

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

CAMILA SCHEID

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ALTERNATIVA PARA
DECOMPOSIÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS VISANDO A
POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS**

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

CAMILA SCHEID

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ALTERNATIVA PARA
DECOMPOSIÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS VISANDO A
POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção de grau de Bacharel em Química Industrial.

Prof (a). Dr (a): Juliana Severo Fagundes Pereira
Orientadora

Porto Alegre

2018

Camila Scheid

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ALTERNATIVA PARA
DECOMPOSIÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS VISANDO A
POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS**

Trabalho de conclusão apresentado junto à
atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do
curso de Química Industrial, como requisito
parcial para a obtenção de grau de Bacharel em
Química Industrial.

Aprovado em 05/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Juliana Severo Fagundes Pereira (Orientadora)

UFRGS

Dr.^a Carla Sirtori

UFRGS

Dr.^a Tânia Mara Pizzolato

UFRGS

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Juliana Severo Fagundes Pereira pela orientação, boa vontade e ensinamentos.

À Juliana Souza do Núcleo de Química Analítica Aplicada pela disponibilidade e contribuições dadas ao trabalho.

À Central Analítica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre por disponibilizar alguns dos equipamentos e reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Humberto Pozo de Mattos por estar comigo desde o início desta jornada.

Aos meus pais Ivoni Maria Scheid e Luiz Delmar Scheid pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados os métodos recomendados pela Farmacopeia Brasileira para a determinação de metais pesados nos fármacos anti-hipertensivos de uso contínuo captopril, maleato de enalapril, cloridrato de propranolol, losartana potássica e hidroclorotiazida. Um método de preparo de amostra baseado na decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) em sistema fechado utilizando ácido diluído e posterior determinação por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), geração de hidretos (HG AAS) e geração de vapor frio (CVG AAS) foi proposto como alternativa. Os métodos farmacopeicos mostraram-se inadequados tanto para o preparo das amostras quanto para a posterior determinação de metais pesados. Os ensaios de recuperação realizados evidenciaram as perdas de elementos durante a decomposição por via seca em forno mufla, especialmente, As e Hg. A determinação de metais através da precipitação de sulfetos utilizando soluções analíticas dos elementos As, Cd, Hg, Cu e Pb apresentou resultado satisfatório somente para Pb. O preparo de amostras proposto por MW-AD mostrou-se eficiente para 300 mg dos fármacos captopril, maleato de enalapril, cloridrato de propranolol e losartana potássica, através da decomposição com HNO_3 $3,75 \text{ mol L}^{-1}$ e 2 mL de H_2O_2 , porém não foi eficiente para o fármaco hidroclorotiazida, cuja digestão foi realizada com HNO_3 14 mol L^{-1} . Os analitos determinados foram Cd, Ni, Pb e Cu por F AAS, As por HG AAS e Hg por CV AAS. Os ensaios de recuperação pelo método de MW-AD apresentaram resultados satisfatórios para todos os analitos, sendo que os mesmos variaram de 103 a 115% para cloridrato de propranolol e de 103 a 111% para captopril. Os limites de quantificação (LQs) encontrados para Cd, Ni, Pb, Cu, As e Hg através da decomposição por MW-AD e determinação pelas técnicas de absorção atômica foram 0,600; 2,364; 12,664; 1,005; 0,0421 e 0,0354 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Somente o LQ para determinação de Pb não atende as exigências preconizadas na Farmacopeia Brasileira tendo em vista que o valor ($12,664 \mu\text{g g}^{-1}$) é superior ao limite estabelecido ($10 \mu\text{g g}^{-1}$). A metodologia desenvolvida, no que se refere a etapa de preparo de amostras, apresenta menor tempo de execução (aproximadamente 1,33 horas para decomposição de 8 amostras) quando comparada ao ensaio indicado na Farmacopeia Brasileira (aproximadamente 8,83 horas para decomposição de 8 amostras). Com a metodologia desenvolvida, esta exige maior treinamento do analista e maiores investimentos financeiros. O ensaio qualitativo indicado pela Farmacopeia Brasileira apresenta inúmeros problemas indicados anteriormente e, em função disto, são inapropriados para o controle de qualidade de matérias-primas utilizadas em medicamentos. Sendo assim, a metodologia proposta permite que o controle da concentração

de metais seja realizado de forma mais adequada, trazendo maior segurança para a população que utiliza estes medicamentos.

Palavras chave: Anti-hipertensivos, metais pesados, preparo de amostra, MW-AD, ácido diluído, AAS.

ABSTRACT

In this work we evaluated the heavy metals determination methods recommended by Brazilian Pharmacopoeia for antihypertensive drugs of continuous use captopril, enalapril maleate, propranolol hydrochloride, losartan potassium and hydrochlorothiazide. A sample preparation method based on wet decomposition assisted by microwave radiation (MW-AD) in a closed system using dilute acid and determination by flame atomic absorption spectrometry (F AAS), hydride generation (HG AAS) and cold vapor generation (CVG AAS) was proposed as an alternative. The pharmacopoeial methods showed poor results for both sample preparation and heavy metals determination method. The recovery tests evidenced that many elements were lost during the decomposition in muffle furnace, especially As and Hg. The determination of metals through the sulfide precipitation using analytical solutions of As, Cd, Hg, Cu and Pb were suitable only for Pb. The sample preparation proposed by MW-AD was efficient for 300 mg of captopril, enalapril maleate, propranolol hydrochloride and losartan potassium, by decomposition with HNO_3 3.75 mol L^{-1} and 2 mL H_2O_2 , but was not efficient for hydrochlorothiazide, whose digestion was performed with $14 \text{ mol L}^{-1} \text{HNO}_3$. Cd, Ni, Pb and Cu were determined by F AAS, As by HG AAS and Hg by CV AAS. The MW-AD method presented satisfactory results for the evaluated elements, between 103 to 115% for propranolol hydrochloride and between 103 to 111% for captopril. The quantification limits (LQs) for Cd, Ni, Pb, Cu, As and Hg through MW-AD decomposition and determination by atomic absorption techniques were 0.600; 2.364; 12.664; 1.005; 0.0421 and $0.0354 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. Only the Pb LQs does not agree the requirements recommended in the pharmacopoeia for drugs in which the limit is $10 \mu\text{g g}^{-1}$, because it presents a value ($12.664 \mu\text{g g}^{-1}$) above what is necessary. The sample preparation developed methodology has a shorter execution time (approximately 1.33 hours for 8 samples) when compared to the indicated pharmacopoeial test (approximately 8.83 hours for 8 samples). With regard to sample preparation and determination of metals, the methodology developed requires greater analyst training and greater financial investments. The qualitative pharmacopoeia method has numerous problems and it's unsuitable for the raw materials used in medicines quality control. Therefore, the proposed methodology allows the most appropriate metal concentration control, bringing greater safety to the population that uses these drugs.

Keywords: Antihypertensives, heavy metals, sample preparation, MW-AD, diluted acid, AAS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos fármacos estudados.....	21
Figura 2 – Fluxograma do Método III para “ <i>Ensaio Limite para Metais Pesados</i> ” conforme Farmacopeia Brasileira.	23
Figura 3 – Esquema de um espectrômetro de absorção atômica com atomização em chama.	32
Figura 4 – Esquema de um espectrômetro de absorção atômica com geração de hidretos. .	33
Figura 5 – a) Forno de Micro-ondas MultiwavePRO. b) Rotor com capacidade máxima para 8 frascos de quartzo	35
Figura 6 – Fluxograma dos parâmetros avaliados para desenvolvimento do método de decomposição por MW-AD.	38
Figura 7 – Cadinhos antes da decomposição em mufla e após serem calcinados em chapa de aquecimento (a) e após decomposição em mufla (b).....	41
Figura 8 - Precipitados obtidos no <i>Ensaio Limite para Metais Pesados</i> conforme Método III da Farmacopeia Brasileira para as amostras de fármacos anti-hipertensivos.	42
Figura 9 - Precipitados obtidos no Ensaio Limite para Metais Pesados conforme Método III da Farmacopeia Brasileira para soluções de diferentes analitos.....	43
Figura 10 - Recuperações obtidas após a decomposição de PROP e CAP em mufla conforme Método III da Farmacopeia Brasileira (n=2). As quantidades adicionadas foram 0,700 mg L ⁻¹ de Cd, Ni, Pb e Cu e 20 µg L ⁻¹ de As e Hg.....	45
Figura 11 – Amostras com diferentes massas de LOS decompostas conforme programa 1 do micro-ondas e HNO ₃ 14 mol L ⁻¹ , sendo 100 mg (A), 250 mg (B), 300 mg (C), 400 mg (D) e 500 mg (E).....	47
Figura 12 – Amostras de 300 mg de LOS decompostas com diferentes concentrações de HNO ₃ e 2 mL de H ₂ O ₂ , utilizando o programa 1 do micro-ondas. HNO ₃ 10,5 mol L ⁻¹ (A), HNO ₃ 7,5 mol L ⁻¹ (B), HNO ₃ 5,25 mol L ⁻¹ (C), HNO ₃ 3,75 mol L ⁻¹ (D) e HNO ₃ 2,25 mol L ⁻¹ (E).....	48
Figura 13 – Amostras de 300 mg de LOS digeridas utilizando o programa 1 do micro-ondas com HNO ₃ 3,75 mol L ⁻¹ (sem adição de H ₂ O ₂) (A), HNO ₃ 3,75 mol L ⁻¹ com 1 mL de H ₂ O ₂ (B) e HNO ₃ 3,75 mol L ⁻¹ com 2 mL de H ₂ O ₂ (C).	49
Figura 14 – Amostras de 300 mg de LOS decompostas com HNO ₃ 3,75 mol L ⁻¹ e 2 mL de H ₂ O ₂ nos programas 1 (A), 2 (B) e 3 (C) do micro-ondas.	50

Figura 15 – Perfil da pressão, temperatura e potência obtido durante a digestão de 300 mg de Losartana com HNO_3 3,75 mol.L ⁻¹ e 2 mL de H_2O_2 utilizando o Programa 2 de digestão.....	51
Figura 16 – Amostra de HID antes da decomposição em micro-ondas (a), após a decomposição com HNO_3 3,75 mol L ⁻¹ + 2 mL de H_2O_2 (b) e após a decomposição com HNO_3 14 mol L ⁻¹ (c).	52
Figura 17 – Amostras de CAP (A), ENA (B), PROP (C) e LOS (D) decompostas utilizando o programa 2 do micro-ondas e solução de decomposição de HNO_3 3,75 mol L ⁻¹ e 2 mL de H_2O_2 e HID (E) decomposta com o mesmo programa utilizando HNO_3 14 mol L ⁻¹	52
Figura 18 - Recuperações obtidas após a decomposição de PROP e CAP utilizando o método de preparo de amostras por MW-AD otimizado (n=2). As quantidades adicionadas foram 0,7 mg L ⁻¹ de Cd, Ni, Pb e Cu e 3 µg mL ⁻¹ de As e Hg	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das impurezas elementares e suas características.....	17
Tabela 2 – Fármacos mais utilizados para o tratamento da hipertensão no Brasil entre os anos de 2013 e 2014.	19
Tabela 3 – Informações sobre os fármacos estudados.	19
Tabela 4 – Método indicado pela Farmacopeia Brasileira para o “ <i>Ensaio Limite para Metais Pesados</i> ” para os fármacos estudados.....	21
Tabela 5 – Reações de precipitação dos metais com tioacetamida em meio ácido, Kps e cor dos precipitados formados.....	24
Tabela 6 – Procedimentos farmacopeicos de preparo da amostra e comparação visual para determinação de metais pesados recomendados pela Farmacopeia Brasileira.	26
Tabela 7 – Programação de aquecimento utilizado para decomposição das amostras em forno mufla.....	37
Tabela 8 – Programas de aquecimento avaliados para a decomposição de fármacos por MW-AD empregando ácido diluído.	39
Tabela 9 – Parâmetros instrumentais das análises por AAS.	40
Tabela 10 – LDs e LQs para o método de preparo utilizando mufla e quantificação por F AAS, HG AAS e CV AAS.	44
Tabela 11 – Concentração de metais nas amostras dos anti-hipertensivos (n=2) utilizando o preparo da amostra por decomposição em mufla e as determinação por F AAS, HG AAS e CV AAS.....	44
Tabela 12 - LDs e LQs obtidos por MW-AD com ácido diluído e quantificação por F AAS, HG AAS e CV AAS.	54
Tabela 13 - Equação da reta e coeficiente de correlação linear obtidos para as curvas padrão dos analitos Cd, Ni, Pb, Cu, As e Hg por F AAS, HG AAS e CV AAS.	54
Tabela 14 - Concentração de metais nas amostras dos anti-hipertensivos (n=2) utilizando o preparo da amostra otimizado por MW-AD e determinação por F AAS, HG AAS e CV AAS. ..	55
Tabela 15 – Comparação entre o tempo de análise da metodologia indicada pela Farmacopeia Brasileira para a análise dos fármacos anti-hipertensivos e a metodologia proposta para um total de 8 amostras.....	56

Tabela 16 – Custos envolvidos para a implementação da metodologia para a análise de metais pesados por digestão em MW-AD e quantificação por F AAS, HG AAS e CV AAS.57

Tabela 17 – Levantamento de custos para a análise de uma amostra e das curvas padrão...58

LISTA DE ABREVIATURAS

CAP, captopril.

CV AAS, espectrometria de absorção atômica por geração de vapor frio, do inglês, *cold vapor atomic absorption spectrometry*.

DCNT, doenças crônicas não transmissíveis.

ENA, maleato de enalapril.

F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, *flame atomic absorption spectrometry*.

FI-CVG-ICP-MS, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado após geração de vapor químico em sistemas em fluxo, do inglês *flow injection chemical vapour generation inductively coupled plasma mass spectrometry*.

GFAAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*.

HAS, hipertensão arterial sistêmica.

HID, hidroclorotiazida.

HG AAS, espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos, do inglês, *hydride generation atomic absorption spectrometry*.

ICP-OES, espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*.

ICP-MS, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*.

LD, limite de detecção.

LOS, losartana potássica.

LQ, limite de quantificação.

MW-AD, decomposição via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted wet digestion*.

PNS, pesquisa nacional de saúde.

PROP, cloridrato de propranolol.

SF-ICP-MS, espectrometria de massa com setor eletromagnético com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *“sector field inductively coupled plasma mass spectrometry”*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 CONTROLE DE QUALIDADE DE IMPUREZAS EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS	17
3.2 FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS	18
3.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS DESCRITOS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS	23
3.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS	27
3.4.1 Decomposição por via seca em forno tipo mufla	28
3.4.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas.....	28
3.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA	31
3.5.1 Espectrometria de absorção atômica com atomização em chama	31
3.5.2 Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e de vapor frio	33
4. PROPOSTA TECNOLÓGICA	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 INSTRUMENTAÇÃO	35
5.2 MATERIAIS E REAGENTES.....	36
5.3 AMOSTRAS	37
5.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR PRECIPITAÇÃO COM SULFETOS	37
5.5 DECOMPOSIÇÃO DA AMOSTRA ASSISTIDA POR MICROONDAS (MW-AD)	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
6.1 DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR PRECIPITAÇÃO DE SULFETOS..	40
6.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA POR DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS EM SISTEMA FECHADO COM USO DE ÁCIDO DILUÍDO	46

6.2.1 Avaliação da massa de amostra	47
6.2.2 Avaliação da concentração de HNO ₃ na presença H ₂ O ₂	47
6.2.3 Avaliação do volume de H ₂ O ₂ na eficiência de decomposição empregando HNO ₃ diluído	48
6.2.4 Avaliação do Programa de digestão	49
6.2.5 Preparo das amostras dos anti-hipertensivos CAP, ENA, PROP, LOS e HID	51
6.2.6 Recuperação, LD e LQ	52
6.2.7 Determinação de metais nas amostras de anti-hipertensivos.....	55
6.3 Comparação do tempo de análise	55
7. ANÁLISE DOS CUSTOS	56
8. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é o principal fator de risco para as doenças cerebrovasculares, sendo a principal causa de óbito passível de prevenção no mundo. O tratamento adequado da HAS é fundamental para a redução da morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares e consiste em mudanças no estilo de vida e uso contínuo de um ou mais tipos de medicamentos anti-hipertensivos¹. Dentre os anti-hipertensivos mais utilizados atualmente estão o captopril, maleato de enalapril, cloridrato de propranolol, losartana potássica e hidroclorotiazida.

Tendo em vista que os anti-hipertensivos são amplamente prescritos e consumidos pela população, é necessário que se faça o controle de qualidade dos mesmos. O controle de qualidade de produtos farmacêuticos é uma etapa fundamental durante as etapas de produção de medicamentos e tem como objetivo assegurar a qualidade dos produtos que serão liberados para o consumo humano². Normalmente, os parâmetros de qualidade são estabelecidos pelas Farmacopeias que, em sua maioria, preconizam ensaios de identificação, doseamento e pureza em suas monografias. Dentre os vários tipos de impurezas, podem ser citados os metais pesados que, ainda hoje, podem ser determinados empregando ensaios semi-quantitativos e não-seletivos através da precipitação dos mesmos na forma de sulfetos^{3,4}.

Atualmente, a Farmacopeia Brasileira recomenda a determinação de metais pesados nas matérias-primas captopril, maleato de enalapril, cloridrato de propranolol, losartana potássica e hidroclorotiazida através da realização do “*Ensaio Limite para Metais Pesados*”⁵ sendo realizados através do método III. Neste método, o preparo da amostra é feito através da decomposição em mufla que, apesar de eliminar a matéria orgânica de forma eficiente e transformar os elementos em suas respectivas formas inorgânicas, pode acarretar perdas por volatilização e a contaminação das amostras. Por se tratar de um sistema aberto de decomposição e que emprega elevadas temperatura, os elementos mais voláteis podem ser perdidos. A contaminação está associada à grande quantidade de reagentes utilizada e, também, ao ambiente inapropriado do interior da mufla⁶. A determinação é baseada na reação dos metais pesados presentes na amostra com o íon sulfeto, proveniente da tioacetamida. A reação produz precipitados coloridos cuja intensidade é avaliada por comparação visual com uma solução de padrão de chumbo de concentração conhecida, sendo que é recomendado para a determinação conjunta⁴ de As, Ag, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn. Este teste traz informações limitadas, pois não especifica qual elemento está contribuindo para o resultado final, não considerando a diferença de toxicidade entre os elementos. Além disso, em muitos casos, estes métodos

baseados em reações de precipitação não são eficientes para a determinação de baixas concentrações de metais, inclusive para os valores considerados como limites nas próprias monografias.

Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias para o adequado preparo das amostras e posterior determinação quantitativa dos metais pesados presentes nas matérias-primas farmacêuticas, especialmente nas utilizadas em medicamentos de uso contínuo. Com esta motivação, a proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia de preparo de amostras para os fármacos anti-hipertensivos citados anteriormente, em sistema fechado assistido por radiação micro-ondas, e posterior determinação por técnicas de espectrometria atômica, visando a obtenção de resultados confiáveis, garantindo a segurança dos usuários dos fármacos mencionados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma metodologia alternativa para decomposição de fármacos anti-hipertensivos utilizando decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado com ácido diluído e posterior determinação de metais por espectrometria de absorção atômica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolvimento do método de preparo de amostras empregando a MW-AD em sistema fechado com ácido diluído, onde alguns parâmetros serão avaliados, como massa de amostra, concentração do ácido, utilização de peróxido de hidrogênio e tempo de aquecimento.
- b) Determinação de metais pesados pelas técnicas de F AAS (Cd, Cu, Ni e Pb), HG AAS (As) e CVG AAS (Hg).
- c) Comparação entre a metodologia desenvolvida para preparo das amostras e determinação pelas técnicas de AAS e as metodologias convencionais indicadas por compêndios oficiais para determinação de metais em fármacos anti-hipertensivos (decomposição em forno mufla e análise química qualitativa).
- d) Análise temporal e de custos envolvidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTROLE DE QUALIDADE DE IMPUREZAS EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS

O controle de qualidade é o conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e demais produtos para que satisfaçam às normas de pureza, eficácia e inocuidade². Os parâmetros utilizados para atestar a qualidade de produtos farmacêuticos são estabelecidos pelas Farmacopeias e, dentre eles, pode-se citar os ensaios de doseamento, identificação e de pureza que identificam e quantificam a presença ou não de impurezas elementares nos fármacos e nos produtos acabados⁷.

Impureza farmacêutica pode ser definida como qualquer componente presente na formulação do fármaco além da substância ativa e dos incipientes⁸. As impurezas presentes em fármacos podem apresentar diversas fontes e são classificadas em orgânicas, inorgânicas e solventes residuais⁹. As impurezas orgânicas podem ser decorrentes das matérias-primas, catalisadores e de intermediários e produtos de degradação gerados durante a síntese. As impurezas inorgânicas podem ser provenientes dos reagentes, catalisadores, resíduos de metais pesados, sais inorgânicos e de materiais utilizados durante o processo de fabricação. Os solventes residuais são líquidos orgânicos ou inorgânicos utilizados durante o processo de síntese e que permanecem no produto final¹⁰. Uma vez que essas impurezas não oferecem benefícios aos pacientes, devem ser controladas e estar presentes em limites aceitáveis nos medicamentos, a fim de evitar efeitos adversos à população^{11,12}

As impurezas inorgânicas merecem destaque, já que alguns elementos são potencialmente tóxicos em baixas dosagens. De acordo com o *Guideline for Elemental Impurities*¹¹, as impurezas elementares podem ser divididas em quatro classes com base nas suas toxicidades, conforme Tabela 1:

Tabela 1 – Classificação das impurezas elementares e suas características.

Classe	Elementos	Características
1	As, Cd, Hg e Pb	Possuem utilização limitada na indústria farmacêutica. Tóxicos em todas as vias de administração (oral, parenteral e inalatória). Genotóxicos e carcinogênicos para os humanos.

2A	V, Mo, Se e Co	Alta probabilidade de ocorrência em fármacos. Possuem grande abundância natural. Apresentam risco nas vias de administração oral, parenteral e inalatória.
2B	Ag, Au, Ti, Pd, Pt Ir, Os, Rh e Ru	Requerem avaliação de risco para todas as vias, somente se forem intencionalmente adicionados no processo (catalisadores, por exemplo).
3	Cr, Cu, Ni, Mo, Sb, Ba e Sn	Baixa toxicidade quando administrados via oral, mas necessitam avaliação de risco quando administrados por inalação ou parenteral.
4	B, Fe, Zn, K, Ca, Na, Mn, Mg, W e Al	Baixa toxicidade. Não apresentam limites de exposição diária.

Fonte: Adaptado da referência 11.

O uso de metodologias não-seletivas para o controle de qualidade de matérias-primas tem diminuído cada vez mais, em função do desenvolvimento de métodos cromatográficos e espectroscópicos que, além do doseamento para determinação da pureza, tornaram possível a identificação e quantificação das impurezas de forma individual⁹.

3.2 FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS

A HAS é o principal fator de risco para as doenças cerebrovasculares e é a principal causa de óbito prevenível no mundo, responsável por 13% das mortes¹. Malta *et. al.*¹³ descreveram as principais doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil segundo informações coletadas de indivíduos de 18 anos ou mais de idade entrevistados na Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) – a pesquisa mais ampla sobre saúde e seus determinantes já realizada no país - no ano de 2013. Segundo a pesquisa, o Rio Grande do Sul foi o estado brasileiro com maior prevalência de DCNT. Com relação às morbidades, a HAS foi a mais citada pelos entrevistados, com prevalência de 21,4% na população de pessoas de 18 anos ou mais de idade, ou, em números absolutos, aproximadamente 31 milhões de indivíduos.

O tratamento adequado da HAS é fundamental para a redução da morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares e consiste em mudanças no estilo de vida e uso contínuo

de um ou mais tipos de medicamentos anti-hipertensivos¹. A Tabela 2, apresenta os anti-hipertensivos mais utilizados no Brasil entre os anos de 2013 e 2014:

Tabela 2 – Fármacos mais utilizados para o tratamento da hipertensão no Brasil entre os anos de 2013 e 2014.

Fármaco	%
Hidroclorotiazida	23,9
Losartana Potássica	20,1
Captopril	11,2
Maleato de Enalapril	10,5
Atenolol	9,0
Anlodipino	6,0
Cloridrato de Propranolol	4,1
Furosemida	2,4
Nifedipino	1,8
Clortalidona	1,8
Outros fármacos para tratamento de hipertensão	9,3

Fonte: Adaptada da Referência 14.

Os fármacos escolhidos para a realização deste trabalho encontram-se entre os mais utilizados no Brasil, sendo estes: captopril, maleato de enalapril, cloridrato de propranolol, losartana potássica e hidroclorotiazida.

A Tabela 3 apresenta informações sobre os fármacos estudados e a Figura 1 apresenta as suas estruturas químicas⁵.

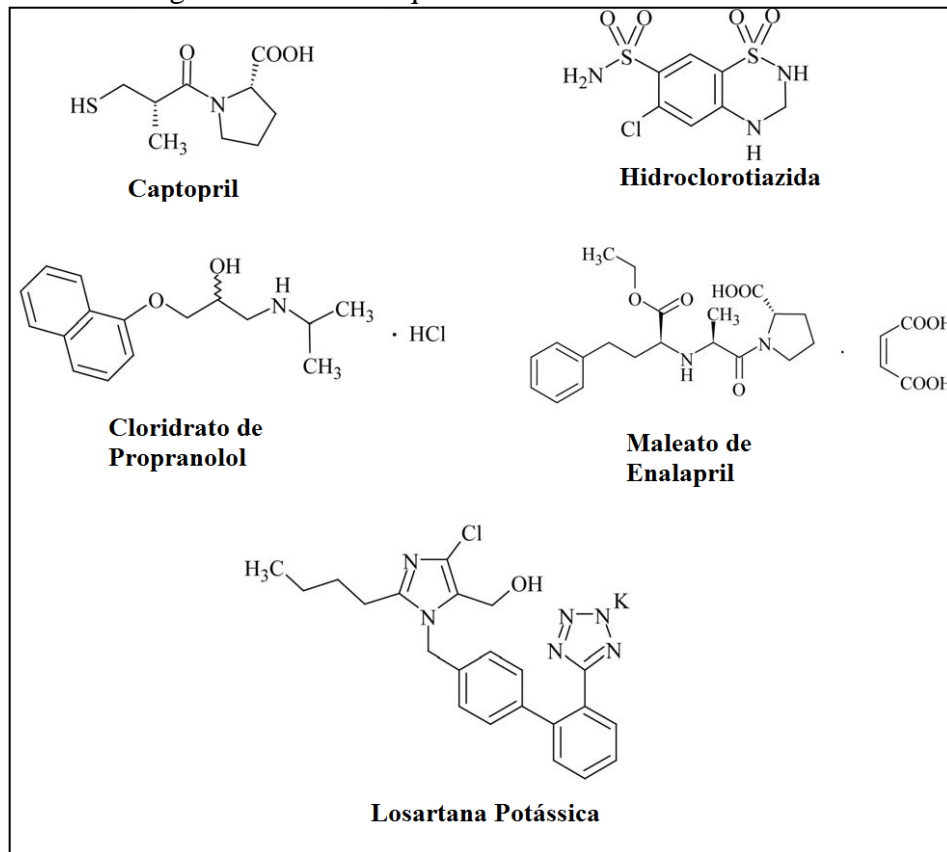
Tabela 3 – Informações sobre os fármacos estudados.

Fármaco	Fórmula Química	Características Físicas	Solubilidade
Captopril	$C_9H_{15}NO_3S$	Pó cristalino branco ou quase branco.	Solúvel em água, facilmente solúvel em metanol e cloreto de metileno. Solúvel em

			soluções diluídas de hidróxidos alcalinos.
Maleato de Enalapril	$C_{20}H_{28}N_2O_3 \cdot C_4H_4O_4$	Pó cristalino branco ou quase branco.	Ligeiramente solúvel em água, facilmente solúvel em metanol e ligeiramente solúvel em cloreto de metileno. Solúvel em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos.
Cloridrato de Propranolol	$C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$	Pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, de sabor amargo e aspecto cristalino amorfo.	Solúvel em água e etanol, pouco solúvel em clorofórmio, insolúvel em éter etílico.
Losartana Potássica	$C_{22}H_{22}ClKN_6O$	Pó cristalino branco ou quase branco.	Solúvel em água e etanol, praticamente insolúvel em acetato de etila, clorofórmio e cloreto de metileno.
Hidroclorotiazida	$C_7H_8ClN_3O_4S_2$	Pó cristalino branco ou quase branco, inodoro.	Muito pouco solúvel em água, solúvel em acetona e pouco solúvel em etanol. Solúvel em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos.

Fonte: Referência 5.

Figura 1 - Estrutura química dos fármacos estudados.



Fonte: Referência 5.

Para todos os fármacos estudados neste trabalho, a Farmacopeia Brasileira indica o “*Ensaio Limite para metais pesados*” seja feito para determinação de impurezas. A Tabela 4 apresenta o método indicado e o limite máximo permitido⁵.

Tabela 4 – Método indicado pela Farmacopeia Brasileira para o “*Ensaio Limite para Metais Pesados*” para os fármacos estudados.

Fármaco	Abreviatura*	Ensaio Limite Metais Pesados	Limite (µg/g)
Captopril	CAP	Método III	20
Maleato de Enalapril	ENA	Método III	10
Cloridrato de Propranolol	PROP	Não especifica o método	20
Losartana Potássica	LOS	Método III	10
Hidroclorotiazida	HID	Método III	10

*As abreviaturas não são usuais e foram definidas somente para este trabalho.

Fonte: Referência 5.

Conforme Método III para “*Ensaio Limite para Metais Pesados*” descrito na Farmacopeia Brasileira, o preparo da amostra consiste em pesar em cadinho de porcelana a quantidade de amostra especificada na monografia de cada fármaco, calculada conforme equação:

$$2/(1000I)$$

Onde I é o limite de metais pesados na amostra em porcentagem (p/p).

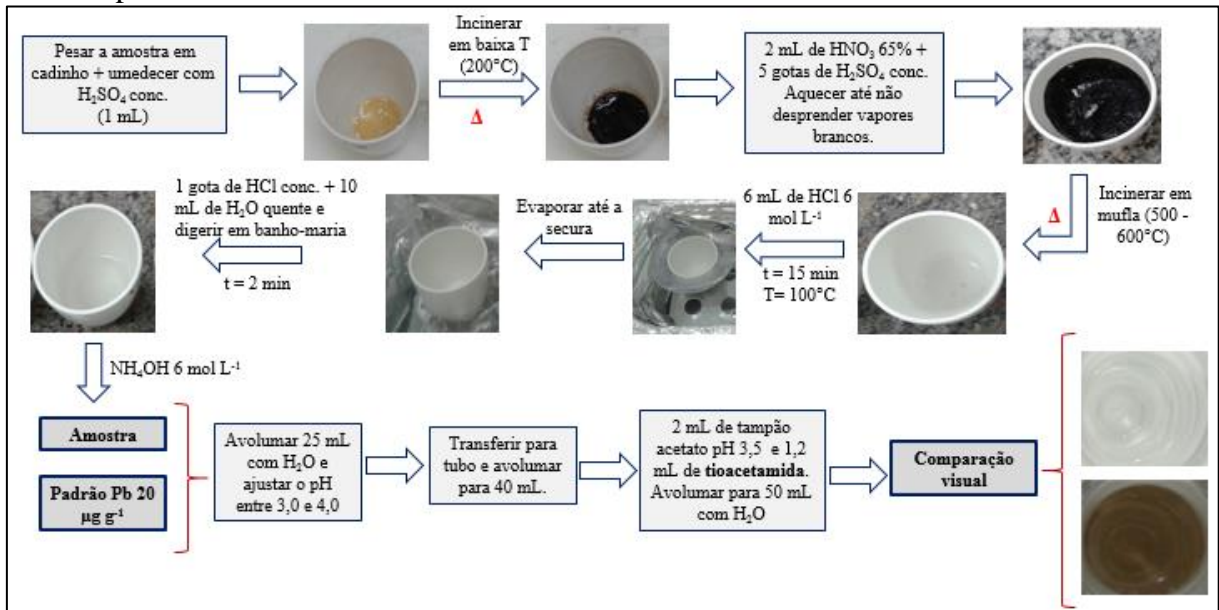
Após, adiciona-se H_2SO_4 concentrado suficiente para umedecer a amostra e a mesma deve ser incinerada sob baixa temperatura. É adicionada à massa carbonizada 2 mL de HNO_3 65% e 5 gotas de H_2SO_4 concentrado. As amostras são aquecidas até que não se desprendam mais vapores brancos e incineradas em mufla a 500 – 600 °C até a completa combustão do carbono. É feito resfriamento em temperatura ambiente, adição de 4 mL de HCl 6 mol L^{-1} e é feita a digestão em banho-maria por 15 minutos com os cadinhos cobertos. Após, as amostras são evaporadas em banho-maria até a secura. O resíduo obtido de cada amostra é umedecido com 1 gota de HCl 37%, adicionado 10 mL de água quente e, novamente, é feita a digestão em banho-maria por 2 minutos. As amostras são alcalinizadas com NH_4OH 6 mol L^{-1} e diluídas com água para 25 mL (é feito ajuste do pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético 1 mol L^{-1} , utilizando papel indicador). As soluções resultantes são filtradas, se necessário, o cadinho e o filtro são lavados com 10 mL de água e o filtrado e as águas de lavagem são transferidos para um tubo adequado para comparação de cor após diluição com água para 40 mL.

O preparo do padrão consiste em transferir 2 mL da solução padrão de chumbo 10 μg mL^{-1} para tubo de comparação de cor e diluir para 25 mL com água. O pH é ajustado entre 3,0 e 4,0 com ácido acético 1 mol L^{-1} ou NH_4OH 6 mol L^{-1} , utilizando papel indicador. É feita diluição com água para aproximadamente 40 mL.

A cada uma das preparações – amostra e padrão - é adicionado 2 mL de tampão acetato pH 3,5 e 1,2 mL de tioacetamida, diluição com água para 50 mL e as soluções são mantidas em repouso por 2 minutos. Após esse tempo, irá desenvolver-se coloração que varia do amarelo ao preto. É feita a observação das preparações de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco. Qualquer coloração desenvolvida na preparação da amostra deve ser menos intensa do que a observada no padrão.

A Figura 2 apresenta o fluxograma do Método III para “*Ensaio Limite para Metais Pesados*” conforme Farmacopeia Brasileira:

Figura 2 – Fluxograma do Método III para “Ensaio Limite para Metais Pesados” conforme Farmacopeia Brasileira.



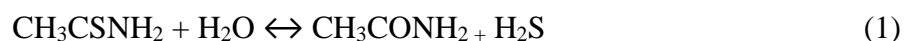
Fonte: o autor.

3.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS DESCRITOS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS

As farmacopeias^{3,4}, de um modo geral, indicam a realização do "Ensaio Limite para Metais Pesados" baseado na precipitação de metais na forma de sulfeto para diversas matérias-primas. Para algumas matérias-primas específicas, existe a indicação de testes que utilizam a espectrometria atômica para a análise de determinados metais³.

O "Ensaio Limite para Metais Pesados" consiste na reação de determinados metais com o íon sulfeto, proveniente do reagente tioacetamida. A reação produz precipitados coloridos cuja intensidade de cor é avaliada através da comparação visual com um precipitado obtido com mistura de uma solução de referência de chumbo de concentração conhecida com o mesmo reagente precipitante³.

A tioacetamida em meio ácido sofre hidrólise, liberando H₂S (agente precipitante), conforme equação 1:



A Tabela 5 apresenta as reações entre os metais e a tioacetamida em meio ácido, assim como a constante do produto de solubilidade (Kps) e a cor dos precipitados formados¹⁵:

Tabela 5 – Reações de precipitação dos metais com tioacetamida em meio ácido, Kps e cor dos precipitados formados.

Substância	Fórmula	Cor precipitado	Kps (25 °C)	Reação
Sulfeto de Antimônio (III)	Sb ₂ S ₃	Laranja	1,7.10 ⁻⁹³	2Sb ³⁺ + 3H ₂ S → Sb ₂ S ₃ ↓ + 6H ⁺
Sulfeto de Antimônio (V)	Sb ₂ S ₅	Laranja	-	2Sb ⁵⁺ + 5H ₂ S → Sb ₂ S ₅ ↓ + 10H ⁺
Sulfeto de Arsênio (III)	As ₂ S ₃	Amarelo	-	2As ³⁺ + 3H ₂ S → As ₂ S ₃ ↓ + 6H ⁺
Sulfeto de Bismuto (III)	Bi ₂ S ₃	Marrom	1,6.10 ⁻⁷²	2Bi ³⁺ + 3H ₂ S → Bi ₂ S ₃ ↓ + 6H ⁺
Sulfeto de Cádmio (II)	CdS	Amarelo	1,4.10 ⁻²⁸	Cd ²⁺ + H ₂ S → CdS↓ + 2H ⁺
Sulfeto de Cobre (II)	CuS	Preto	1.10 ⁻⁴⁴	Cu ²⁺ + H ₂ S → CuS↓ + 2H ⁺
Sulfeto de Chumbo (II)	PbS	Preto	5.10 ⁻²⁹	Pb ²⁺ + H ₂ S → PbS↓ + 2H ⁺
Sulfeto de Estanho (IV)	SnS ₂	Amarelo	-	Sn ⁴⁺ + 2H ₂ S → SnS ₂ ↓ + 4H ⁺
Sulfeto de mercúrio (II)	HgS	Preto	4.10 ⁻⁵⁴	Hg ₂ ²⁺ + H ₂ S → Hg↓ + HgS↓ + 2H ⁺
Sulfeto de Molibdênio (IV)	MoS ₂	Preto	-	Mo ⁴⁺ + 2H ₂ S → MoS ₂ ↓ + 4H ⁺
Sulfeto de prata (I)	Ag ₂ S	Preto	1,6.10 ⁻⁴⁹	2Ag ²⁺ + H ₂ S → Ag ₂ S↓ + 2H ⁺

Apesar de ser um teste simples, este ensaio baseado em teste qualitativo apresenta diversas limitações. Os resultados obtidos são semi-quantitativos e inespecíficos, uma vez que a coloração final é a somatória da intensidade de cor de todos os sulfetos gerados, impossibilitando a identificação de quais elementos estão presentes na amostra e qual a concentração de cada elemento³.

Outra desvantagem deste método está relacionada ao fato do precipitado de sulfeto de chumbo, utilizado como solução de referência para comparação, possuir coloração preta, enquanto que o sulfeto de Bi é marrom e os sulfetos de As, Cd e Sb são amarelos ou alaranjados. A detecção destes elementos pode ser prejudicada durante a comparação entre a amostra e a solução de referência de chumbo, gerando resultados duvidosos. Além disso, a determinação baseada na comparação de cor é subjetiva e depende da percepção do analista, assim como da luminosidade do ambiente¹². Além disso, os sulfetos determinados por este teste apresentam diferentes solubilidades, o que representa um problema quando são comparados com o padrão de chumbo¹⁶. Outro aspecto que deve ser destacado é o fato de que nas Farmacopeias não há recomendações com relação à procedimentos específicos para descontaminação de materiais e vidrarias utilizados nestes testes, o que representa uma grande limitação, podendo gerar resultados falsos positivos¹².

O Ensaio Limite para Metais Pesados é recomendado para a determinação conjunta de As, Ag, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn, contudo não é capaz de determinar outros elementos que apresentam preocupação toxicológica, como Ni e Cr. Além disso, a determinação destes elementos depende da forma química como estão presentes na solução, sendo que diferentes estados de oxidação apresentam diferentes reações com o íon sulfeto^{12,4}.

A Tabela 6 apresenta, de maneira resumida, os métodos de preparo da amostra para posterior comparação visual com o padrão de Pb, indicados no "*Ensaio Limite para Metais Pesados*" da Farmacopeia Brasileira³. O método IV de decomposição de amostra somente é realizado quando as metodologias anteriores não foram eficientes.

Tabela 6 – Procedimentos farmacopeicos de preparo da amostra e comparação visual para determinação de metais pesados recomendados pela Farmacopeia Brasileira.

Método	Preparo da Amostra	Procedimento para comparação visual
Método I	Dissolução e completar para 25 mL com H ₂ O.	
Método II	Dissolução e completar para 25 mL com solvente orgânico (dioxano ou acetona, contendo, no mínimo, 15% v/v de água)	
Método III	<p>Amostra + H₂SO₄ concentrado + aquecimento brando + 2 mL de HNO₃ 65% + 5 gotas de H₂SO₄ concentrado + aquecimento até não desprender mais vapores + mufla (500 – 600°C até completa combustão do carbono)</p> <p>4 mL HCl 6 mol L⁻¹ + aquecimento em banho maria por 15 minutos coberto + descobrir e evaporar em banho-maria + 1 gota de HCl 37% + 10 mL de H₂O + banho-maria por 2 minutos.</p> <p>Transferir para tubo adequado e completar o volume para 25 mL.</p>	<p>Amostra: Ajustar pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético 1 mol L⁻¹ ou NH₄OH 6 mol L⁻¹. Adicionar 2 mL tampão acetato pH 3,5 + 1,2 mL de Tioacetamida. Diluir para 50 mL e comparar com o padrão.</p> <p>Padrão: Adicionar 2 mL do padrão Pb 10 µg mL⁻¹, diluir para 25 mL com H₂O e realizar o mesmo procedimento feito na amostra.</p>
Método IV	<p>Decomposição por via úmida em sistema fechado: pesar entre 0,1 g e 0,5g e adicionar HNO₃ 65%. Tempo de digestão: aquecimento convencional 240 minutos e micro-ondas 20 minutos.</p> <p>Método de combustão iniciada por micro-onda: é recomendada nos casos em que a digestão por via úmida não for eficiente.</p>	

Adaptado da referência 3.

Um caso ocorrido no Brasil¹², no ano de 1999, destacou os perigos da utilização de métodos não seletivos para a determinação de metais. O fármaco antimoniato de meglumina, utilizado para o tratamento de leishmaniose, é composto por uma solução injetável de antimônio pentavalente. O antimônio pentavalente reage com o íon sulfeto quando submetido ao “*Ensaio Limite de Metais Pesados*”, gerando um precipitado laranja que prejudica a comparação visual da amostra com o padrão de chumbo, cujo precipitado é preto. Em função disso, alguns lotes deste medicamento contaminados com 84 mg L⁻¹ de As e 52 mg L⁻¹ de Pb foram liberados para comercialização, gerando efeitos colaterais nos usuários e algumas mortes⁶. Atualmente, o método para a determinação de impurezas elementares no antimoniato de meglumina foi modificado na Farmacopeia Brasileira, podendo ser realizada por técnicas espectrométricas, como espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), F AAS ou HG AAS¹⁷.

Barin¹⁸ avaliou o desempenho dos métodos farmacopeicos de preparo de amostras e de determinação de metais pesados para os fármacos tricíclicos carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina. Segundo o autor, os métodos farmacopeicos mostraram-se inadequados tanto para o preparo quanto para a determinação de metais pesados. Na decomposição em forno tipo mufla vários elementos foram perdidos por volatilização. Já nos ensaios de determinação de metais pesados por precipitação com íon sulfeto, onde foram adicionadas soluções de elementos que teoricamente responderiam a este método (Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn), foram obtidos bons resultados somente para Ag e Pb, sendo Pb o padrão utilizado para comparação de cor neste tipo de teste.

3.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS

Grande parte das técnicas analíticas, com exceção daquelas que permitem a análise direta de sólidos, requer que a amostra esteja na forma de solução, necessitando de uma etapa prévia de decomposição para posterior determinação¹⁹.

Diversos métodos podem ser utilizados para o preparo de amostras farmacêuticas para posterior determinação de impurezas inorgânicas, tais como decomposição por via seca, decomposição por via úmida com aquecimento por radiação micro-ondas e métodos de combustão¹². A seguir, serão abordados os métodos de decomposição utilizados neste trabalho, sendo estes, decomposição por via seca em forno tipo mufla e decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.

3.4.1 Decomposição por via seca em forno tipo mufla

A decomposição por via seca é um dos procedimentos mais simples para o preparo de amostras e é realizada em forno tipo mufla. A amostra é colocada em cadinho, geralmente de porcelana ou de platina, e submetida ao aquecimento em elevadas temperaturas, entre 450 e 550 °C. A queima dos compostos orgânicos da amostra resulta na formação de um resíduo inorgânico composto por substâncias não voláteis como óxidos e carbonatos de metais, que são solúveis em ácidos minerais⁶.

A decomposição em mufla apresenta como maiores vantagens a possibilidade de utilização de grandes massas de amostra e dissolução da amostra após a queima em pequeno volume de ácido, o que se torna bastante interessante ao se trabalhar com elementos em concentrações muito baixas, uma vez que permite a pré-concentração destes na solução final⁶. Em função das elevadas temperaturas que são empregadas, este tipo de preparo de amostra não deve ser utilizado quando deseja-se determinar elementos muito voláteis, como Hg, As e Se, por exemplo. Outros elementos, como Cd e Pb, geralmente não apresentam perdas significativas quando submetidos às temperaturas comumente utilizadas na etapa de decomposição. Outras desvantagens deste método são o longo tempo de execução e a possibilidade de contaminação por espécies presentes no ambiente, visto que as decomposições são realizadas em sistema aberto⁶.

Muller *et. al.*²⁰ realizaram a digestão de amostras de plantas medicinais em mufla, entre 500 °C e 600 °C até completa decomposição da amostra, e determinaram Hg, Pb e Cd por ICP-MS. Obtiveram recuperações inferiores a 2% para Hg, entre 70 e 83% para Pb e entre 92 e 98% para Cd. Também foi desenvolvida uma metodologia por digestão em sistema fechado assistida por micro-ondas para o preparo de amostras e posterior análise de As, Cd e Pb por ICP-MS e Hg por geração de vapor químico em sistemas em fluxo acoplado a ICP-MS (FI-CVG-ICP-MS). Para esta metodologia, obtiveram recuperações acima de 95% para todos os analitos.

3.4.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas

A decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado vem sendo bastante utilizada em função da sua alta eficiência de digestão, diminuição das perdas de elementos por volatilização e menor risco de contaminação. Nestes sistemas, é possível alcançar elevadas temperaturas e pressões, assim como monitorar os parâmetros reacionais em tempo real²¹. A decomposição de amostras empregando radiação micro-ondas em sistema fechados requer um tempo consideravelmente menor quando comparada à

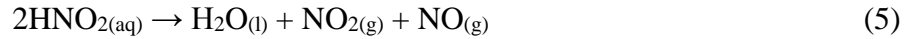
decomposição de amostras com aquecimento convencional. Isto se deve ao aumento da velocidade de reação devido a elevada pressão e temperatura interna dos frascos de digestão¹⁹. Além disso, caso seja utilizada a decomposição em sistemas abertos, esta fica limitada à temperatura do ponto de ebulição do ácido ou mistura de decomposição empregados.

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas e cobrem uma faixa de frequências do espectro eletromagnético entre 300 e 300.000 MHz. Quando um material não transparente às micro-ondas absorve este tipo de radiação sofre aumento de sua temperatura em função, principalmente, da interação desta radiação com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando migração iônica e rotação de dipolos. Estes dois processos ocorrem quando as micro-ondas interagem com o ácido ou mistura usada para a decomposição da amostra. A penetração das micro-ondas é nula nos materiais que refletem este tipo de radiação, como os metais, e infinita nos meios transparentes, como quartzo e Teflon™. Sendo assim, os frascos de digestão devem ser fabricados em material que não absorva a radiação micro-ondas, para que estas interajam exclusivamente com a amostra²².

Por se tratarem de sistemas fechados, a principal desvantagem é o fato de não ser possível a digestão de massas elevadas de amostra em função da pressão interna que se desenvolve nos frascos de digestão. Essa pressão interna depende da pressão de vapor do ácido empregado e da pressão resultante causada pelos produtos gasosos gerados nas reações de decomposição¹⁷. Por alcançarem pressões muito elevada, os equipamentos possuem diversos itens de segurança como exaustão, controladores de pressão e temperatura, cavidades para alívio da pressão e portas que não abrem caso ocorra uma explosão²².

3.4.3 Decomposição assistida por radiação micro-ondas empregando ácido nítrico diluído

O preparo de amostras por decomposição por via úmida apresenta um histórico de utilização de ácidos concentrados, sendo que um dos ácidos mais empregados é o HNO₃ em função de seu alto poder de oxidação. A utilização de fornos de micro-ondas para a realização de decomposições em altas pressões e temperaturas permitiu o desenvolvimento de metodologias utilizando soluções diluídas de HNO₃, sem comprometer a eficiência da digestão da amostra²³. Bizzi *et. al.*²³ relataram que a utilização de soluções diluídas de HNO₃, em presença de oxigênio ocasiona a regeneração do HNO₃, promovendo uma decomposição eficiente mesmo com uso de ácido diluído. A oxidação da matéria orgânica ocorre através de uma série de reações simultâneas que levam a regeneração do HNO₃²⁴.



Conforme as reações acima, é possível observar que os compostos orgânicos são oxidados, gerando preferencialmente NO que, por sua vez, na presença de O₂, é oxidado a NO₂. Após, o NO₂ formado é absorvido pela fase líquida, regenerando o HNO₃. Os dois principais fatores no processo de regeneração são a presença de O₂ na fase de vapor e o gradiente de temperatura entre a fase líquida e a fase de vapor ao longo do frasco de decomposição. O gradiente de temperatura evita um aumento brusco da pressão no início do programa de aquecimento, fazendo com que a temperatura da fase líquida não aumente rapidamente também, favorecendo a absorção dos vapores formados na fase líquida²⁴. A adição de O₂ favorece a regeneração do HNO₃, o que pode ser feito através da adição de O₂ gasoso (pressurizando os frascos com oxigênio) e H₂O₂, uma vez que seus produtos de decomposição são H₂O e O₂²⁵.

Barela *et. al.*²¹ avaliaram a decomposição de amostras de biodiesel por MW-AD utilizando ácido diluído para a posterior determinação de Ba, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V e Zn por espectrometria de massa com setor eletromagnético com plasma indutivamente acoplado (SF-ICP-MS). Os autores estudaram a eficiência de decomposição de amostras de biodiesel através do teor de acidez residual e carbono residual, para diversas concentrações de HNO₃ (1; 2; 3,5; 7; 9,3 e 14 mol L⁻¹) e volumes de H₂O₂ 30% (0; 1; 1,5; 2 e 3 mL). Também realizaram a avaliação da massa de amostra (500, 550, 600, 650 e 700 mg). A composição da mistura de decomposição que apresentou maior eficiência foi 7 mol L⁻¹ de HNO₃ e 2 mL de H₂O₂. A maior massa estudada (700 mg) foi digerida sem exceder o limite máximo de pressão (80 bar) do sistema utilizado.

Em outro trabalho, Bizzi *et. al.*²⁵ estudaram a decomposição de amostras de leite em pó e fígado bovino utilizando o H₂O₂ como fonte de O₂ para promover a regeneração do HNO₃. Primeiramente avaliaram a decomposição de 500 mg das amostras com HNO₃ 2 mol L⁻¹ e adição de 7,5 e 5 bar de O₂ para decomposição de amostras de leite em pó e de fígado bovino, respectivamente. O efeito da adição de diferentes volumes de H₂O₂ (0, 1, 2 e 3 mL) em atmosfera de oxigênio também foi avaliado. Ao realizarem as decomposições com a adição de 2 mL de H₂O₂, com e sem pressurização de O₂, o teor de carbono residual foi semelhante em ambos os casos. Porém, a acidez residual foi maior nas soluções obtidas após a pressurização dos frascos, pois o aumento da concentração O₂ no meio reacional favoreceu a reação de

regeneração do HNO_3 , elevando a acidez residual. Os autores avaliaram também a redução da concentração do ácido e aumento do volume de H_2O_2 , alcançando uma eficiência de decomposição próxima à obtida anteriormente, com a adição de HNO_3 1 mol L^{-1} e 3 mL de H_2O_2 para as amostras de leite em pó e HNO_3 $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ e 2,5 mL de H_2O_2 para amostras de fígado bovino.

Conforme pode ser observado, o uso de ácidos diluídos pode ser eficiente para a decomposição de amostras orgânicas, tendo em vista a possibilidade de regeneração do HNO_3 em sistemas fechados. A diminuição da quantidade de reagentes adicionados durante o processo de digestão é vantajosa em diversos aspectos, entre eles a segurança, a minimização na geração de resíduos e os custos. Além disso, a obtenção de soluções com menor acidez residual é interessante quando se trata da determinação de analitos empregando técnicas com sistemas de nebulização da amostra. Soluções ácidas diluídas também previnem danos aos equipamentos²².

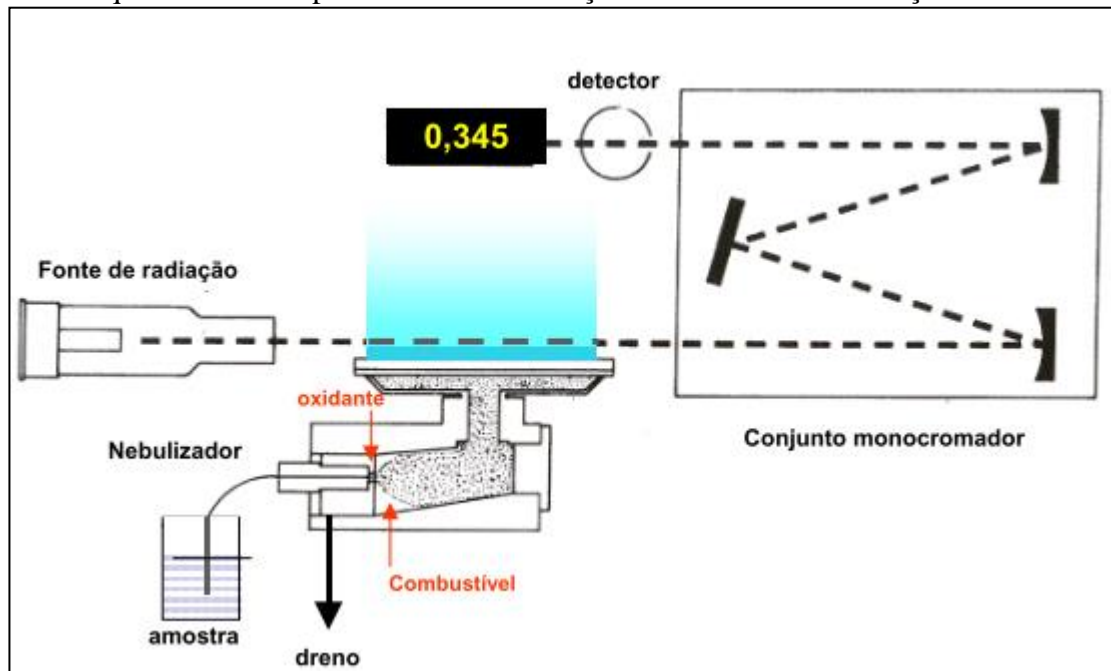
3.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

3.5.1 Espectrometria de absorção atômica com atomização em chama

O princípio fundamental da espectrometria de absorção atômica envolve a medida da absorção da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária por átomos gasosos no estado fundamental, sendo que a espectrometria de absorção atômica com chama é a técnica mais utilizada para análises elementares em níveis de mg L^{-1} .²⁶

Os principais componentes de um F AAS são fonte de radiação, atomizador, monocromador e detector (Figura 3).

Figura 3 – Esquema de um espectrômetro de absorção atômica com atomização em chama.



Fonte: Referência 26.

A amostra é aspirada e passa por um nebulizador, cuja função é formar um aerossol da solução aquosa que se deseja analisar. Esse aerossol é constituído por pequenas gotículas que, após processo de nebulização, são encaminhadas até o queimador (atomizador) através de gases²¹.

A chama gerada no queimador tem a finalidade de transformar íons e moléculas em átomos no estado fundamental. Estes átomos no estado fundamental irão absorver a radiação de comprimento de onda característico proveniente da fonte de radiação e, em função disto, a concentração do elemento de interesse pode ser determinada²⁶.

A fonte de radiação mais utilizada é a lâmpada de cátodo oco, onde o cátodo é confeccionado com o próprio elemento metálico de interesse, ou revestido por ele, e um ânodo constituído por um bastão de zircônio ou tungstênio²⁶.

A função do monocromador é separar a linha espectral de interesse das outras linhas emitidas pela fonte de radiação, através da utilização de um prisma ou rede de difração associado a duas fendas estreitas que servem para entrada e saída da radiação²⁶.

Os detectores encontrados nos espectrômetros de absorção atômica são válvulas fotomultiplicadoras ou detectores de estado sólido²⁶.

F AAS é uma técnica que permite analisar uma grande gama de elementos, porém é uma técnica monoelementar, ou seja, é possível analisar somente um elemento por vez. A determinação de cada elemento requer a utilização de uma lâmpada específica e diferentes

elementos podem necessitar de diferentes gases^{27,28}. É uma técnica com baixo custo de operação e de aquisição quando comparada a outras técnicas espectrométricas, como espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e ICP-MS. É um equipamento de fácil utilização e que consome pequeno volume de gases, porém grandes volumes de amostras²⁸.

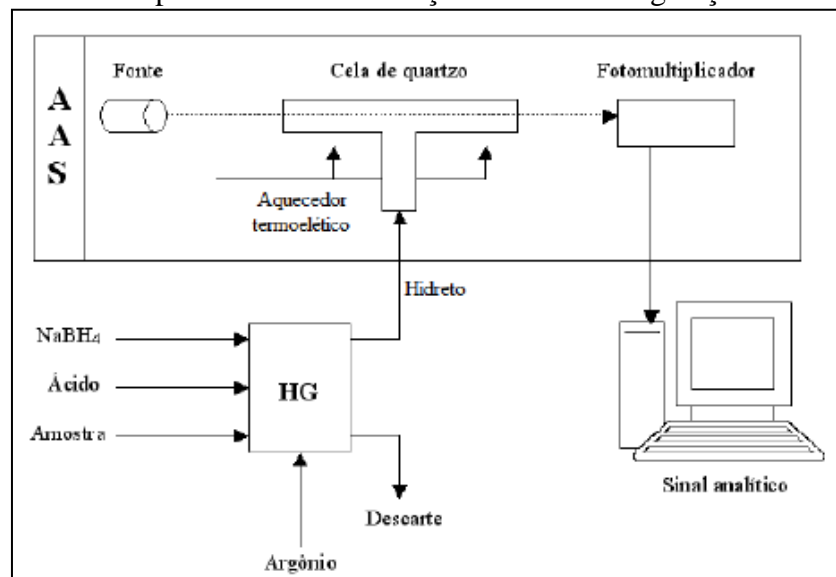
3.5.2 Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e de vapor frio

A espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos é uma técnica utilizada para a determinação de elementos formadores de hidretos voláteis como As, Se, Sb, Bi, Ge, Sn, Pb e Te²⁹. Esta técnica envolve a conversão do analito presente na amostra na forma de solução em um composto volátil através da reação com um agente redutor. Após, os hidretos são separados da fase líquida através de um separador gás-líquido e são transportados até o atomizador por um gás de arraste inerte, como argônio. A atomização é feita em uma cela de quartzo aquecida eletricamente ou por uma chama ar/acetileno, atingindo temperaturas de 800 a 1000 °C. Os átomos na forma elementar absorvem a radiação emitida e o sinal analítico é gerado^{29,30}.

O agente redutor mais utilizado é o borohidreto de sódio (NaBH_4), em meio ácido. Por ser instável, a solução do redutor deve ser preparada imediatamente antes do uso e na presença de KOH ou NaOH³¹.

A Figura 4 apresenta as partes que constituem um espectrômetro de absorção atômica com geração de hidretos.

Figura 4 – Esquema de um espectrômetro de absorção atômica com geração de hidretos.



Fonte: Referência 32.

Esta técnica possui como principais vantagens a separação do analito da matriz minimizando interferências e permitindo a pré-concentração do analito, baixos limites de detecção e a possibilidade de realização de especiação química³³. Apresenta também algumas desvantagens, como o fato das concentrações dos reagentes interferirem na geração ou liberação do hidreto. Com relação às interferências na cinética de redução, sabe-se que alguns elementos podem existir em solução em dois estados de oxidação, por exemplo o As(III)/As(V), e que os estados de oxidação mais altos apresentam velocidade de reação mais lenta. Sendo assim, é indicada uma redução prévia do elemento, sendo os pré-redutores mais comuns o iodeto de potássio (KI), misturas de KI com ácido ascórbico e L-cisteína³⁰.

Na espectrometria atômica com geração de vapor frio, o equipamento e os reagentes são os mesmos utilizados no sistema de geração de hidretos, porém a cela de quartzo não precisa ser aquecida, uma vez que o mercúrio é reduzido com NaBH_4 a mercúrio metálico, que é volátil a temperatura ambiente. Como o Hg já chega na célula de absorção na forma atômica, esta não necessita ser aquecida.²⁹

4. PROPOSTA TECNOLÓGICA

As metodologias utilizadas em laboratórios de rotina devem ser constantemente questionadas, revisadas e atualizadas, visando a melhoria constante dos resultados gerados e da produtividade.

A metodologia indicada pela Farmacopeia Brasileira para o Ensaio Limite para Metais Pesados nos anti-hipertensivos CAP, ENA, PROP, LOS e HID apresenta problemas tanto na etapa de preparo de amostra (decomposição em forno mufla) quanto na etapa de determinação (precipitação dos metais na forma de sulfetos). O preparo da amostra é de longa execução (em torno de 9 h) e alguns metais são perdidos por volatilização. Além disso, o preparo da amostra requer uso de vários reagentes, inclusive ácidos concentrados, o que por sua vez, aumenta o risco de contaminação da amostra e geração de resíduos, além de apresentar riscos ao operador. Com relação a etapa de determinação dos metais, esta é feita através da precipitação na forma de sulfetos utilizando o reagente tioacetamida. Neste caso, a precipitação não é seletiva, tendo em vista que todos os metais precipitam nesta forma química, as cores de alguns precipitados não são similares ao de referência (sulfeto de chumbo) e alguns metais precipitam apenas em concentrações superiores aos limites estabelecidos pela Farmacopeia. Desta forma, esta

proposta tecnológica visa o desenvolvimento de metodologia alternativa, utilizando preparo destas amostras por MW-AD com ácido diluído e determinação de metais pesados por AAS.

Para avaliação da possibilidade de implementação da metodologia proposta, o procedimento será avaliado com relação ao seu desempenho analítico, através de ensaios de recuperação, LD/LQ e levantamento de tempo de análise e de custos. Estes dados serão comparados com o método atualmente recomendado pela Farmacopeia Brasileira para a determinação de metais pesados nestes fármacos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para a decomposição por via seca em sistema aberto, conforme método recomendado pela Farmacopeia Brasileira, utilizou-se chapa de aquecimento da marca Velp Científica, modelo Arc F20500011 e forno mufla microprocessado da marca EDG Equipamentos, modelo 7000 3P.

A decomposição por via úmida em sistema fechado foi realizada em forno de micro-ondas MultiwavePRO, marca Anton Paar, com rotor modelo 8NXQ80, equipado com oito frascos de quartzo com volume interno de 80 mL. O sistema possui sensores que permitem medir a temperatura e a pressão em tempo real em todos os frascos, com temperatura e pressão máximas de trabalho de 280 °C e 80 bar, respectivamente. A Figura 5 apresenta o forno de micro-ondas utilizado.

Figura 5 – a) Forno de Micro-ondas MultiwavePRO. b) Rotor com capacidade máxima para 8 frascos de quartzo



Fonte: o autor.

As pesagens foram efetuadas em balança analítica digital com precisão de 0,0001 g, marca Mettler Toledo, modelo X5105, com capacidade máxima para 120 g.

As determinações por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama foram realizadas em equipamento da marca Shimadzu, modelo AA-7000. As análises por geração de hidretos e de vapor frio foram realizadas no mesmo equipamento, através da instalação do sistema de geração de vapor HVG-1. Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Ni, Cu e Hg da marca Hamamatsu, As e Pb da marca Hollow Cathode Lamp e Cd da marca Heraeus.

5.2 MATERIAIS E REAGENTES

Para o preparo de todas as soluções e amostras foi utilizada água purificada (com resistividade de 18,2 M Ω cm a 25 °C), em sistema Milli-Q® (Millipore). Os reagentes tioacetamida (Vetec), ácido acético (Neon), hidróxido de amônio (F. Maia), glicerina (Alphatec), ácido clorídrico (Vetec), ácido nítrico (Neon), acetato de amônio (Synth) e hidróxido de sódio (Alphatec), empregados na etapa de determinação de metais pesados por precipitação de sulfetos, são de grau analítico.

Para a decomposição por MW-AD foram utilizados ácido nítrico 65% (m/m) (Merck) purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição em sistema sub-boiling, modelo Distillacid BSB-939-IR (Berghof) e peróxido de hidrogênio 30% (Vetec).

As soluções de calibração empregadas nas determinações por AAS e as soluções dos metais utilizadas nos ensaios de determinação de metais pesados por precipitação de sulfetos foram preparadas através de diluições partindo-se de soluções de referência comercial de concentração 1000 mg L⁻¹, Cádmio (Specsol), Níquel (Alphatec), Chumbo (Specsol), Cobre (Merck), Arsênio (Specsol) e Mercúrio (Specsol). Para os sistemas de geração de hidretos e vapor frio utilizados para a determinação de arsênio e mercúrio, respectivamente, foram utilizados os reagentes borohidreto de sódio (Sigma), ácido clorídrico (Fisher Chemical) e hidróxido de sódio (Alphatec). Para a etapa de pré-redução realizada para a determinação de As foi utilizado iodeto de potássio (Alphatec), ácido ascórbico (Sigma) e ácido clorídrico (Fisher Chemical).

Para as análises por AAS foram utilizados os gases ar comprimido gerado a partir de um compressor, acetileno (pureza \geq 98%) e argônio (pureza \geq 99,99%) fornecidos pela empresa Linde Industrial Gases.

Todos os materiais utilizados neste trabalho foram previamente descontaminados, deixando-os em contato com soluções de HNO₃ 10% (v/v) pelo período mínimo de 24 horas e, após, foram enxaguados com água purificada.

5.3 AMOSTRAS

As amostras de CAP, PROP, ENA, LOS e HID foram adquiridas na farmácia de manipulação Marcela, localizada na Rua Coronel Vicente, nº 620, no Centro de Porto Alegre. Todas as amostras vieram com certificado de análise, isentas de umidade e com granulometria adequada para a execução das análises.

5.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR PRECIPITAÇÃO COM SULFETOS

O método III do “*Ensaio Limite para Metais Pesados*” foi aplicado às amostras dos anti-hipertensivos CAP, ENA, PROP, LOS e HID, conforme metodologia descrita no item 3.2. A etapa de incineração a baixa temperatura foi realizada em chapa de aquecimento a 200°C por aproximadamente 160 minutos. A incineração em mufla seguiu o programa descrito na Tabela 7, com tempo de duração total de 310 minutos.

Tabela 7 – Programação de aquecimento utilizado para decomposição das amostras em forno mufla

Rampa de aquecimento (°C min ⁻¹)	Temperatura	Tempo de permanência (min.)
15	300	60
20	600	180
15	50	-

As etapas de digestão e evaporação em banho-maria foram realizadas a 100 °C.

O padrão de Pb 10 mg L⁻¹ foi preparado a partir da diluição de um padrão de Pb 1000 mg L⁻¹.

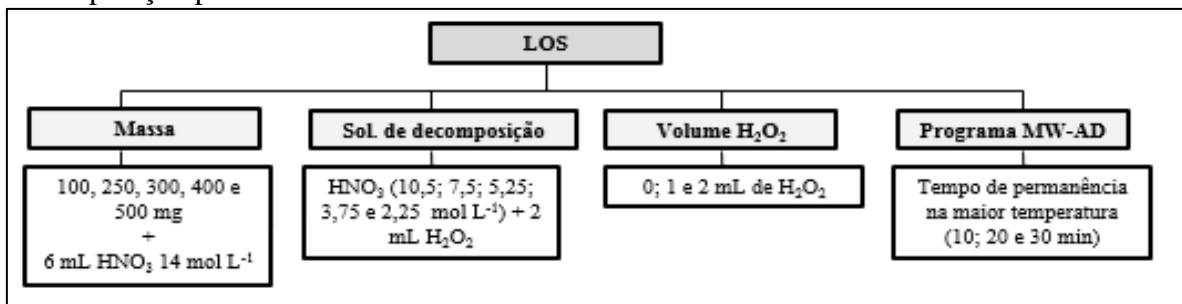
O reagente tioacetamida indicado pela farmacopeia para a precipitação de sulfetos consistiu em uma solução contendo 0,2 mL de tioacetamida 4% e 1 mL de uma mistura de 1,5 mL de NaOH 1 mol L⁻¹, 5 mL de H₂O e 20 mL de glicerina. Este foi aquecido em banho-maria por 20 segundos, resfriado e utilizado imediatamente.

5.5 DECOMPOSIÇÃO DA AMOSTRA ASSISTIDA POR MICROONDAS (MW-AD)

Para a otimização da metodologia de preparo de amostras por MW-AD foi utilizada a amostra LOS por apresentar dois anéis aromáticos na sua estrutura, o que poderia dificultar a decomposição, e por ter apresentado maior dificuldade de digestão na metodologia indicada pela Farmacopeia Brasileira (método III).

Os parâmetros avaliados para o desenvolvimento do método de decomposição por MW-AD com ácido diluído foram massa de amostra, concentração de HNO_3 , volume de H_2O_2 e o programa de aquecimento do forno de micro-ondas, conforme fluxograma apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma dos parâmetros avaliados para desenvolvimento do método de decomposição por MW-AD.



Fonte: o autor.

Inicialmente, foram avaliadas massas de 100, 250, 300, 400 e 500 mg de amostra com a adição de HNO_3 14 mol L^{-1} . A avaliação da eficiência de decomposição foi feita visualmente, onde somente amostras límpidas, sem a presença de sólidos residuais, foram consideradas com decomposição satisfatória.

Foi utilizada a massa da amostra otimizada anteriormente para avaliar a concentração de HNO_3 (10,5; 7,5; 5,25; 3,75 e 2,25 mol L^{-1}) juntamente com 2 mL H_2O_2 30% (m/m). Após isso, o emprego do HNO_3 diluído foi avaliado sem o uso de H_2O_2 e com adição de 1 mL de H_2O_2 . Para todas as avaliações, foi mantido o volume mínimo de 6 mL de solução, conforme recomendação do fabricante.

Na Tabela 8 estão descritos os programas de aquecimento utilizados para a decomposição de fármacos por MW-AD. Todos os testes descritos anteriormente foram realizados utilizando o Programa 1 de aquecimento. Para otimização do tempo de digestão foram avaliados dois outros programas de aquecimento, Programa 2 e Programa 3. A

descontaminação dos frascos de quartzo foi executada com a adição de 6 mL de HNO₃ 65% (m/m) destilado e submetidos ao programa de aquecimento para descontaminação.

Tabela 8 – Programas de aquecimento avaliados para a decomposição de fármacos por MW-AD empregando ácido diluído.

Programa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo de permanência (min)	Ventilação (min)	Tempo total (min)
1	1400	10	30	20	60
2	1400	10	20	20	50
3	1400	10	10	20	40
Descontaminação	1400	5	15	20	40

Todas as soluções resultantes dos processos de digestão foram transferidas para frascos de polipropileno e o volume foi aferido a 25 mL com água ultrapura.

5.6 Determinação de metais pesados por espectrometria de absorção atômica

Os analitos Cd, Ni, Pb e Cu foram analisados por F AAS, As por HG AAS e Hg por CV AAS. Todas as análises por atomização em chama utilizaram chama ar-acetileno.

As análises de As e Hg utilizaram o agente redutor NaBH₄ 0,4% em NaOH 0,5% e HCl 5 mol L⁻¹. O fluxo de cada um destes reagentes foi de 2 mL min⁻¹ e o fluxo de amostra de 5 mL min⁻¹. Entre cada uma das amostras e padrões foi realizada a limpeza com água ultrapura. A análise de Hg foi realizada com a chama desligada e de As com a chama ar-acetileno ligada.

Para as determinações de As foi realizada uma etapa de redução antes da análise por HG AAS, uma vez que no preparo das amostra foram utilizados reagentes oxidantes fortes. Esta etapa foi realizada através da adição de 5% de KI, 1% de ácido ascórbico e 1,2 mol L⁻¹ de HCl³⁴ às amostras e aos padrões analíticos.

Utilizando soluções intermediárias preparadas a partir de padrões 1000 mg mL⁻¹ foram feitas curvas de calibração com 5 concentrações diferentes para cada analito. Para Ni e Pb as curvas foram preparadas na faixa de 0,25 a 1,5 mg L⁻¹, para Cu de 0,1 a 1 mg L⁻¹, para Cd de 0,05 a 1 mg L⁻¹, para As de 0,5 a 4 µg L⁻¹ e para Hg de 1 a 5 µg L⁻¹.

A Tabela 9 apresenta os parâmetros instrumentais utilizados para estas análises

Tabela 9 – Parâmetros instrumentais das análises por AAS.

	Cd	Ni	Pb	Cu	As	Hg
Modo	Chama	Chama	Chama	Chama	Geração de hidretos	Geração de vapor frio
Comprimento de onda (nm)	228,8	232	283,3	324,8	193,7	253,7
Corrente da lâmpada (mA)	8	12	10	8	12	4
Tipo de chama	Ar – C ₂ H ₂	Ar – C ₂ H ₂	Ar – C ₂ H ₂	Ar – C ₂ H ₂	Ar – C ₂ H ₂	-
Altura do queimador (mm)	7	7	7	7	16	18
Fluxo C₂H₂ (mL min⁻¹)	1,8	1,6	2	1,8	2	-
Fluxo ar comprimido (mL min⁻¹)	15	15	15	15	15	-
Fluxo argônio (mL min⁻¹)	-	-	-	-	70	70

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

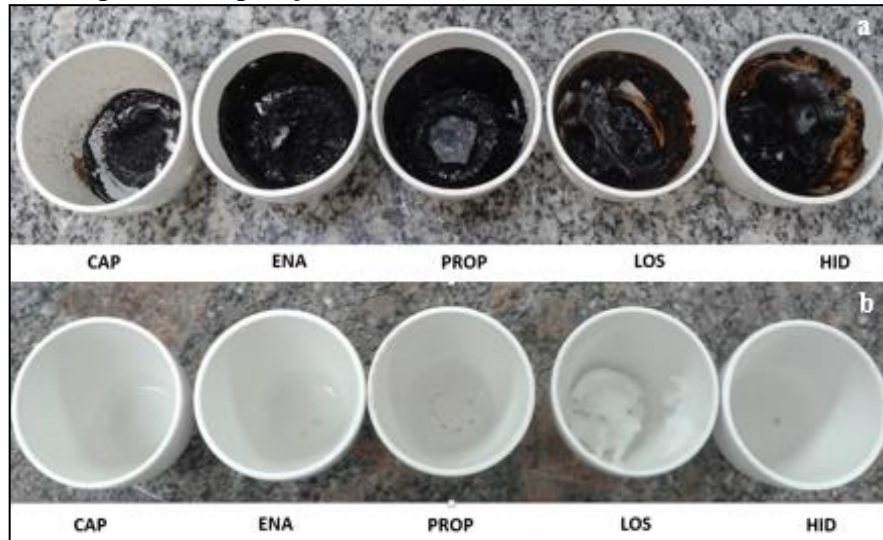
6.1 DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR PRECIPITAÇÃO DE SULFETOS

Inicialmente, a determinação de metais foi feita pelo método recomendado pela Farmacopeia Brasileira através do *Ensaio Limite para Metais Pesados*. Os ensaios foram feitos, conforme descrito no item 5.4 para todas as amostras dos anti-hipertensivos estudadas neste trabalho.

As amostras passaram por calcinação em chapa de aquecimento a 200°C, por aproximadamente 160 minutos. Após, foram calcinadas em mufla, onde permaneceram 180

minutos a 200°C. Os resultados dos cadinhos com as amostras após a calcinação em chapa e após a calcinação em mufla podem ser observados na Figura 7:

Figura 7 – Cadinhos antes da decomposição em mufla e após serem calcinados em chapa de aquecimento (a) e após decomposição em mufla (b).

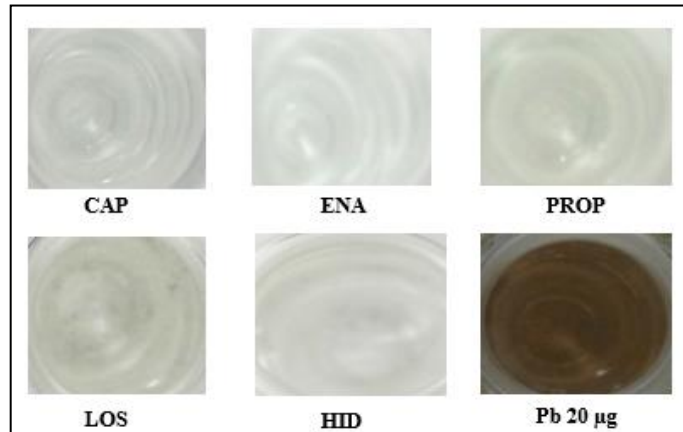


Fonte: o autor.

Avaliando a Figura 5, percebe-se que a amostra LOS apresentou maior quantidade de material sólido após a digestão em forno mufla do que as outras amostras. Tendo em vista que esta etapa consistiu em reproduzir o método de preparo de amostra indicado na Farmacopeia Brasileira, não foi aplicado um tempo maior de decomposição (ou temperatura maior) para a LOS.

Em seguida, os cadinhos passaram por digestão ácida em banho-maria e foi ajustado o pH da solução resultante entre 3,0 e 4,0. Por fim, foram adicionados tampão acetato pH 3,5 e tioacetamida. Após 2 minutos foi realizada a comparação de cor entre as amostras e o padrão de Pb 20 µg (Figura 8):

Figura 8 - Precipitados obtidos no *Ensaio Limite para Metais Pesados* conforme Método III da Farmacopeia Brasileira para as amostras de fármacos anti-hipertensivos.

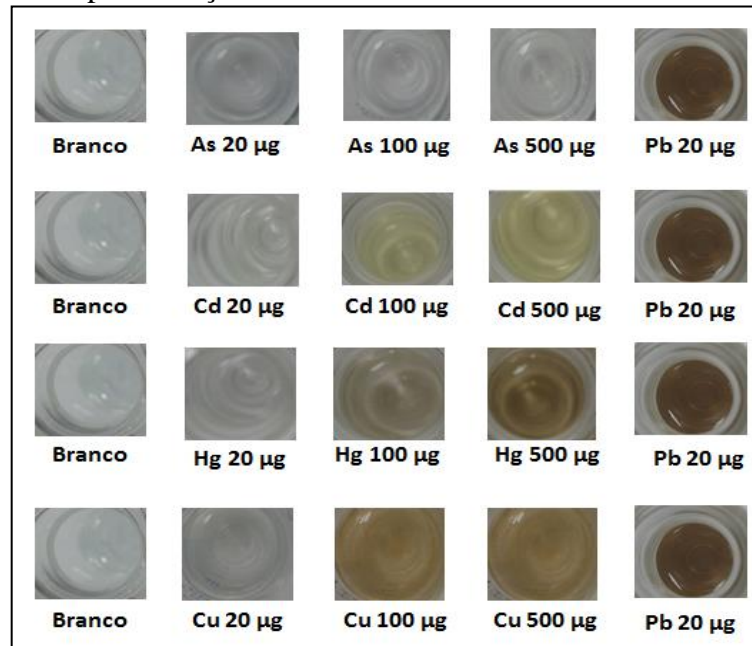


Fonte: o autor.

Analisando a Figura 6, nenhuma das amostras apresentou coloração mais intensa do que o padrão de Pb 20 µg. Desta forma, pelos resultados obtidos, é possível supor que os fármacos investigados não apresentam os metais As, Ag, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn em sua composição.

Para avaliação da efetividade da metodologia de determinação de metais através da precipitação de sulfetos, foi realizado o mesmo procedimento aplicado ao padrão Pb 20 µg – ajuste de pH, adição de tampão acetato pH 3,5 e tioacetamida e volume final de 50 mL - para soluções analíticas de alguns dos metais que deveriam responder ao teste, sendo estes As, Cd, Hg e Cu. As concentrações avaliadas foram 20, 100 e 500 µg. A Figura 9 apresenta os resultados:

Figura 9 - Precipitados obtidos no Ensaio Limite para Metais Pesados conforme Método III da Farmacopeia Brasileira para soluções de diferentes analitos.



Fonte: o autor.

Com relação a Figura 9, é possível perceber que As não apresentou nenhuma coloração mesmo em concentração 25 vezes superior ao padrão de 20 µg de Pb utilizado como referência para os fármacos estudados. Os analitos Cd, Hg e Cu apresentaram coloração a partir da concentração de 100 µg, contudo muito inferior a coloração do padrão de Pb. Sendo assim, é possível concluir que se a amostra estiver contaminada com As, Cd, Hg e Cu em concentrações acima do limite permitido (ou até mesmo combinações destes), o teste não será capaz de detectar, representando um falso negativo.

A fim de realizar a quantificação dos metais pesados presentes nas amostras de CAP, ENA, PROP, LOS e HID preparadas por decomposição em mufla, foram pesadas as quantidades estipuladas pela farmacopeia de cada amostra em cadinhos de porcelana. Estes foram submetidos a calcinação em chapa, seguida de calcinação em mufla e digestão em banho-maria, conforme item 4.4. Após, as amostras foram transferidas para frascos de polipropileno e o volume foi aferido a 50 mL. Os analitos Cd, Cu, Ni e Pb foram analisados por F AAS, As por HG AAS e Hg por CV AAS.

Os LDs e LQs deste método foram calculados através da multiplicação do desvio padrão de 10 leituras do branco por 3 e por 10, respectivamente, somado ao valor médio do branco. Os LDs e LQs podem ser observados na Tabela 10 e os resultados das amostras na Tabela 11.

Tabela 10 – LDs e LQs para o método de preparo utilizando mufla e quantificação por F AAS, HG AAS e CV AAS.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ^b ($\mu\text{g g}^{-1}$)
			CAP e PROP	ENA, LOS e HID
Cd	3,479	11,595	0,580	0,290
Ni	11,993	39,976	1,999	0,999
Pb	62,390	168,768	8,438	4,219
Cu	7,233	24,111	1,206	0,603
As	0,190	0,632	0,0316	0,0158
Hg	0,206	0,306	0,0153	0,00764

^a: LQ para CAP e PROP, cuja massa pesada foi 1g.

^b: LQ para ENA, LOS e HID, cuja massa pesada foi 2g.

Tabela 11 – Concentração de metais nas amostras dos anti-hipertensivos (n=2) utilizando o preparo da amostra por decomposição em mufla e as determinação por F AAS, HG AAS e CV AAS.

Amostra	Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	As ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$)
CAP	< 0,580*	< 1,999*	< 8,438*	< 1,206*	< 0,0316*	< 0,0158*
ENA	< 0,290*	< 0,999*	< 4,219*	< 0,603*	< 0,0158*	< 0,00764*
PROP	< 0,580*	< 1,999*	< 8,438*	< 1,206*	< 0,0316*	< 0,0158*
LOS	< 0,290*	< 0,999*	< 4,219*	< 0,603*	< 0,0158*	< 0,00764*
HID	< 0,290*	< 0,999*	< 4,219*	< 0,603*	< 0,0158*	< 0,00764*

* Limite de quantificação obtido após decomposição em forno mufla e determinação por AAS.

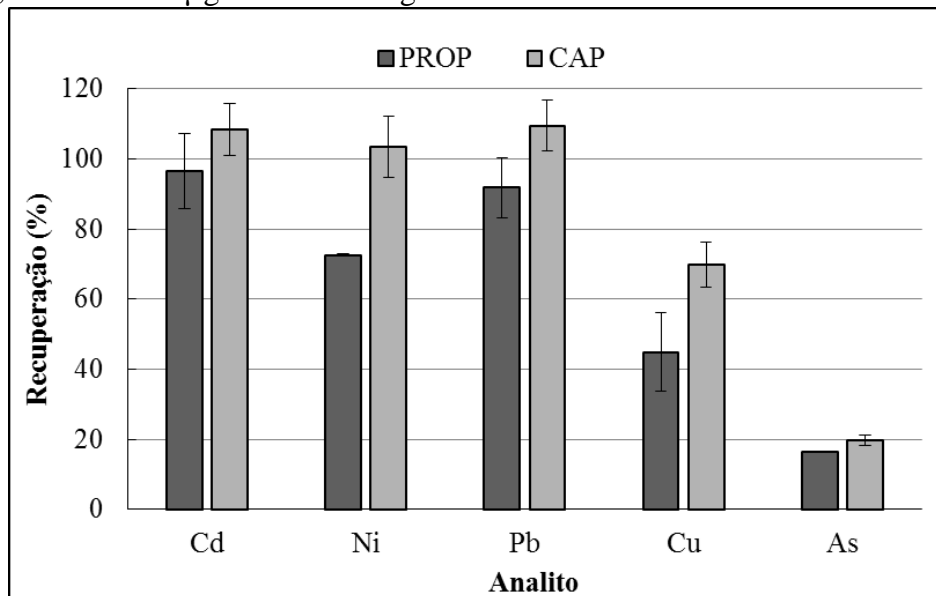
Analisando a Tabela 11, todas as amostras apresentaram concentrações abaixo dos LQs para todos os analitos.

Considerando que foram pesados em torno de 2 g das amostras de ENA, LOS e HID, cujo limite para metais pesados é $10 \mu\text{g g}^{-1}$ e 1 g das amostras de CAP e PROP, cujo limite é $20 \mu\text{g g}^{-1}$ e o volume de aferição final das amostras foi de 50 mL, tem-se uma concentração máxima de metais pesados de $400 \mu\text{g L}^{-1}$. Sendo assim, os LQs dispostos na Tabela 10 estão adequados para a quantificação destes analitos.

Apesar do procedimento de preparo de amostra em mufla apresentar boa eficiência de decomposição, pode estar sujeito a problemas de perdas e contaminação pelo fato de se tratar de um sistema aberto e que envolve elevadas temperaturas. A fim de avaliar a eficiência desse processo de digestão, foram realizados ensaios de recuperação dos analitos As, Hg, Cd, Cu, Ni e Pb. As amostras escolhidas para essa avaliação foram CAP e PROP, onde PROP apresenta

cloro em sua estrutura, diferente de CAP, possibilitando a avaliação da perda dos analitos pela formação de cloretos voláteis. Foram pesados em cadinho de porcelana 1 g de cada amostra e foram adicionadas concentrações de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ dos analitos Cd, Cu, Ni e Pb e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos As e Hg. Após completa absorção dos volumes adicionados, foram realizados os mesmos procedimentos de preparo e de quantificação realizados para as amostras decompostas em forno mufla e quantificadas por AAS. A Figura 10 apresenta os resultados de recuperação obtidos para esta metodologia.

Figura 10 - Recuperações obtidas após a decomposição de PROP e CAP em mufla conforme Método III da Farmacopeia Brasileira (n=2). As quantidades adicionadas foram $0,700 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd, Ni, Pb e Cu e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de As e Hg.



Foram consideradas recuperações adequadas aquelas entre 80 e 120%. Analisando a Figura 10, recuperações satisfatórias foram obtidas para Pb e Cd para ambas as amostras, que variaram 91,78 a 109,5% para Pb e 96,54 a 108,4% para Cd. Conforme a literatura¹³, estes analitos, apesar de voláteis, costumam apresentar recuperações quantitativas quando submetidos a este tipo de método de preparo de amostra. Para Ni, a recuperação só foi satisfatória para CAP. Por outro lado, recuperações em torno de 72,5% foram obtidas para PROP. Para os analitos Cu, As e Hg as recuperações não foram aceitáveis para nenhuma das amostras, sendo inferiores a 69,76% para Cu e inferiores a 19,85% para As.

O analito Hg para PROP e CAP apresentou valores de concentração em solução abaixo do LQ após os ensaios de recuperação ($LQ = 0,306 \mu\text{g L}^{-1}$) e, em função disto, não está exposto no gráfico para nenhuma das amostras. Os analitos As e Hg apresentam temperatura de ebulição de 614 e $356,73^\circ\text{C}$, respectivamente³⁵. Em função disto, podem ter sido perdidos durante o

preparo das amostras em forno mufla, já que se trata de um sistema aberto e que empregou temperatura de 600 °C por 180 minutos.

Comparando as recuperações obtidas para cada uma das amostras, foi verificado que para o PROP menores valores de recuperação foram obtidos para todos os elementos estudados. Isso pode ser explicado analisando as estruturas destes fármacos, dispostas anteriormente na Figura 1. Como PROP apresenta cloro em sua composição, diferentemente do CAP, pode ter ocorrido a formação de cloretos voláteis, acarretando perdas por volatilização. Alguns dos possíveis cloretos formados são AsCl_3 , HgCl_2 , PbCl_4 , CdCl_2 , NiCl_2 e CuCl_2 e os seus pontos de ebulição são, respectivamente, 129,85; 303,85; 50; 960; 985 e 993°C³⁵.

Considerando que a metodologia para a determinação de metais através da precipitação por sulfetos não é eficiente para os limites estabelecidos pela farmacopeia e que a metodologia de preparo de amostras por decomposição em mufla apresentou perdas significativas de alguns analitos, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos que possam fornecer resultados quantitativos e reprodutíveis que permitam a determinação de metais em fármacos.

6.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA POR DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS EM SISTEMA FECHADO COM USO DE ÁCIDO DILUÍDO

Tendo em vista que o método recomendado pela Farmacopeia Brasileira para determinação de metais pesados baseado no preparo das amostras em mufla e determinação por precipitação de sulfetos não se mostrou adequado, foi desenvolvido um método com decomposição por MW-AD em sistema fechado e uso de ácidos diluídos para os fármacos avaliados. Cabe destacar que este método foi proposto nos últimos anos para decomposição de amostras e só foram encontrados trabalhos na literatura para decomposição de amostras de alimentos³⁶⁻⁴¹, plantas medicinais²⁰, biológicas^{42,43}, botânicas⁴⁴ e combustíveis²¹.

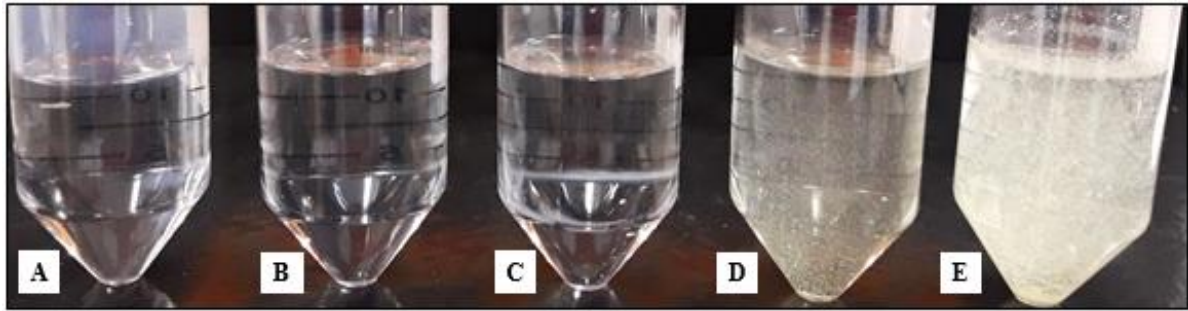
O fármaco LOS foi utilizado para as otimizações em função da estrutura mais complexa e por ter apresentado maior dificuldade de decomposição por mufla, como pode ser observado na Figura 7, apresentada anteriormente. O desenvolvimento da metodologia teve como principal orientação a referência número 21.

6.2.1 Avaliação da massa de amostra

A decomposição em sistema fechado apresenta como principal desvantagem o fato de não ser possível a digestão de massas elevadas de amostra em função da pressão interna que se desenvolve nos frascos de digestão. O primeiro teste de otimização realizado para o método foi a massa de amostra.

As decomposições realizadas com HNO_3 14 mol L^{-1} e seguindo o programa 1 do micro-ondas (Tabela 8) apresentaram resultado satisfatório para as massas de 100, 250 e 300 mg de LOS. A partir de 400 mg as amostras apresentaram precipitado insolúvel, indicando que a decomposição não foi eficiente. Os resultados podem ser observados na Figura 11:

Figura 11 – Amostras com diferentes massas de LOS decompostas conforme programa 1 do micro-ondas e HNO_3 14 mol L^{-1} , sendo 100 mg (A), 250 mg (B), 300 mg (C), 400 mg (D) e 500 mg (E).



Fonte: o autor

Sendo assim, a massa de amostra escolhida para realizar as otimizações posteriores foi de 300 mg.

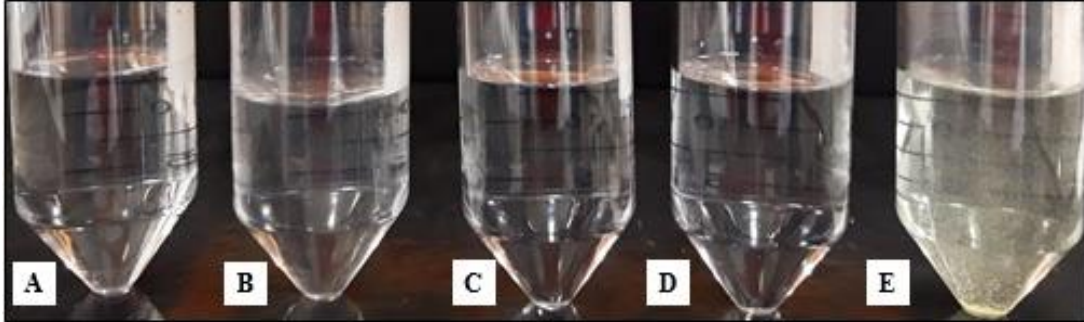
6.2.2 Avaliação da concentração de HNO_3 na presença H_2O_2

A utilização de ácidos diluídos traz inúmeros benefícios, entre eles a diminuição de custos com reagentes, a geração de resíduos menos perigosos e maior segurança para o analista durante o preparo. A obtenção de soluções ácidas mais diluídas também diminui os danos ao equipamento, aumentando a sua vida útil.¹⁶ A utilização de HNO_3 diluído na presença de oxigênio, acarreta a regeneração do HNO_3 , promovendo uma decomposição eficiente mesmo com uso de ácido diluído.

Considerando isto, amostras de 300 mg de LOS foram digeridas utilizando o programa 1 do micro-ondas (Tabela 8) e soluções de decomposição compostas por HNO_3 diluído na

presença de 2 mL de H_2O_2 . A Figura 12 apresenta os resultados obtidos utilizando diferentes concentrações de ácido nítrico:

Figura 12 – Amostras de 300 mg de LOS decompostas com diferentes concentrações de HNO_3 e 2 mL de H_2O_2 , utilizando o programa 1 do micro-ondas. HNO_3 10,5 mol L^{-1} (A), HNO_3 7,5 mol L^{-1} (B), HNO_3 5,25 mol L^{-1} (C), HNO_3 3,75 mol L^{-1} (D) e HNO_3 2,25 mol L^{-1} (E).



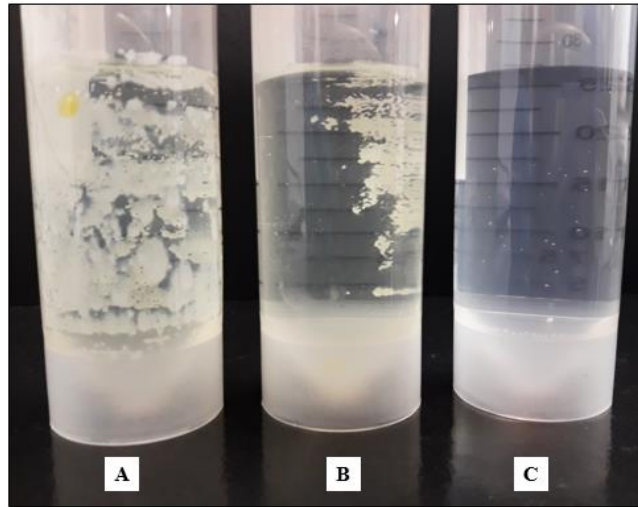
Fonte: o autor.

As soluções que apresentaram boa eficiência de digestão combinadas com 2 mL de H_2O_2 foram HNO_3 10,5 mol L^{-1} , 7,5 mol L^{-1} , 5,25 mol L^{-1} e 3,75 mol L^{-1} . A solução com HNO_3 2,25 mol L^{-1} apresentou sólidos insolúveis, indicando que a decomposição não foi eficiente. Sendo assim, a concentração de ácido nítrico escolhida para os testes posteriores foi 3,75 mol L^{-1} .

6.2.3 Avaliação do volume de H_2O_2 na eficiência de decomposição empregando HNO_3 diluído

A fim de avaliar a influência do H_2O_2 na eficiência da digestão, foram realizadas digestões variando o volume deste reagente e, conseqüentemente, a concentração de O_2 no meio reacional, já que esta espécie é uma das responsáveis pela regeneração do HNO_3 em sistemas fechados. Foram realizadas decomposições de 300 mg de LOS utilizando o programa 1 do micro-ondas (Tabela 8) e soluções de HNO_3 3,75 mol L^{-1} na ausência de H_2O_2 e com adição de 1 mL ou 2 mL de H_2O_2 . A Figura 13 apresenta os resultados obtidos para este teste.

Figura 13 – Amostras de 300 mg de LOS digeridas utilizando o programa 1 do micro-ondas com HNO_3 3,75 mol L^{-1} (sem adição de H_2O_2) (A), HNO_3 3,75 mol L^{-1} com 1 mL de H_2O_2 (B) e HNO_3 3,75 mol L^{-1} com 2 mL de H_2O_2 (C).



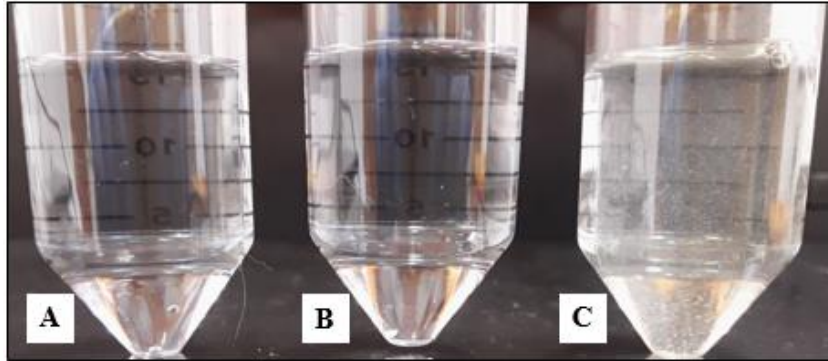
Fonte: o autor.

Analisando a Figura 13, é possível perceber que somente a solução de decomposição composta por HNO_3 3,75 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 foi eficiente para a decomposição da amostra, mostrando que a presença de H_2O_2 é fundamental para garantir a completa decomposição com HNO_3 diluído, em função da regeneração do ácido promovida. Além disso, a concentração de O_2 disponível no meio é importante para que a decomposição seja satisfatória.

6.2.4 Avaliação do Programa de digestão

Amostras de 300 mg de LOS foram digeridas utilizando solução de decomposição composta por HNO_3 3,75 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 nos programas 1, 2 e 3 (Tabela 8), a fim de otimizar o tempo de digestão e de tentar decompor as amostras no menor tempo possível. A diferença entre os programas de digestão está no tempo de permanência na maior temperatura, sendo 30 minutos para o programa 1, 20 minutos para o programa 2 e 10 minutos para o programa 3. A Figura 14 apresenta o resultado dessas decomposições.

Figura 14 – Amostras de 300 mg de LOS decompostas com HNO_3 $3,75 \text{ mol L}^{-1}$ e 2 mL de H_2O_2 nos programas 1 (A), 2 (B) e 3 (C) do micro-ondas.



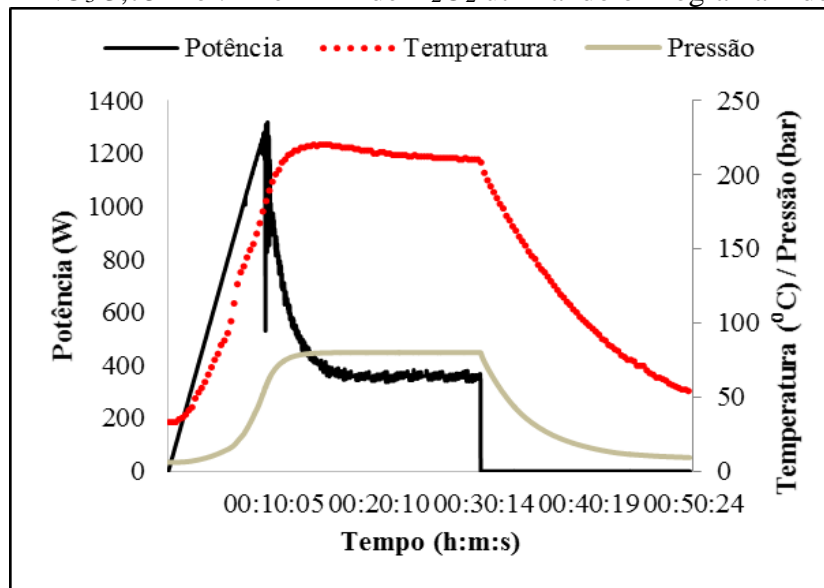
Fonte: o autor

As digestões foram satisfatórias para os programas de digestão 1 (30 min de permanência em 217°C) e 2 (20 min de permanência em 220°C). As amostras digeridas utilizando o programa 3 (10 min de permanência em 213°C) não ficaram límpidas, indicando que a digestão não foi eficiente. Além disto, as digestões realizadas com os programas 1 e 2 atingiram temperatura máxima ligeiramente superior ao programa 3. Conforme esperado, a temperatura máxima atingida e o tempo em que a amostra permaneceu nesta temperatura está relacionado com a eficiência de decomposição.

O programa de decomposição do forno de micro-ondas escolhido foi o 2, uma vez que apresentou decomposição satisfatória e menor tempo do que o programa 1, representando um tempo de digestão total de 50 minutos.

A Figura 15 apresenta um gráfico com o perfil da pressão, temperatura e potência obtidos durante a digestão de 300 mg de LOS com as condições otimizadas.

Figura 15 – Perfil da pressão, temperatura e potência obtido durante a digestão de 300 mg de Losartana com HNO_3 $3,75 \text{ mol.L}^{-1}$ e 2 mL de H_2O_2 utilizando o Programa 2 de digestão.



O gráfico exposto na Figura 15 mostra que a digestão foi bem controlada, onde a pressão e temperatura não ultrapassaram o limite do equipamento, especificados no item 4.1.

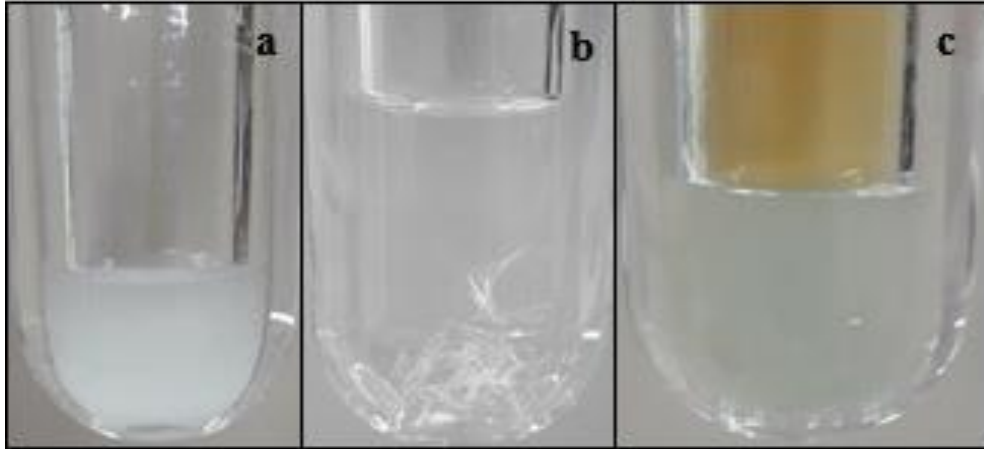
6.2.5 Preparo das amostras dos anti-hipertensivos CAP, ENA, PROP, LOS e HID

Os parâmetros de preparo de amostra otimizados foram 300 mg de amostra, 6 mL de solução de decomposição composta por HNO_3 $3,75 \text{ mol L}^{-1}$ e 2 mL de H_2O_2 e programa 2 de decomposição (Tabela 8), totalizando 50 minutos de preparo no microondas, sendo 20 minutos na temperatura mais alta atingida.

Aplicou-se o método de preparo desenvolvido nas amostras dos anti-hipertensivos CAP, ENA, PROP, LOS e HID.

Entre todas as amostras dos anti-hipertensivos estudados, o método de preparo de amostra desenvolvido para LOS não foi eficiente somente para HID, apresentando material sólido semelhante a cristais após a decomposição. Analisando as características físicas dos fármacos dispostas na Tabela 3, percebe-se que HID é o único que apresenta muito pouca solubilidade em água. Como foi utilizada solução de decomposição composta por HNO_3 bastante diluído, acredita-se que a decomposição não tenha sido eficiente para este fármaco em função disto. Sendo assim, foi realizada a digestão deste fármaco utilizando HNO_3 14 mol.L^{-1} e esta foi satisfatória, conforme pode ser observado na Figura 16.

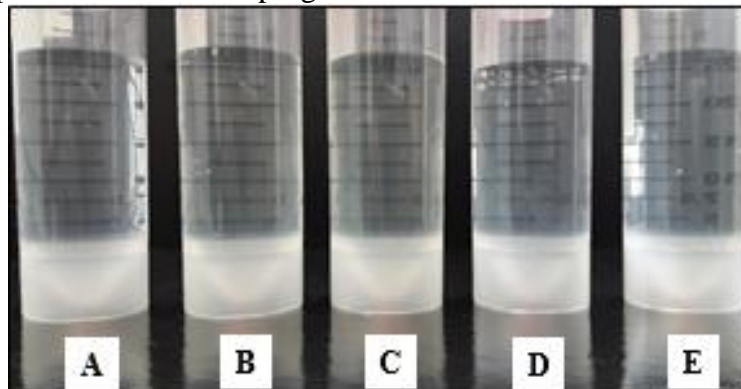
Figura 16 – Amostra de HID antes da decomposição em micro-ondas (a), após a decomposição com HNO_3 3,75 mol L^{-1} + 2 mL de H_2O_2 (b) e após a decomposição com HNO_3 14 mol L^{-1} (c).



Fonte: o autor.

Após decomposição em MW-AD, as amostras foram transferidas para frascos de polipropileno e o volume foi aferido a 25 mL com água ultrapura. A Figura 17 apresenta as amostras dos fármacos anti-hipertensivos após a decomposição em micro-ondas utilizando as condições otimizadas para CAP, ENA, PROP e LOS e modificando somente a concentração do ácido para HNO_3 14 mol L^{-1} para a amostra HID.

Figura 17 – Amostras de CAP (A), ENA (B), PROP (C) e LOS (D) decompostas utilizando o programa 2 do micro-ondas e solução de decomposição de HNO_3 3,75 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 e HID (E) decomposta com o mesmo programa utilizando HNO_3 14 mol L^{-1} .



Fonte: o autor

6.2.6 Recuperação, LD e LQ

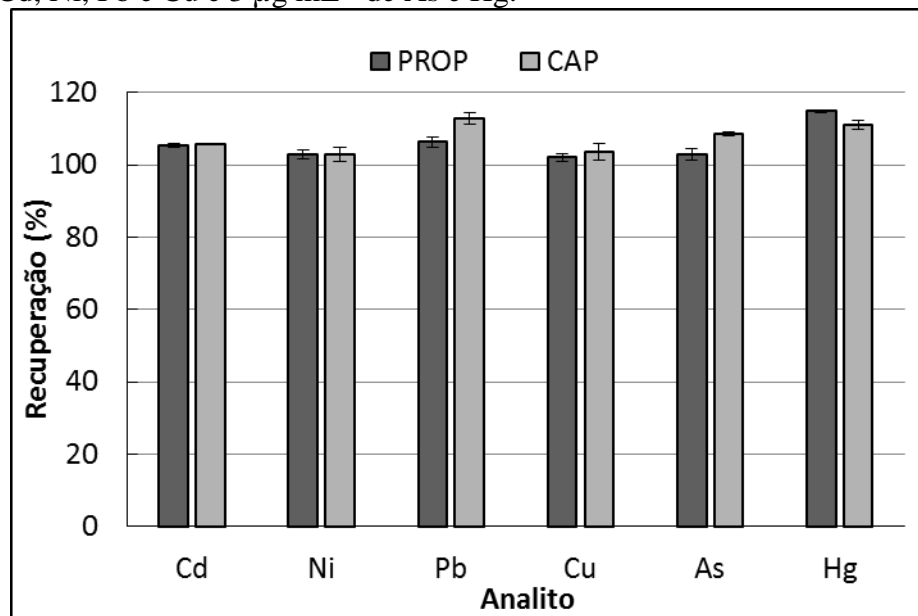
Após a avaliação das melhores condições de decomposição, amostras de CAP e PROP foram utilizadas para a realização de ensaios de recuperação a fim de avaliar o método de decomposição proposto por MW-AD com ácido diluído. Foram escolhidas as mesmas amostras

utilizadas para os ensaios de recuperação do método de preparo por mufla, pelos mesmos motivos expostos anteriormente.

Foram pesadas 300 mg das amostras de CAP e PROP e foram adicionadas concentrações de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ dos analitos Cd, Cu, Ni e Pb e $3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos As e Hg. Após absorção das soluções pelos fármacos, foram adicionadas 6 mL das soluções de decomposição compostas por HNO_3 $3,75 \text{ mol L}^{-1}$ e 2 mL H_2O_2 e as amostras foram submetidas ao programa 2 de digestão. Após decomposição, as amostras foram transferidas para frasco de polipropileno e aferidas a 25 mL com água ultrapura. A quantificação foi realizada por AAS.

As recuperações obtidas para o método otimizado de preparo de amostra estão dispostas na Figura 18.

Figura 18 - Recuperações obtidas após a decomposição de PROP e CAP utilizando o método de preparo de amostras por MW-AD otimizado ($n=2$). As quantidades adicionadas foram $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd, Ni, Pb e Cu e $3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de As e Hg.



Para ambas as amostras foram obtidas recuperações satisfatórias, que variaram de 103 a 115% para PROP e de 103 a 111% para CAP.

Comparando os resultados de recuperação das Figuras 10 e 18, percebe-se que o desvio padrão entre as replicatas das amostras preparadas pelo método otimizado por MW-AD foi muito inferior àquelas preparadas por mufla. O preparo de amostras em sistemas fechados está menos suscetível a perdas por volatilização, por projeção da amostra e a contaminações. Além disso, é um processo que exige menos etapas quando comparado ao método indicado para o

Ensaio Limite para Metais Pesados, diminuindo a possibilidade de perdas ou de contaminações, gerando resultados mais confiáveis e reprodutíveis.

Não foi observada diferença significativa entre as recuperações obtidas para as duas amostras, diferente do que aconteceu para o preparo por mufla, onde a amostra de PROP apresentou resultados de recuperação inferiores para todos os analitos quando comparado as recuperações de CAP.

Na Tabela 12 estão dispostos os LDs e LQs obtidos para a metodologia proposta e as equações da reta e coeficiente de correlação (r) estão na Tabela 13.

Tabela 12 - LDs e LQs obtidos por MW-AD com ácido diluído e quantificação por F AAS, HG AAS e CV AAS.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Cd	2,144	7,145	0,179	0,600
Ni	8,512	8,512	0,710	2,364
Pb	45,590	151,968	3,800	12,664
Cu	3,617	12,055	0,301	1,005
As	0,152	0,505	0,0126	0,0421
Hg	0,128	0,425	0,0106	0,0354

Tabela 13 - Equação da reta e coeficiente de correlação linear obtidos para as curvas padrão dos analitos Cd, Ni, Pb, Cu, As e Hg por F AAS, HG AAS e CV AAS.

Analito	Equação da reta	r
Cd	$y = 0,41985x + 0,0073755$	0,9998
Ni	$y = 0,10573x + 0,0014162$	0,9999
Pb	$y = 0,019741x + 0,00066757$	1,0000
Cu	$y = 0,16590x + 0,0021115$	0,9994
As ^a	$y = 0,050512x + 0,011824$	0,9997
Hg	$y = 0,021170x - 0,0030700$	0,9989

^a: pré-redução com KI 5% (m/v)/ácido ascórbico 1% (m/v) em HCl 1,2 mol L⁻¹.

Considerando que o limite para o *Ensaio Limite para Metais Pesados* é 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ para alguns dos fármacos estudados, que a massa de amostra otimizada para o método proposto foi de 300 mg e que o volume final de amostra foi de 25 mL, tem-se uma concentração máxima permitida de metais pesados 120 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para as amostras cujo limite é de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$, a concentração máxima é de 240 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sendo assim, para as amostras em que o limite é de 10

$\mu\text{g g}^{-1}$, a quantificação de chumbo por absorção atômica com atomização em chama não é indicada, pois apresenta LQ acima do necessário. Neste caso, as alternativas seriam avaliar outros parâmetros do método de preparo de amostras com o objetivo de usar massas maiores de amostra e, assim, diminuir os limites de quantificação ou utilizar técnicas de quantificação mais sensíveis, como GF AAS ou ICP-MS.

Analisado os coeficientes de correlação obtidos para as curvas, pode-se afirmar que elas apresentaram comportamento linear para todos os analitos na faixa de concentração analisada.

6.2.7 Determinação de metais nas amostras de anti-hipertensivos

Na Tabela 14 estão dispostos os resultados das análises dos fármacos anti-hipertensivos através do método de preparo otimizado e determinação por F AAS, HG AAS e CV AAS.

Tabela 14 - Concentração de metais nas amostras dos anti-hipertensivos (n=2) utilizando o preparo da amostra otimizado por MW-AD e determinação por F AAS, HG AAS e CV AAS.

Amostra	Cd ($\mu\text{g/g}$)	Ni ($\mu\text{g/g}$)	Pb ($\mu\text{g/g}$)	Cu ($\mu\text{g/g}$)	As ($\mu\text{g/g}$)	Hg ($\mu\text{g/g}$)
CAP	< 0,600*	< 2,364*	< 12,664*	< 1,005*	< 0,0421*	< 0,0354*
ENA	< 0,600*	< 2,364*	< 12,664*	< 1,005*	< 0,0421*	< 0,0354*
PROP	< 0,600*	< 2,364*	< 12,664*	< 1,005*	< 0,0421*	< 0,0354*
LOS	< 0,600*	< 2,364*	< 12,664*	< 1,005*	< 0,0421*	< 0,0354*
HID	< 0,600*	< 2,364*	< 12,664*	< 1,005*	< 0,0421*	< 0,0354*

* Limite de quantificação obtido após decomposição com MW-AD e determinação por AAS.

Todos os fármacos apresentaram resultado abaixo do LQ para todos os analitos.

6.3 Comparação do tempo de análise

A Tabela 15 apresenta o tempo necessário para realização de cada uma das etapas do método III do Ensaio Limite para Metais Pesados, conforme Farmacopeia Brasileira, e da metodologia proposta por MW-AD e determinação por AAS.

Tabela 15 – Comparação entre o tempo de análise da metodologia indicada pela Farmacopeia Brasileira para a análise dos fármacos anti-hipertensivos e a metodologia proposta para um total de 8 amostras.

Ensaio Limite Metais Pesados – Método 3 Farmacopeia Brasileira		Metodologia por MW-AD e AAS	
Etapa da Metodologia	Tempo (min)	Etapa da Metodologia	Tempo (min)
Incineração em chapa	160	Decomposição por MW-AD	50
Decomposição em mufla	310	Processos posteriores (abrir frascos, transferência das amostras, completar volume)	30
Digestão em banho-maria	60	Determinação por F AAS (Cd, Pb, Ni e Cu)	180
Processos posteriores (ajuste de pH, adição de reagentes, completar volume)	40	Determinação por HG AAS e CV AAS (As e Hg)	160
Somatório	570	Somatório	420
Total (h)	9,5	Total (h)	7,0

Analisando a Tabela 14, percebe-se que a metodologia proposta para a determinação de metais pesados apresenta maior produtividade do que a metodologia indicada pela Farmacopeia Brasileira para a determinação destes fármacos, uma vez que é possível realizar o mesmo número de amostras em menor tempo. O maior ganho de tempo é, com certeza, na etapa de preparo da amostra, onde gasta-se em torno de 1,33 horas para a metodologia proposta e 8,83 h para a metodologia indicada pela farmacopeia.

O tempo total de análise da metodologia proposta poderia ser diminuído consideravelmente se fossem utilizadas técnicas multi-elementares de quantificação, como ICP MS ou ICP OES.

7. ANÁLISE DOS CUSTOS

A Tabela 16 apresenta o levantamento de custo para a implementação desta metodologia. É importante salientar que é necessária a realização da instalação de uma linha de gases adequada (acetileno, argônio e ar comprimido), além da aquisição dos cilindros de gases (cascos) e um compressor para produzir ar comprimido para permitir a determinação dos metais estudados neste trabalho pelas técnicas de AAS. Estes itens não constam no levantamento de preço.

Tabela 16 – Custos envolvidos para a implementação da metodologia para a análise de metais pesados por digestão em MW-AD e quantificação por F AAS, HG AAS e CV AAS.

	Item	Quantidade	Preço (R\$)
Equipamentos	Espectrômetro de Absorção Atômica com atomização em chama e geração de hidretos com lâmpadas de cátodo oco inclusas.	1 unidade	150.000,00
	Micro-ondas de alta pressão com frascos de quartzo	1 unidade	180.000,00
	Purificador de ácidos	1 unidade	17.658,00
	Ultrapurificador de água	1 unidade	22.591,00
Reagentes	Solução Padrão de As 1000 mg L ⁻¹ em 5% HNO ₃	100 mL	175,71
	Solução Padrão de Hg 1000 mg L ⁻¹ em 5% HNO ₃	100 mL	175,71
	Solução Padrão de Pb 1000 mg L ⁻¹ em 5% HNO ₃	100 mL	175,71
	Solução Padrão de Cd 1000 mg L ⁻¹ em 5% HNO ₃	100 mL	175,71
	Solução Padrão de Ni 1000 mg L ⁻¹ em 5% HNO ₃	100 mL	175,71
	Solução Padrão de Cu 1000 mg L ⁻¹ em 5% HNO ₃	100 mL	175,71
	Borohidreto de Sódio	100 g	200,02
	HCl PA	1 L	56,67
	NaOH PA	500 g	73,60
	HNO ₃ 65%	1 L	84,00
	H ₂ O ₂ 30%	1 L	432,67
	Iodeto de Potássio PA	250 g	181,98
	Ácido Ascórbico	100 g	169,00
	Recarga de gás argônio	1 cilindro	995,9
Recarga de gás acetileno	1 cilindro	230,4	
Consumíveis	Vial de 50 mL	Pacote com 50 unidades	29,22

Pipeta Pasteur de plástico	Pacote com 500 unidades	34,30
Micropipeta 10 -100 µL	1 unidade	1214,40
Micropipeta 10 -1000 µL	1 unidade	1152,36
Ponteira universal amarela 2 – 200 µL	Pacote com 1000 unidades	49,48
Ponteira universal azul 100 – 1000 µL	Pacote com 1000 unidades	61,63
Total (R\$)		376.268,89

Considerando que uma mufla e um cadinho de porcelana custam em torno de R\$ 6000,00 e R\$ 15,00, pode-se inferir que a técnica proposta para determinação de metais pesados nos fármacos anti-hipertensivos exige um investimento muito maior quando comparada à técnica indicada pela Farmacopeia para o *Ensaio Limite para Metais Pesados*. Porém, através dela é possível quantificar os metais de forma seletiva e obter resultados confiáveis, onde não há perda dos analitos durante o processo de preparo da amostra. Esta técnica permite que o controle destas impurezas inorgânicas seja realizado de forma mais adequada, trazendo maior segurança para a população que utiliza estes medicamentos. Cabe ressaltar que a metodologia foi desenvolvida em um modelo de forno de micro-ondas de alta pressão pois este era o modelo que havia disponível. No entanto, ela pode ser avaliada em modelos de média pressão, tornando o investimento financeiro menor.

A Tabela 17 apresenta a quantidade de reagentes e consumíveis utilizados para a análise de uma amostra, juntamente com as curvas analíticas.

Tabela 17 – Levantamento de custos para a análise de uma amostra e das curvas padrão.

Item	Quantidade/ amostra	Quantidade Curvas (Cd, Ni, Pb, Cu, As e Hg)	Custo (R\$) de uma amostra	Custo (R\$) Curvas
HNO ₃	1,6 mL	-	0,134	-
H ₂ O ₂	2 mL	-	0,865	-
KI	0,75 g	3,75	0,546	2,730
Ácido Ascórbico	0,15 g	0,75	0,254	1,268
HCl PA	0,86 mL	5,82 mL	0,0487	0,330

Pipeta Pasteur	1 un.	-	0,0686	-
Vial de 50 mL	2 un.	35 un.	1,17	20,45
NaBH ₄	0,08 g	0,8 g	0,160	1,600
NaOH PA	0,02 g	0,2 g	0,00294	0,0294
Padrão As 1000 mg mL ⁻¹	-	0,5 mL	-	0,879
Sol. Padrão Hg 1000 mg mL ⁻¹	-	0,5 mL	-	0,879
Sol. Padrão Cd 1000 mg mL ⁻¹	-	5 mL	-	8,785
Sol. Padrão Pb 1000 mg mL ⁻¹	-	5 mL	-	8,785
Sol. Padrão Ni 1000 mg mL ⁻¹	-	5 mL	-	8,785
Sol. Padrão Cu 1000 mg mL ⁻¹	-	5 mL	-	8,785
Total Análise de uma amostra (R\$)			66,55	

Analisando os custos, percebe-se que o item que agregou maior valor à análise foram os vial de 50 mL, porém estes podem ser descontaminados de maneira adequada e utilizados novamente. A quantidade das soluções padrão dos analitos expressa na tabela está relacionada ao preparo de soluções intermediárias, sendo que estas não necessitam ser preparadas diariamente, mas mensalmente quando adicionadas a 5% de HNO₃. Não foram contabilizados neste levantamento o gasto com gases nem o valor da mão de obra do analista.

8. CONCLUSÕES

Com base no estudo realizado, pode-se afirmar que os procedimentos farmacopeicos indicados para a determinação de metais pesados nos fármacos anti-hipertensivos captopril, maleato de enalapril, cloridrato de propranolol, losartana potássica e hidroclorotiazida apresentam problemas relacionados às etapas de preparo e de determinação. O ensaio de recuperação realizado evidenciou a perda de elementos durante a decomposição em forno mufla, especialmente dos mais voláteis como As e Hg. A determinação de metais através da precipitação de sulfetos utilizando soluções analíticas dos elementos As, Cd, Hg, Cu e Pb demonstrou a fragilidade desta técnica não seletiva, onde somente o analito Pb, utilizado como padrão neste tipo de teste, respondeu de forma eficiente. O analito As não apresentou coloração mesmo em concentração 25 vezes superior ao limite máximo permitido. Os analitos Cd, Hg e Cu apresentaram coloração em concentrações 5 vezes maiores do que limite máximo permitido, contudo muito inferior a coloração do padrão de Pb. Sendo assim, foi possível concluir que se a amostra apresentar os metais As, Cd, Hg e Cu em concentrações acima do limite permitido, o teste não será capaz de detectar, representando um falso negativo.

O preparo de amostra através de decomposição por via úmida assistida por micro-ondas com ácido diluído foi eficiente para 300 mg dos fármacos CAP, ENA, PROP e LOS, utilizando HNO_3 3,75 mol L⁻¹ e 2 mL de H_2O_2 . Em função da sua pouca solubilidade em água, a digestão do fármaco HID não foi possível nestas condições, sendo necessária a utilização de HNO_3 14 mol L⁻¹. As decomposições por MW-AD com ácido diluído apresentaram recuperações satisfatórias para os elementos determinados, que variaram de 103 a 115% para PROP e de 103 a 111% para CAP. Os analitos As e Hg apresentaram recuperações quantitativas, diferente do que foi observado para a digestão por forno mufla (método indicado na Farmacopeia Brasileira).

Os LQs obtidos por MW-AD com ácido diluído e F AAS para os analitos Cd, Ni, Cu foram adequados para a determinação destes metais nos fármacos estudados. Por outro lado, o analito Pb apresentou LQ superior ao necessário para a determinação em fármacos cujo limite máximo estabelecido na Farmacopeia Brasileira é de 10 $\mu\text{g g}^{-1}$. Neste caso, uma alternativa seria a utilização de técnicas de quantificação mais sensíveis, como GF AAS ou ICP-MS ou aprimorar o método de decomposição por MW-AD com ácido diluído para aumentar a massa de amostra e, conseqüentemente, melhorar os limites de quantificação.

Os LQs para os analitos Hg e As, determinados por CV AAS e HG AAS, foram satisfatórios para a quantificação nos fármacos anti-hipertensivos estudados.

As amostras analisadas através da metodologia otimizada apresentaram concentrações de Cd, Ni, Cu, Pb, As e Hg abaixo dos LQs obtidos por MW-AD com ácido diluído e determinação por AAS.

A metodologia desenvolvida apresenta menor tempo de execução quando comparada ao ensaio indicado pela Farmacopeia Brasileira para os fármacos estudados. Este tempo poderia ser otimizado ainda mais caso fossem utilizadas técnicas multi-elementares de quantificação, como ICP-MS ou ICP OES.

A metodologia proposta para determinação de metais pesados nos fármacos anti-hipertensivos exige maior treinamento do analista e maior investimento financeiro quando comparada à técnica indicada pela Farmacopeia para o *Ensaio Limite para Metais Pesados*. Contudo, a técnica proposta permite que o controle da concentração de metais seja realizado de forma mais adequada, trazendo maior a segurança para a população que utiliza estes medicamentos de forma contínua. Cabe ressaltar que na literatura não há trabalhos publicados utilizando decomposição por MW-AD com ácido diluído para decomposição de fármacos e o desenvolvimento do trabalho poderá contribuir neste sentido.

REFERÊNCIAS

1. FERREIRA, Reginara Alves; BARRETO, Sandhi Maria; GIATTI, Luana. Self-reported hypertension and non-adherence to continuous-use medication in Brazil: a population-based study. **Cadernos de saúde pública**, v. 30, n. 4, p. 815-826, 2014.
2. Lei Nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33864/284972/lei_6360.pdf/5330c06d-1c17-4e1e-8d21-d7e3db4d3ce4>. Acesso em: 28 de maio de 2018.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Farmacopeia Brasileira**, 5ª Ed., Cap. Métodos gerais - 5.3.2.3. Ensaio limite para metais pesados, Brasil, 2010.
4. **The United States Pharmacopeia: The National Formulary**, USP 36/NF 31, USP Convention, Rockville, Chapter 231, Heavy elements; 2013.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Farmacopeia Brasileira**, 5ª Ed., Monografias, Brasil, 2010.
6. HOENIG, Michel; DE KERSABIEC, Anne-Marie. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 51, n. 11, p. 1297-1307, 1996.
7. MÜLLER, Aline Lima Hermes et al. **Determinação de impurezas elementares em fármacos e estudo de interferências em ICP-MS após decomposição em sistema de alta pressão e por combustão iniciada por micro-ondas**; Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2014.
8. BASAK, A. K.; RAW, A. S.; YU, L. X. Pharmaceutical impurities: analytical, toxicological and regulatory perspectives. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 1, p. 1, 2007.
9. GOROG, Sándor. The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 8, 2006.
10. GÖRÖG, Sándor (Ed.). **Identification and determination of impurities in drugs**. 1 Ed. Holanda: Elsevier, 2000. 733 p.
11. International Conference on Harmonisation of Thechnical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Elemental Impurities Q3D 2013. Disponível em http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3D/Q3D_Step2b.pdf>. Acesso em: 28 de maio de 2018.
12. BARIN, Juliano S. et al. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 17, p. 4547-4566, 2016.
13. MALTA, Deborah Carvalho et al. A vigilância e o monitoramento das principais doenças crônicas não transmissíveis no Brasil-Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 3-16, 2015.
14. SERRATE MENGUE, Sotero et al. Acesso e uso de medicamentos para hipertensão arterial no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 2, 2016.
15. VOGEL, A. **Química Analítica Qualitativa**. 5ª Ed. São Paulo. Mestre Jou. 1981. 659.
16. RAGHURAM, P.; RAJU, I. V.; SRIRAMULU, J. Heavy metals testing in active pharmaceutical ingredients: an alternate approach. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 1, p. 15-18, 2010.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Farmacopeia Brasileira**, 5ª Ed., Monografias. Antimoniato de Meglumina, Brasil, 2010.

18. BARIN J., S.; **Desenvolvimento de procedimentos alternativos para a determinação de metais pesados em fármacos tricíclicos**; Tese de doutorado; Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2007.
19. FLORES, Érico MM et al. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels—a brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 1051-1064, 2007.
20. MULLER, Aline LH et al. Microwave-assisted digestion using diluted acids for toxic element determination in medicinal plants by ICP-MS in compliance with United States pharmacopeia requirements. **Analytical Methods**, v. 7, n. 12, p. 5218-5225, 2015.
21. BARELA, P. S. et al. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS. **Fuel**, v. 204, p. 85-90, 2017.
22. Francisco José Krug. Workshop sobre prepare de amostras UFSM: Decomposições assistidas por radiação microondas. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/47656>>. Acesso em: 27 de maio de 2018.
23. BIZZI, Cezar A. et al. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 2, p. 193-196, 2011.
24. BIZZI, Cezar A. et al. Microwave-Assisted Oxidation of Organic Matter Using Diluted HNO₃ under O₂ Pressure: Rationalization of the Temperature Gradient Effect for Acid Regeneration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 9, p. 1673-1681, 2017.
25. BIZZI, Cezar A. et al. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 2, p. 332-338, 2014.
26. Francisco José Krug et al. Espectrometria de absorção atômica: Fundamentos e atomização com chama. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/AAS-geral-parte-1-revisada.pdf>>. Acesso em: 02 de junho de 2018.
27. BALARAM, V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals—status, challenges and moving frontiers. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 83-95, 2016.
28. DERKACH, Tetiana M.; BAULA, Olga P. Pharmacopoeia methods for elemental analysis of medicines: a comparative study. **Вісник Дніпропетровського університету. Серія: Хімія**, 2017.
29. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Farmacopeia Brasileira**, 5º Ed., Cap. Métodos gerais - 5.3.13. Espectrometria Atômica, Brasil, 2010.
30. TAKASE, Iracema et al. A geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1132-1144, 2002.
31. BARRA, Cristina Maria et al. Arsenic speciation—A review. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 58-70, 2000.
32. PEREIRA, Mariana Dutra. **Desenvolvimento de métodos para determinação de espécies de arsênio em amostras de resíduos oleosos de petróleo por HG-AAS**; Trabalho de Conclusão de Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2017.
33. YAN, Xiu-Ping; NI, Zhe-Ming. Vapour generation atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 291, n. 1-2, p. 89-105, 1994.
34. CERVEIRA, Camila. **Especiação química de arsênio inorgânico em arroz por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos**; Tese de doutorado;

- Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2015.
35. Lide, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**. 84 ed. CRC Press. 2003. 2475 p.
 36. CASTRO, Jacira T. et al. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 78, n. 4-5, p. 1378-1382, 2009.
 37. BIZZI, Cezar A. et al. Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 5, p. 394-398, 2011.
 38. BARBOSA, José Tiago P. et al. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. **Food chemistry**, v. 175, p. 212-217, 2015.
 39. MARTINS, Camila Alves et al. Metal determination in tea, wheat, and wheat flour using diluted nitric acid, high-efficiency nebulizer, and axially viewed ICP OES. **Food analytical methods**, v. 8, n. 7, p. 1652-1660, 2015.
 40. SOUZA, Silvéria NP; NASCENTES, Clésia C.; COSTA, Letícia M. Validation of a microwave-assisted digestion procedure of pâté samples using diluted HNO₃ for Fe and Zn determination by FS FAAS. **Analytical Methods**, v. 5, n. 22, p. 6411-6415, 2013.
 41. TARANTINO, Taiana B. et al. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for multi-element determination in rice by ICP OES and ICP-MS. **Food analytical methods**, v. 10, n. 4, p. 1007-1015, 2017
 42. GONZALEZ, Mário H. et al. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 396-401, 2009.
 43. BIZZI, Cezar A. et al. Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure. **Analytica chimica acta**, v. 837, p. 16-22, 2014.
 44. BIZZI, Cezar Augusto et al. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1324-1328, 2011.