

Determinação de ferro (III) em produtos farmacêuticos por titulação fotométrica

Airton Vicente Pereira^{1*}, Natalício Valus¹, Flávio Luís Beltrame¹ e Lúcia Helena Garrido²

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. ²Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: airtonvp@uepg.br

RESUMO. Este trabalho descreve a montagem de um sistema de titulação fotométrica simples e de baixo custo para a determinação de ferro (III) em produtos farmacêuticos. O sistema de titulação fotométrica foi construído utilizando-se a bomba peristáltica de um espectrofotômetro convencional. O procedimento é baseado na titulação de ferro (III) com EDTA e ácido salicílico como indicador. A absorção do complexo ferro (III)-ácido salicílico foi monitorada espectrofotometricamente em 525 nm. O limite de quantificação foi de 5 µg de ferro (III). O procedimento de titulação fotométrica foi aplicado para a determinação de ferro (III) em amostras contendo sulfato ferroso e hidróxido férrico polimaltosado. O procedimento mostrou sensibilidade, reprodutibilidade e precisão para a utilização em análise rotineira de ferro (III) em produtos farmacêuticos.

Palavras-chave: titulação fotométrica, ferro (III), produtos farmacêuticos.

ABSTRACT. Determination of iron (III) in pharmaceutical products by photometric titration. This paper describes a simple, precise and low-cost photometric titration method for iron (III) determination in pharmaceutical preparations. The photometric titration system was constructed using the peristaltic pump of a conventional spectrophotometer. The method is based on titration of iron (III) with EDTA using salicylic acid as indicator. The absorption of the iron (III)-salicylic acid complex was monitored spectrophotometrically at 525 nm. The limit of quantification was 5 µg of iron (III). The photometric titration procedure was applied for the determination of iron (III) in samples of ferrous sulfate and ferric hydroxide polymaltose complex. The procedure showed sensibility, reproducibility and accuracy for use as a method for the routine analysis of iron (III) in pharmaceutical formulations.

Keywords: photometric titration, iron (III), pharmaceutical preparations.

Introdução

A anemia ferropriva é uma doença comum no Brasil, particularmente decorrente de deficiência nutricional, já que mais de 50% da população não possui nutrição adequada. O déficit de ferro pode levar às alterações de pele e mucosas, baixo peso, distúrbios gastrintestinais, redução do trabalho físico em consequência da limitação do transporte de oxigênio e diminuição da função do sistema imune (LIMA, 2004).

O ferro é o elemento central da hemoglobina, mioglobina e citocromos (BARROS, 1992). Os homens necessitam cerca de 10 mg diariamente, enquanto as mulheres requerem 18 mg, ou ainda mais durante a gravidez (UCKO, 1992). O tratamento medicamentoso do estado carencial consiste na utilização de sais ferrosos como sulfato, citrato, fumarato ou férricos como o hidróxido férrico polimaltosado e quelato glicinato (LIMA, 2004).

Os complexos de Fe³⁺, como o hidróxido férrico polimaltosado, acarretam menor incidência de náuseas, diarreia e má digestão, além de evitar manchas enegrecidas nos dentes causadas pelo sulfato ferroso. Na forma de complexo de hidróxido polimaltosado, em razão da presença da polimaltose, o Fe³⁺ é liberado de forma mais gradual, evitando a liberação maciça e potencialmente tóxica sobre a mucosa gastrintestinal (LAMOUNIER et al., 2004).

A Farmacopéia Brasileira em sua quarta edição, (1988) descreve apenas os procedimentos de análise qualitativa e ensaio-limite de Fe³⁺. Entre os procedimentos analíticos de determinação de Fe³⁺, encontra-se a titulação complexométrica com EDTA utilizando-se os indicadores pirocatequina-3,5-dissulfônico ou laranja de xilenol, com detecção visual do ponto final (BACCAN, et al., 2001; GUENTHER, 1972).

Os métodos espectrofotométricos são amplamente utilizados em análises de grande

variedade de amostras (urina, sangue, alimentos, fármacos, sucos e água); entretanto, apresenta como desvantagem a baixa frequência de amostragem (PAIM et al., 1998). A espectrofotometria possui elevada sensibilidade e precisão e pode ser empregada na detecção do ponto final de uma titulação (SKOOG, 2002).

A determinação fotométrica do ponto final de uma análise volumétrica está baseada na diferença das absorvidades molares das várias espécies presentes no meio reacional quando a luz monocromática atravessa uma solução. A formação ou o desaparecimento de uma espécie que absorve luz no comprimento de onda selecionado provoca mudança na absorbância dependente da concentração (MENDHAM et al., 2002). Assim, numa titulação onde o titulante, o reagente ou o produto da reação absorve a radiação luminosa, a curva de absorbância contra o volume de titulante adicionado consistirá, se a reação for completa e a variação de volume for pequena, de duas linhas retas que se interceptam no ponto final da titulação. A forma da curva de uma titulação espectrofotométrica depende das propriedades ópticas do reagente, do titulante e dos produtos da reação no comprimento de onda utilizado. A Figura 1 apresenta alguns gráficos típicos de titulações fotométricas.

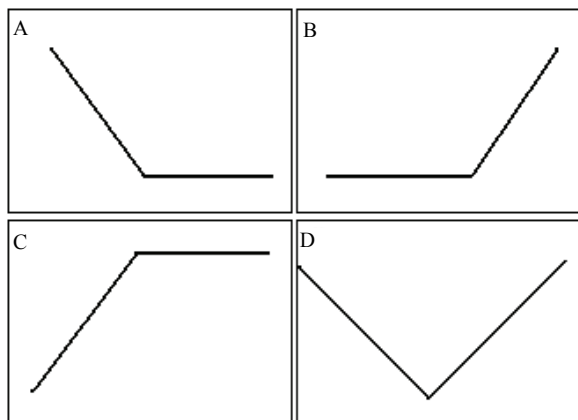


Figura 1. Curvas de titulações fotométricas: A) a substância titulada converte-se em um produto que não absorve radiação; B) apenas o titulante absorve radiação; C) a substância titulada e o titulante são incolores e somente o produto absorve radiação; D) um reagente colorido é transformado por um titulante colorido em um produto incolor (MENDHAM et al., 2002; EWING, 1972).

A titulação complexométrica com EDTA é amplamente utilizada em química analítica para a quantificação de cátions como Bi^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} (BACCAN et al., 2001; OHLWEILER, 1976; PAIM et al., 1998; SKOOG, 2002). As titulações de Bi^{3+} e Cu^{2+} podem ser realizadas com detecção fotométrica do ponto final (SKOOG, 2002; EWING, 1972).

A constante de formação do complexo metal-EDTA depende significativamente do pH do meio. O Fe^{3+} forma um complexo heptacoordenado com o EDTA ($\text{Fe}(\text{EDTA})(\text{H}_2\text{O})$) com elevada constante de formação ($\log k = 25,1$) (HARRIS, 2005). O ácido salicílico (AS) e os íons Fe^{3+} formam um complexo colorido com máximo de absorção em 525 nm (KELLY, 1970; TRINDER, 1954). Na titulação fotométrica de uma solução de Fe^{3+} em presença de ácido salicílico, a cor do complexo $[\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{AS})_3]$ desaparece gradualmente com a aproximação do ponto final (MENDHAM et al., 2002).

Neste trabalho, descreve-se a montagem de um sistema de titulação fotométrico utilizando-se um espectrofotômetro convencional e a aplicação na determinação de Fe^{3+} em produtos farmacêuticos. A concentração de Fe^{3+} nas amostras foi determinada pela titulação com EDTA utilizando ácido salicílico como indicador. A diminuição da absorbância do complexo $[\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{AS})_3]$ foi monitorada em 525 nm.

Os íons Fe^{3+} (forma de hidróxido férrico polimaltosado) foram determinados nas formas farmacêuticas comprimido e suspensão e em amostras de Fe^{2+} (drágeas de sulfato ferroso), com elevada precisão e exatidão.

Material e métodos

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada, evitando-se a presença de íons metálicos interferentes.

A solução de EDTA foi preparada dissolvendo-se 7,445 g com água deionizada em balão de 200 mL, obtendo-se solução $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. A partir desta solução, prepararam-se diluições nas concentrações de 1×10^{-2} e $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A padronização das soluções de EDTA foi realizada utilizando-se carbonato de cálcio como padrão primário.

A solução tampão acetato de sódio/ácido clorídrico pH 2,2 foi preparada com adição de ácido clorídrico 1 mol L^{-1} a 350 mL de uma solução de acetato de sódio 1 mol L^{-1} até o ajuste do pH.

A solução de ácido salicílico 3% (m v^{-1}) foi obtida dissolvendo-se 300 mg do ácido em 10 mL de acetona.

As soluções-padrão de Fe^{3+} nas concentrações de 1×10^{-1} , 1×10^{-2} e $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas pesando-se massas adequadas de sulfato férrico amoniacal e dissolvendo-se em tampão acetato de sódio/ácido clorídrico pH 2,2.

Preparo das amostras

Foram analisadas cinco amostras de produtos farmacêuticos. O Fe^{3+} foi determinado em amostras

de sulfato ferroso e na forma hidróxido polimaltosado (suspensão de 50 mg mL⁻¹ e comprimidos de 100 mg).

Sulfato ferroso (drágeas de 110,30 mg de Fe²⁺): após a maceração das drágeas utilizando-se grau e pistilo, transferiu-se uma quantidade relativa a quatro unidades para um béquer de 250 mL. Adicionou-se 60 mL da solução tampão pH 2,2 e deixou-se em agitação por 30 min. Filtrou-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com a solução tampão pH 2,2. Transferiu-se uma alíquota de 5 mL desta solução para o recipiente de titulação, adicionou-se 0,2 mL da solução de ácido salicílico a 3% (m v⁻¹) em acetona e titulou-se com a solução de EDTA 5 x 10⁻³ mol L⁻¹.

Hidróxido férrico polimaltosado: transferiu-se uma massa da amostra (suspensão ou comprimido) relativa a 50 mg do complexo férrico para um béquer e adicionou-se 0,8 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após a completa dissolução da amostra, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água deionizada. A filtração, utilizando-se papel filtro, foi realizada apenas com a amostra na forma de comprimidos. A seguir, uma alíquota de 1 mL foi transferida para o recipiente de titulação, adicionou-se 0,3 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹, 4 mL de solução tampão acetato pH 2,2 e 0,2 mL da solução de ácido salicílico 3% (m v⁻¹) em acetona e titulou-se com a solução de EDTA 1 x 10⁻² mol L⁻¹.

Titulações fotométricas

Um espectrofotômetro Biosystems, modelo BTS 330, foi utilizado para monitorar as variações das absorvâncias. Este equipamento dispõe de uma bomba peristáltica para aspiração das soluções que permite transferir volumes de 100 µL a 5 mL. O percurso tradicional das soluções no espectrofotômetro foi modificado utilizando-se conexões com tubos de polietileno (0,8 mm d.i). A solução que iria para o descarte, retorna para o recipiente de titulação após passagem pela célula fotométrica, formando um sistema de titulação fotométrico (Figura 2). Uma microbureta de 2,00 mL foi utilizada nas titulações fotométricas. No procedimento proposto, a cada adição da solução de EDTA, 1 mL da solução titulada foi aspirado para preencher o percurso analítico e a célula de fluxo (18 µL) e o excesso reconduzido ao recipiente de titulação. As curvas de titulação foram construídas plotando-se os valores das

absorvâncias corrigidas do complexo [Fe^(III) (AS)₃] versus o volume da solução de EDTA.

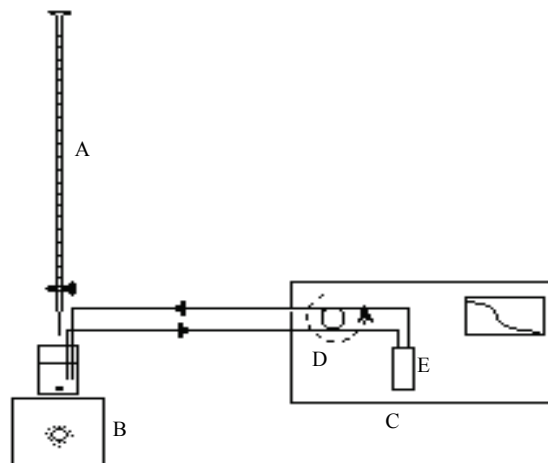


Figura 2. Diagrama do sistema de titulação fotométrica: A) microbureta; B) agitador magnético; C) espectrofotômetro; D) dispositivo de aspiração (bomba); E) célula fotométrica.

Resultados e discussão

A titulação complexométrica com detecção fotométrica do ponto final proposta neste trabalho baseia-se na reação do ácido salicílico com os íons Fe³⁺, resultando na formação de complexo colorido. A absorvância deste complexo foi monitorada na titulação fotométrica dos íons Fe³⁺ com EDTA. Em pH próximo a 2,2 o complexo heptacoordenado (Fe (EDTA)(H₂O)) é muito mais estável do que o complexo [Fe^(III) (AS)₃] (MENDHAM et al., 2002). Na titulação de uma solução de íons férrico com EDTA na presença de ácido salicílico, a cor do complexo [Fe^(III) (AS)₃] desaparece gradualmente quando se aproxima do ponto final que é muito nítido quando determinado fotometricamente em 525 nm.

Ensaio preliminar

Alguns testes preliminares foram realizados para estabelecer a concentração e o volume ideal do indicador. O estudo da concentração do indicador foi realizado adicionando-se um volume de 200 µL das soluções de ácido salicílico na faixa de 0,375 a 6% (m v⁻¹) em acetona a soluções de Fe³⁺ com concentrações de 5 x 10⁻³, 1 x 10⁻² e 1 x 10⁻¹ mol L⁻¹ preparadas em tampão pH 2,2 e as absorvâncias foram determinadas em 525 nm. Os resultados estão apresentados na Figura 3. Os valores de absorvância aumentaram gradualmente até a máxima concentração avaliada. Como houve apenas um ligeiro aumento acima de 3% (m v⁻¹),

esta concentração de ácido salicílico foi selecionada para o restante do trabalho.

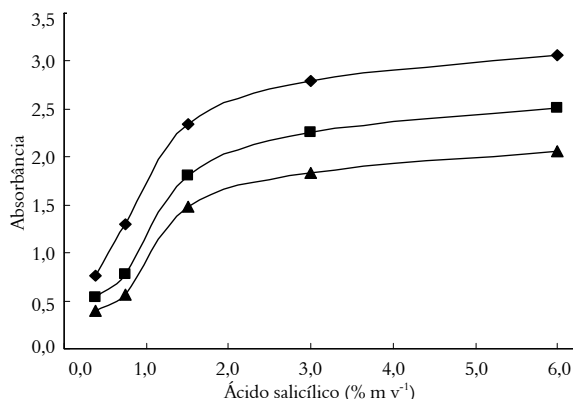


Figura 3. Estudo da concentração do ácido salicílico na faixa de 0,375 a 6% (m v⁻¹) em acetona adicionado nas soluções de Fe³⁺ nas concentrações de (▲) 5 x 10⁻³, (■) 1 x 10⁻² e (◆) 1 x 10⁻¹ mol L⁻¹.

A determinação do volume ideal foi realizada adicionando-se de 50 a 300 µL da solução de salicílico a 3% (m v⁻¹) em acetona a soluções de Fe³⁺ em tampão pH 2,2 com concentrações de 5 x 10⁻³, 1 x 10⁻² e 1 x 10⁻¹ mol L⁻¹. As absorbâncias foram determinadas em 525 nm. Os valores de absorbância aumentaram gradualmente até o máximo volume adicionado. Como pode ser observado na Figura 4, há apenas uma pequena diferença entre 200 e 300 µL. Desta forma, o volume de 200 µL da solução indicadora foi selecionado para os demais experimentos.

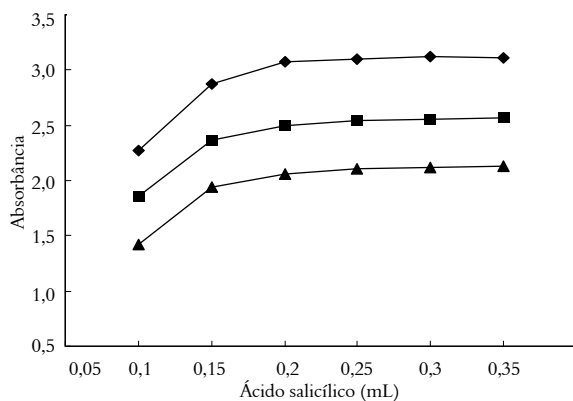


Figura 4. Estudo do volume da solução de adição de ácido salicílico 3% (m v⁻¹) em acetona em soluções de Fe³⁺ (▲) 5 x 10⁻³, (■) 1 x 10⁻² e (◆) 1 x 10⁻¹ mol L⁻¹.

Após a montagem do sistema de titulação fotométrica, procedeu-se a padronização das condições analíticas. O volume ideal da solução amostra para preencher todo o percurso analítico e retornar ao frasco de titulação foi de 1 mL. A Figura 5(A) apresenta a curva de uma titulação

fotométrica de Fe³⁺ com EDTA nas condições experimentais selecionadas. A curva de titulação é linear apresentando uma diminuição gradual da absorbância com a adição de EDTA até o ponto final, a partir do qual, torna-se constante. Assim, a inflexão das retas é o ponto de equivalência da titulação. Nas titulações subsequentes, apenas poucos pontos são necessários antes e depois do ponto de equivalência para localizar o ponto de intersecção que corresponde ao ponto final da titulação.

A Figura 5(B) apresenta um gráfico de segunda derivada da titulação de Fe³⁺ 1 x 10⁻¹ mol L⁻¹ com EDTA 5 x 10⁻³ mol L⁻¹, onde o ponto exato da viragem é a intersecção da curva no eixo das abscissas.

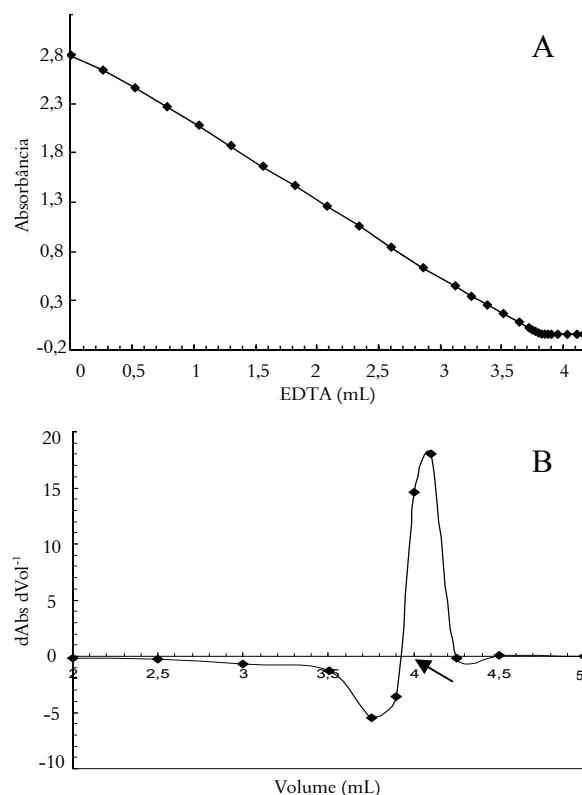


Figura 5. (A) Curva típica de uma titulação fotométrica de solução Fe³⁺ 1 x 10⁻¹ mol L⁻¹ com EDTA 5 x 10⁻³ mol L⁻¹ e (B) gráfico de segunda derivada da titulação de Fe³⁺ 1 x 10⁻¹ mol L⁻¹ com EDTA 5 x 10⁻³ mol L⁻¹. O ponto de equivalência (3,92 mL) está indicado pela seta.

O estudo da sensibilidade e linearidade das curvas de titulação fotométrica foi realizado pela adição e titulação sucessiva de soluções de Fe³⁺. A Figura 6 indica que a linearidade é mantida na faixa de concentração estudada, com um coeficiente de correlação médio de 0,9997. O coeficiente de variação de determinações (n = 5) de 5 µg de Fe³⁺ foi de 0,8%.

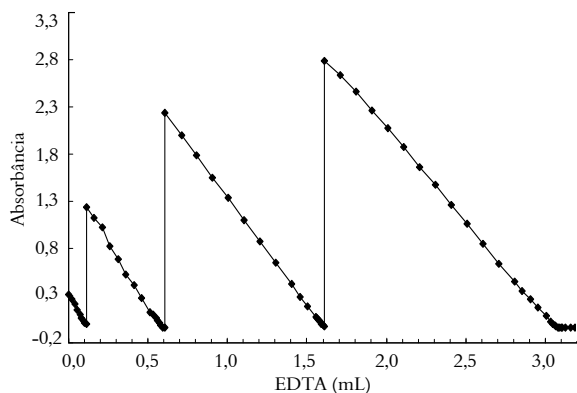


Figura 6. Titulações sucessivas de volumes de 100, 500, 1.000 e 1.500 µL de uma solução de Fe³⁺ 1 x 10⁻² mol L⁻¹ com EDTA 1 x 10⁻² mol L⁻¹.

Estudo de interferentes e teste de adição e recuperação

O efeito de interferentes em potencial na determinação de Fe³⁺ em formulações farmacêuticas foi avaliado utilizando-se excipientes normalmente presentes nos produtos analisados. Nesses experimentos, foram utilizadas soluções de padrão de Fe³⁺ 5,0 x 10⁻² mol L⁻¹ adicionadas a soluções de excipientes normalmente contidos nas amostras analisadas (carboximetilcelulose, amido, hidroxipropilmetilcelulose, sacarina, lactose, sacarose e estearato de magnésio) em concentrações de 5,0 x 10⁻² mol L⁻¹ e os resultados foram comparados com aqueles obtidos de uma solução de Fe³⁺ na mesma concentração. Nenhum dos excipientes testados causou interferência na determinação de Fe³⁺.

Amostras contendo ácido ascórbico (agente redutor) e outros metais (Pb²⁺, Bi²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ e Cu²⁺) (HUSSAIN et al., 2006) que possuem elevada constante de formação (log K) em meio ácido com o EDTA, não podem ser analisadas por este método (KELLY, 1970). Entretanto, não são encontrados em amostras farmacêuticas destinadas à suplementação de ferro.

Nos testes de adição e recuperação, três concentrações diferentes de Fe³⁺ foram adicionadas a três amostras e os resultados comparados com aqueles obtidos com as amostras não-adicionadas do analito. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Os valores percentuais de recuperação variaram entre 98,92 e 102,4% sugerindo assim ausência de interferência da matriz no procedimento fotométrico.

Tabela 1. Resultados do teste de recuperação de Fe³⁺ adicionado às amostras comerciais.

Amostra	Fe ³⁺ (µg)		% Recuperação
	Adicionado	Recuperado	
A	100,0	99,73	99,73
	250,0	251,0	100,4
	500,0	497,8	99,56
B	100,0	100,1	100,1
	250,0	247,3	98,92
	500,0	501,2	102,4
C	100,0	99,36	99,36
	250,0	251,7	100,7
	500,0	498,5	99,70

Análise das amostras

O sistema de titulação fotométrico desenvolvido foi aplicado na determinação de íons férrico em cinco produtos farmacêuticos. Cada amostra foi analisada em quintuplicata. Foram analisados medicamentos com sulfato de ferroso e hidróxido férrico polimaltosado.

Em amostras de sulfato ferroso, em que o Fe³⁺ está presente em pequenas quantidades, houve a necessidade da remoção da camada superficial de proteção das drágeas para evitar erros sistemáticos na leitura fotométrica.

As amostras de hidróxido férrico polimaltosado foram previamente tratadas com ácido sulfúrico concentrado para a liberação dos íons férricos do complexo. A adição de NaOH foi utilizada para neutralizar o excesso do ácido adicionado; em seguida, o pH do meio foi ajustado com a solução tampão acetato de sódio/HCl pH 2,2. O ajuste do pH do meio é essencial, pois em meio básico os íons férricos precipitam na forma de uma substância gelatinosa (óxido hidratado, Fe₂O₃ x H₂O) (HUSSAIN et al., 2006).

A titulação fotométrica foi aplicada na determinação de Fe³⁺ em produtos farmacêuticos e os resultados comparados com aqueles obtidos pela espectrofotometria com KSCN (MENDHAM et al., 2002). Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Aplicando-se o test t pareado, encontrou-se que os resultados são concordantes a um nível de 95% de confiança.

Tabela 2. Resultados das determinações de Fe³⁺ nos produtos farmacêuticos contendo sulfato ferroso e hidróxido férrico polimaltosado.

Amostras	Rotulado (mg)	KSCN (mg ± s)	Fotométrico (mg ± s)	CV (%)	Er (%)
A*	---	2,95 ± 0,321	2,92 ± 0,011	0,38	- 1,0
B*	---	0,968 ± 0,282	0,954 ± 0,005	0,57	- 1,4
C*	---	1,20 ± 0,221	1,22 ± 0,004	0,35	+ 1,7
D**	50	49,2 ± 1,07	48,8 ± 0,219	0,45	- 0,8
E***	100	98,4 ± 1,45	98,9 ± 0,534	0,55	+ 0,5

*FeSO₄, drágeas; hidróxido férrico polimaltosado (suspensão** e comprimido***). Er (Erro relativo) fotométrico x visível.

Os valores de coeficiente de variação demonstram a elevada precisão do método fotométrico. Os valores de erro relativo, comparação do valor rotulado (amostras contendo Fe³⁺) com os da titulação fotométrica, evidenciam a exatidão do método proposto e a eficiência do pré-tratamento.

Conclusão

O sistema de titulação fotométrico, utilizando-se um espectrofotômetro convencional, é de fácil montagem e operação. O sistema permitiu associar a simplicidade da titulação complexométrica com a sensibilidade da espectrofotometria na determinação de

Fe³⁺ em produtos farmacêuticos. A exatidão, a precisão e a economia de reagentes evidenciam as vantagens do sistema de titulação fotométrica proposto.

Referências

- BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; BARONE, J. S.; GODINHO, O. E. S. **Química analítica quantitativa elementar**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- BARROS, H. L. C. **Química inorgânica: uma introdução**. Belo Horizonte: Segrac, 1992.
- EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgard Blücher, 1972.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- GUENTHER, W. B. **Química quantitativa: medições e equilíbrio**. São Paulo: Edgard Blücher, 1972.
- HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2005.
- HUSSAIN, F.; ARAYNE, S.; SULTANA, N. Spectrophotometric method for quantitative determination of iron (III) from iron polymaltose complex in pharmaceutical formulations. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 299-303, 2006.
- KELLY, C. A. Determination of the decomposition of aspirin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 8, p. 1053-1079, 1970.
- LAMOUNIER, J. A.; SAMPAIO, A.; BRACARENSE, B.; PEREIRA, M. P.; CHAMONE, B. C.; CAMPOS, C. T.; ROCHA, F.; HORTMANN, H. C.; RODRIGUES, L. M. C.; MUNIZ, L. D.; PIMENTA, L. C. A.; SANTOS, L. M. Eficácia terapêutica do hidróxido de ferro III polimaltosado na anemia ferropriva em crianças menores de seis anos em Carrancas, Minas Gerais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, n. 1, p. 26-31, 2004.
- LIMA, D. R. **Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia**. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2004.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC-Longman, 2002.
- OHLWEILER, O. A. **Química analítica quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.
- PAIM, A. P. S.; KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F. Determinação espectrofotométrica de ácido ascórbico em fármacos empregando amostragem binária em fluxo. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 47-50, 1998.
- SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- TRINDER, P. Rapid determination of salicylate in biological fluids. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 1, p. 301-303, 1954.
- UCKO, D. A. **Química: uma introdução a química geral, orgânica e biológica**. São Paulo: Manole, 1992.

Received on August 22, 2009.

Accepted on March 19, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.