Em geral, os métodos de precipitação são combinados com titulações, que possibilitam a determinação quantitativa do ácido fítico (YOUNG, 1936). Dentre as principais desvantagens dos métodos de precipitação estão a estequiometria inconsistente dos complexos formados entre metais e ácido fítico, já que esta varia diante da concentração e do pH do meio.

Além disso, a falta de seletividade frente a outros fosfatos de inositol e a baixa sensibilidade também são desvantagens a serem consideradas (MAROLT; KOLAR, 2020). Dentre as vantagens, podemos citar a simplicidade e baixo custo dos métodos, sendo possível realizar a quantificação absoluta, sem comparação com padrões ou curvas externas.

Os métodos de separação, de forma geral, têm como principal desvantagem o custo e o tempo de análise, já que as técnicas requerem equipamentos e materiais de alto valor (MAROLT; KOLAR, 2020). Dentre as vantagens gerais, principalmente no caso da cromatografia líquida e da cromatografia iônica, está a possibilidade de uso de diversos detectores, como índice de refração, espectrometria de massas e espectrometria no UV-Vis, sendo que para a última é necessário realizar etapas de derivatização da amostra ou de tratamento pós-coluna, já que o ácido fítico não apresenta pico de absorvância característico (PHILLIPPY; JOHNSTON, 1985).

Quando falamos de métodos espectrofotométricos, podemos enumerar diferentes técnicas, cada uma com seus desafios e benefícios. A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) fornece diversas informações tanto sobre o ácido fítico quanto de outros fosfatos de inositol, porém requer o emprego de equipamentos de alto custo e de extenso conhecimento da técnica, não se tornando um método de primeira escolha quando se trata de análises de rotina (MAROLT; KOLAR, 2020). A quantificação por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) ou por Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) permite a quantificação indireta, via determinação de fósforo, de forma rápida e com alta sensibilidade, porém apresenta problemas de interferência com outros fosfatos de inositol e fosfatos inorgânicos (GRASES et al., 2004), (MUÑOZ; VALIENTE, 2003). Métodos que utilizam a espectrometria de fluorescência molecular e a espectrometria de UV-Vis são, em geral, métodos de detecção indiretos, devido à ausência de espectro característico e também apresentam interferências com outros fosfatos de inositol (CHEN Y. et al., 2009) (KAHRIMAN et al., 2020). No caso dos métodos colorimétricos, eles se mostram robustos, com procedimentos simples e de baixo custo, porém costumam apresentar resultados superestimados (KAHRIMAN et al., 2020).

Quando se trata de sensores, podemos citar o uso de biossensores eletroquímicos, que utilizam eletrodos modificados com enzimas imobilizadas. Esses sensores são aplicados em diferentes técnicas eletroanalíticas, como

amperometria (MAK et al., 2004) e voltametria cíclica (CASELI et al., 2006), de modo a desenvolver métodos seletivos e com baixos limites de detecção para determinação de ácido fítico. No entanto, o uso de enzimas torna o método dependente da atividade enzimática, além de exigirem preparações complexas, com materiais e métodos de custo mais elevado (MAROLT; KOLAR, 2020). Outra inovação no campo dos sensores são os nanosensores fluorescentes, aplicados principalmente na detecção de fitatos em células vivas (SHI et al., 2019). Essa técnica apresenta boa sensibilidade, porém apresenta interferência com outros fosfatos de inositol e faixa linear limitada.

Neste trabalho, optou-se pelo enfoque nos métodos colorimétricos, uma vez que estes se mostram uma alternativa simples e de baixo custo, viável para ser aplicada na indústria farmacêutica, e que apresenta robustez e boa sensibilidade.

### 3.3.1 Métodos Colorimétricos

Em geral, os métodos colorimétricos são frequentemente aplicados em conjunto com métodos de separação ou de precipitação. Devido à ausência de espectro de absorvância específico do ácido fítico, os métodos colorimétricos voltados ao composto são baseados em medidas indiretas de mudança de coloração em complexos metálicos ou na medida do fósforo inorgânico obtido via digestão enzimática ou hidrólise do ácido fítico (MAROLT; KOLAR, 2020).

Para determinação a partir de ferro no precipitado, inicialmente a amostra contendo ácido fítico é tratada com solução de concentração conhecida de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), resultando na precipitação do complexo Fe-fitato. Posteriormente, o complexo é separado do sobrenadante e tratado com solução concentrada de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), formando fitato de sódio (solúvel) e hidróxido de ferro (III) (pouco solúvel). O precipitado é filtrado e então solubilizado utilizando solução de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ). Após a reconstituição, a quantidade de ferro é determinada por colorimetria utilizando o complexo formado com tiocianato de amônio ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) (YOUNG, 1936). No caso da análise do sobrenadante, é determinada a quantidade de ferro residual. Makower (1970) utilizou orto-fenantrolina ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ ), após realizar a redução de  $\text{Fe}^{+3}$  para  $\text{Fe}^{+2}$ , como reagente colorimétrico para determinação do ferro.

Para a determinação via fósforo, em geral, se utiliza a reação de azul de

molibdênio. O método desenvolvido por Harland et al. (1986) utiliza uma purificação preliminar por troca iônica, seguida de digestão das amostras com ácido sulfúrico e ácido nítrico. Posteriormente, é realizada a reação de azul de molibdênio, combinando a amostra já digerida com uma solução de molibdato de amônio e ácido 1-amino-2-hidroxinaftaleno-4- sulfônico, o que resulta em um pico de absorção em 640 nm. Este procedimento é amplamente aceito e é considerado pela *Association of Official Analytical Collaboration* (AOAC) o método oficial para determinação de teor de ácido fítico em produtos alimentícios (HARLAND et al., 1986).

Outra abordagem, utilizada em métodos colorimétricos, é o uso de reações de complexação competitivas nas quais íons metálicos deixam o composto de coordenação inicial, para então formar um complexo mais estável com o ácido fítico (MAROLT; KOLAR, 2020). O método de Wade é um dos mais amplamente utilizados e aceitos como método de referência para sementes e alimentos (KAHRIMAN, et al. 2019). Neste método, se utiliza o complexo Fe (III)-sulfosalicílico, conhecido como reagente de Wade, que absorve em 500 nm. Quando o reagente é adicionado em uma amostra que contém ácido fítico, forma-se o complexo Fe (III)-fitato, que é mais estável, o que gera uma diminuição da absorbância, já que o complexo colorido é desfeito (WADE; MORGAN, 1955) (VAINTRAUB; LAPTEVA, 1988). O mesmo princípio é aplicado utilizando o complexo ítrio (III)- 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) que apresenta absorbância máxima em 546 nm (MAYR, 1988) e o complexo Fe (III)-bi- piridina, com  $\lambda_{\text{máx}}$  em em 519 nm (HAUG; LANTZSCH, 1983).

Um estudo realizado por Bebot-Brigaud (1999) avaliou a formação de complexos de ácido fítico com uma série de cátions metálicos ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$ ) utilizando técnicas potenciométricas, espectrofotométricas e de ressonância magnética nuclear de fósforo-31 ( $^{31}\text{P}$ ). Dentre os complexos avaliados, apenas o complexo Co(II)-fitato apresentou solubilidade em água e uma absortividade molar suficientemente alta para permitir análises espectrofotométricas detalhadas. Observou-se que o complexo exibiu um pico de absorbância em 515 nm para pH abaixo de 7. Já considerando valores de pH entre 7 e 10, observa-se um deslocamento do máximo comprimento de onda de 515 nm para 550 nm, além de ocorrer um aumento na absortividade molar para pH acima de 9. A aplicação do complexo Co(II)-fitato em métodos colorimétricos para determinação de ácido fítico

não foi avaliada no estudo em questão.

Considerando a ausência de espectro de absorção característico do ácido fítico na faixa do UV-Vis, optou-se por explorar a sua capacidade quelante e, conseqüentemente, sua característica de formar complexos estáveis com íons metálicos (VASCA et al., 2002). O ferro, tanto na forma de Fe(II) quanto de Fe(III), interage fortemente com o ácido fítico, formando complexos bastante estáveis, tanto em solução quanto em estado sólido (QUIRRENBACH, *et al.*, 2009).

Diante dessas considerações, decidiu-se investigar a reação competitiva entre o complexo Fe(III)-fitato e Fe(III)-tiocianato, através das modificações observadas nos espectros de absorbância. O complexo Fe(III)-tiocianato é um complexo conhecido por sua coloração avermelhada e por apresentar espectro de absorbância na região do visível, próximo a 465 nm. A coloração do complexo é dada pelo fenômeno de absorção por transferência de carga, na qual a absorção de um fóton resulta na transferência de um elétron do íon tiocianato para um orbital característico do Fe(III) (SKOOG; WEST; JAMES, 2006). Desta forma, mantendo-se constantes as concentrações de ferro e tiocianato no meio, tem-se uma diminuição na absorbância conforme aumenta a concentração de ácido fítico na solução, estabelecendo uma relação inversamente proporcional entre ácido fítico e absorbância.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Para o preparo das soluções utilizadas na curva analítica, bem como no preparo das demais soluções aplicadas durante o desenvolvimento do trabalho, utilizou-se água ultrapura, proveniente de sistema de filtração de água Milli-Q.

Os reagentes químicos empregados no preparo de soluções foram: tiocianato de amônio P.A.(Neon), cloreto de ferro III hexahidratado P.A./A.C.S. (Neon), ácido clorídrico 37% (Química Moderna), fosfato de sódio monobásico anidro (Synth) e ácido fítico, sal sódico hidrato (Sigma-Aldrich).

A pesagem dos reagentes foi feita utilizando balança analítica da marca Shimatzu, com precisão de 0,0001 g e carga máxima de 220 g.

Todas as vidrarias utilizadas foram previamente limpas em banho de Extran 10% (v/v) e enxaguadas com água ultrapura, proveniente de sistema de filtração Milli-Q.

As medições foram realizadas em espectrofotômetro da marca Mettler Toledo, modelo UV/VIS Excellence UV5. Utilizou-se o modo "Scanning" do aparelho, com faixa de medida de 190 nm a 1100 nm. Para a análise de valores de absorbância, considerou-se o comprimento de onda de 465 nm. As leituras foram feitas com uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

### 4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

As soluções utilizadas na curva analítica e demais ensaios realizados durante o trabalho foram preparadas conforme descrito abaixo:

- Ácido fítico 0,05 mol L<sup>-1</sup>: pesou-se cerca de 0,3300 g de ácido fítico, de um lote de amostra, aqui identificado como A, que foi dissolvido em água e a solução foi avolumada para 10,0 mL, em balão volumétrico.
- Cloreto férrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>: pesou-se e dissolveu-se cerca de 0,2700 g de cloreto férrico em água, após foi acrescentado 1 mL de ácido clorídrico 3 mol L<sup>-1</sup> e a solução foi avolumada para 10,0 mL em balão volumétrico.
- Ácido clorídrico 3 mol L<sup>-1</sup>: diluiu-se 30,9 mL de ácido clorídrico para 100,0 mL com água, em balão volumétrico.
- Tiocianato de amônio: pesou-se cerca de 8,0000 g de tiocianato de

amônio e dissolveu-se em água, para 100,0 mL, em balão volumétrico.

- Fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>: pesou-se 1,2000 g de fosfato de sódio monobásico anidro e dissolveu-se em água até o volume de 100,0 mL, em balão volumétrico.
- Soluções padrão de ácido fítico: adicionou-se a um balão 2 mL da solução de ácido clorídrico 3 mol L<sup>-1</sup>, 2 mL da solução de tiocianato de amônio, 0,5 mL de solução de cloreto férrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> e a quantidade pertinente de solução de ácido fítico 0,05 mol L<sup>-1</sup>, conforme especificado na Tabela 1. A solução resultante foi avolumada com água para o volume de 100,0 mL, em balão volumétrico. Imediatamente antes do uso, uma pequena alíquota foi filtrada, utilizando-se funil e papel filtro e realizou-se uma diluição 1:1 com água.
- Solução Branco 1: adicionou-se a um balão 2 mL da solução de ácido clorídrico 3 mol L<sup>-1</sup>, 2 mL da solução de tiocianato de amônio, 0,5 mL de solução de cloreto férrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A solução resultante foi avolumada com água para o volume de 100,0 mL, em balão volumétrico. Imediatamente antes do uso, realizou-se uma diluição 1:1 com água.

Tabela 1: Preparo das soluções da curva de calibração.

	0 mol L <sup>-1</sup> (Branco 1)	37,5 μmol L <sup>-1</sup>	50,0 μmol L <sup>-1</sup>	62,5 μmol L <sup>-1</sup>	75 μmol L <sup>-1</sup>	87,5 μmol L <sup>-1</sup>
<b>HCl 3 mol L<sup>-1</sup></b>	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
<b>NH<sub>4</sub>SCN</b>	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
<b>Cloreto férrico 0,1 mol L<sup>-1</sup></b>	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
<b>Ác. Fítico 0,05 mol L<sup>-1</sup></b>	-	150 μL	200 μL	250 μL	300 μL	350 μL

Fonte: Autora

A fim de avaliar a possível presença de ferro nos reagentes utilizados, preparou-se também uma segunda solução em branco, denominada “Branco 2”, conforme a Tabela 2, sem a adição da solução de cloreto férrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Após, a solução foi avolumada para 100,0 mL e foi realizada a diluição 1:1 imediatamente antes da leitura.

Tabela 2: Preparo da solução em branco 2.

<b>Solução</b>	<b>Volume</b>
<b>HCl 3 mol L<sup>-1</sup></b>	2 mL
<b>NH<sub>4</sub>SCN</b>	2 mL
<b>Cloreto férrico 0,1 mol L<sup>-1</sup></b>	-
<b>Ác. Fítico 0,05 mol L<sup>-1</sup></b>	250 µL

Fonte: Autora

#### 4.3 ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO

A fim de avaliar a estabilidade e as modificações que ocorrem nas soluções da curva de calibração, empregou-se a solução padrão de concentração 62,5 µmol L<sup>-1</sup>. As leituras ocorreram em 0, 10, 30, 50 e 60 minutos. Também foi feita uma leitura após 24h da preparação. A etapa de filtração e diluição 1:1 foi realizada imediatamente antes de cada leitura.

#### 4.4 INFLUÊNCIA DO pH

A avaliação da influência do pH no espectro de absorvância da solução foi feita utilizando-se 3 soluções, com três valores de pH de 1, 2 e 3, todas com 62,5 µmol L<sup>-1</sup> de ácido fítico. As soluções foram preparadas conforme descrito na Tabela 3. A medição do valor de pH foi realizada utilizando fita indicadora de pH de 0 a 2,5, para as soluções de pH 1 e 2, e fita indicadora de pH 0 a 6,0 para a solução de pH 3.

Tabela 3: Preparo das soluções utilizadas para investigação da influência do pH na absorvância

<b>Solução</b>	<b>pH 1</b>	<b>pH 2</b>	<b>pH 3</b>
HCl 3 mol L <sup>-1</sup>	2 mL	1 mL	-
NH <sub>4</sub> SCN	2 mL	2 mL	2 mL
Cloreto férrico 0,1 mol L <sup>-1</sup>	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Ác. Fítico 0,05 mol L <sup>-1</sup>	250 µL	250 µL	250 µL

Fonte: Autora

As soluções resultantes foram avolumadas para 100,0 mL em balão volumétrico. Após o preparo, procedeu-se com a filtração e a diluição 1:1 com água e foi realizada a leitura no espectrofotômetro.

#### 4.5 SELETIVIDADE FRENTE A FOSTATO

A avaliação da seletividade do método frente ao íon fosfato foi realizada através da comparação dos espectro de absorvância obtido para a solução padrão de 62,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico e outra solução de preparo idêntico, porém com a adição de 0,5 mL da solução de fosfato de sódio 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ . Após o preparo das soluções, foi realizada a etapa de filtração e diluição 1:1 e, em sequência, foram realizadas as leituras conforme os parâmetros já mencionados. A solução final tem uma concentração de 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de fosfato.

#### 4.6 CURVA DE CALIBRAÇÃO

As soluções padrão da curva de calibração foram preparadas conforme descrito no item 4.2.

Para verificar a linearidade do método proposto, foram realizadas 3 medidas, sendo realizada a etapa de diluição 1:1 separadamente antes de cada medida. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro utilizando o modo “*Scanning*” e foram utilizados os valores de absorvância obtidos em 465 nm.

#### 4.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO

A fim de verificar a aplicabilidade do método desenvolvido, foi preparada uma solução com uma amostra de outro lote de ácido fítico (lote B), com concentração de 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ . Após, essa solução foi diluída, utilizando preparo idêntico ao da solução padrão de concentração 62,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico, utilizando 250  $\mu\text{L}$  de da solução de ácido fítico 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , em um balão volumétrico, além dos demais reagentes. Foram então realizadas três medidas de absorvância no comprimento de onda de 465 nm. A quantificação foi realizada a partir da curva de calibração construída com a amostra do lote A.

Para comparação dos resultados, as amostras de ácido fítico dos lotes A e B, foram analisadas por espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF MAS), através do monitoramento da

molécula diatômica de PO. Através dessa técnica, foi feita a determinação a concentração de fósforo nas amostras. Para calibração foram empregadas soluções padrão de fósforo. Considerou-se que todo fósforo presente, tanto na amostra quanto no padrão, provém do ácido fítico.

#### 4.8 ATIVIDADE EXTENSIONISTA

O projeto junto à empresa, iniciou-se com reuniões de alinhamento, buscando compreender as necessidades e expectativas para que estas pudessem ser contempladas no método analítico, que visa a determinação do teor de ácido fítico na matéria-prima utilizada na produção de radiofármacos.

Em outro momento, realizou-se um levantamento dos materiais e reagentes já utilizados no setor, para que o seu uso pudesse ser priorizado, evitando assim, que o desenvolvimento do método se tornasse economicamente oneroso para a empresa.

Além disso, a grande maioria dos testes e experimentos desenvolvidos durante o trabalho foram realizados nas dependências da empresa, visando garantir que o método se enquadrasse com a realidade prática vivenciada no setor.

Por fim, foi realizada a etapa de divulgação do método desenvolvido para a equipe do setor de controle da qualidade. Nesta etapa, os resultados obtidos, bem como sugestões relacionadas à melhorias do método foram apresentados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

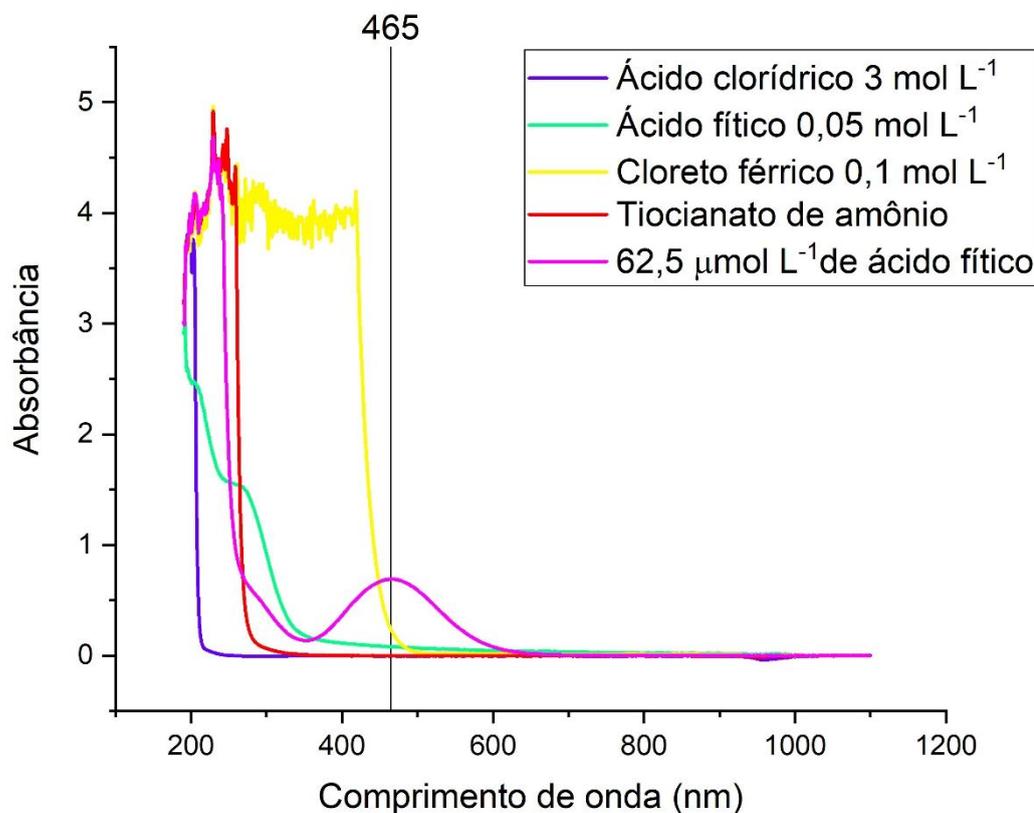
### 5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Inicialmente, foi definida a técnica a ser utilizada para o desenvolvimento do método de determinação do teor de ácido fítico na matéria-prima utilizada na produção de radiofármacos, sendo escolhida a espectrometria de absorção molecular no UV-Visível. Para tanto, considerou-se a facilidade de aplicação e o baixo custo da técnica, bem como os recursos disponíveis nas instalações do laboratório de controle de qualidade da indústria em questão, que dispõe de espectrofotômetro em condições de uso.

Para a determinação das concentrações dos reagentes levou-se em conta os seguintes pontos: a faixa de valor de absorbância, visando obter um método em que não houvesse desvios da Lei de Lambert-Beer, o pH da solução e a determinação dos reagentes que deveriam estar em excesso. Outro aspecto importante observado no preparo da curva de calibração, foi a formação de um precipitado fino, proveniente da complexação do  $\text{Fe}^{+3}$  pelo ácido fítico. A fim de evitar a interferência do complexo na medida de absorbância, adicionou-se a etapa de filtração e a diluição 1:1. Com estes procedimentos, evitou-se o espalhamento da luz pelas partículas em suspensão.

Os espectros de absorbância obtidos para as soluções utilizadas na curva de calibração em comparação com o espectro de absorbância da solução de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  podem ser observados na Figura 3. Um ponto importante a ser observado é a baixa transmitância da solução de cloreto férrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , que se estende até um comprimento de onda de cerca de  $450 \text{ nm}$ , resultando em uma alta absorbância, sem picos bem definidos. Esta característica é minimizada pela adição de tiocianato de amônio, que leva a formação do complexo que possui pico de absorbância bem definido, com máxima absorção próximo a  $465 \text{ nm}$ . Desta forma, torna-se imprescindível a adição do íon tiocianato em excesso na solução, evitando possíveis interferências em decorrência da presença do cloreto férrico em solução.

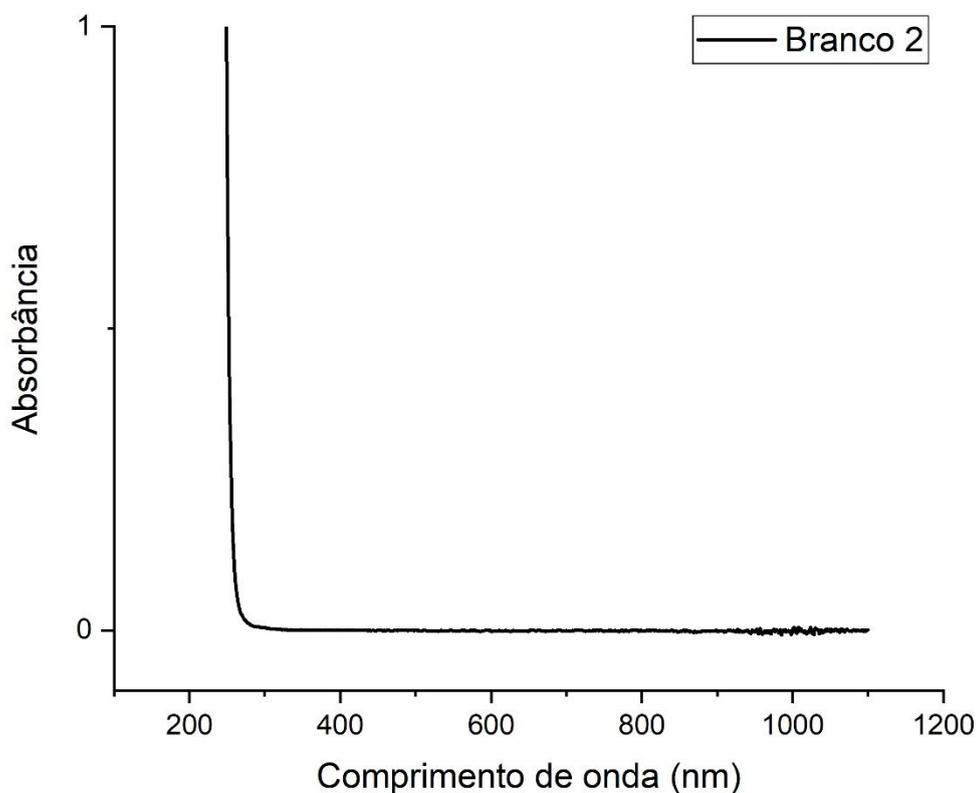
Figura 3: Espectros de absorvância na região do UV-Vis das soluções utilizados na preparação da curva de calibração em comparação com espectro do padrão de 62,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico.



Fonte: Autora

A solução de ácido fítico 0,05 mol L<sup>-1</sup> apresenta alguns “ombros” de absorvância próximo de 200 nm e 280 nm, além de uma absorvância diferente de zero na região de interesse, em 465 nm. Os demais reagentes adicionados não possuem absorvância significativa em 465 nm. Observa-se que a solução padrão de concentração 62,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico possui uma região de baixa transmitância até cerca de 250 nm, que coincide com a região de baixa transmitância do tiocianato de amônio.

Figura 4: Espectro da solução Branco 2, com  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico, sem a adição de cloreto férrico.



Fonte: Autora

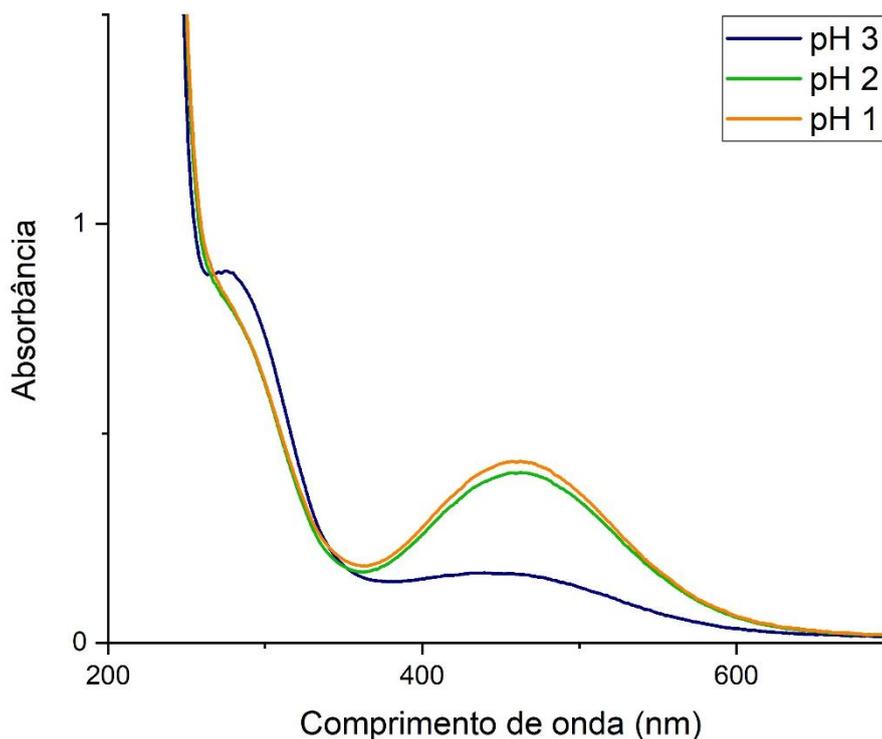
Na Figura 4, observa-se que não há um sinal de absorvância relevante em 465 nm o que indica que não há contaminação por ferro nos reagentes empregados. A contaminação por  $\text{Fe}^{3+}$  pode tornar-se um possível interferente, já que a concentração de  $\text{Fe}^{3+}$  deve ser mantida constante entre todas as soluções utilizadas para a construção da curva analítica. Além disso, nota-se que não há a presença dos ombros no espectro da solução de ácido fítico de concentração  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , observados na Figura 3. Isso indica que a região de absorvância em 290 nm observada no espectro da solução padrão de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , não é decorrente do ácido fítico isolado, mas sim, do complexo formado entre ácido fítico e  $\text{Fe}^{3+}$ .

## 5.2 INFLUÊNCIA DO pH

Para avaliar a influência do pH na absorvância, prepararam-se 3 soluções

com diferentes pH: 1, 2 e 3; sendo o pH 1 o habitual da curva de calibração utilizada no método. Ao sobrepor os espectros obtidos, conforme Figura 5, observa-se uma diminuição na absorbância na faixa de 465 nm conforme aumenta-se o pH, sendo a solução de pH 3, a com menor absorbância e a solução de pH 1 a com maior.

Figura 5: Espectros de absorbância da solução padrão de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico em diferentes faixas de pH.



Fonte: Autora

Na Figura 5, pode-se notar que não se tem grandes modificações nos valores de absorbância quando comparados os espectros obtidos em pH 1 e 2. Para o pH 1, obteve-se um valor de absorbância de 0,43109 em 465 nm e de 0,40524 no pH 2, o que representa uma diminuição de 6,0% na absorbância. Porém, ao trabalharmos com a solução em pH 3, tem-se uma diminuição bastante significativa, com valor de absorbância de 0,16236, comprimento de onda de 465 nm, que representa uma redução de 62,3% em relação a absorbância em pH 1. Além disso, observa-se um leve aumento no pico presente na faixa de 290 nm. Isso se deve ao fato de que conforme há o aumento de pH, aumenta-se o grau de desprotonação do ácido fítico, aumentando a sua capacidade quelante.

Ao analisarmos os valores de absorbância obtidos para cada pH percebe-se

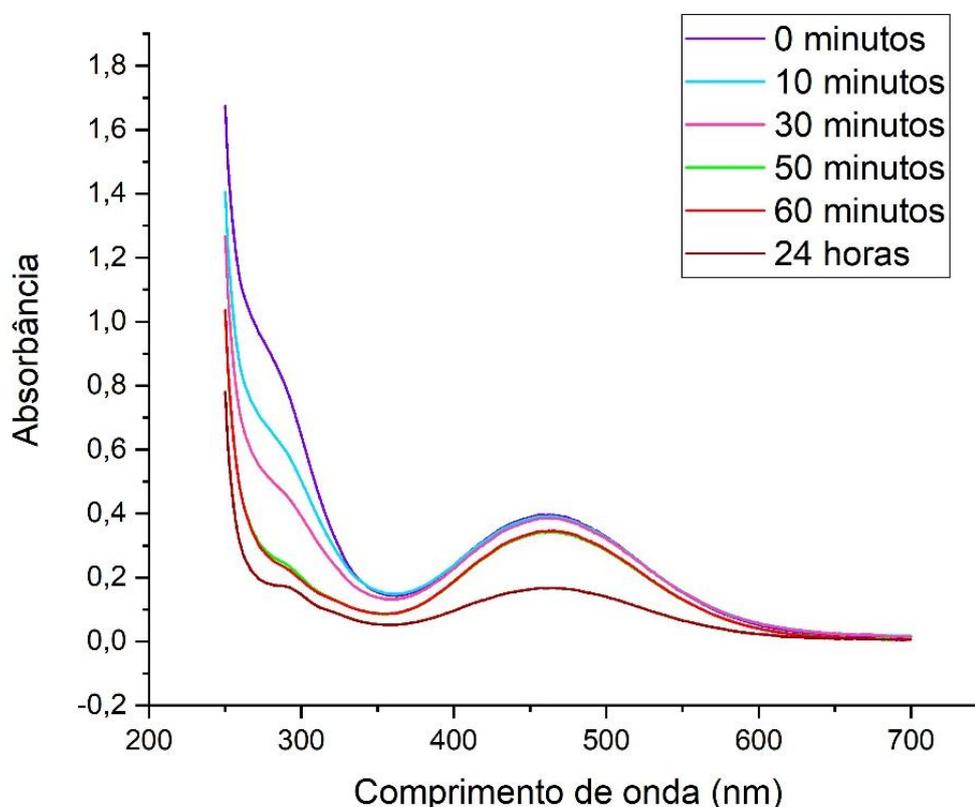
que o pH 3 não se mostra muito adequado para a execução do método pois não há a formação de um pico bem definido, o que prejudica a identificação do ponto que possui valor máximo de absorvância. Apesar da pequena modificação nos valores de absorvância, quando comparados os espectros obtidos em pH 1 e 2, o pH 1 se mostra mais vantajoso, pois garante maior controle da reação de complexação e, conseqüentemente dos espectros obtidos. Desta forma, empregou-se o pH 1 em todas as análises subseqüentes deste trabalho.

### 5.3 ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES

O estudo da estabilidade das soluções utilizadas para a confecção da curva analítica tem por objetivo verificar a variação nos valores de absorvância ao longo do tempo. A partir destas informações, é possível estimar o tempo ideal de leitura da solução no espectrofotômetro, bem como observar o progresso da reação de complexação do  $\text{Fe}^{3+}$  pelo ácido fítico ao longo do tempo.

A Figura 6, mostra os espectros obtidos em 0, 10, 30, 50 e 60 minutos, e depois de 24 h da primeira leitura. Observa-se que ao longo do tempo, tanto o pico observado em 465 nm, quanto o pico na região de 290 nm diminuem.

Figura 6: Espectros de absorvância da solução padrão de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  ao longo do tempo.



Fonte: Autora

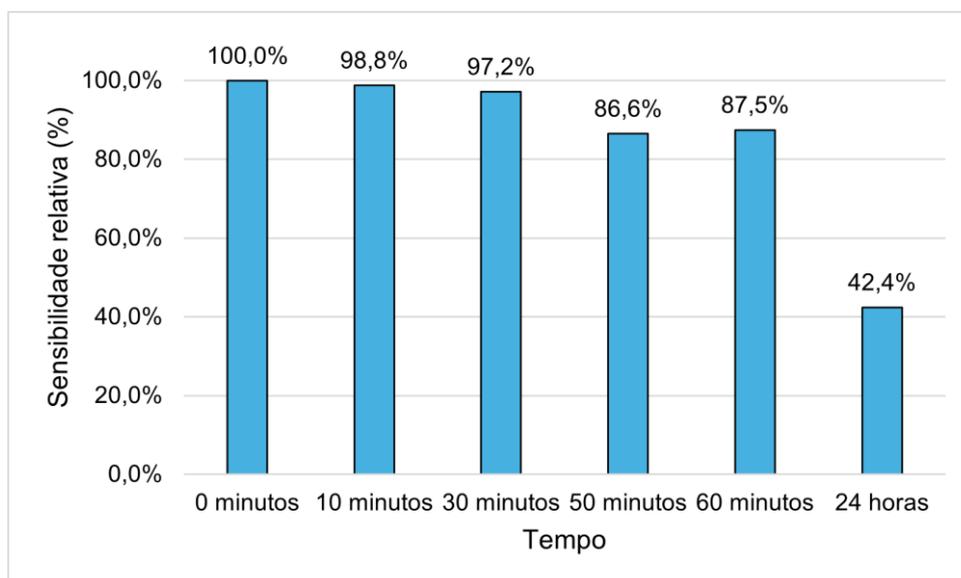
O decaimento da absorvância pode ser associado a formação do complexo pouco solúvel entre ácido fítico e  $\text{Fe}^{3+}$ . O equilíbrio da reação pode ser representado da seguinte forma:



A formação do sólido acaba deslocando o equilíbrio da reação para a direita, levando à maior complexação de ferro pelo ácido fítico ao longo do tempo. A diminuição da absorvância na região de 290 nm ajuda a confirmar esta hipótese, já que também está associada a presença do complexo Fe-fitato em solução, sendo a sua diminuição resultante da menor concentração do complexo no meio aquoso ao longo do tempo, devido a precipitação.

A Figura 7 exibe, percentualmente, a modificação no valor da absorvância em 465 nm ao longo do tempo. Observa-se que nos primeiros 30 minutos há uma queda de 2,8% no valor da absorvância.

Figura 7: Sensibilidade relativa da solução padrão de ácido fítico  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  ao longo do tempo.



Fonte: Autora

Já nos 30 minutos subsequentes, tem-se um decréscimo de cerca de 12%, representando uma queda significativa no valor da absorbância uma hora após o preparo da solução. Ao passar 24 horas, há uma diminuição de mais de 50 % no sinal medido em 465 nm, evidenciando a diminuição do teor de ferro na solução, em decorrência da precipitação do complexo Fe-fitato.

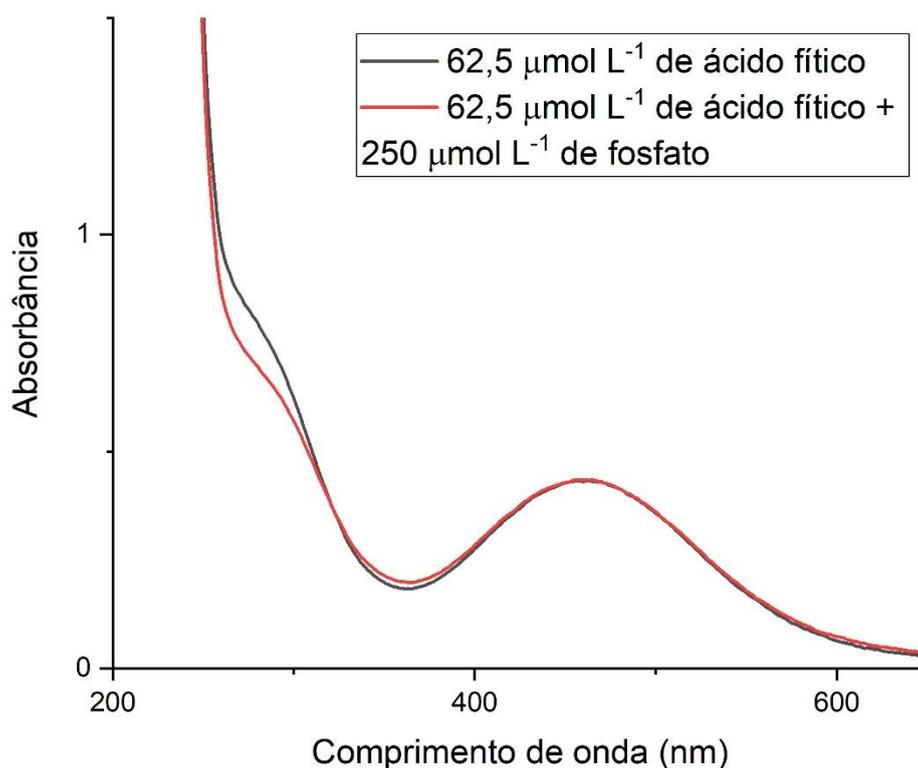
Observa-se ainda, que a tendência de diminuição na absorbância não exhibe comportamento perfeitamente linear. Por esse, motivo é importante que a leitura da absorbância durante a preparação da curva de calibração seja realizada imediatamente após a preparação da solução, minimizando possíveis erros.

#### 5.4 SELETIVIDADE FRENTE A FOSTATO

Ao longo da revisão bibliográfica, percebeu-se que um dos possíveis interferentes na determinação de ácido fítico são sais de fosfato inorgânico, que são compostos presentes em estruturas vegetais. A matéria-prima utilizada e que se pretende analisar, tem como fonte o arroz, logo, os fosfatos são uma das impurezas que poderia estar presente em sua composição. Diante desta observação, decidiu-se testar a seletividade do método proposto na presença de fosfato inorgânico na solução a partir da comparação do espectro de absorbância para duas soluções.

A Figura 8 exibe a sobreposição entre os espectros obtidos para as duas soluções de preparo idêntico, com exceção da presença de fosfato. Observa-se que as curvas se sobrepõem na região de 465 nm, sem alteração significativa nos valores de absorbância.

Figura 8: Espectros de absorbância da solução padrão de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico (preto) e da solução padrão de  $62 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido fítico na presença de  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$  de fosfato (vermelha).



Fonte: Autora

A única modificação no espectro é uma leve diminuição da absorbância na região de 290 nm, porém sem impactos para o comprimento de onda de interesse. Desta forma, pode-se concluir que o método se mostra seletivo frente ao fosfato inorgânico.

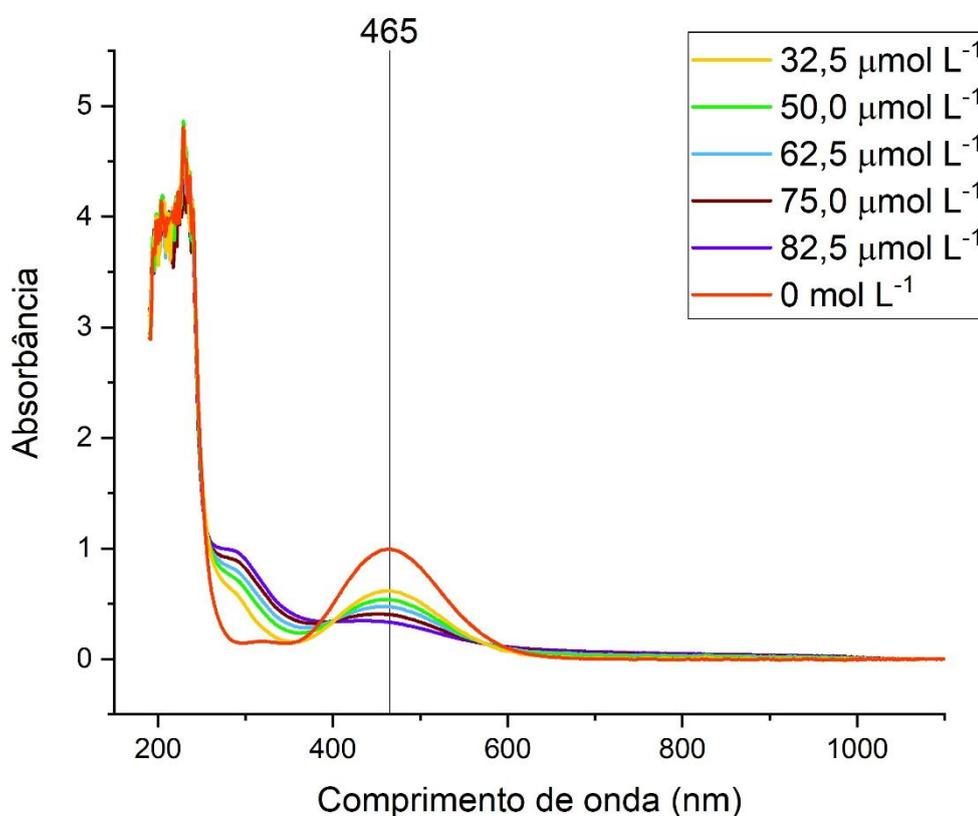
## 5.5 CURVA ANALÍTICA

A curva analítica é composta por 5 pontos com concentração de ácido fítico entre  $32,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $82,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O pH selecionado para a execução da curva de calibração foi o pH 1 e as leituras foram realizadas imediatamente após o preparo e diluição das soluções padrão, conforme definido nas etapas de estudo de

influência do pH e de estabilidade da solução.

Além da comparação dos espectros de absorvância obtidos entre os pontos, também foi feita a comparação com a solução Branco 1, sem a presença do ácido fítico. Os espectros obtidos entre 190 nm e 1100 nm podem ser observados na Figura 9.

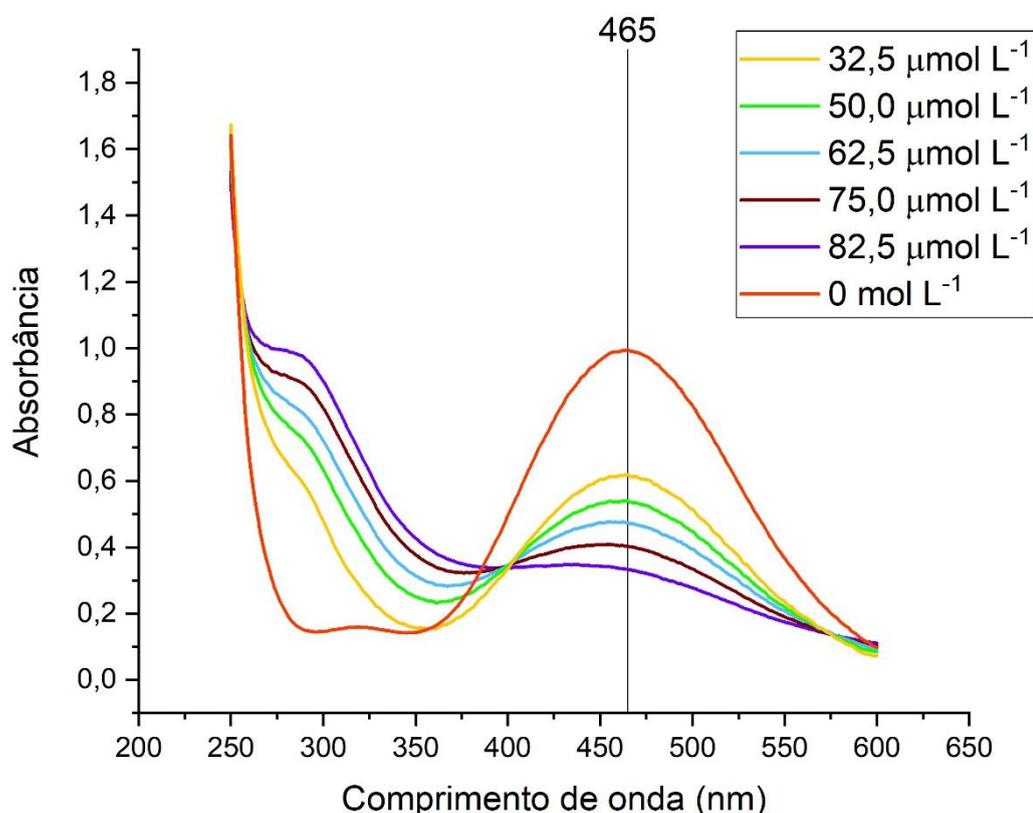
Figura 9: Espectros de absorvância dos pontos da curva e do branco entre 190 nm e 1100 nm.



Fonte: Autora

Nos espectros exibidos na Figura 9, observamos a região de baixa transmitância, proveniente da solução de tiocianato de amônio, conforme já discutido anteriormente neste trabalho. Observa-se, também, a presença de duas regiões de absorção principais, a primeira próxima aos 290 nm e outra com máximo de absorção em 465 nm. A partir de 600 nm, as soluções apresentam absorvância próxima de zero. A Figura 10 traz os espectros de absorção obtidos entre 250 nm e 600 nm, a fim de melhor investigar as principais regiões de absorção das soluções que compõe a curva de calibração.

Figura 10: Espectros de absorvância dos pontos da curva e do branco entre 250 nm e 600 nm.



Fonte: Autora

Nos espectros exibidos na Figura 10, fica clara a relação inversamente proporcional entre a concentração de ácido fítico e a absorvância no comprimento de onda de 465 nm, sendo o branco 1, sem a presença de ácido fítico, a solução com maior valor de absorvância e a solução com 82,5 μmol L<sup>-1</sup> a com menor valor. Isso reforça que a absorvância observada nesta região não provém do complexo Fe-fitato, mas sim do complexo [Fe(SCN)<sub>3</sub>]. Além disso, percebe-se que a formação do complexo entre o ferro e o ácido fítico é mais favorecida, já que ocorre a diminuição na absorvância.

A ausência do pico de absorção na região de 290 nm na solução do branco, demonstra que este pico está relacionado ao complexo formado entre ferro e ácido fítico. Nota-se, também, que a absorvância nesta faixa aumenta com a quantidade de ácido fítico adicionado. Além disso, observa-se um leve deslocamento

hipsocrômico associado ao aumento de ácido fítico no meio, ou seja, o máximo de absorvância desloca-se para a região do azul, em menores comprimentos de onda. No ponto de maior concentração, já não se observa a formação de pico bem definido, podendo ser um indicativo de que a concentração limite de ácido fítico foi atingida.

As medidas para a construção da curva de calibração foram compiladas na Tabela 4, juntamente com os valores de média e desvio padrão para cada ponto.

Tabela 4: Valores de absorvância obtidos para cada concentração e valores de média, variância e desvio padrão calculados.

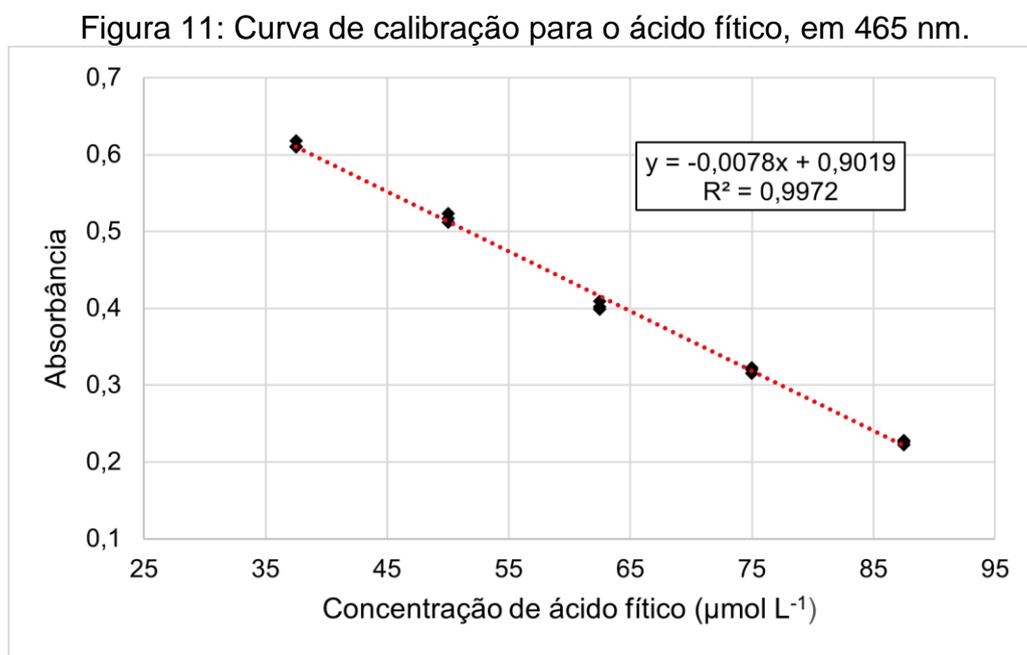
<b>Concentração (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Desvio padrão relativo</b>
<b>87,5</b>	0,22789 0,22585 0,22196	0,22523	$9,08 \times 10^{-6}$	0,00301	1,34%
<b>75</b>	0,32284 0,32013 0,31554	0,31950	$1,36 \times 10^{-5}$	0,00369	1,15%
<b>62,5</b>	0,40900 0,40219 0,39850	0,40323	$2,84 \times 10^{-5}$	0,00533	1,32%
<b>50</b>	0,51671 0,52332 0,51224	0,51742	$3,11 \times 10^{-5}$	0,00557	1,08%
<b>37,5</b>	0,61770 0,61036 0,60959	0,61255	$2,00 \times 10^{-5}$	0,00448	0,73%
<b>0</b>	0,99352 1,00389 0,99819	0,99853	$2,70 \times 10^{-5}$	0,00519	0,52%

Fonte: Autora

Ao analisar os dados obtidos, fica claro que conforme aumentam as concentrações de ácido fítico, os valores de absorvância obtidos diminuem. Percebe-se que a absorvância dos pontos varia entre 1 e 0,23. Pode-se observar que os valores de desvio padrão encontrados são baixos, o que fica ainda mais claro quando os valores de desvio padrão relativo (RSD) são analisados. Os valores de RSD variaram entre 0,52 e 1,34%, indicando que o método apresenta precisão

satisfatória.

Para avaliar a linearidade do método, foi traçada a curva de calibração. O gráfico obtido, bem como o ajuste linear, pode ser observado na Figura 11.



Fonte: Autora

Através da curva de calibração obtida, percebe-se que existe uma relação linear entre concentração de ácido fítico e a absorbância, o que fica evidente através do coeficiente de determinação obtido, de 0,9972. Deste modo, percebe-se que é possível aplicar a lei de Lambert-Beer sem que haja desvios significativos na faixa de trabalho definida.

A partir da equação da reta obtida, também é possível determinar o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), através das fórmulas

$$LD = \left| \frac{3S_b}{a} \right|$$

$$LQ = \left| \frac{10S_b}{a} \right|$$

onde  $S_b$  é o desvio padrão de dez medidas do branco e  $a$  é a inclinação da reta.

Assim, foi obtido um LD de 1,9 µmol L<sup>-1</sup> e um LQ de 6,5 µmol L<sup>-1</sup>. Os valores indicam que a faixa de trabalho escolhida está adequada, uma vez que as concentrações utilizadas na curva de calibração são superiores ao limite de

quantificação. Além disso, o método possui boa sensibilidade, já que apresenta um baixo limite de detecção, sendo capaz de produzir resposta frente a pequenas variações do analito.

## 5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após a preparação da amostra (lote B), foram realizadas três medidas de absorvância nas quais se obtiveram os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de absorvância da solução amostra Lote B, em 465 nm.

<b>Medida</b>	<b>Absorvância</b>
<b>1</b>	0,41114
<b>2</b>	0,40695
<b>3</b>	0,40479
<b>Média</b>	0,40763
<b>Desvio padrão</b>	0,00323
<b>Desvio padrão relativo</b>	0,79%

Fonte: Autora

Observa-se que o RSD obtido para a amostra assemelha-se ao encontrado para os pontos da curva, indicando uma boa consistência, mesmo quando usados diferentes lotes da matéria-prima ácido fítico.

Os valores obtidos foram aplicados na equação da reta  $y = -0,0078x + 0,9019$ , obtida pelo ajuste linear apresentado na Figura 11, onde a variável “y” representa o valor de absorvância e a variável “x” representa a concentração em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Obteve-se uma concentração de  $63,52 \pm 0,41 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Considerando o procedimento de preparo e diluições, essa concentração corresponde a  $101,6 \pm 0,7 \%$  de ácido fítico na amostra do lote B.

Através da HR-CS GF MAS determinou-se a concentração de fósforo, o qual foi usado para determinar o teor de ácido fítico, assumindo que todo o fósforo presente estava na forma de ácido fítico. Foi encontrado um teor de ácido fítico de  $99,6 \pm 1,4 \%$  (m/m) para o ácido do lote A, usado para a construção da curva de

calibração e desenvolvimento do método. Já para amostra do lote B, foi encontrado  $96,1 \pm 0,2$  % de ácido fítico.

Comparando-se o teor de ácido fítico encontrado na amostra do Lote B, pelos métodos colorimétrico e HR-CS GF MAS, observa-se uma diferença de 5,5 %. Aplicando o teste t-*Student* na porcentagem mássica obtida em comparação com o valor de referência encontrado pela técnica de HR-CS GF MAS, foi obtido um valor de t calculado de 14,44. Como o valor de t tabelado para um intervalo de 95% de confiança e 2 graus de liberdade é 4,30, fica evidente que a variação encontrada é estatisticamente significativa.

Ao analisarmos o resultado obtido, deve-se lembrar que o método utilizado como padrão, não realiza diferenciações entre o ácido fítico e outros interferentes fosforados presentes na amostra, desta forma, para avaliar-se o método de forma mais confiável, se faz necessário uma investigação mais aprofundada do real teor de ácido fítico, tanto na amostra quanto no padrão, a fim de identificar possíveis interferentes fosforados.

## **6 IMPACTO NA CADEIA TECNOLÓGICA**

O teste de doseamento, juntamente com a identificação, constitui um importante indicador de qualidade de uma matéria-prima, desempenhando papel fundamental no controle de qualidade em indústrias farmacêuticas. A relevância destes testes aumenta quando tratamos de insumos farmacêuticos ativos, já que neste caso, estes fatores estão diretamente relacionados com a eficácia e qualidade de uma preparação farmacêutica.

A implementação do método analítico proposto neste trabalho, impacta diretamente a indústria farmacêutica de radiofármacos, tornando-se uma alternativa para a determinação do teor de ácido fítico na matéria-prima utilizada na fabricação de fármacos que tem o composto como princípio ativo. O método analítico representa um grande ganho para a qualidade, garantindo que os insumos atendam os critérios especificados para a fabricação, o que reflete diretamente na eficácia e qualidade do produto final.

## 7 AVALIAÇÃO DO IMPACTO ECONÔMICO E AMBIENTAL DA PROPOSTA

O método proposto apresenta-se como uma alternativa de baixo custo para a determinação do teor de ácido fítico na matéria-prima utilizada na fabricação de radiofármacos. Quando comparado com outros métodos instrumentais, como métodos cromatográficos, que apresentam altos custos associados a consumíveis ou outros métodos espectrofotométricos, como a ressonância magnética nuclear, a espectrometria de absorção molecular no UV-Vis apresenta-se como uma opção mais econômica. Além disso, possibilita a realização da análise nas dependências da empresa, que possui o espectrofotômetro em condições de uso.

Contudo, é importante reconhecer que o método trará um aumento de custo, mesmo que baixo, para o processo de análise da matéria-prima, já que, atualmente, não existe nenhum método com o mesmo objetivo. Em especial, deve-se ressaltar os custos iniciais, referentes a implementação e validação do método na empresa, principalmente relacionado ao tempo despendido a realização da validação, bem como a elaboração de documentações e etapas de regularização junto a ANVISA, que se fazem necessárias já que se trata de insumo farmacêutico ativo. Além disso, haverá necessidade de treinamentos técnicos junto a equipe para que o método possa ser corretamente aplicado na rotina de análise.

Quanto aos impactos ambientais, o método proposto busca utilizar reagentes químicos em baixas quantidades e não faz uso de solventes orgânicos ou insumos com alto grau de toxicidade. Além disso, o método proposto não faz uso de equipamentos com alto gasto de energia, o que acarreta um menor impacto ambiental. Ao longo do trabalho, todos os resíduos foram corretamente descartados, evitando a contaminação do solo e de recursos hídricos. Desta forma, o método se alinha aos princípios da sustentabilidade e química verde, promovendo o uso responsável dos recursos e buscando o menor impacto ambiental possível.

## 8 IMPACTOS DA ATIVIDADE EXTENSIONISTA

Desde a concepção deste Projeto Tecnológico decidiu-se que haveria a presença de prática extensionista, promovendo a integração entre os conhecimentos adquiridos no âmbito da universidade e as problemáticas vivenciadas no cotidiano do trabalho no laboratório de controle de qualidade de uma indústria de radiofármacos. Desta forma, considerando as demandas trazidas pela empresa, optou-se pelo desenvolvimento de um método analítico para a determinação do teor na matéria-prima ácido fítico, tendo em vista a importância da análise de doseamento de um insumo farmacêutico ativo para a garantia de qualidade do produto final.

Na etapa de planejamento, as conversas com os responsáveis pelo setor foram fundamentais para a compreensão das necessidades e expectativas da empresa. Além disso, foram identificados os principais desafios relacionados ao desenvolvimento do método, como a origem da matéria-prima utilizada na fabricação dos radiofármacos e a ausência de padrões de referência. A etapa de planejamento pode ser contabilizada como 4 horas de extensão.

Além das reuniões, também se aproveitou o projeto já existente na empresa, denominado “Seminários Científicos”, que tem por objetivo promover encontros em que, mensalmente, um colaborador do setor de Controle de Qualidade da empresa apresenta um seminário baseado em artigos científicos, com tema relacionado ao setor. No dia 09 de julho de 2024, foi realizada uma apresentação de título “Ácido fítico - propriedades, aplicações e métodos de análise”, abordando as propriedades químicas, aplicações industriais e os métodos de análise do material. Além disso, também foi exposto para os demais colaboradores os objetivos do projeto em desenvolvimento. A preparação do seminário levou cerca de 10 horas e a apresentação teve duração de 2 horas, incluindo as discussões.

Após o seminário, foi aplicado um formulário de avaliação, no qual os ouvintes puderam avaliar a sua percepção da apresentação. O formulário contava com 5 perguntas:

1. Você acha que o seminário foi útil para compreender as propriedades químicas do ácido fítico?
2. Como você avalia a sua compreensão quanto aos impactos do ácido fítico na saúde humana após participar deste seminário?

3. Você compreendeu qual é o papel do ácido fítico quando aplicado em radiofármacos?

4. Você acredita que o seminário abordou adequadamente os desafios analíticos do ácido fítico?

5. Você se sente mais capacitado para discutir os conhecimentos sobre ácido fítico após esse seminário?

Além das perguntas, o formulário ainda contava com um espaço livre para comentários.

Observando as respostas dos 7 participantes, percebeu-se que o seminário teve impacto positivo, aumentando a compreensão e a capacitação dos ouvintes sobre o tema. Estima-se um total de 3 horas entre concepção e avaliação do formulário.

A partir do levantamento dos reagentes utilizados no laboratório foi possível utilizar apenas os materiais que o setor já possuía e não houve a necessidade de compra de nenhum reagente exclusivamente para o desenvolvimento ou implementação do método. Um exemplo disso foi a incorporação das soluções de ácido clorídrico  $3 \text{ mol L}^{-1}$  e tiocianato de amônio, que já eram empregadas na realização de outras análises do laboratório. O levantamento de materiais, bem como pesquisas relacionadas ao seu uso no método pode ser contabilizado como aproximadamente 6 horas de extensão.

Além disso, o método desenvolvido também utilizou como equipamento principal o espectrofotômetro de UV-Vis, que é um equipamento disponível no setor e que foi utilizado para a condução da grande maioria dos experimentos realizados ao longo do trabalho. A realização da parte experimental do trabalho dentro das dependências da empresa possibilitou a melhor compreensão da estrutura disponível, bem como a melhor percepção do impacto da implementação do método nas rotinas do setor. A etapa experimental pode ser contabilizada como 16 horas de extensão.

Por fim, o trabalho desenvolvido foi socializado com a empresa, por meio de uma reunião com a responsável pelo setor de controle de qualidade, onde foram apresentados os resultados encontrados, bem como possíveis pontos de melhoria do método, visando que a futura implantação ocorra da melhor forma possível e que seja bem-sucedida.

## 9 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido um método analítico colorimétrico para a determinação do teor de ácido fítico em matéria prima utilizada na indústria de radiofármacos. A revisão bibliográfica sobre as propriedades químicas do ácido fítico e das diferentes técnicas de quantificação presentes na literatura foram fundamentais para que o desenvolvimento de um método que explorasse adequadamente as características do analito, em especial, a sua capacidade de formar complexos estáveis com cátions metálicos.

A otimização dos parâmetros demonstrou a importância do controle do tempo para a realização das medidas de absorvância após o preparo das soluções, bem como o controle do pH do meio. Além disso, o método proposto mostrou-se seletivo frente ao íon fosfato. Esse resultado é bastante relevante, dada a presença de fosfatos em matrizes vegetais, de onde é extraída a matéria-prima em questão, podendo se tornar um possível contaminante.

Os resultados obtidos para uma amostra de lote diferente, quando comparados com os obtidos por técnica comparativa, demonstram que o método ainda precisa de otimização. A ausência de um padrão de referência no mercado e os resultados observados demonstram que mais estudos relacionados a possíveis contaminantes do lote utilizado como padrão se fazem necessários para que o método possa ser validado e implementado na empresa de forma satisfatória.

## 10 ETAPAS FUTURAS

Como etapa futura deste trabalho, pretende-se executar as medições da curva analítica também nos valores de pH 2 e 3, visando uma avaliação mais detalhada sobre os efeitos da variação desse parâmetro, em especial sobre a linearidade e a sensibilidade. Além disso, será realizada uma investigação mais aprofundada quanto a pureza do lote A e B, por meio de técnicas analíticas complementares, para a quantificação e identificação de possíveis contaminantes. Através das análises em questão, será possível a determinação do teor real de ácido fítico da amostra. Por fim, pretende-se investigar a seletividade do método frente a outros possíveis contaminantes encontrados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Farmacopeia Brasileira 6ª edição: volume I. 2024 Disponível em: <https://bibliotecadigital.anvisa.gov.br/jspui/handle/anvisa/12287> Acesso em: 25 jul. 2024

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 359, de 27 de março de 2020. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2961691/RDC\\_359\\_2020\\_COMP.pdf/c/8f6fcd0-b9a4-479d-bb03-78893b38f687](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2961691/RDC_359_2020_COMP.pdf/c/8f6fcd0-b9a4-479d-bb03-78893b38f687) Acesso em: 25 jul. 2024.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 658, de 30 de março de 2022. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6415119/RDC\\_658\\_2022\\_.pdf/aff5cdd7-4ad1-40e8-8751-87df566e6424](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6415119/RDC_658_2022_.pdf/aff5cdd7-4ad1-40e8-8751-87df566e6424). Acesso em: 24 de jul de 2024.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 738, de 28 de julho de 2022. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6469089/RDC\\_738\\_2022\\_.pdf/bb64a637-a7a0-4aea-bcda-38518f36d523](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6469089/RDC_738_2022_.pdf/bb64a637-a7a0-4aea-bcda-38518f36d523). Acesso em: 24 jul. 2024.

ALAVI, A. et al. Technetium-99m Stannous Phytate as an Imaging Agent for LymphNodes. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 19, n. 4, p. 422–426, 1978.

BEBOT-BRIGAUD, A. et al. <sup>31</sup>P NMR, potentiometric and spectrophotometric studies of phytic acid ionization and complexation properties toward Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 71–78, 1999.

CASELI, L. et al. Fabrication of Phytic Acid Sensor Based on Mixed Phytase–Lipid Langmuir–Blodgett Films. **Langmuir**, v. 22, n. 20, p. 8501–8508, 2006.

CHEN, W.; XU, D. Phytic acid and its interactions in food components, health benefits, and applications: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology (online)**, v. 141, 2023.

CHEN, Y. et al. Synchronous fluorescence analysis of phytate in food. **MicrochimicaActa**, v. 164, n. 1, p. 35–40, 2009.

FERNANDES, R. S. et al. <sup>99m</sup>Tc-phytate as a diagnostic probe for assessing inflammatory reaction in malignant tumors. **Nuclear Medicine Communications**, v.36, n. 10, p. 1042–1048, 2015.

GRASES, F. et al. Determination of myo-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 510, n. 1, p. 41–43, 2004.

HARLAND, B. F. et al. Anion-Exchange Method for Determination of Phytate in Foods: Collaborative Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 69, n.

4, p.667–670, 1986.

HAUG, W.; LANTZSCH, H. Sensitive method for the rapid determination of phytate incereals and cereal products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, n. 12, p. 1423–1426, 1983.

KAHRIMAN, F. et al. Comparison of colorimetric methods for determination of phytic acid content in raw and oil extracted flour samples of maize. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 86, p. 103380, 2020.

MAK, W. C. et al. Novel biosensors for quantitative phytic acid and phytase measurement. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 9, p. 1029–1035, 2004.

MAKOWER, R. U. Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus vulgaris*). **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 47, n. 3, p. 288-295, 1970.

MAROLT, G.; KOLAR, M. Analytical Methods for Determination of Phytic Acid and Other Inositol Phosphates: A Review. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 174, 2020.

MAYR, G. W. A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c.analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens. **Biochemical Journal**, v. 254, n. 2, p. 585–591, 1988.

MUÑOZ, J. A.; VALIENTE, M. Determination of Phytic Acid in Urine by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 22, p. 6374–6378, 2003.

OLIVEIRA, R. et al. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 151–165, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Farmacopeia Internacional. 11. ed. Genebra: OMS, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240066900>. Acesso em: 18 ago. 2024.

PHILLIPPY, B. O.; JOHNSTON, M. R. Determination of Phytic Acid in Foods by IonChromatography with Post-Column Derivatization. **Journal of Food Science**, v. 50,n. 2, p. 541–542, 1985.

QUIRRENBACH, H. R. et al. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe(III). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 24–32, 2009.

RPHLIMPHA. Ácido fítico. MJM PRODUTOS FARMACÊUTICOS E DE RADIOPROTEÇÃO LTDA, 2020. Disponível em: <https://www.gruporph.com.br/wp-content/uploads/2021/11/COD-003136-BULA-RPHLIMPHA.pdf>. Acesso em: 01 ago.2024.

SAPIENZA, M. T. et al. The role of sentinel node mapping in malignant melanoma: experience with <sup>99m</sup>Tc-phytate and a review of the literature. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 2, p. 181–191, 2004.

SCHLEMMER, U. et al. Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. S2, p. S330–S375, 2009.

SHI, H. et al. A novel fluorescent nanosensor based on small-sized conjugated polyelectrolyte dots for ultrasensitive detection of phytic acid. **Talanta**, v. 202, p. 214–220, 2019.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos De Quimica Analitica**. 8ª edição ed. Cengage, 2006. 136 p.

SKOOG, D.A., HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Principles of Instrumental Analysis**. 7ª edição, ed. Sunder College Publisher, New York, 2017. 335 p.

SUBRAMANIAN, G.  $m^{99}\text{Tc}$ -Stannous Phytate: A new in vivo colloid for imaging reticuloendothelial system. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 14, p. 459, 1973

THOMPSON, D. B.; ERDMAN, J. W. Phytic Acid Determination in Soybeans. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 2, p. 513–517, 1982.

VAINTRAUB, I. A.; LAPTEVA, N. A. Colorimetric determination of phytate in unpurified extracts of seeds and the products of their processing. **Analytical Biochemistry**, v. 175, n. 1, p. 227–230, 1988.

VASCA, E. et al. Complex formation between phytic acid and divalent metal ions: a solution equilibria and solid state investigation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, n. 1, p. 173–178, 2002.

VITAL, K. D. et al. Radiofármacos e suas aplicações. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 1, n. 2, p. 69–79, 2019.

WADE, H. E.; MORGAN, D. M. Fractionation of phosphates by paper ionophoresis and chromatography. **Biochemical Journal**, v. 60, n. 2, p. 264–270, 1955.

YOUNG, L. The determination of phytic acid. **Biochemical Journal**, v. 30, n. 2, p. 252–257, 1936.