



UFSM

Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS
ALTERNATIVOS DE PREPARO E DE
DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM
FÁRMACOS TRICÍCLICOS**

Juliano Smanioto Barin

PPGQ

Santa Maria, RS – Brasil

2007

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS
ALTERNATIVOS DE PREPARO E DE
DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM
FÁRMACOS TRICÍCLICOS**

por

Juliano Smanioto Barin

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em
Química Analítica.**

PPGQ

Santa Maria, RS – Brasil

24 de agosto de 2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS DE
PREPARO E DE DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM FÁRMACOS
TRICÍCLICOS**

elaborada por

Juliano Smanioto Barin

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Érico Marlon de Moraes Flores – Orientador (UFSM - RS)

Celso Figueiredo Bittencourt – (UFSM - RS)

Joaquim de Araújo Nóbrega – (UFSCar - SP)

Marcos Antônio Segatto Silva – (UFSC - SC)

Renato Zanella – (UFSM - RS)

Santa Maria, 24 de Agosto de 2007.

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, Enio e Lurdes, pelo apoio, confiança, sacrifício e exemplo de trabalho, humildade e honestidade.

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de execução deste trabalho, meus agradecimentos.

Ao Prof. Dr. **Érico M. M. Flores**, pelo exemplo profissional e pelas oportunidades que permitiram meu crescimento profissional e pessoal, além da orientação e amizade sempre presentes.

Ao Prof. Dr. **Celso Figueiredo Bittencourt**, pela participação como banca examinadora e, também, pelo importante apoio e contribuição durante a execução do trabalho e em minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. **Joaquim de Araújo Nóbrega**, pela amizade, participação como banca examinadora e pelas valiosas sugestões que aperfeiçoaram, sobremaneira, este e outros trabalhos realizados no grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Marcos Antônio Segatto Silva**, pela amizade, participação como banca examinadora e pelas valiosas sugestões que aperfeiçoaram, sobremaneira, este trabalho.

Ao Prof. Dr. **Renato Zanella**, pela amizade, cooperação e participação como banca examinadora e pelas valiosas sugestões que aperfeiçoaram, sobremaneira, este trabalho.

Aos Profs. Drs. **José Neri Gottfried Paniz** e **Valderi Luiz Dressler**, pela amizade e valiosas contribuições durante a elaboração deste trabalho.

Aos amigos do **Setor de Química Industrial e Ambiental**, pela amizade, incentivo e companheirismo demonstrados.

Ao Prof. Dr. **Günter Knapp**, pela amizade e oportunidade da realização de alguns experimentos nos laboratórios da Graz University of Technology, Department of Analytical Chemistry, Micro and Radiochemistry, Graz, (Áustria).

Ao Dr. **Peter Fecher**, pela amizade e oportunidade da realização de alguns experimentos nos laboratórios do Instituto de Controle de Qualidade de Alimentos da Bavária (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) em Erlangen, Alemanha.

Aos amigos e colegas da **URI, Campus Frederico Westphalen**, pela amizade, incentivo e paciência demonstrados no decorrer do trabalho.

Ao **Ademir** do PPGQ, pela disposição e amizade demonstradas durante a execução do trabalho.

À **Sabrina**, pela ajuda, incentivo, carinho e paciência demonstrados em todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	<i>ix</i>
LISTA DE TABELAS	<i>x</i>
<i>iv</i>	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	<i>xvi</i>
RESUMO	<i>x</i>
<i>viii</i>	
ABSTRACT	
<i>xix</i>	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. IMPUREZAS EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS	5
2.2. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS	6
2.2.1. Procedimentos descritos em compêndios oficiais	8
2.2.1.1. Preparo de amostras descrito em compêndios oficiais	8
2.2.1.2. Determinação de metais pesados descrita em compêndios oficiais	12
2.2.2. Determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos empregando técnicas de espectrometria atômica	14
2.3. PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS	23
2.3.1. Decomposição de amostras por combustão	24
2.3.1.1. Decomposição em forno tipo mufla	25
2.3.1.2. Decomposição por combustão iniciada por microondas	27

2.3.2. Decomposição de amostras por via úmida	28
2.3.2.1. Decomposição em sistemas fechados	30
2.4. TÉCNICAS DE ESPECTROMETRIA ATÔMICA	31
2.4.1. Limites de detecção	34
2.4.2. Interferências	34
2.4.2.1. interferências em ICP-MS	34
2.4.2.2. interferências em ICP-OES	36
2.4.2.3. interferências em GF AAS	36
2.4.3. Quantidade de sólidos dissolvidos	37
2.4.4. Faixa de trabalho	37
2.4.5. Capacidade de processamento de amostras	37
2.4.6. Custos	38
2.5. FÁRMACOS TRICÍCLICOS: CARBAMAZEPINA, CLORIDRATO DE AMITRIPTILINA E CLORIDRATO DE IMIPRAMINA	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. INSTRUMENTAÇÃO	42
3.2. REAGENTES	43
3.3. AMOSTRAS	45
3.4. MATERIAIS DIVERSOS	45
3.5. PROCEDIMENTOS DE DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS	45
3.5.1. Determinação de metais pesados por precipitação com sulfetos	45
3.5.2. Determinação de metais pesados por GF AAS	46
3.5.3. Determinação de metais pesados por ICP-MS e ICP-OES	48
3.6. PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS	49
3.6.1. Decomposição por via úmida	49
3.6.1.1. Decomposição em sistema aberto por via úmida com aquecimento convencional	49
3.6.1.2. Decomposição em sistema fechado por via úmida com aquecimento convencional "High Pressure Asher" (HPA).....	50

3.6.1.3. Decomposição assistida por microondas em sistema fechado.....	50
3.6.1. Decomposição por combustão.....	51
3.6.2.1. Decomposição em sistema aberto em forno tipo mufla.....	51
3.6.2.2. Decomposição em sistema fechado por combustão iniciada por microondas.....	52
3.7. CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DA DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA.....	54
3.7.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível.....	54
3.7.2. Cromatografia a líquido de alta eficiência.....	54
3.7.3. Espectroscopia no Infravermelho.....	55
3.7.4. Ressonância Magnética Nuclear.....	55
3.8. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONO RESIDUAL.....	56
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	58
4.1. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPÉICOS DE DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS.....	59
4.1.1. Ensaio-limite para metais pesados.....	59
4.1.2. Preparo de amostra por decomposição em mufla e por via úmida em sistema aberto.....	62
4.2. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR GF AAS.....	65
4.3. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR ICP-OES E ICP-MS.....	80
4.4. PREPARO DE AMOSTRAS.....	85
4.4.1. Decomposição de amostras por via úmida.....	85
4.4.1.1. Caracterização dos resíduos obtidos nos procedimentos de decomposição por via úmida.....	86
4.4.2. Decomposição de amostras por combustão.....	94
4.5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	96
5. CONCLUSÃO.....	98

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
7. ANEXO	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas da carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina.....	40
Figura 2. Esquema simplificado dos procedimentos analíticos estudados.....	57
Figura 3. Recuperações obtidas após a decomposição de cloridrato de amitriptilina (branco) e carbamazepina (cinza) pelo Método II da USP 30 (2007). As determinações foram efetuadas por ICP-OES. A quantidade de analitos adicionada nas amostras é equivalente a $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada elemento.	63
Figura 4. Digerido obtido após o preparo da amostra segundo o Método III da USP 30 para o cloridrato de amitriptilina.....	65
Figura 5. Curvas de pirólise e atomização obtidas sem modificador químico para solução analítica de Ag (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Ag adicionada nas amostras é equivalente à concentração de $0,025 \mu\text{g g}^{-1}$	67
Figura 6. Curvas de pirólise e atomização obtidas sem modificador químico para solução analítica de Pb (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro	

representam o desvio padrão observado ($n=3$). A quantidade de Pb adicionada nas amostras é equivalente à concentração de $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ 68

Figura 7. Curvas de pirólise e atomização obtidas com $1 \mu\text{g}$ de Pd para solução analítica de Pb (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado ($n=3$). A quantidade de Pb adicionada nas amostras é equivalente à concentração de $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ 69

Figura 8. Curvas de pirólise e atomização obtidas sem modificador químico para solução analítica de Cd (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado ($n=3$). A quantidade de Cd adicionada nas amostras é equivalente à concentração de $0,0125 \mu\text{g g}^{-1}$ 70

Figura 9. Curvas de pirólise e atomização obtidas com $1 \mu\text{g}$ de Pd para solução analítica de Cd (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado ($n=3$). A quantidade de Cd adicionada nas amostras é equivalente à concentração de $0,0125 \mu\text{g g}^{-1}$ 71

Figura 10. Curvas de pirólise e atomização obtidas com $5 \mu\text{g}$ de Pd para solução analítica de Cd (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado ($n=3$). A quantidade de Cd adicionada nas amostras é equivalente à concentração de $0,0125 \mu\text{g g}^{-1}$ 72

Figura 11. Curvas de pirólise e atomização obtidas com $1 \mu\text{g}$ de Pd para solução analítica de Sb (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 1% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado ($n=3$). A quantidade de Sb adicionada nas amostras é equivalente à concentração de $10,0 \mu\text{g g}^{-1}$ 73

- Figura 12.** Perfil termogravimétrico das amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina obtido em analisador termogravimétrico. A linha vermelha indica porcentagem de massa perdida com o aumento da temperatura, enquanto que a linha azul indica a temperatura em que há maior perda de massa.....75
- Figura 13.** Perfil termogravimétrico de amostras de cloridrato de imipramina obtido usando GF AAS com fluxo de argônio durante a pirólise de 2,0 L min⁻¹ sem Pd (azul), 2,0 L min⁻¹ com Pd (laranja), 1,0 L min⁻¹ sem Pd (verde) e sem fluxo e sem Pd (vermelho).....76
- Figura 14.** Forno de grafite empregado para as determinações de metais pesados em cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina após 500 ciclos de aquecimento. A: vista superior; B: vista inferior; C: corte longitudinal com vista da região interna; D: vista superior da plataforma de L'vov.....79
- Figura 15.** Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por GF AAS em cloridrato de amitriptilina (branco), cloridrato de imipramina (cinza) e carbamazepina (preto). As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% de recuperação e a linha intermitente recuperação de 100%.....80
- Figura 16.** Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por ICP-MS em cloridrato de amitriptilina 0,1% (m/v) com diluição em H₂O (branco) e HNO₃ 4% (em cinza). As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% de recuperação e a linha intermitente a recuperação de 100%. A quantidade de analito adicionada é equivalente à concentração de 10 µg L⁻¹ na solução e 10 µg g⁻¹ na amostra sólida.....82
- Figura 17.** Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por ICP-MS em cloridrato de imipramina 0,1% (m/v) com diluição em H₂O (em preto) e HNO₃ 4% (em cinza). As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% de recuperação e a linha intermitente a recuperação de 100%. A quantidade de analito

adicionada é equivalente à concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ na solução e $10 \mu\text{g g}^{-1}$ na amostra sólida.....83

Figura 18. Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por ICP-OES em cloridrato de amitriptilina (em branco) e cloridrato de imipramina (em cinza) 1% (m/v) com diluição em H_2O . As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% de recuperação e a linha intermitente a recuperação de 100%. A quantidade de analito adicionada é equivalente à concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ na solução e $5 \mu\text{g g}^{-1}$ na amostra sólida.....84

Figura 19. Espectros obtidos na região da radiação ultravioleta e visível para as amostras de carbamazepina em diferentes condições de preparo das amostras.....87

Figura 20. Cromatogramas obtidos para as amostras de carbamazepina em diferentes condições de preparo das amostras. Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel metanol:água (70:30), fluxo $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, 30 min, concentração da amostra 100 mg L^{-1} , detector UV 230 nm.....88

Figura 21. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H para amostras de carbamazepina (A) e carbamazepina após reação com HNO_3 em forno de microondas (B).....89

Figura 22. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C para amostras de carbamazepina..... 90

Figura 23. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C para amostras de carbamazepina após a reação com ácido nítrico.....92

Figura 24. Espectros de infravermelho obtidos para as amostras de carbamazepina em diferentes condições de preparo das amostras.....93

Figura 25. Possível estrutura formada após a reação do HNO_3 com a carbamazepina.....94

Figura 26. Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por ICP-MS em carbamazepina após combustão iniciada por microondas empregando como solução absorvedora HNO_3 1 mol L^{-1} (branco), HNO_3 7 mol L^{-1} (cinza claro) e

HNO_3 14 mol L^{-1} (cinza escuro). As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% de recuperação e a linha intermitente recuperação de 100%. A quantidade de analito adicionada é equivalente à concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ na solução e 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ na amostra sólida.....95

Figura 27. Curvas de pirólise e atomização obtidas sem modificador químico para solução analítica de Cu (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Cu adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ 112

Figura 28. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 1 μg de Pd para solução analítica de As (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 1% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de As adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 10,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ 113

Figura 29. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 1 μg de Pd para solução analítica de Bi (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 1% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Bi adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 15,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ 114

Figura 30. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 1 μg de Pd para solução analítica de Sn (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 1% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Cd adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Procedimentos farmacopéicos de preparo de amostras para posterior determinação de metais pesados..	10
Tabela 2.	Trabalhos descritos na literatura (1995-2007) sobre a determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos empregando técnicas de espectrometria atômica.....	17
Tabela 3.	Comparação simplificada das técnicas de ICP-MS, ICP-OES e GF AAS.....	33
Tabela 4.	Procedimentos de preparo de amostras e limites máximos permitidos para metais pesados em diferentes farmacopéias para carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina.....	41
Tabela 5.	Condições empregadas para a determinação de metais pesados por GF AAS.....	47
Tabela 6.	Programa de aquecimento empregado para a determinação de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb e Sn..	48
Tabela 7.	Razão massa/carga e comprimentos de onda empregados para determinação de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Mo, Pb, Sb e Sn por ICP-MS e ICP-OES, respectivamente.....	49
Tabela 8.	Programas de aquecimento empregados para decomposição das amostras pelo sistema HPA.....	50
Tabela 9.	Programa de irradiação de microondas empregado para decomposição da amostras.....	51
Tabela 10.	Programas de aquecimento utilizados. Taxa de aumento de pressão: máx. 3 bar s ⁻¹ , temperatura máx.: 280 °C e pressão máx.: 80 bar.....	53

- Tabela 11.** Precipitados obtidos no ensaio-limite para metais pesados descrito na farmacopéia americana (USP 30, 2007) com soluções analíticas de diferentes elementos. Cada par de tubos corresponde ao branco (à direita) e aos precipitados das soluções de metais tratados com tioacetamida (à esquerda).....60
- Tabela 12.** Resumo das condições ótimas para a determinação de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb e Sn em cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina.....79
- Tabela 13.** Eficiência de decomposição das amostras de carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina em sistemas de decomposição por via úmida. As massas de amostra e as condições empregadas estão entre parênteses.....85
- Tabela 14.** Eficiência de decomposição das amostras de carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina para procedimentos baseados no processo de combustão. As massas de amostra e as condições empregadas estão entre parênteses.....95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. AFS, espectrometria de fluorescência atômica, do inglês *Atomic Fluorescence Spectrometry*
2. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária
3. CV AAS, espectrometria de absorção atômica com vapor frio, do inglês *Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry*
4. DCP-OES, espectrometria de emissão ótica com plasma de corrente direta, do inglês *Direct Current Plasma Optical Emission Spectrometry*
5. EDXRF, fluorescência de raios-X com energia dispersiva, do inglês *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*
6. EP, farmacopéia europeia 2004, do inglês *European Pharmacopoeia*
7. ETAAS, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*
8. FAAS, espectrometria de absorção atômica em chama, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*
9. FAES, espectrometria de emissão atômica em chama, do inglês *Flame Atomic Emission Spectrometry*
10. FB, farmacopéia brasileira 4ª edição, 1988
11. FI, injeção em fluxo, do inglês *Flow Injection*
12. GFAAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*
13. HG AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*
14. HPA, sistema de decomposição em altas temperaturas, do inglês *High Pressure Asher*
15. HPLC, cromatografia à líquido de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
16. ICP-OES, espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*
17. ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

18. INAA, análise por ativação neutrônica instrumental, do inglês *Instrumental Neutron Activation Analysis*
19. IV, espectroscopia no infravermelho, do inglês *Infrared Spectroscopy*
20. LCO, lâmpada de cátodo oco
21. MIC, combustão iniciada por microondas, do inglês *Microwave-induced combustion*
22. m/v, massa por volume
23. PFA, perfluoralcóxi
24. PM, peso molecular
25. PTFE, politetrafluoretileno
26. RCC, teor de carbono residual, do inglês *Residual Carbon Content*
27. RMN, ressonância magnética nuclear, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*
28. TFM, politetrafluoretileno quimicamente modificado
29. USP 30, farmacopéia americana 30ª edição, 2007, do inglês *The United States Pharmacopeia*
30. UV, espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta

RESUMO

Neste trabalho os métodos farmacopéicos de preparo de amostras e de determinação de metais pesados foram avaliados e novos métodos de preparo de amostras em sistemas fechados e determinação de metais pesados por espectrometria atômica são propostos como alternativa. Para tanto, amostras de fármacos tricíclicos (carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina) foram utilizadas.

Os métodos farmacopéicos mostraram-se inadequados tanto para o preparo quanto para a determinação de metais pesados. Na decomposição em mufla vários elementos foram perdidos por volatilização enquanto que na decomposição por via úmida a decomposição foi incompleta. Já nos ensaios de determinação de metais pesados por precipitação com íon sulfeto, resultados satisfatórios para soluções analíticas de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn foram encontrados apenas para Ag e Pb.

Desta forma, novos procedimentos de preparo de amostras e determinação de metais pesados foram estudados. A decomposição por combustão iniciada por microondas (MIC) mostrou-se adequada para todos os elementos estudados empregando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora, com recuperações entre 80 e 110%. Já a decomposição das amostras por via úmida com HNO_3 em sistema fechado em alta temperatura e pressão (HPA) foi eficiente para carbamazepina apenas na temperatura de $320 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 horas. A decomposição em temperaturas inferiores ou a utilização de sistemas de decomposição assistidos por microondas foi ineficiente, com a formação de uma grande quantidade de resíduo após aquecimento. Para tentar compreender a formação dos resíduos da decomposição por via úmida, foi efetuada a caracterização dos mesmos por UV, HPLC, IV e RMN de ^1H e ^{13}C , evidenciando a formação de um composto tricíclico nitrado.

Para as amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina, a solubilização direta em água ou HNO_3 diluído foi suficiente para as determinações por GF AAS, ICP-OES e ICP-MS para os elementos estudados. Já para carbamazepina, a única alternativa foi a decomposição por MIC, seguida da determinação por ICP-MS, ou através da análise direta de amostras sólidas por GF AAS.

ABSTRACT

In this work, sample preparation and determination methods described in pharmacopeias were evaluated and alternative methods using sample decomposition in closed vessels and determination by atomic spectrometry were proposed as alternative. Tricyclic drugs (carbamazepine, amitriptyline hydrochloride and imipramine hydrochloride) were used to evaluate the methods.

Pharmacopeial methods showed poor results for both sample preparation and determination methods. Many elements were lost during the decomposition in a muffle furnace and an incomplete decomposition was observed by wet digestion. For determination, the precipitation of analytical solutions of Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb and Sn with sulfide ion were suitable only for Ag and Pb.

Therefore, some methods of sample preparation and heavy metals determination were evaluated. The microwave-induced combustion (MIC) with 7 mol L⁻¹ HNO₃ as absorbing solution was suitable for all elements with recoveries between 80 and 110%. The wet digestion of carbamazepine samples with HNO₃ using the high pressure asher system (HPA) was efficient only at 320 °C by 3 h. If lower temperatures in HPA or microwave-assisted digestion systems were used a incomplete digestion was obtained with a residue formation. These residues were characterized by UV, HPLC, IV and RMN (¹H and ¹³C) and a nitrated tricyclic structure could be pointed out.

For amitriptyline hydrochloride and imipramine hydrochloride samples the dilution in water or diluted HNO₃ was suitable for determination of heavy metals by GF AAS, ICP-OES and ICP-MS. However, for carbamazepine samples only two possibilities were found: the decomposition by MIC and determination by ICP-MS or the determination by directly solid sampling GF AAS.

1. INTRODUÇÃO

O controle de qualidade da matéria-prima utilizada na elaboração de diferentes formas farmacêuticas é fundamental para a segurança dos usuários de medicamentos. Normalmente, os parâmetros de qualidade são estabelecidos pelas farmacopéias 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, são determinados empregando ensaios semiquantitativos e não-seletivos de precipitação de sulfetos metálicos. Entretanto, nos últimos anos, a importância de metodologias não-seletivas para a caracterização da qualidade de matérias-primas tem decrescido consideravelmente. Uma das razões se deve ao desenvolvimento dos métodos espectroscópicos e cromatográficos e suas combinações que tornaram possível a identificação e quantificação das impurezas de forma individual e não apenas parcialmente seletiva. Desta forma, a caracterização de impurezas tem se tornado, atualmente, uma das mais importantes atividades na garantia da qualidade de fármacos e diversos exemplos a este respeito têm sido descritos em recentes publicações.⁴⁶

O ensaio-limite para metais pesados, baseado na comparação visual de soluções por meio da reação com o íon sulfeto, descrito na maioria das farmacopéias, foi proposto, possivelmente, visando a uma rápida identificação da qualidade do produto a ser analisado. Entre outras características, isto possibilitaria o controle da matéria-prima ou de produtos acabados a laboratórios de pequeno porte. Porém, estes testes possuem o inconveniente de trazer apenas uma informação parcialmente qualitativa para os elementos que precipitam nas condições mencionadas, sem a informação de qual elemento específico está contribuindo para o resultado final. Evidentemente, esta informação, apesar de sua importância, é limitada, pois não considera a diferença de toxicidade entre os elementos

⁴⁶ GÖRÖG, S., (Editor), *Drug-Impurity Profiling*, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 743-840.

pertencentes ao grupo de metais avaliados. Alguns elementos importantes do ponto de vista toxicológico (ou nutricional) não formam precipitados com soluções de tioacetamida e de sulfeto de hidrogênio. Adicionalmente, os testes são sujeitos a interferências por outros elementos e os reagentes (tioacetamida e H_2S) são tóxicos e instáveis, devendo serem preparados imediatamente antes da etapa de determinação. Ademais, o teste apresenta resultados ideais para a detecção de elementos em solução, porém apenas para determinados estados de oxidação e na forma inorgânica. Além disso, procedimentos para a limpeza e descontaminação do material utilizado não são descritos, apesar de sua extrema importância na determinação de contaminantes em nível de traços.

Em vista da baixa seletividade e sensibilidade, em muitos casos, estes ensaios farmacopéicos baseados em reações de precipitação, não são suficientes para a determinação de baixas concentrações de impurezas inorgânicas, sugerindo que técnicas instrumentais venham a ser mais adequadas ao controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Com respeito aos procedimentos de decomposição, necessários para a obtenção do analito em uma forma adequada para a determinação, o grande e crescente número de artigos publicados em periódicos especializados reflete a relevância deste assunto. Dentre as tendências atuais, recomendadas para a análise de traços, podem ser citadas as seguintes: minimização de erros devido a perdas ou contaminação, miniaturização, facilidade para processamento de grande número de amostras e extrema sensibilidade. Para os procedimentos de decomposição estas recomendações podem ser assim adaptadas: uso de sistemas fechados, emprego de pequena massa de amostra e reagentes, bem como recipientes de pequeno volume e de fácil manipulação e mínima diluição da amostra. Em vista disso, o uso de sistemas fechados é, freqüentemente, citado como o estado de arte referente à etapa da decomposição de amostras. Entretanto, as farmacopéias, de modo geral, não acompanharam estas novas tendências e muitos procedimentos, ainda vigentes, estão baseados em técnicas antigas de decomposição que apresentam algumas limitações que não podem mais serem desconsideradas. Este é o caso de ensaios farmacopéicos que empregam a decomposição por via seca em mufla, sujeita a problemas de perdas (principalmente para elementos voláteis, como As, Sb e Hg) e também de contaminação. Já a decomposição por via úmida, preconizada nas farmacopéias, emprega grande quantidade de ácidos inorgânicos com informação

insuficiente em relação à pureza dos mesmos, o que pode acarretar problemas de contaminação.

Portanto, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de técnicas instrumentais para o controle quantitativo de metais pesados em produtos farmacêuticos que forneçam resultados rápidos, precisos e, acima de tudo, confiáveis. Sob este aspecto, o emprego de técnicas de espectrometria atômica e preparo de amostras, como ferramentas analíticas fundamentais, pode ser recomendado como alternativa para este tipo de controle.

O controle de metais pesados em fármacos tricíclicos é importante, pois muitas destas substâncias são empregadas em tratamentos de uso contínuo. Entretanto, a determinação de metais pesados nestes fármacos apresenta algumas limitações, como observado para carbamazepina na etapa de decomposição de amostras por via úmida, mesmo empregando altas temperaturas e pressões.³⁹

Baseado nos pressupostos citados acima, neste trabalho foram desenvolvidos e avaliados diferentes procedimentos de decomposição de amostras e de determinação de metais pesados por espectrometria atômica em fármacos tricíclicos (carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina). Neste trabalho, a decomposição por via úmida em sistemas abertos e fechados foi avaliada, bem como a decomposição por combustão em mufla e a combustão iniciada por microondas. Dentre as técnicas de espectrometria, foram investigadas a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com o objetivo de estabelecer um método geral para a determinação de metais pesados empregando técnicas instrumentais. Cabe ressaltar, que os procedimentos recomendados por algumas farmacopéias (Farmacopéias Brasileira, Americana e Européia) também foram investigados, juntamente com uma discussão acerca de suas limitações para as amostras estudadas, bem como da necessidade do desenvolvimento de novas metodologias para a determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

³⁹ FLORES, E.M.M., BARIN, J.S., MESKO, M.F., KNAPP, G., *Spectrochim. Acta* 62 (2007) 1051-1064.

A revisão bibliográfica, aqui apresentada, encontra-se subdividida em cinco partes, compreendendo os principais assuntos abordados neste trabalho. Na primeira parte, uma breve discussão sobre impurezas em produtos farmacêuticos é efetuada. Na segunda parte, procurou-se descrever os métodos oficiais para determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos, bem como as alternativas encontradas na literatura. Na terceira e quarta partes, é feita uma discussão geral acerca dos procedimentos de decomposição e de espectrometria atômica mais extensivamente empregados, respectivamente. Por último, algumas propriedades das substâncias utilizadas para a determinação de metais pesados são descritas.

Ao longo deste trabalho, quando os ácidos " HNO_3 , HCl e H_2SO_4 ", não forem discriminados, estes referem-se aos ácidos concentrados (65%, $d = 1,40 \text{ g mL}^{-1}$; 37%, $d = 1,19 \text{ g mL}^{-1}$; 98%, $d = 1,84 \text{ g mL}^{-1}$, respectivamente).

2.1. Impurezas em produtos farmacêuticos

A segurança do tratamento de enfermidades através da utilização de medicamentos está diretamente relacionada à qualidade da matéria-prima utilizada na elaboração de diferentes formas farmacêuticas. Os parâmetros de qualidade empregados estão descritos em compêndios oficiais (p. ex., farmacopéias) que, em sua maioria, preconizam ensaios analíticos para o controle de qualidade. Normalmente, são descritos testes para a identificação, doseamento e pureza para cada produto farmacêutico. A determinação da concentração de um determinado fármaco ou de suas impurezas pode ser feita através da utilização de diferentes métodos, que podem ser classificadas em seletivos (p. ex., cromatografia à líquido de alta eficiência, HPLC) ou não-seletivos (p. ex., titulação, espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível).⁴⁴ Nos últimos anos, a importância das metodologias não-seletivas para a caracterização da qualidade de matérias-primas tem decrescido consideravelmente, devido ao desenvolvimento dos métodos cromatográficos e espectroscópicos e suas combinações que, além do doseamento, tornaram possível a identificação e quantificação das impurezas de forma individual. Desta forma, a caracterização de impurezas tem se tornado, atualmente, a mais importante atividade na garantia da qualidade de fármacos.⁴⁵

Recentemente, três livros^{5,6,47} e vários artigos sobre este tema foram publicados. Além disso, um número especial da revista *Trends in Analytical Chemistry*, umas das mais importantes na área de Química Analítica, foi dedicado, recentemente, a este tema, demonstrando a importância do desenvolvimento de novas técnicas para o controle de impurezas em produtos farmacêuticos.⁴⁶

Para comercialização, um fármaco deve ser avaliado, primeiramente, em relação aos seus efeitos farmacológicos e toxicológicos, considerando a relação risco/benefício. Em princípio, os efeitos colaterais podem ter sua origem através de duas fontes: das propriedades indesejadas, inerentes aos fármacos, que

⁴⁴ GOMEZ, M.R., CERUTTI, S., OLSINA, R.A., SILVA, M.F., MARTINEZ, L.D., J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 569-576.

⁴⁵ GÖRÖG, S, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 755-757.

⁵ AHUJA, S., ALSANTE K.M., (Editors), Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals, Academic Press-Elsevier, New York, USA, 2003.

⁶ AHUJA, S., Impurities Evaluation of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, USA, 1998.

⁴⁷ GÖRÖG, S., (Editor), Identification and determination of impurities in drugs, Elsevier, 2000.

⁴⁶ GÖRÖG, S., (Editor), Drug-Impurity Profiling, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 743-840.

independem da qualidade da matéria-prima empregada ou pela presença de impurezas de atividade tóxica na mesma. Uma vez que a caracterização de impurezas de um determinado fármaco depende, entre outros fatores, da rota sintética, os efeitos colaterais causados por estas impurezas podem variar de acordo com a origem da matéria-prima. Portanto, através da determinação das impurezas presentes e o emprego de limites máximos de concentração é possível minimizar o risco dos efeitos colaterais causados por estas impurezas. Além disso, a determinação de impurezas pode fornecer informações sobre a origem e a qualidade dos reagentes empregados na síntese do fármaco, bem como sobre as etapas de purificação e as condições de cristalização, secagem e armazenagem do produto final.⁴⁵

As impurezas em produtos farmacêuticos podem ser classificadas, de forma geral, em impurezas orgânicas, solventes residuais e impurezas inorgânicas.⁴⁵ Neste último tipo de impureza estão presentes os metais pesados que, ainda hoje, são determinados empregando metodologias farmacopéicas através da utilização de ensaios semiquantitativos e não-seletivos de precipitação de sulfetos metálicos, fornecendo informações apenas sobre um determinado grupo de metais denominados, genericamente, como metais pesados.

2.2. Determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos

Existem várias definições de metais pesados, algumas delas incompletas e outras sujeitas a interpretações duvidosas. Uma definição mais recente, descrita por Hawkes,⁵¹ define metais pesados como sendo os elementos contidos nos grupos 3 a 16 e que estão no período 4 e sucessivos da tabela periódica. Esta classificação abrange diversos elementos importantes do ponto de vista toxicológico, tais como Cr, Ni, Pd e Zn, cujo risco de estarem presentes como contaminantes em produtos farmacêuticos é elevado. Porém, de acordo com a farmacopéia americana (USP), somente os elementos Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn respondem ao ensaio-limite para metais pesados.

⁴⁵ GÖRÖG, S, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 755-757.

⁵¹ HAWKES, S.J., J. Chem. Ed. 74 (1997) 1374.

De um modo geral, em suas últimas edições, as Farmacopéias Americana e Européia (EP) mencionam a exigência de testes limites para metais pesados em diversas matérias-primas e produtos acabados. Estes testes estão incluídos, praticamente, em todas as demais farmacopéias. Alguns testes são específicos para determinados elementos, como, por exemplo, Pb, Hg, Ni, As, etc. Entretanto, grande parte do controle de qualidade de matérias-primas envolve a recomendação de testes para o grupo “metais pesados”, em vez de testes seletivos para a detecção de elementos específicos.

Vários artigos na literatura descrevem o desenvolvimento de técnicas instrumentais para a determinação de metais pesados que buscam avaliar o grau de contaminação em produtos farmacêuticos, como demonstrado na Tabela 2. Entretanto, talvez um dos casos mais graves de contaminação que aconteceu no Brasil foi o do antimoniato de meglumina. Este medicamento é empregado, ainda hoje, para o tratamento da leishmaniose, uma doença endêmica que atinge cerca de 88 países e cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo.⁸⁰

Mais de 3 milhões de ampolas são comercializadas anualmente no país, cada uma contendo 5 mL de uma solução de 81.000 mg L⁻¹ de Sb(V). Como a maioria dos métodos oficiais empregados para o controle de metais pesados está baseada na precipitação com íon sulfeto, seu emprego para este medicamento é inviável, pois o Sb também precipita com este íon. Sendo assim, a única maneira de determinar o teor de metais pesados no antimoniato de meglumina foi através da utilização de métodos instrumentais (espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, neste caso), que permitiram a determinação de elevados teores de Pb e As, chegando a 52,3 mg L⁻¹ e 84,6 mg L⁻¹, respectivamente.⁹⁸ Atualmente, o controle de metais pesados empregando métodos instrumentais para este medicamento já está descrito na Farmacopéia Brasileira, tanto para matéria-prima quanto para o produto acabado.³⁸

⁸⁰ MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana, FUNASA, Brasília, Brasil, 1999.

⁹⁸ SILVA JR, J.B., Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34 (2001) 103-105.

³⁸ FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte II, Fascículo 4, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2002.

2.2.1. Procedimentos descritos em compêndios oficiais

A Farmacopéia Brasileira estabelece os critérios de qualidade dos medicamentos em uso no Brasil, envolvendo todos os componentes empregados na fabricação dos medicamentos.³² Além da Farmacopéia Brasileira, outras farmacopéias podem ser utilizadas no país. Segundo a Portaria Nº 116, de 22 de novembro de 1995, Art. 1º, “*Na ausência de monografia oficial de Matéria-Prima, Formas Farmacêuticas, Correlatos e Metodologias Gerais inscritos na Farmacopéia Brasileira, poderá ser adotada monografia oficial, última edição, de um dos seguintes compêndios internacionais: Farmacopéia Alemã, Farmacopéia Americana e seu Formulário Nacional, Farmacopéia Britânica, Farmacopéia Européia, Farmacopéia Francesa, Farmacopéia Japonesa, Farmacopéia Mexicana e Farmacopéia Portuguesa.*”²

Dentre as farmacopéias estrangeiras citadas acima, as farmacopéias Americana e Européia têm uso mais corrente no Brasil. Sendo assim, nesta revisão serão abordadas as farmacopéias Farmacopéia Brasileira,³⁷ Americana¹⁰⁹ e Européia³⁵ em suas últimas edições.

2.2.1.1. Preparo de amostras descrito em compêndios oficiais

As Farmacopéias Brasileira (FB), Americana (USP) e Européia (EP), empregam como preparo de amostras para posterior determinação de metais pesados, basicamente, três procedimentos: *solubilização direta em solventes*, *decomposição em forno tipo mufla* e *decomposição por via úmida*, conforme demonstrado na Tabela 1.

A solubilização direta das amostras em água, solução ácida ou em solventes orgânicos, apesar de bastante simples, permite a detecção apenas dos metais que estiverem na forma química reativa com o íon sulfeto, ou seja, como íons em

³² COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, <http://www.farmacopeia.org.br>, 2007

² ANVISA, Resolução RDC Nº 79, de 11 de abril de 2003; Resolução RDC Nº 169, de 21 de agosto de 2006.

³⁷ FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Edição, Parte I, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988.

¹⁰⁹ UNITED STATES PHARMACOPEIA 30, USP Convention Inc., Rockville, MD, USA, 2007.

³⁵ EUROPEAN PHARMACOPEIA, 4th Edition, Council of Europe, Strasbourg, France, 2004.

solução. Portanto, se algum destes elementos estiver em uma forma diferente, p. ex. como um composto orgânico, este não será detectado. Isso pode representar um grave problema pois, muitas vezes, os compostos orgânicos de alguns elementos são mais tóxicos que os inorgânicos. Metilmercúrio (CH_3Hg^+), por exemplo, é mais tóxico que sais de Hg(I) ou Hg(II). Além disso, diferenças no estado de oxidação de um determinado elemento, mesmo na forma inorgânica, podem levar a diferentes toxicidades, como observado para antimônio, onde o Sb(III) é cerca de 10 vezes mais tóxico que o Sb(V).¹⁴

¹⁴ ARIZA, J.L.G., MORALES, E., SÁNCHEZ-RODAS, D., GIRÁLDEZ, I., Trends Anal. Chem. 19 (2000) 200-209.

Tabela 1. Procedimentos farmacopéicos de preparo de amostras para posterior determinação de metais pesados.

Farmacopéia Americana (USP)	Farmacopéia Brasileira (FB)	Farmacopéia Européia (EP)
Método I <ul style="list-style-type: none">• Dissolução com água ou solução ácida	Métodos de reação do íon sulfeto – Método I <ul style="list-style-type: none">• Dissolução com água ou solução ácida	Método A <ul style="list-style-type: none">• Dissolução em água
Método II <ul style="list-style-type: none">• Amostra + H₂SO₄ + aquecimento + 2 mL HNO₃ + 5 gotas H₂SO₄ + mufla (500-600 °C por 2 h)• 2 porções de 5 mL HCl 6 mol L⁻¹	Métodos de reação do íon sulfeto – Método II <ul style="list-style-type: none">• Amostra + H₂SO₄ + aquecimento + 2 mL HNO₃ + 5 gotas H₂SO₄ + mufla (500-600 °C)• 4 mL HCl 6 mol L⁻¹ + aquecimento + 1 gota HCl 6 mol L⁻¹ + 10 mL água	Método B <ul style="list-style-type: none">• Dissolução em solvente orgânico (acetona ou 1,4-dioxano com, no mínimo, 15% (v/v) H₂O)
Método III <ul style="list-style-type: none">• Amostra + 8 mL H₂SO₄ + 10 mL HNO₃ + aquecimento + 2 mL HNO₃ + aquecimento + 5 mL H₂O + aquecimento + 5 mL H₂O• H₂O₂ (caso a solução fique amarela)	Métodos de reação do íon sulfeto – Método III <ul style="list-style-type: none">• idêntico ao Método III/USP Métodos de reação c/ tioacetamida – Método I <ul style="list-style-type: none">• Dissolução com água ou solução ácida Métodos de reação c/ tioacetamida – Método II <ul style="list-style-type: none">• idêntico ao Método B/EP Métodos de reação c/ tioacetamida – Método III <ul style="list-style-type: none">• idêntico ao Método C/EP Métodos de reação c/ tioacetamida – Método IV <ul style="list-style-type: none">• idêntico ao Método D/EP	Método C <ul style="list-style-type: none">• Amostra + 4 mL MgSO₄ 25% (m/V) em H₂SO₄ 1 mol L⁻¹ + mufla + 0,2 mL H₂SO₄ 1 mol L⁻¹ + mufla; tempo total na mufla < 2 h, <800 °C• 2 porções de 5 mL HCl 2 mol L⁻¹ Método D <ul style="list-style-type: none">• Amostra + 0,5 g MgO + mufla (800 °C, 1,5 h)• 2 porções de 5 mL HCl 5 mol L⁻¹ Método E <ul style="list-style-type: none">• dissolução com água e filtração Método F <ul style="list-style-type: none">• idêntico ao Método III/USP

Os procedimentos de decomposição em mufla, apesar de eliminarem eficientemente a matéria orgânica da amostra e transformar os elementos em suas respectivas formas inorgânicas, estão sujeitos a riscos de perdas e contaminação. As perdas podem estar associadas à volatilização dos elementos durante a decomposição, como é o caso do mercúrio, em que a própria farmacopéia declara que o método não é adequado para este elemento (USP 30, Método II, Tabela 1). Além disso, perdas podem ocorrer, também, por interação com o recipiente e a formação de compostos insolúveis. Já a contaminação pode estar associada à grande quantidade de reagentes utilizada e, também, ao ambiente inapropriado do interior da mufla.

A decomposição por via úmida é efetuada em frascos do tipo Kjeldahl empregando a mistura de ácido nítrico e ácido sulfúrico, normalmente com aquecimento em bico de Bunsen, com a parte superior do frasco posicionada em um ângulo de 45°, voltado para o interior de uma capela de exaustão. Os ácidos são empregados em grandes quantidades sem nenhuma recomendação para purificação, o que pode aumentar os riscos de contaminação. Além disso, o controle da temperatura de decomposição neste procedimento é difícil, podendo torná-lo irreproduzível. Ademais, o procedimento é moroso e requer atenção constante do operador.

Assim, pode-se dizer que os procedimentos de decomposição de amostras descritos nas farmacopéias (decomposição em mufla e via úmida) utilizam grandes quantidades de reagentes, são morosos e dependem da atenção contínua do operador. Ademais, são efetuados em sistemas abertos que, conseqüentemente, podem aumentar os riscos de perdas e/ou contaminação. Outro aspecto importante, é que nenhum procedimento de lavagem e/ou descontaminação da vidraria é descrito.

Lewen *et al.*⁶⁹ avaliaram a recuperação obtida empregando o Método II da USP para nove substâncias, as quais tiveram a adição de 14 elementos (As, Se, Mo, Ru, Pd, Pb, Cd, In, Sn, Sb, Pt, Hg, Bi e Ag) perfazendo a concentração de 10 µg g⁻¹ para cada elemento e um total de 140 µg g⁻¹ de metais pesados. Os resultados obtidos para a concentração de metais pesados totais nestas amostras com precipitação de sulfetos foi inferior à 80 µg g⁻¹. Uma das amostras acusou uma concentração de metais pesados totais entre 60 e 80 µg g⁻¹ e todas as demais entre

⁶⁹ LEWEN, N., MATHEW, S., SCHENKENBERGER, M., RAGLIONE, T., J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 739-752.

40 e 60 $\mu\text{g g}^{-1}$. Uma vez que este procedimento envolve a decomposição em mufla, os autores também efetuaram a determinação nos digeridos por ICP-MS para identificar se algum(ns) elemento(s) foi(ram) perdido(s) ou não detectado(s) durante a decomposição. Desta forma, foi possível verificar que as recuperações para Se, Sn, Sb, Ru e Hg foram inferiores a 10%. Já para Pb, As, Cd, Mo, Pd, Pt e In as recuperações ficaram entre 30 e 50%. Prata foi o único elemento em que a recuperação chegou próxima a 100%. Segundo os autores, as perdas dos elementos voláteis ocorreram, possivelmente, devido às altas temperaturas empregadas durante a decomposição na mufla (500 a 600 °C).²³

2.2.1.2. Determinação de metais pesados em compêndios oficiais

Os testes recomendados para determinação de metais pesados descritos nas farmacopéias estão baseados na reação destes com o íon sulfeto, proveniente da tioacetamida ou sulfeto de hidrogênio. A reação produz precipitados coloridos cuja intensidade é avaliada, normalmente, por comparação visual com uma solução de referência de chumbo de concentração conhecida. O teste é recomendado para a determinação conjunta de As, Ag, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn.

Estes testes gerais foram recomendados há mais de 70 anos, possivelmente, visando uma rápida identificação da qualidade do produto, possibilitando a laboratórios de pequeno porte o controle da matéria-prima ou de produtos acabados. Na época, as técnicas instrumentais hoje empregadas de forma rotineira, ainda encontravam-se em desenvolvimento e, além do elevado custo dos equipamentos, estes não eram facilmente disponíveis para laboratórios fora de países industrializados. Além disso, era necessário o treinamento adequado dos analistas para operação de equipamentos recentes (em meados das décadas de 50 e 60) e não se dispunha, ainda, de experiência prévia consolidada para tal. Outro aspecto importante referia-se aos níveis máximos de concentração tolerados na época e a escassez de conhecimentos acerca da influência de metais pesados, o que servia de subsídio para a proposição dos testes baseados na formação de sulfetos metálicos.

²³ BOCK, R., *Handbook of decomposition methods in analytical chemistry*, Willey, New York, 1979.

A espectrometria de absorção atômica como técnica analítica surgiu em 1955 e encontra-se, hoje, consolidada como ferramenta analítica para grande parte das determinações de metais pesados nos mais variados tipos de amostra. Apesar da importância desta técnica, as farmacopéias ainda recomendam os testes gerais empregados para detectar a presença de metais pesados “totais”, mesmo com suas limitações. Cabe ressaltar, que o ensaio-limite para metais pesados não apresentou evolução significativa nos últimos 70 anos, uma vez que, em 1936, o teste proposto pela USP 11 já era feito com sulfeto de hidrogênio.¹⁰⁷

Estes testes possuem o inconveniente de trazer apenas uma informação qualitativa para alguns elementos, pois o desenvolvimento de cor será proporcional ao somatório dos precipitados metálicos, que porventura ocorrerem nas condições mencionadas, sem a informação de qual elemento específico está contribuindo para a coloração final. Evidentemente, esta informação é limitada, pois se houver apenas cobre ou chumbo como contaminante, mas em níveis que ultrapassem determinado limite, o teste apenas apontará este resultado, apesar da grande diferença de toxicidade dos elementos tomados como exemplo. Além disso, existe uma dependência da acuidade visual do operador, pois a detecção ocorre por comparação direta com uma solução de chumbo (a comparação visual sempre é sujeita a variações em vista do operador e do grau de luminosidade do ambiente). O teste também não permite o conhecimento da concentração individual da maior parte dos elementos suspeitos como contaminantes. Outro aspecto negativo, está relacionado ao precipitado de chumbo (PbS), utilizado como referência para comparação que é preto, enquanto que o sulfeto de bismuto (Bi₂S₃) é marrom e os sulfetos de As, Cd e Sb(V) são amarelos ou alaranjados. Isto pode complicar a comparação entre a amostra e a solução de referência de chumbo e, no caso destes elementos estarem presentes na amostra, concentrações relativamente elevadas poderiam não ser detectadas pelo teste.⁴¹

Adicionalmente, alguns elementos importantes do ponto de vista toxicológico não formam precipitados com soluções de tioacetamida e de sulfeto de hidrogênio (p. ex. Cr, W, Ni e Pd). Ademais, os testes são sujeitos a interferências e os reagentes (tioacetamida e H₂S) são tóxicos e instáveis, devendo ser preparados no dia da

¹⁰⁷ THE PHARMACOPOEIA OF UNITED STATES OF AMERICA, 11th ed., Mack Printing Company, Easton, PA, 1936.

⁴¹ FLORES, E.M.M, BITTENCOURT, C.F., LAPORTA, L.V., BARIN, J.S., Pharm. Tech. 4 (2000) 9-13.

determinação. A quantidade de amostra empregada é relativamente grande, cerca de 1 a 2 g por ensaio, o que dificulta sua utilização em fármacos em desenvolvimento e, também, com elevado custo da matéria-prima. O teste apresenta resultados ideais para a detecção de elementos em solução em determinados estados de oxidação. Entretanto, elementos como Hg, Sn e As, apresentam espécies alquiladas, tornando difícil a sua detecção. Além disso, procedimentos para a limpeza e descontaminação do material utilizado não são descritos, apesar de sua extrema importância na determinação de contaminantes em nível de traços.

2.2.2. Determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos empregando técnicas de espectrometria atômica

As técnicas de espectrometria atômica têm uso relativamente grande nas farmacopéias. Dentre as diferentes técnicas, a mais utilizada é a absorção atômica com chama. Se a USP 28 for utilizada como exemplo, podemos verificar que a espectrometria de absorção atômica com chama é utilizada em cerca de 88 monografias, principalmente para o doseamento e, em menor proporção, para a determinação de elementos presentes como impurezas. Isto se deve, provavelmente, aos limites de detecção da espectrometria de absorção atômica com chama, que não permitem a determinação de contaminantes em níveis de traços. Neste caso, a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite é preferida, porém, sendo recomendada em apenas 7 monografias. Já a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado é recomendada em apenas 1 monografia, para a determinação de boro. Entretanto, nenhuma metodologia específica tem sido recomendada para a determinação dos elementos do grupo metais pesados empregando técnicas de espectrometria atômica.

Contudo, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos empregando as técnicas de espectrometria atômica para a determinação de metais em produtos farmacêuticos. Na literatura, quase uma centena de artigos pode ser encontrada empregando, principalmente, as técnicas de absorção atômica (F AAS, espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*; GF AAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*; HG AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *hydride generation atomic absorption*

spectrometry; CV AAS, espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, do inglês *cold vapor atomic absorption spectrometry*), emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*). Entretanto, cabe ressaltar que, para utilização destas técnicas, é necessário que a amostra seja preparada adequadamente, pois o uso da técnica instrumental não assegura, *per sí*, a qualidade da análise. Assim, muita importância deve ser dada, também, à etapa de preparo de amostras que, além de consumir grande parte do tempo da análise, pode introduzir erros sistemáticos maiores que 100% no resultado final.^{103,111}

Nas técnicas de espectrometria atômica, os elementos podem ser determinados individualmente, ao contrário do ensaio-limite para metais pesados. Apesar de permitirem, também, a determinação de concentrações mais baixas, estas técnicas apresentam maior custo e, muitas vezes, necessitam de maior treinamento do operador. A escolha do melhor método depende de vários fatores, dentre eles do tipo de amostra, da concentração do analito, do número de elementos a serem determinados, do tipo de preparo da amostra e do tempo envolvido durante a determinação. Assim, cada técnica apresenta vantagens e limitações que podem definir a escolha do analista.

Na Tabela 2 estão relacionados os trabalhos desenvolvidos no período de 1995 a 2007 sobre a determinação de elementos presentes como contaminantes em produtos farmacêuticos empregando técnicas de espectrometria atômica, bem como informações sobre o preparo da amostra empregado. Cabe ressaltar que não estão contemplados os trabalhos que empregam técnicas de espectrometria atômica para outros fins, tais como o doseamento de princípios ativos em substâncias que contenham um metal em sua estrutura,^{17,25,102} quantificação de elementos essenciais em suplementos minerais,^{1,100,127} determinação indireta de fármacos^{34,50,126} e para especificação química.^{110,125}

¹⁰³ SULCEK, Z., POVONDRA, P., *Methods of Decomposition in Inorganic Analysis*, CRC Press, (1989).

¹¹¹ WAGNER, G., *Sci. Total Environ.* 176 (1995) 63-71.

¹⁷ BAREFOOT, R.R., VANLOON, J.C., *Anal. Chim. Acta* 334 (1996) 5-14.

²⁵ BROUWERS, E.E.M. *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1484-1490.

¹⁰² STOICA, A.I., PELTEA, M., BAIULESCU, G.E., IONICA, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 653-656.

¹ ABARCA A., CANFRANC E., SIERRA I., MARINA M.L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 941-945.

-
- ¹⁰⁰ SOLTYK, K., LOZAK, A., OSTAPCZUK, P., FIJALEK, Z., J. Pharm. Biomed. Anal. 32 (2003) 425-432.
- ¹²⁷ ZACHARIADIS, G.A., KAPSIMALI, D.C., J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 1212-1219.
- ³⁴ EL REIS, M.A., ABOU ATTIA, F.M., KENAWY, I.M.M., J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 249-254.
- ⁵⁰ HASSAN, S.S.M., Organic analysis using atomic absorption spectrometry, Ellis Horwood Limited, 1984.
- ¹²⁶ YEBRA, M.C., Trends Anal. Chem. 19 (2000) 629-641.
- ¹¹⁰ VINAS, P., CAMPILLO, N., LÓPEZ-GARCIA, I., CÓRDOBA, M.H., Anal. Chim. Acta 318 (1996) 319-325.
- ¹²⁵ YANG, Z., HOU, X.D., JONES, B.T., Appl. Spectrosc. Rev. 37 (2002) 57-88.

Tabela 2. Trabalhos descritos na literatura (1995-2007) sobre a determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos empregando técnicas de espectrometria atômica.

Amostra (s)	Elemento (s)	Preparo da amostra	Determinação	Referências
Açúcares, manitol, sorbitol, cloral, amidopirina e paracetamol	Cd, Pb, Co, Ni, Cr(III), Cr(VI)	Dissolução	FI-GF AAS	60
Adoçantes	Pb	Diluição em água seguida de diálise	F AAS	13
Antimoniato de meglumina	As	Diluição com ácido cítrico	HG AAS	42
Cocaína e heroína	Ag, Cr, Mn	Dissolução em HNO ₃ diluído	GF AAS	20, 21
Cocaína e heroína	Pb	Dissolução em HNO ₃ 35% (v/v)	GFAAS	19
Cosméticos	Hg	Bomba de PTFE, HNO ₃ e HClO ₄	CV AAS	129
Derivados de animais	Pb, Cd	HNO ₃ , aberto, aquecimento convencional	GF AAS	31
Diisopropanolamina e trimetilglicina	Ru	Diluição em dimetilsulfóxido	GF AAS	56
<i>Echinacea purpurea</i>	Zn, Fe, Cu, Mn, Ca, Mg, Sr, Ni	Mufla (500 °C)	F AAS	93
	Li		F AES	
Etionamida, maleato de enalapril, cloridrato de fluoxetina, terazosina	Pd	Dissolução em HNO ₃ 0,2 mol L ⁻¹ ou metanol 75% em HNO ₃ 0,2 mol L ⁻¹	FI-GF AAS	59
Fármacos	Pd	Diluição em HNO ₃ 70%	GF AAS	113
Fármacos e intermediários de síntese	Pd	Dissolução em acetonitrila ou dimetilsulfóxido e misturas de ambos com água	GF AAS	57
Fármacos e intermediários de síntese	W	Dissolução em HNO ₃ 80% (v/v)	ICP-OES, ICP-MS	112
Fitoterápicos	Hg	Água régia, aberto, aquecimento convencional	CV AAS	11
Fitoterápicos	Hg	Forno de microondas, HNO ₃	CV AAS	86

Amostra (s)	Elemento (s)	Preparo da amostra	Determinação	Referências
Fitoterápicos	Li, Na K Cu, Mg, Mn, Zn Ni	Sistema aberto, aquecimento convencional, HNO ₃ e HClO ₄	F AES F AAS GF AAS	44
Fitoterápicos	Pb	Água régia, aberto, aquecimento convencional	F AAS	12
Folinato de cálcio e xinafoato de salmeterol	Pt	Mufla (550 °C)	FI-GF AAS	67
Fosinopril sódico	Pd	Dissolução em sol. 25% 2-butoxietanol em água	ICP-MS	70
Heroína	Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, S, Sr, Zn	Forno de microondas, HNO ₃	ICP-OES	26
Maleato de enalapril	Pd	Análise direta de sólidos	GF AAS	95
Maleato de enalapril, folinato de cálcio e levodopa	Pd, Pt, Be, V, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sn, Tl, Pb Rh, Cr	Dissolução em HNO ₃ diluído ou mufla (550 °C)	ICP-MS GF AAS	66
Medicamentos da medicina chinesa	As, Hg	Decomposição com HNO ₃ ou água régia em sistema fechado com microondas; extração com fluidos gastrointestinais artificiais, água ou solventes orgânicos com microondas focalizadas ou soxhlet	CV-AFS, ICP-MS, HG-AFS	118
<i>Mentha spicata</i>	Cd, Cu, Ni, Pb	Decomposição com HNO ₃ + HClO ₄ (5:1)	INAA, F AAS	30
Metotrexato	Fe, Pd	Decomposição com H ₂ SO ₄ + HNO ₃ em frascos fechados e aquecimento com microondas	DCP-OES, GF AAS	82
Plantas medicinais	Hg	Forno de microondas, HNO ₃	Pirólise-CV AAS, CV-ICP-MS	22
Plantas medicinais	Cu, Zn, Mn, Fe, K, Ca, Mg Al, Ba, B	Chapa + Mufla 500 °C	F AAS ICP-OES	92
Plantas medicinais	Cu, Zn, Mn, Fe, K, Ca, Mg Al, Ba, B		F AAS / F AES ICP-OES, EDXRF	91

Amostra (s)	Elemento (s)	Preparo da amostra	Determinação	Referência
Plantas medicinais	Pb	Mufla 450 °C	F AAS	89
Plantas medicinais	Cu	Introdução de suspensões em glicerol 10%	ET AAS (tubo de molibdênio)	8
Plantas medicinais	Pb, Hg, Cd, As, U, Cr, V, Cu, Zn, Mo, Pd, Sn, Sb, Tl e W	Decomposição com HNO ₃ em sistema aberto com frascos de PTFE (aproximadamente 75 °C)	ICP-MS	90
Plantas medicinais	Pb	Decomposição com HNO ₃ + HCl em chapa de aquecimento	AT-F AAS	104
Plantas medicinais	Mn	Introdução de suspensões em glicerol 10%	ET AAS (tubo de molibdênio)	9
Solução de diálise peritoneal	Rb	Análise direta, HNO ₃ fechado aquecimento conv.	F AAS, GF AAS	97
Solução de diálise peritoneal	Al, Cr, Cu, Mn, Fe Zn	Determinação direta na solução	GF AAS F AAS	79
Soluções de nutrição parenteral	Cu, Cr	Diluição com tampão	FI-ICP-OES	43, 105
Soluções de nutrição parenteral	Cr	Diluição com tampão	FI-F AAS	120
Soluções de nutrição parenteral	V	Extração em ponto nuvem e diluição em etanol	FI-ICP-OES	119
Soluções de nutrição parenteral	Al	Extração em ponto nuvem e diluição com HCl	FI-ICP OES	101
Soluções de nutrição parenteral	Al	Determinação direta na solução	GF AAS	88
Suplementos de cálcio	Cd	Dissolução em água ou decomposição com HNO ₃ diluído + H ₂ O ₂	ET AAS (tubo de molibdênio)	4
Suplementos de cálcio	Pb	Bomba PTFE, Microondas, HNO ₃	GF AAS	74
Suplementos de cálcio	Pb	Dissolução em água; decomposição com HNO ₃ diluído + H ₂ O ₂	ET AAS (tubo de molibdênio)	3
Timerosal e vacina gamaglobulínica	Hg	Diluição em água	GF AAS	7

Amostra (s)	Elemento (s)	Preparo da amostra	Determinação	Referência
Xaropes	Pb	Diluição em HNO ₃ diluído	GF AAS	71
Xaropes de antitussígenos	Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, Mg, Mn, Ni, Pb, Pd, Se, Zn	Diluição em HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ ou decomposição em frascos fechados de PTFE com HNO ₃	ICP-OES	127

Analisando a Tabela 2, observa-se que, com exceção de alguns trabalhos com introdução de amostras em suspensão^{8,9} ou sólidos diretamente,⁹⁵ todos os demais utilizam soluções obtidas por diluição/dissolução ou decomposição das amostras. Muitos autores preferem diluir ou dissolver as amostras em solvente adequado e introduzi-las diretamente.^{3,7,19,20,21,42,43,56,57,59,60,66,70,71,105,112,113,120,127} Quando as amostras precisam ser decompostas, percebe-se que os sistemas abertos ainda são bastante utilizados.^{11,12,30,31,44,66,89,92,93} Entretanto, estes vêm sendo substituídos por sistemas fechados com aquecimento convencional^{74,97,127,129} ou com radiação microondas.^{22,26,74,82,86,118}

Dentre as técnicas de espectrometria atômica, as técnicas de absorção atômica e plasma indutivamente acoplado têm sido as mais empregadas. Várias

-
- ⁸ AMIN, M.N., KANECO, S., SUZUKI, T., OHTA, K., *Microchem. J.* 74 (2003) 181-186.
- ⁹ AMIN, M.N., KANECO, S., SUZUKI, T., TANIGUCHI, Y., OHTA, K., *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 205-208.
- ⁹⁵ RESANO, M. *et al.*, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 18 (2003) 1477-1484.
- ³ AHSAN, S. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 362 (1998) 279-284.
- ⁷ ALEXIU, V., CHIRTOP, E., VLADESCU, L., SIMION, M., *Acta Chim. Slov.* 51 (2004) 361-372.
- ¹⁹ BERMEJO-BARRERA, P. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 310 (1995) 355-367.
- ²⁰ BERMEJO-BARRERA, P. *et al.*, *Talanta* 43 (1996) 77-87.
- ²¹ BERMEJO-BARRERA, P. *et al.*, *Talanta* 43 (1996) 1783-1792.
- ⁴² FLORES, E.M.M. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2095-2102.
- ⁴³ GIL, R.A., CERUTTI, S., GASQUEZ, J.A., OLSINA, R.A., MARTINEZ, L.D., *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 531-535.
- ⁵⁶ JIA, X., WANG, T., BU, X., TU, Q., SPENCER, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 43-47.
- ⁵⁷ JIA, X., WANG, T., WU, J., *Talanta* 54 (2001) 741-751.
- ⁵⁹ KELKÓ-LÉVAI, A., LÁSZTITY, A., ZIH-PERÉNYI, K., HORVÁTH, Z., *Microchem. J.* 58 (1998) 272-280.
- ⁶⁰ KELKÓ-LÉVAI, A., VARGA, I., ZIH-PERÉNYI, K., LÁSZTITY, A., *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 827-833.
- ⁶⁶ LÁSZTITY, A., KELKÓ-LÉVAI, A., VARGA, I., ZIH-PERÉNYI, K., BERTALAN, E., *Microchem. J.* 73 (2002) 59-63.
- ⁷⁰ LEWEN, N. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 879-883.
- ⁷¹ LIMA, E.C., KRUG, F.J., ARRUDA, M.A.Z., *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 601-611.
- ¹⁰⁵ TAKARA, E.A. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 735-739.
- ¹¹² WANG, T., GE, Z., WU, J., LI, B., LIANG, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 937-943.
- ¹¹³ WANG, T., WALDEN, S., EGAN, R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 593-599.
- ¹²⁰ WUILLOUD, G.M. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 117-124.
- ¹²⁷ ZACHARIADIS, G.A., KAPSIMALI, D.C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1212-1219.
- ¹¹ ANG, H.H., LEE, E.L., CHEANG, H.S., *Int. J. Toxicol.*, 23 (2004) 65-71.
- ¹² ANG, H.H., LEE, E.L., MATSUMOTO, K., *Human Exp. Toxicol.* 22 (2003) 445-451.
- ³⁰ CHOUDHURY, R.P., KUMAR, A., GARG, A.N., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 825-832.
- ³¹ CHUANG, I.C., HUANG, Y.L., LIN, T.H., *Anal. Sci.* 15 (1999) 1133-1136.
- ⁴⁴ GOMEZ, M.R., CERUTTI, S., OLSINA, R.A., SILVA, M.F., MARTINEZ, L.D., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 569-576.
- ⁸⁹ QI, L., HUIRONG, L., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 1203-1205.
- ⁹² RAZIC, S., ONJIA, A., DOGO, S., SLAVKOVIC, L., POPOVIC, A., *Talanta* 67 (2005) 233-239.
- ⁹³ RAZIC, S., ONJIA, A., POTKONJAK, B., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 845-850.
- ⁷⁴ MATTOS, J.C.P. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 687-692.
- ⁹⁷ SCANCAR, J., MILACIC, R., BENEDIK, M., BUKOVEC, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 423-428.
- ¹²⁹ ZHANG, D.Q., YANG, L.L., SUN, H.W., *Anal. Chim. Acta* 395 (1999) 173-178.
- ²² BIN, C., XIAORU, W., LEE, F.S.C., *Anal. Chim. Acta* 447 (2001) 161-169.
- ²⁶ BUDIC, B., KLEMENC, S., *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 681-688.
- ⁸² NIEMELA, M., KOLA, H., EILOLA, K., PERAMAKI, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 433-439.
- ⁸⁶ ONG, E.S., YONG, Y.L., WOO, S.O., KEE, L.K., *Anal. Sci.* 16 (2000) 391-395.
- ¹¹⁸ WU, X., SUN, D., ZHANG, Z., WANG, X., GONG, H., HONG, J., LEE, F.S.C., *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 311-323.

aplicações podem ser encontradas para ICP-OES^{26,43,91,92,101,105,112,119,127} e ICP-MS^{66,70,90,112,118}. Entretanto, poucas aplicações para análise por ativação neutrônica instrumental (INAA),³⁰ espectrometria de fluorescência atômica (AFS)¹¹⁸ e espectrometria de emissão atômica em chama (FAES).^{44,91,93} Pode-se perceber, também, que alguns trabalhos utilizam a análise por injeção em fluxo para a pré-concentração dos analitos e/ou separação de interferentes.^{43,59,60,67,101,105,119,120}

Em relação às técnicas de absorção atômica utilizadas, a HG AAS⁴² e a CV AAS^{11,22,86,129} têm sido pouco utilizadas. A F AAS^{13,30,44,79,89,91,92,93,97,104,120} foi empregada para elementos em elevadas concentrações e que, normalmente, não são considerados contaminantes. Já a GFAAS^{7,19,20,21,31,44,56,57,59,60,66,67,74,79,82,88,97,113}

-
- ²⁶ BUDIC, B., KLEMENC, S., *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 681-688.
- ⁴³ GIL, R.A., CERUTTI, S., GASQUEZ, J.A., OLSINA, R.A., MARTINEZ, L.D., *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 531-535.
- ⁹¹ RAZIC, S., DOGO, S., SLAVKOVIC, L., POPOVIC, A., *J. Serb. Chem. Soc.* 70 (11) 1347-1355 (2005).
- ⁹² RAZIC, S., ONJIA, A., DOGO, S., SLAVKOVIC, L., POPOVIC, A., *Talanta* 67 (2005) 233-239.
- ¹⁰¹ SOMBRA, L.L. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1451-1458.
- ¹⁰⁵ TAKARA, E.A. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 735-739.
- ¹¹² WANG, T., GE, Z., WU, J., LI, B., LIANG, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 937-943.
- ¹¹⁹ WUILLOUD, G.M. *et al.*, *Talanta* 58 (2002) 619-627.
- ¹²⁷ ZACHARIADIS, G.A., KAPSIMALI, D.C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1212-1219.
- ⁶⁶ LÁSZTITY, A., KELKÓ-LÉVAI, A., VARGA, I., ZIH-PERÉNYI, K., BERTALAN, E., *Microchem. J.* 73 (2002) 59-63.
- ⁷⁰ LEWEN, N. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 879-883.
- ⁹⁰ RAMAN, P., PATINO, L.C., NAIR, M.G., *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 7822-7827.
- ¹¹⁸ WU, X., SUN, D., ZHANG, Z., WANG, X., GONG, H., HONG, J., LEE, F.S.C., *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 311-323.
- ³⁰ CHOUDHURY, R.P., KUMAR, A., GARG, A.N., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 825-832.
- ⁴⁴ GOMEZ, M.R., CERUTTI, S., OLSINA, R.A., SILVA, M.F., MARTINEZ, L.D., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 569-576.
- ⁹³ RAZIC, S., ONJIA, A., POTKONJAK, B., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 845-850.
- ⁵⁹ KELKÓ-LÉVAI, A., LÁSZTITY, A., ZIH-PERÉNYI, K., HORVÁTH, Z., *Microchem. J.* 58 (1998) 272-280.
- ⁶⁰ KELKÓ-LÉVAI, A., VARGA, I., ZIH-PERÉNYI, K., LÁSZTITY, A., *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 827-833.
- ⁶⁷ LÁSZTITY, A., KELKÓ-LÉVAI, A., ZIH-PERÉNYI, K., VARGA, I., *Talanta* 59 (2003) 393-398.
- ¹²⁰ WUILLOUD, G.M. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 117-124.
- ⁴² FLORES, E.M.M. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2095-2102.
- ¹¹ ANG, H.H., LEE, E.L., CHEANG, H.S., *Int. J. Toxicol.*, 23 (2004) 65-71.
- ²² BIN, C., XIAORU, W., LEE, F.S.C., *Anal. Chim. Acta* 447 (2001) 161-169.
- ⁸⁶ ONG, E.S., YONG, Y.L., WOO, S.O., KEE, L.K., *Anal. Sci.* 16 (2000) 391-395.
- ¹²⁹ ZHANG, D.Q., YANG, L.L., SUN, H.W., *Anal. Chim. Acta* 395 (1999) 173-178.
- ¹³ ANTONIA, A., ALLEN, L.B., *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4615-4618.
- ⁷⁹ MILACIC, R., BENEDIK, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1999) 1029-1035.
- ⁸⁹ QI, L., HUIRONG, L., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 1203-1205.
- ⁹⁷ SCANCAR, J., MILACIC, R., BENEDIK, M., BUKOVEC, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 423-428.
- ¹⁰⁴ SUN, H., GAO, Y., YUAN, C., ZHANG, Y., YANG, L., ZHANG, D., *Anal. Sci.* 18 (2002) 325-328.
- ⁷ ALEXIU, V., CHIRTOP, E., VLADESCU, L., SIMION, M., *Acta Chim. Slov.* 51 (2004) 361-372.
- ¹⁹ BERMEJO-BARRERA, P. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 310 (1995) 355-367.
- ²⁰ BERMEJO-BARRERA, P. *et al.*, *Talanta* 43 (1996) 77-87.
- ²¹ BERMEJO-BARRERA, P. *et al.*, *Talanta* 43 (1996) 1783-1792.
- ³¹ CHUANG, I.C., HUANG, Y.L., LIN, T.H., *Anal. Sci.* 15 (1999) 1133-1136.
- ⁵⁶ JIA, X., WANG, T., BU, X., TU, Q., SPENCER, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 43-47.
- ⁵⁷ JIA, X., WANG, T., WU, J., *Talanta* 54 (2001) 741-751.
- ⁷⁴ MATTOS, J.C.P. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 687-692.

tem sido a técnica de espectrometria atômica mais empregada, principalmente, devido à elevada sensibilidade e a possibilidade introdução direta das amostras sem necessidade de uma etapa prévia de decomposição.

A técnica de ICP-OES foi empregada, possivelmente, devido a sua capacidade de análise multielementar, assim como a ICP-MS. Entretanto, a ICP-MS além da capacidade multielementar, permite a determinação de elementos em concentrações ainda mais baixas que a GF AAS e a ICP-OES. Recentemente, alguns procedimentos foram propostos visando o emprego da ICP-MS em substituição aos métodos gerais farmacopéicos de precipitação de sulfetos.^{69,114} Nestes trabalhos, as amostras foram solubilizadas em mistura de 2-butoxietanol e água (25:75) ou em solução de ácido nítrico de 1 a 80% (v/v) e introduzidas diretamente no espectrômetro. Boas recuperações foram encontradas para todos os elementos estudados, e os limites de quantificação nas amostras sólidas ficaram situados na faixa de 0,04 a 1,82 $\mu\text{g g}^{-1}$ para os mesmos elementos avaliados pelo teste farmacopéico de precipitação com sulfetos.

Apesar dos trabalhos envolvendo a ICP-MS serem relativamente recentes, cabe ressaltar que nenhum estudo foi encontrado visando o desenvolvimento de um método geral para a determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos por espectrometria de absorção atômica e por ICP-OES.

2.3. Procedimentos de preparo de amostra

Um procedimento de decomposição eficiente requer a decomposição da matriz, onde os analitos de interesse devem ser completamente liberados e solubilizados, estando dispostos de forma adequada em relação ao método analítico escolhido para a determinação. Entretanto, os avanços tecnológicos nesta área têm ocorrido lentamente em relação ao desenvolvimento da instrumentação analítica. Até recentemente, as técnicas de decomposição de amostras estavam restritas às técnicas de fusão, decomposição por via seca e decomposição por via úmida com

⁸² NIEMELA, M., KOLA, H., EILOLA, K., PERAMAKI, P., J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 433-439.

⁸⁸ POPINSKA, K. *et al.*, Nutrition 15 (1999) 683-686.

¹¹³ WANG, T., WALDEN, S., EGAN, R., J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 593-599.

⁶⁹ LEWEN, N., MATHEW, S., SCHENKENBERGER, M., RAGLIONE, T., J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 739-752.

¹¹⁴ WANG, T., WU, J., HARTMAN, R., JIA, X., EGAN, R.S., J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 867-890.

aquecimento convencional. Tais procedimentos, freqüentemente, envolvem muito tempo para decomposição, podem ocasionar contaminação ou perda do elemento de interesse e, geralmente, requerem atenção e experiência para a obtenção de resultados satisfatórios.⁶⁵

Infelizmente, um método generalizado para a decomposição de amostras sólidas não pode ser prescrito, devido à diversidade dos materiais a serem avaliados, à natureza do(s) elemento(s) a ser(em) determinado(s) e à técnica analítica a ser utilizada para a detecção.²⁹

Nesta breve revisão, maior destaque será dado aos procedimentos de combustão, em especial a decomposição em forno tipo mufla e a decomposição por combustão iniciada por microondas. Os procedimentos de decomposição por via úmida serão descritos e discutidos, dando preferência aos procedimentos em sistemas fechados. Os demais sistemas, apesar de importantes e muito empregados em rotina, não foram igualmente comentados em vista da extensa literatura disponível que documenta totalmente os fundamentos e a aplicação destes procedimentos.^{10,15,23,54,63,78,103}

2.3.1. Decomposição de amostras por combustão

Em contraste aos sistemas por via úmida que utilizam ácidos inorgânicos como oxidantes, a decomposição por via seca de materiais orgânicos envolve a ação do oxigênio em temperaturas elevadas ou, mais raramente um plasma de radicais oxigênio e oxigênio excitado. A fonte de oxigênio pode ser o ar ou, mesmo, ocorrer através do preenchimento do frasco de decomposição com oxigênio ou pela passagem de oxigênio por este. Portanto, a grande vantagem deste procedimento é utilizar apenas ar ou oxigênio como reagente, além de que estes gases apresentam mínimos teores de elementos-traço em relação aos ácidos inorgânicos normalmente

⁶⁵ LAMBLE, K.J., HILL, S.J., *Analyst* 123 (1998) 103R-133R.

²⁹ CHAKRABORTY, R., DAS, A.K., CERVERA, M.L., DE LA GUARDIA, M., *Fresenius J. Anal. Chem.* 355 (1996) 99-111.

¹⁰ ANDERSON, R., *Sample Pretreatment and Separation*, (1987) John Wiley & Sons.

¹⁵ ARRUDA (ED.), M.A.Z., *Trends in Sample Preparation*, Nova Science Publishers, Hauppauge, 2006.

²³ BOCK, R., *Handbook of decomposition methods in analytical chemistry*, Willey, New York, 1979.

⁵⁴ IYENGAR, G.V. *et al.*, *Element analysis of biological samples - principles and practice*, CRC Press, 1997.

⁶³ KRUG, F.J., Apostila "Métodos de Preparo de Amostras – Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar", VI Workshop sobre Preparo de Amostras, 2006, Santa Maria – RS.

⁷⁸ MESTER, Z., STURGEON, R.E. (Eds.), *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

empregados.⁵⁴ Neste procedimento, a matéria orgânica é decomposta por uma combinação de processos envolvendo, principalmente, pirólise e oxidação.

A seguir, serão discutidos apenas os procedimentos de decomposição em forno tipo mufla e a combustão iniciada por microondas, uma vez que o primeiro é comumente empregado em procedimentos farmacopéicos e o segundo representa uma alternativa eficiente de combustão em sistema fechado. As demais técnicas estão descritas em publicações específicas, nas quais maiores informações podem ser obtidas.^{18,39,72}

2.3.1.1. Decomposição em forno tipo mufla

A decomposição por via seca é um dos procedimentos mais simples para o preparo de amostras, onde a decomposição ocorre através da combustão e pirólise em uma mufla, normalmente com temperatura entre 450 e 550 °C para amostras orgânicas. A mufla empregada é relativamente simples e barata, empregando materiais como béqueres, cadinhos de porcelana, quartzo, platina e zircônio. Com exceção dos cadinhos de porcelana, os demais apresentam custo elevado para aquisição, mas podem ser reutilizados inúmeras vezes. Grandes quantidades de amostra podem ser decompostas, necessitando pouca atenção do analista durante este processo. Conseqüentemente, uma grande freqüência de determinações pode ser esperada, bem como pequena diluição da amostra, uma vez que o resíduo pode ser reconstituído em um pequeno volume de ácidos, normalmente diluídos. Os teores de matéria orgânica residual normalmente encontrados são extremamente baixos.⁵³

Entretanto, vários problemas podem ser observados. Apesar de existirem resultados contraditórios na literatura, a perda de elementos por volatilização pode ser significativa. Mercúrio é volátil em grande parte de suas formas químicas, o mesmo ocorrendo com As, Sb, Sn, Ge, Se, porém, em menor proporção. Além disso,

¹⁰³ SULCEK, Z., POVONDRA, P., *Methods of Decomposition in Inorganic Analysis*, CRC Press, (1989).

⁵⁴ IYENGAR, G.V. *et al.*, *Element analysis of biological samples - principles and practice*, CRC Press, 1997.

¹⁸ BARIN, J.S., FLORES, E.M.M., KNAPP, G., *Trends in sample preparation using combustion techniques*, In: M.A.Z. Arruda (Ed.), *Trends in Sample Preparation*, Nova Science Publishers, Hauppauge, 2006.

³⁹ FLORES, E.M.M., BARIN, J.S., MESKO, M.F., KNAPP, G., *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 1051-1064.

⁷² MAGALHÃES, C.E.C. *et al.*, *Decomposição de materiais orgânicos por combustão*, em: F.J. Krug, *Apostila "Métodos de Preparo de Amostras – Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elemental"*, VI Workshop sobre Preparo de Amostras, 2006, Santa Maria – RS.

⁵³ HOENIG, M. *et al.*, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 85-94.

Cd, Pb, Zn e Co são voláteis como cloretos ou brometos a temperaturas elevadas.⁵⁴ Para minimizar este problema, podem ser adicionados alguns sais, tais como nitratos e sulfatos, produzindo sulfatos e/ou nitratos dos elementos de interesse menos voláteis ou, ainda, facilitando a eliminação dos cloretos como NOCl ou HCl. Porém, se ácido nítrico e/ou ácido sulfúrico ou alguns nitratos e sulfatos forem introduzidos no sistema, a possibilidade de contaminação aumenta. Perdas também podem ocorrer através da retenção dos elementos no recipiente de decomposição. Além disso, muitas vezes, pode ocorrer a formação de silicatos, através da reação da amostra com o vidro ou quartzo empregado nos recipientes. Cadinhos de platina podem formar ligas com metais nobres. Outro problema que pode ser encontrado é que se o aumento da temperatura é feito muito rapidamente ($> 50 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$), pode levar a perdas da amostra por projeção ou ignição.⁵⁸ Por se tratar de um sistema de decomposição aberto, existe a possibilidade de contaminação através do ar atmosférico ou do ambiente interno da mufla.

Canfranc *et al.*²⁸ determinaram ferro e molibdênio em preparações dietéticas de uso farmacêutico por F AAS após decomposição por via seca em mufla a $600 \text{ }^\circ\text{C}$, obtendo bons resultados. Os autores salientam que não existem métodos validados para a determinação de Fe e Mo em tais amostras, uma vez que estas necessitam de um tratamento da amostra mais complexo em relação a outras preparações. Segundo estes, isto se deve ao fato destas amostras apresentarem elevada concentração de vitaminas, minerais, carboidratos, gorduras e proteínas.

Selênio, Zn e Cd foram determinados por ICP-OES em xampus anti-caspa por Salvador *et al.*, após decomposição por via seca em mufla ($500 \text{ }^\circ\text{C}$) e decomposição em sistema fechado assistida por microondas.⁹⁶ Os autores verificaram que a decomposição em sistema fechado assistida por microondas mostrou-se mais adequada, pois previne a perda de selênio como SeS_2 (substância adicionada ao xampu responsável pela ação anticaspa) por volatilização. Para cádmio e zinco, o mesmo procedimento é recomendado por ser simples e rápido.

A decomposição por via seca em mufla foi comparada com a decomposição assistida por microondas e a decomposição em alta pressão com aquecimento convencional ($300 \text{ }^\circ\text{C}$), High Pressure Asher (HPA), como procedimento de preparo de amostras para a determinação de As por espectrometria de absorção atômica

⁵⁴ IYENGAR, G.V. *et al.*, Element analysis of biological samples - principles and practice, CRC Press, 1997.

⁵⁸ JORHEM, L., *Mikrochim. Acta* 119 (1995) 211-218.

²⁸ CANFRANC, E., ABARCA, A., SIERRA, I., MARINA, M.L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 103-108.

com geração de hidretos por injeção em fluxo (FI-HG AAS) em materiais de referência certificados de amostras marinhas.³³ O procedimento empregando microondas mostrou-se insuficiente para a mineralização do arsênio presente nas amostras (apenas 13% do valor de As para tecido de mexilhões e 2% para músculo de bacalhau), bem como o sistema de alta pressão e temperatura (56% do valor de As para tecido de mexilhões e 25% para músculo de bacalhau), sendo que em ambos procedimentos, utilizou-se uma mistura de HNO₃ e H₂O₂. O procedimento envolvendo a decomposição por via seca a 550 °C, cadinho de quartzo e nitrato de magnésio como auxiliar de combustão foi mais adequado, uma vez que apresentou resultados concordantes com o valor certificado.

Alguns problemas como contaminação e dificuldades associadas ao lento aquecimento de sistemas tradicionais de decomposição por via seca, como as muflas, podem ser resolvidos. Atualmente estão disponíveis no mercado muflas com sistema de aquecimento através da irradiação de microondas, onde carbeto de silício altamente absorvedor de microondas é empregado. Entretanto, perdas por projeção da amostra podem ocorrer devido à elevada taxa de aquecimento.⁵⁸

2.3.1.2. Decomposição por combustão iniciada por microondas

Recentemente, foi proposto um procedimento de decomposição de amostras em sistema fechado por combustão iniciada por microondas (MIC).⁴⁰ Neste sistema, até 500 mg de amostra podem ser decompostas no interior de um frasco de quartzo em pressões de oxigênio de até 30 bar. O procedimento consiste na inserção da amostra previamente comprimida em um suporte de quartzo sobre um pequeno disco de papel filtro, no qual são adicionados 50 µL de uma solução de nitrato de amônio 6 mol L⁻¹. A ignição da amostra ocorre pela irradiação com microondas e os analitos são recolhidos em uma solução absorvedora na base do frasco.

O procedimento de decomposição iniciada por microondas permite a utilização do mesmo frasco comercial empregado para decomposição de amostras por via úmida, no qual a única modificação é o suporte de quartzo. A pressurização do

⁹⁶ SALVADOR, A., PASCUAL-MARTÍ, M.C., ARAGÓ, E., CHISVERT, A., MARCH, J.G., *Talanta* 51 (2000) 1171-1177.

³³ DAMKRÖGER, G., GROTE, M., JANSSEN, E., *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 817-821.

⁵⁸ JORHEM, L., *Mikrochim. Acta* 119 (1995) 211-218.

⁴⁰ FLORES, E.M.M., BARIN, J.S., PANIZ, J.N.G., MEDEIROS, J.A., KNAPP, G., *Anal. Chem.* 76 (2004) 3525-3529.

sistema é feita pela válvula originalmente desenvolvida para alívio dos gases após a decomposição com ácidos concentrados.

A decomposição por combustão iniciada por microondas permite a aplicação de uma etapa de refluxo da solução absorvedora, permitindo maior eficiência na lavagem do sistema e conseqüente melhora na solubilização dos analitos. A etapa de refluxo pode ser aplicada por 5 ou 10 min após a combustão através da irradiação com microondas.

O procedimento de decomposição é praticamente o mesmo para diferentes tipos de amostras orgânicas divergindo, apenas, na absorção e/ou solubilização dos analitos. Para tanto, diferentes soluções absorvedoras podem ser empregadas, dependendo do tipo de analito. Normalmente soluções ácidas são empregadas para metais enquanto que, para não-metais, soluções de pH mais elevado são utilizadas. Além disso, a concentração da solução absorvedora e a aplicação de uma etapa de refluxo podem influenciar na absorção de um determinado analito.

Maiores detalhes sobre a combustão iniciada por microondas podem ser encontrados na literatura.^{18,39,40,77}

2.3.2. Decomposição de amostras por via úmida

A decomposição de amostras através da utilização de ácidos inorgânicos oxidantes é bastante utilizada para a determinação de elementos nos mais variados tipos de amostras.²³ Normalmente, ácido nítrico é empregado como oxidante sozinho ou combinado com outros ácidos (p. ex., ácido sulfúrico e ácido clorídrico) ou, ainda, com peróxido de hidrogênio. Entretanto, outros reagentes podem ser empregados.^{16,83} Com relação aos sistemas disponíveis para a decomposição das

¹⁸ BARIN, J.S., FLORES, E.M.M., KNAPP, G., Trends in sample preparation using combustion techniques, In: M.A.Z. Arruda (Ed.), Trends in Sample Preparation, Nova Science Publishers, Hauppauge, 2006.

³⁹ FLORES, E.M.M., BARIN, J.S., MESKO, M.F., KNAPP, G., Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 1051-1064.

⁴⁰ FLORES, E.M.M., BARIN, J.S., PANIZ, J.N.G., MEDEIROS, J.A., KNAPP, G., Anal. Chem. 76 (2004) 3525-3529.

⁷⁷ MESKO, M.F. *et al.*, Microchem. J. 82 (2006) 183-188.

²³ BOCK, R., Handbook of decomposition methods in analytical chemistry, Willey, New York, 1979.

¹⁶ BARBOSA J.R., F., PALMER, C., KRUG, F.J., PARSONS, P.J., J. Anal. At. Spectrom. 19 (2004) 1000-1005.

⁸³ NÓBREGA, J.A. *et al.*, Spectrochim. Acta Part B 61 (2006) 465-495.

amostras, estes podem ser abertos ou fechados, sendo aquecidos por convecção ou através da utilização de microondas.⁷⁵

Os sistemas abertos de decomposição são mais suscetíveis a erros sistemáticos, principalmente por perdas ou contaminação do analito. Além disso, a decomposição em pressão ambiente com ácido nítrico apresenta temperatura limitada pelo ponto de ebulição do ácido ou mistura ácida, o que, muitas vezes, acarreta na decomposição incompleta da amostra. Para solucionar este problema, ácido sulfúrico pode ser utilizado para aumentar o ponto de ebulição podendo, assim, elevar a eficiência de oxidação. Entretanto, a utilização deste ácido pode causar problemas na etapa de determinação por técnicas de espectrometria atômica.^{27,36,49,87,130}

Por outro lado, a decomposição por via úmida em sistema aberto permite o processamento de um grande número de amostras empregando um sistema bastante simples e de baixo custo. Adicionalmente, grandes quantidades de amostra podem ser decompostas.⁷³ Além disso, a decomposição pode ser feita através do aquecimento com radiação microondas, que aumenta, substancialmente, a eficiência de aquecimento, tornando o procedimento mais rápido.⁸⁴

Outros oxidantes juntamente com ácido nítrico podem ser empregados para evitar os problemas associados com a baixa eficiência de decomposição. Ácido perclórico pode ser utilizado como oxidante auxiliar^{64,94} mas, apesar de apresentar elevada capacidade de oxidação, este ácido pode oferecer riscos ao operador e seu uso não tem sido recomendado.⁷⁸ Ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio também podem ser empregados como auxiliares de decomposição. Entretanto, sua utilização também deve ser avaliada em relação à possibilidade de introdução de contaminantes, pois grandes quantidades de ácido são normalmente consumidas em sistemas abertos.⁶⁸

⁷⁵ MATUSIEWICZ, H., Wet digestion methods, in: Z. Mester, R.E. Sturgeon (Eds.), *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003, pp.193-233.

²⁷ CABON, J.Y., LE BIHAN, A., *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 619-631.

³⁶ EVANS, E.H., GIGLIO, J.J., *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 1-18.

⁴⁹ GROTTI, M., LEARDI, R., FRACHE, R., *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1915-1924.

⁸⁷ OZCAN, M., AKMAN, S., *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 509-515.

¹³⁰ ZHE-MING, N., BIN, H., HENG-BIN, H., *Spectrochim. Acta Part B* 49 (1994) 947-953.

⁷³ MAICHIN, B., ZISCHKA, M., KNAPP, G., *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 715-720.

⁸⁴ NÓBREGA, J.A. *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1855-1876.

⁶⁴ LAMBLE, K., HILL, S.J., *Analyst* 120 (1995) 413-417.

⁹⁴ REID, H.J., GREENFIELD, S., EDMONDS, T.E., *Analyst* 120 (1995) 1543-1548.

⁷⁸ MESTER, Z., STURGEON, R.E. (Eds.), *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

⁶⁸ LEVINE, K.E., BATCHELOR, J.D., RHOADES, C.B., JONES, B.T. *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 40-59.

2.3.2.1. Decomposição em sistema fechado

A decomposição de amostras empregando ácidos concentrados em sistemas fechados requer um tempo consideravelmente menor quando comparada à decomposição de amostras em sistemas abertos que, normalmente, fica limitada à temperatura do ponto de ebulição do(s) ácido(s) empregado(s). Isto se deve ao aumento da pressão e, conseqüentemente, da temperatura que acarreta aumento da velocidade da reação e, também, a eficiência de decomposição.⁶² Além disso, algumas substâncias que não são decompostas em sistemas abertos podem ser decompostas em sistemas fechados.^{115,121,122,123,124}

Assim, a decomposição de amostras por via úmida em sistema fechado tem sido considerada como o estado da arte para preparo das amostras anteriormente à etapa de determinação.¹¹⁵ Nestes sistemas, ácido nítrico pode ser empregado como único reagente para a decomposição de materiais orgânicos devido às elevadas temperaturas atingidas. Desta forma, erros sistemáticos podem ser reduzidos significativamente quando técnicas instrumentais de espectrometria atômica forem utilizadas para determinação.

Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que temperaturas superiores a 300 °C são necessárias para a decomposição completa de várias substâncias.^{114,120,123} Isto pode ser um problema, por exemplo, quando o sistema de decomposição empregar frascos feitos de PTFE (politetrafluoretileno) ou PFA (perfluoroalcoxi), pois tais polímeros não suportam estas condições extremas de decomposição e, portanto, frascos de quartzo devem ser utilizados.⁷⁸ Sob este aspecto, alguns sistemas de alta pressão foram propostos para obter baixos valores de carbono residual quando ácido nítrico é empregado como único oxidante.^{24,117,131}

⁶² KINGSTON, H.M., JASSIE, L.B., *Anal. Chem.* 58 (1986) 2534-2541.

¹¹⁵ WASILEWSKA, M. *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1121-1125.

¹²¹ WÜRFELS M., JACKWERTH, E., STOEPLER, M., *Fresenius Z. Anal. Chem.* 329 (1987) 459-461.

¹²² WÜRFELS, M., JACKWERTH, E., STOEPLER, M., *Anal. Chim. Acta* 226 (1989) 1-16.

¹²³ WÜRFELS, M., JACKWERTH, E., STOEPLER, M., *Anal. Chim. Acta* 226 (1989) 17-30.

¹²⁴ WÜRFELS, M., *Mar. Chem.* 28 (1989) 259-264.

¹¹⁴ WANG, T., WU, J., HARTMAN, R., JIA, X., EGAN, R.S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 867-890.

¹²⁰ WUILLOUD, G.M. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 117-124.

⁷⁸ MESTER, Z., STURGEON, R.E. (Eds.), *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003.

²⁴ BOROWSKI, K.J., SCHOENFELD, C., *Am. Lab.* 38 (2006) 26.

¹¹⁷ WHITE, R.T., KETTISCH, P., KAINRATH, P., *At. Spectrosc.* 19 (1998) 187-192.

¹³¹ ZISCHKA, M., KETTISCH, P., SCHALK, A., KNAPP, G., *Fresenius J. Anal. Chem* 361 (1998) 90-95.

Contudo, concentrações elevadas de ácidos podem estar presentes nos digeridos fazendo com que, muitas vezes, aconteçam problemas com algumas técnicas analíticas e uma etapa subsequente de remoção ou diluição do excesso de ácido pode ser necessária.¹⁰⁸

A velocidade e a eficiência da instrumentação para a análise química tem aumentado dramaticamente nos últimos vinte anos. Até recentemente, os métodos de preparo de amostras não haviam mudado no mesmo ritmo da instrumentação para a análise química, passando então a constituir a etapa mais lenta na metodologia empregada em química analítica. A grande utilização de fornos de microondas domésticos nos últimos vinte anos acabou por estender o seu uso para laboratórios de química. A tecnologia envolvida no emprego de microondas está bastante avançada atualmente, revolucionando as áreas de preparo de amostras e química sintética. Desde a primeira aplicação de um forno de microondas para o preparo de amostras, em 1975, muitos procedimentos para decomposição (ou por vezes dissolução, extração, fusão, etc) têm sido desenvolvidos, sendo virtualmente aplicáveis a qualquer tipo de amostra.⁹⁹

Embora a decomposição por via úmida em sistema fechado tenha sido desenvolvida e fundamentada primeiramente através da utilização de um sistema de aquecimento convencional, as aplicações mais recentes têm empregado radiação microondas para aquecimento. Sua utilização crescente se deve, principalmente, ao menor tempo envolvido no processamento das amostras.⁶¹

2.4. Técnicas de espectrometria atômica

Dentre as diferentes técnicas de espectrometria atômica, vários princípios físicos diferentes são explorados para determinação de vários elementos, como por exemplo, absorção, emissão ou fluorescência atômica, difração de raios-X, entre outros. Entretanto, as técnicas mais empregadas rotineiramente são aquelas que envolvem absorção atômica (F AAS, CV AAS, HG AAS, ET AAS), emissão óptica (ICP-OES) e espectrometria de massas (ICP-MS). Os princípios de cada técnica,

¹⁰⁸ TODOLI, J.L., MERMET, J.M., *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 895-929.

⁹⁹ SMITH, F.E., ARSENAULT, E.A., *Talanta* 43 (1996) 1207-1268.

⁶¹ KINGSTON, H.M. (SKIP), HASWELL, S.J. (EDS.), *Microwave-Enhanced Chemistry. Fundamentals, Sample Preparation, and Applications*, American Chemical Society, Washington, 1997.

atualmente, estão bem estabelecidos e vários livros trazem os princípios básicos de cada técnica.^{55,81,85,116} Portanto, nesta revisão das técnicas de espectrometria atômica, serão abordados apenas os aspectos que permitam a comparação de diferentes aspectos de cada técnica que possam ter influência na escolha da melhor alternativa frente aos métodos farmacopéicos. Um resumo destes parâmetros pode ser encontrado na Tabela 3.

As técnicas de absorção atômica são bastante conhecidas e de uso difundido, pois foram uma das primeiras técnicas de espectrometria atômica a serem utilizadas para a determinação de diferentes elementos em baixas concentrações. As técnicas de F AAS e GF AAS são as que apresentam maior aplicação, podendo ser empregadas para a determinação de mais de 50 elementos. Já a HG AAS é limitada à determinação de elementos que formam hidretos voláteis, tais como As, Bi, Ge, In, Pb, Sb, Se, Sn e Te, enquanto a CV AAS é empregada apenas para a determinação de mercúrio. Apesar da F AAS poder ser aplicada praticamente para todos os elementos que a GF AAS, a faixa de trabalho normalmente está em mg L^{-1} , o que torna difícil sua aplicação para a determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos. Sendo assim, somente a GF AAS, juntamente com a ICP-OES e ICP-MS serão discutidas a seguir.

⁵⁵ JARVIS, K.E, GRAY, A.L., HOUK, R.S., *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Blackie, 1992.

⁸¹ MONTASER, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Wiley-VHC, New York, 1998.

⁸⁵ NOLTE, J., *ICP Emission Spectrometry, A Practical Guide*, Wiley-VCH Verlag, Alemanha, 2003.

¹¹⁶ WELZ, B., SPERLING, M., *Atomic Absorption Spectrometry*, VHC, 3a. ed., Weinheim, Alemanha, 1999.

Tabela 3. Comparação simplificada das técnicas de ICP-MS, ICP-OES e GF AAS.

	ICP-MS	ICP-OES	GF AAS
Limites de detecção	excelente para muitos elementos	muito bom para muitos elementos	excelente para alguns elementos
Elementos determináveis	>75	>75	>50
Capacidade de processamento de amostras*	<10 min por amostra para vários elementos	<10 min por amostra para vários elementos	3 a 4 min por elemento por amostra
Faixa de trabalho	ng L ⁻¹ a µg L ⁻¹	µg L ⁻¹ a mg L ⁻¹	µg L ⁻¹
Precisão	<5%	<5%	<5%
Grau de interferências	alta	média	baixa
Sólidos dissolvidos (concentração máxima)	0,1 a 0,4%	até 25%	>20%
Dificuldade de operação em rotina	fácil	fácil	fácil
Desenvolvimento de procedimentos	requer treinamento	requer treinamento	requer treinamento
Automação	disponível	disponível	disponível
Custo de operação	alto	alto	médio
Custo de aquisição	muito alto	alto	médio/alto

* amostras previamente decompostas e diluídas

2.4.1. Limites de detecção

Normalmente, os metais pesados encontram-se em concentrações relativamente baixas em medicamentos, o que limita a determinação destes a apenas algumas técnicas analíticas. Assim, a concentração mínima detectada por uma determinada técnica analítica é um parâmetro relevante na sua escolha para a determinação de metais pesados.

Os limites de detecção da ICP-MS para soluções analíticas ficam situados na faixa de ng L^{-1} . Estes limites são, em geral, melhores que aqueles obtidos em GF AAS, que ficam na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, a ICP-MS permite a determinação de vários elementos que apresentam piores limites de detecção por GF AAS, como observado para alguns elementos do grupo dos terras-raras. Em relação à ICP-OES, a ICP-MS apresenta limites de detecção cerca de três ordens de magnitude melhores. Com base nos limites de detecção, as técnicas, em suas configurações convencionais, podem ser classificadas na seguinte ordem: ICP-MS, GF AAS, ICP-OES, F AAS. Entretanto, é importante salientar que a GF AAS quando empregada para a determinação direta em amostras sólidas, sem preparo da amostra, pode apresentar limites de detecção da mesma ordem que a ICP-MS.

2.4.2. Interferências

As técnicas de absorção atômica, ICP-OES e ICP-MS possuem diferentes tipos de interferências e, portanto, serão tratadas a seguir separadamente. Cabe ressaltar, que os processos aqui discutidos cobrem somente as principais interferências relatadas na literatura, estando aqui mostradas apenas aquelas mais comumente observadas e que, de certa forma, permitam embasar as discussões posteriores.

2.4.2.1. Interferências em ICP-MS

As interferências espectrais podem ser classificadas em interferências devido a íons poliatômicos, isobáricos e íons de carga dupla, ocorrendo quando uma espécie formada apresenta a mesma razão massa/carga nominal ao analito. Estas interferências são observadas porque a maioria dos separadores de massa empregados, normalmente baseados em sistemas com quadrupolo ou tempo de voo, não apresenta resolução suficiente para resolver a interferência, p. ex., $^{40}\text{Ar}^+$ em

$^{40}\text{Ca}^+$; $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ em $^{80}\text{Se}^+$; $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ em $^{56}\text{Fe}^+$. Para corrigir estas interferências, isótopos do analito de interesse com menor abundância podem ser utilizados. Além disso, equações matemáticas para correção e instrumentos com celas de colisão/reação podem ser empregados.

A utilização de ácidos como HCl, HClO₄, e H₂SO₄ deve ser evitada em ICP-MS, pois interferências espectrais podem ocorrer para alguns elementos, p. ex., $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ em $^{75}\text{As}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ em $^{51}\text{V}^+$ e $^{32}\text{S}_2^+$ em $^{64}\text{Zn}^+$.⁷⁵ As alternativas para contornar os problemas causados por estes ácidos podem ser a utilização de colunas de separação/pré-concentração dos analitos, vaporização eletrotérmica (ETV), sistemas de nebulização com dessolvatação e células de colisão/reação. Sendo assim, a utilização de HNO₃ é recomendada, pois causa menos problemas de interferências poliatômicas.

Amostras com elevado teor de carbono também podem causar interferências espectrais, como p. ex., $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ em $^{52}\text{Cr}^+$. Além disso, o excesso de carbono pode causar deposição na interface do instrumento e alteração na capacidade de ionização do plasma, modificando, assim, as condições analíticas e a qualidade dos resultados obtidos.

Além das interferências espectrais, dependendo da concentração do ácido empregado, alguns efeitos na etapa de nebulização ou nas características do plasma podem ser evidenciados. Para HNO₃, a concentração máxima em que não são observadas interferências significativas para soluções analíticas é de 4% (v/v).¹⁰⁸ Entretanto, estas interferências podem ser corrigidas através da calibração com padrões internos.

Dependendo do tipo de amostra, podem ocorrer efeitos físicos, como por exemplo, na etapa de nebulização, ou mudanças na composição plasma. Para solucionar o problema podem ser empregados padrões internos ou ajuste de matriz (“*matrix matching*”).

Outra interferência observada deve-se aos efeitos de supressão do sinal, que podem ser causados por amostras que contenham elevadas concentrações de elementos dos grupos 1 da tabela periódica. Ajuste de matriz (“*matrix matching*”), diluição da amostra, calibração por adição de analito, diluição isotópica, extração ou separação do analito pode ser necessária para contornar esta interferência.

⁷⁵ MATUSIEWICZ, H., Wet digestion methods, in: Z. Mester, R.E. Sturgeon (Eds.), *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003, pp.193-233.

¹⁰⁸ TODOLI, J.L., MERMET, J.M., *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 895-929.

2.4.2.2. Interferências em ICP-OES

As interferências espectrais na ICP-OES se devem à emissão de radiação eletromagnética concomitante dos interferentes nas linhas espectrais dos elementos de interesse. Estas interferências podem ser oriundas da emissão de outro elemento com uma linha espectral próxima ao comprimento de onda de interesse ou emissão dos constituintes da amostra. Efeitos de matriz, de ácidos e de ionização também são observados. Desta forma, pode-se dizer que as interferências espectrais em ICP-OES são bem mais pronunciadas em relação à ICP-MS.

Uma vez que os sistemas de introdução de amostras em ICP-OES, assim como no caso da ICP-MS, normalmente empregam nebulizadores pneumáticos, efeitos físicos relacionados à eficiência de geração e transporte do aerossol podem ser observados.¹⁰⁸ Ajustes de matriz, diluição da amostra, calibração por adição de analito, extração ou separação do analito podem ser necessárias para contornar estas interferências.

2.4.2.3. Interferências em GF AAS

Em GF AAS as interferências normalmente se devem à presença da matriz da amostra, que pode causar elevado sinal de fundo. Além disso, perdas dos analitos podem ocorrer se estes forem voláteis. Estas interferências podem ser evitadas através da escolha correta das condições de temperatura e tempo do programa de aquecimento do forno de grafite, que permite eliminar grande parte da matriz sem perda dos analitos anteriormente à etapa de atomização. Adicionalmente, a utilização de ácidos inorgânicos, tais como H_2SO_4 e H_3PO_4 deve ser evitada, pois estes podem causar elevado sinal de fundo e, conseqüentemente, problemas de correção de fundo para alguns elementos.^{27,87,130}

Geralmente, para solucionar o problema da correção de fundo, deve-se assegurar a eliminação da matriz antes da etapa de atomização. Alguns auxiliares, os modificadores químicos, têm sido usados para minimizar diversos problemas durante o aquecimento, permitindo estabilizar termicamente o analito durante a etapa de pirólise, eliminando a matriz sem perdas do analito até a etapa de atomização.

¹⁰⁸ TODOLI, J.L., MERMET, J.M., *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 895-929.

²⁷ CABON, J.Y., LE BIHAN, A., *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 619-631.

⁸⁷ OZCAN, M., AKMAN, S., *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 509-515.

¹³⁰ ZHE-MING, N., BIN, H., HENG-BIN, H., *Spectrochim. Acta Part B* 49 (1994) 947-953.

Dentre os mais empregados para produtos farmacêuticos, pode-se destacar o paládio.^{20,21,71}

2.4.3. Quantidade de sólidos dissolvidos

A introdução das amostras nos espectrômetros aqui discutidos normalmente é efetuada na forma líquida. Entretanto, mesmo nesta forma, a amostra pode conter uma grande quantidade de sólidos dissolvidos que podem causar interferências durante a determinação dos analitos de interesse. A ICP-OES permite trabalhar com quantidades de sólidos dissolvidos que podem atingir até 25%, dependendo da configuração do equipamento (axial ou radial). Já a ICP-MS é a técnica mais sensível, sendo recomendável o limite máximo de 0,2% de sólidos dissolvidos, devido à deposição de sais na interface e ao aumento do efeito espaço-carga, que causa interferência, principalmente, para íons de baixa massa. Em GF AAS, amostras com elevados teores de sólidos podem ser utilizadas sem maiores problemas, uma vez que até mesmo amostras sólidas podem ser introduzidas diretamente no equipamento. Em ICP-OES, suspensões também podem ser utilizadas.

2.4.4. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho da ICP-MS e ICP-OES, em geral, se estende por oito ordens de magnitude, enquanto que para GF AAS esta faixa abrange uma ou duas ordens de magnitude. Esta diferença pode ser importante quando se trabalha com amostras com diferentes concentrações do(s) elemento(s) de interesse, pois pode evitar, em muitos casos, sucessivas etapas de diluição das amostras e das soluções de referência empregadas.

2.4.5. Capacidade de processamento de amostras

Neste trabalho, entende-se por processamento de amostras (do inglês, “*sample throughput*”), todas as etapas decorrentes desde o recebimento da amostra até o tratamento dos dados obtidos. Pelo caráter monoelementar da GF AAS, quando um grande número de elementos deve ser determinado em várias amostras,

²⁰ BERMEJO-BARRERA, P. *et al.*, *Talanta* 43 (1996) 77-87.

²¹ BERMEJO-BARRERA, P. *et al.*, *Talanta* 43 (1996) 1783-1792.

⁷¹ LIMA, E.C., KRUG, F.J., ARRUDA, M.A.Z., *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 601-611.

a capacidade de processamento é baixa frente a capacidade multielementar da ICP-OES e da ICP-MS. De maneira geral, pode-se dizer que a ICP-MS e a ICP-OES permitem a determinação de vários elementos (até cerca de 20) em menos de 5 min, enquanto que a GF AAS permite a determinação de apenas um elemento em cerca de 3 a 4 min. Entretanto, cabe ressaltar que, muitas vezes, a determinação por GF AAS não necessita do preparo das amostras enquanto que para ICP-OES e ICP-MS esta etapa pode ser imprescindível. Dependendo da natureza e concentração do analito, sistemas fechados de decomposição podem ser empregados, o que pode reduzir, sensivelmente, a capacidade de processamento de amostras da ICP-OES e ICP-MS.

2.4.6. Custos

A ICP-MS é a técnica de maior custo para aquisição do equipamento (de US\$ 150.000,00 a US\$ 200.000,00), enquanto que a ICP-OES apresenta custo um pouco superior a GF AAS (aproximadamente US\$ 100.000,00 para ICP-OES e de US\$ 40.000,00 a US\$ 60.000,00 para GF AAS), dependendo dos acessórios. As peças de manutenção, como tochas e nebulizadores apresentam custos semelhantes em ICP-OES e ICP-MS. Entretanto, o desgaste dos cones e da interface deve ser levado em consideração na ICP-MS. Em GF AAS, o custo dos tubos de grafite deve ser considerado, bem como o custo das lâmpadas de cátodo oco. Em todas as técnicas há um consumo elevado de argônio, sendo que as técnicas de ICP consomem mais argônio que a GF AAS, podendo consumir cerca de 10 m³ de argônio por dia.

Um fator que muitas vezes não é considerado no planejamento de um laboratório são os gastos referentes aos reagentes, equipamentos e ambiente de trabalho necessários à análise de traços que, obviamente, envolvem custos adicionais e que não estão inseridos nesta discussão.

2.5. Fármacos tricíclicos: Carbamazepina, Cloridrato de Amitriptilina e Cloridrato de Imipramina

Os fármacos tricíclicos têm importância relativamente grande no tratamento de diversas enfermidades, apresentando atividade farmacológica diferenciada entre seus representantes, como p. ex., antidepressiva (cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina), antihistamínica (loratadina), antipsicótica (clotiapina) e

anticonvulsivante (carbamazepina). Muitas vezes, o tratamento com estes fármacos é crônico, o que torna o controle de impurezas ainda mais importante, uma vez que o paciente irá ingeri-los diariamente. Além disso, o controle de qualidade nestas amostras pode apresentar alguns problemas, como mostrado para a decomposição de amostras de carbamazepina com ácido nítrico, mesmo em altas temperaturas e pressões.³⁹ Considerando esses aspectos, amostras de carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina foram escolhidas como exemplos para a determinação de metais pesados.

Primeiramente, os métodos farmacopéicos foram avaliados visando a identificação de suas vantagens e limitações. Após, diferentes procedimentos de preparo de amostras e de técnicas de espectrometria atômica foram avaliados. A seguir, uma breve descrição das substâncias é apresentada, bem como uma discussão acerca dos procedimentos farmacopéicos vigentes para determinação de metais pesados. As estruturas químicas das referidas substâncias estão apresentadas na Figura 1.

Carbamazepina

A carbamazepina é utilizada na terapêutica como um fármaco de ação anticonvulsivante. Quimicamente, é denominada 5*H*-Dibenz[*b,f*]azepina-5-carboxamida, sendo um pó cristalino branco a branco amarelado, inodoro. Este fármaco apresenta diferentes formas polimórficas que podem diferir, significativamente, em relação à solubilidade. É praticamente insolúvel em água. Apresenta fórmula molecular C₁₅H₁₂N₂O (PM 236,27 g mol⁻¹), sendo constituída por 76,25% de carbono, 5,12% de hidrogênio, 11,86% de nitrogênio e 6,77% de oxigênio. A faixa de fusão é de 190 a 193 °C.¹⁰⁶

Cloridrato de amitriptilina

O cloridrato de 3-(10,11-diidro-5*H*-dibenzo[*a,d*]ciclopten-5-ilideno)-*N,N*-dimetil-1-propanamina é utilizado como antidepressivo, sendo um pó branco ou quase branco ou cristais incolores, facilmente solúvel em água, clorofórmio e etanol. Apresenta fórmula molecular C₂₀H₂₃N.HCl (PM 313,87 g mol⁻¹), sendo constituído por

³⁹ FLORES, E.M.M., BARIN, J.S., MESKO, M.F., KNAPP, G., Spectrochim. Acta 62 (2007) 1051-1064.

76,53% de carbono, 7,71% de hidrogênio, 4,46% de nitrogênio e 11,30% de cloro. A faixa de fusão é de 196 a 197 °C.¹⁰⁶

Cloridrato de imipramina

O cloridrato de imipramina tem sido empregado na terapêutica como um fármaco para tratamento da depressão. Consiste em um pó branco ou levemente amarelado e, quando exposto à luz, adquire coloração que varia de amarelo até vermelho. Com relação à solubilidade, é livremente solúvel em água e etanol e ligeiramente solúvel em acetona. Apresenta fórmula molecular $C_{19}H_{24}N_2 \cdot HCl$ (PM 316,88 g mol⁻¹), sendo constituído por 72,02% de carbono, 7,95% de hidrogênio, 8,84% de nitrogênio e 11,19% de cloro. A faixa de fusão é de 174 a 175 °C.¹⁰⁶

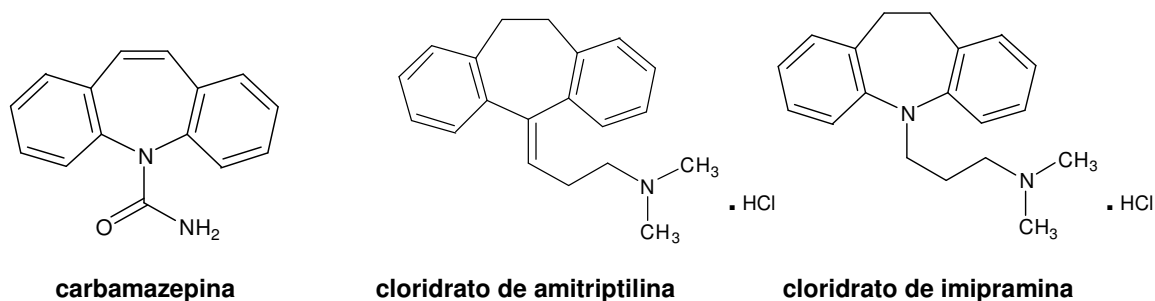


Fig. 1. Estruturas químicas da carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina.

Praticamente todas as farmacopéias apresentam monografias para estas substâncias, com exceção da Farmacopéia Brasileira que não possui monografia para o cloridrato de imipramina. Os ensaios de pureza descritos nas monografias farmacopéicas trazem o ensaio-limite para metais pesados, com limites máximos permitidos que variam de 10 a 20 µg g⁻¹. Porém, o preparo das amostras para determinação de metais pesados varia de acordo com a farmacopéia empregada, conforme demonstrado na Tabela 4.

¹⁰⁶ THE MERCK INDEX, Thirteenth Edition on CD-ROM, White House Station, New Jersey, USA 2001.

¹⁰⁶ THE MERCK INDEX, Thirteenth Edition on CD-ROM, White House Station, New Jersey, USA 2001.

Para a carbamazepina, a USP e a EP recomendam a decomposição em mufla. Entretanto, diferenças podem ser observadas em relação às temperaturas (500 a 600 °C para USP e 800 °C para EP) e auxiliares de decomposição empregados ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$, para USP e $\text{MgSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$, para EP). Já a Farmacopéia Brasileira recomenda a extração com água à quente durante 10 min.

Diferentes procedimentos são recomendados nas farmacopéias para o cloridrato de amitriptilina: decomposição em mufla (USP), solubilização em solvente orgânico (FB) e decomposição por via úmida (EP). Aparentemente, não há motivo para a utilização do método prescrito pela Farmacopéia Brasileira, pois a solubilização em solvente orgânico não é necessária porque a substância apresenta boa solubilidade em água. Os métodos de preparo das amostras para o cloridrato de imipramina são os mesmos adotados pelas farmacopéias americana e européia para a carbamazepina.

Tabela 4. Procedimentos de preparo de amostras e limites máximos permitidos para metais pesados em diferentes farmacopéias para carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina.

Substância	Preparo da amostra	Limite ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Carbamazepina		
USP	Método II (mufla)	10
FB	Método I (extração com H_2O)	10
EP	Método C (mufla)	20
Cloridrato de amitriptilina		
USP	Método II (mufla)	10
FB	Método II (dissolução em solv. orgânico)	10
EP	Método F (via úmida)	20
Cloridrato de imipramina		
USP	Método II (mufla)	10
FB	---	---
EP	Método C (mufla)	20

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

Para decomposição por via úmida em sistema aberto foi utilizado um bloco de aquecimento Velp Scientifica (modelo DK 42, Itália), com controle de temperatura, tempo de aquecimento e capacidade para 42 frascos. As decomposições efetuadas no sistema de decomposição *High pressure Asher* (HPA, Anton Paar GmbH, Graz, Áustria) foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Bavária (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) em Erlangen, Alemanha, sob responsabilidade do Dr. Peter Fecher. Para tanto, frascos de quartzo com volume de 70 mL de volume interno foram empregados, permitindo a decomposição de até 5 amostras simultaneamente.

A decomposição por via úmida assistida por microondas em sistema fechado foi feita em forno de microondas Milestone (Soriso, Itália), modelo Ethos 1, com potência de 1600 W (2 magnetrons de 800 W) equipado com rotor HPR-1000/10S com capacidade para dez frascos de TFM (PTFE quimicamente modificado). O controle de pressão e temperatura foi efetuado através de sensores, que só podem ser utilizados em temperaturas e pressões de, no máximo, 260 °C e 55 bar, respectivamente. Os sensores foram inseridos em um recipiente de decomposição, que serve como referência para os demais.

Para a decomposição das amostras por combustão iniciada por microondas foi empregado o forno de microondas Multiwave 3000 (Microwave Sample Preparation System, Anton Paar GmbH, Graz, Áustria), equipado com oito frascos de quartzo com volume interno de 80 mL (mod. XQ-80). 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.

As determinações por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite foram feitas no equipamento Analytik Jena, modelo AAS 5, equipado com amostrador automático MPE 5 e correção de fundo com lâmpada de deutério. O espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado empregado foi Perkin Elmer, mod. Elan DRC II, equipado com nebulizador do tipo Meinhard concêntrico e câmara de nebulização ciclônica. O mesmo sistema de introdução de amostras foi utilizado para as determinações por ICP-OES (Perkin Elmer, mod, Optima 4300 DV).

Para a preparação dos comprimidos das amostras decompostas por combustão iniciada por microondas, utilizou-se uma prensa hidráulica de aço Specac (Hydraulic Press 15 Ton, Orpington, Inglaterra). As amostras foram prensadas por três minutos sob pressão de 5 T.

Outros equipamentos também foram utilizados como: balança digital, com resolução de 0,0001 g e capacidade de 220 g, Shimadzu (mod. AY 220, Kyoto, Japão), estufa convencional com circulação de ar Nova Técnica (mod. 400/2ND, São Paulo, Brasil). Para as determinações de carbono residual nos digeridos foi empregado um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Alemanha), equipado com sistema de nebulização pneumático tipo “cross-flow”, câmara de nebulização de duplo passo tipo “Scott” e tocha com tubo injetor de quartzo com 2,5 mm de diâmetro interno.

Para a caracterização dos resíduos de decomposição foram empregados um espectrofotômetro de absorção molecular na região do ultravioleta e visível, modelo Lambda 25, espectrômetro de infravermelho, modelo Spectrum one e cromatógrafo à líquido de alta eficiência isocrático com detector UV, modelo Series 200, todos de fabricação Perkin Elmer (Norwalk, EUA). Também, foram empregados equipamentos de ressonância magnética nuclear de 300 MHz e análise elementar (CHN) da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.2. REAGENTES

A água utilizada foi previamente destilada e desionizada em coluna de troca iônica convencional e, posteriormente, purificada em sistema Milli-Q[®] (Ultrapure Water Purification System, Millipore, Bedford, EUA), apresentando resistividade final

inferior a 18,2 MΩ cm. Os ácidos, nítrico concentrado P.A. (Art. nº 100452.1000, 65%, 1,4 kg L⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha) e clorídrico concentrado P.A. (Art. nº 100318.250, 37%, 1,19 kg L⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha) foram destilados abaixo de seu ponto de ebulição em sistema de quartzo (Milestone, mod. duoPur 2.01E, Bergamo, Itália). Ácido sulfúrico concentrado P.A. (98%, 1,84 kg L⁻¹, Synth, Diadema, Brasil) e peróxido de hidrogênio (30% v/v) P.A. (Synth, Diadema, Brasil) também foram utilizados. Nitrato de amônio P.A. (lote 408015, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado para preparar a solução usada na etapa de ignição da amostra no procedimento de combustão iniciada por microondas. As soluções de nitrato de amônio 6 mol L⁻¹ foram preparadas através da dissolução do sal em água purificada.

As soluções de calibração empregadas nas determinações por GF AAS e ICP-MS foram preparadas a partir da solução de referência comercial 10 mg L⁻¹ SCP Science PlasmaCAL SCP33MS 140-130-325 (Quebec, Canadá) para Ag, As, Bi, Cd, Cu, Mo, Pb, Sn e Sb. Para mercúrio, as soluções foram preparadas a partir da solução de referência comercial na concentração de 1000 mg L⁻¹ Merck (Darmstadt, Alemanha).

Oxigênio, com de pureza 99,9991% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado no procedimento de combustão assistido por microondas.

Os reagentes tioacetamida, ácido acético, hidróxido de amônio, glicerina, ácido clorídrico, acetato de amônio, hidróxido de sódio empregados na etapa de determinação de metais pesados por precipitação de sulfetos foram de grau analítico.

As soluções de referência na concentração de 1000 mg L⁻¹ empregadas nos ensaios de determinação de metais pesados por precipitação de sulfetos foram feitas por diluição em água a partir dos seguintes sais: Ag(I): AgNO₃, (Merck Darmstadt, Alemanha); As(III): NaAsO₂ (Merck); As(V): Na₂HAsO₄ (Riedel de Haën, Alemanha); Cd(II): 3CdSO₄.8H₂O (Merck); Cu(II): Cu(NO₃)₂.3H₂O (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); Hg(II): HgCl₂ (Nuclear, Brasil); Mo(VI): Na₂MoO₄.2H₂O (Ecibra, Santo Amaro, SP); Pb(II): Pb(NO₃)₂ (Merck); Sb(III): C₄H₄KO₇Sb.0,5H₂O (Merck); Sb(V): K[Sb(OH)₆] (Merck). Já as soluções de Bi(III), preparada a partir de nitrato de bismuto básico (Merck) e Cu(I), preparada a partir de cloreto de cobre (Merck), foram dissolvidas em HCl 3 mol L⁻¹. A solução de referência de Sn(IV) empregada foi a solução estoque 1000 mg L⁻¹ em HCl 2 mol L⁻¹ (Merck nº. cat. 1.70242.0100).

3.3. AMOSTRAS

As amostras de carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina foram adquiridas diretamente de fornecedores de matéria-prima para a indústria farmacêutica.⁵²

3.4. MATERIAIS DIVERSOS

Toda a vidraria e materiais comuns de laboratório foram lavados e descontaminados por imersão em HNO₃ 10% (v/v) por, pelo menos, 24 h. Os papéis filtro (Black Ribbon Ashless, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Alemanha), utilizados na base do suporte de quartzo para adição de NH₄NO₃ no procedimento de decomposição por combustão iniciada por microondas, foram descontaminados por imersão em HNO₃ 10% (v/v) sendo, posteriormente, lavados com água purificada e secos em capela de fluxo laminar.

3.5. PROCEDIMENTOS DE DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS

3.5.1. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR PRECIPITAÇÃO COM SULFETOS

Foi utilizado o procedimento descrito na Farmacopéia Americana (USP 30, 2007). O procedimento consiste na comparação visual da amostra frente a um padrão de chumbo. O procedimento descrito no Método II consiste na adição de 4 mL de uma solução de referência de chumbo na concentração de 10 mg L⁻¹ (equivalente a 40 µg de Pb) em um tubo para comparação de cor e diluição com água à 25 mL. A seguir, o pH foi ajustado entre 3 e 4 com ácido acético 1 mol L⁻¹ ou hidróxido de amônio 6 mol L⁻¹ e o volume aferido à 40 mL. Posteriormente, foi adicionado 2 mL de tampão acetato pH 3,5 e 1,2 mL de tioacetamida, diluindo-se,

⁵² Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda; Valdequímica Produtos Químicos Ltda.

então, à 50 mL com água. Após 2 min, verificou-se a cor do precipitado obtido contra uma superfície branca.

3.5.2. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR GF AAS

Para a realização das curvas de pirólise e atomização nas amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina, efetuou-se a dissolução direta em água, uma vez que as amostras são bastante solúveis, não necessitando da etapa prévia de decomposição. Posteriormente, com as temperaturas de pirólise e atomização estabelecidas para cada elemento, foi feita a determinação nas amostras de carbamazepina, porém, através da introdução direta da amostra sólida. Apesar de existirem na literatura vários dados sobre as curvas de pirólise e atomização para soluções analíticas de metais pesados, os mesmos foram repetidos neste trabalho para avaliação do comportamento térmico e verificar a possibilidade de calibração com soluções aquosas.

Os elementos determinados por GF AAS foram Ag, As, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb e Sn. Mercúrio não foi determinado devido à dificuldade de estabilização térmica durante a pirólise, mesmo em baixas temperaturas. Isto inviabilizou uma maior remoção da matriz da amostra sem perda do analito, havendo a volatilização concomitante da amostra e do analito na etapa de atomização e conseqüente interferência em fase gasosa. Já para molibdênio, a determinação não foi efetuada devido a dificuldades na etapa de atomização para tubos de grafite com plataforma.

As amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina foram diluídas diretamente em água ou em HNO₃ 1% (v/v) na concentração de 1 ou 10% (m/v) para as determinações por GF AAS. Primeiramente, foram realizadas as curvas de pirólise e atomização e, também, foi verificada a necessidade de modificador químico (Pd). Posteriormente, com as condições otimizadas foram realizados os ensaios de recuperação, adicionando-se uma concentração conhecida dos elementos de interesse.

Todas as determinações foram efetuadas empregando-se plataforma de L'vov e corretor de deutério. Cerca de 20 µL de amostra e 10 µL de modificador, quando necessário, foram utilizados. Para a determinação de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb e Sn foram utilizadas as condições recomendadas pelo fabricante com relação à corrente

da lâmpada de cátodo oco (LCO) e resolução espectral, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Condições empregadas para a determinação de metais pesados por GF AAS.

Elemento	Corrente da LCO (mA)	Comprimento de onda (nm)	Resolução espectral (nm)
Ag	3,0	328,1	0,8
As	13,0	193,7	0,8
Bi	11,5	223,1	0,2
Cd	4,5	228,8	0,8
Cu	3,5	324,8	0,5
Pb	5,5	283,3	0,8
Sb	14,0	217,6	0,5
Sn	10,0	224,6	0,5

O programa de aquecimento empregado foi praticamente o mesmo, conforme demonstrado na Tabela 6. Entretanto, diferentes temperaturas de pirólise e atomização foram escolhidas após a otimização para cada elemento (ver Tabela 12 do item 4.2, Resultados e discussão). Cabe ressaltar, que o tempo de integração de 6 s foi suficiente para quase todos os elementos estudados, com exceção para Cu, em que o tempo foi de 10 s.

A determinação de metais pesados na carbamazepina foi feita utilizando o mesmo programa de aquecimento das amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina. Porém, pelo fato desta não ser solúvel em solventes aquosos, optou-se por efetuar a determinação através da introdução da amostra na forma sólida. Para tanto, foram utilizadas massas de amostra em torno de 1 mg. Quando necessário, modificador químico (Pd) foi pipetado diretamente sobre a plataforma antes da pesagem da amostra.

Tabela 6. Programa de aquecimento empregado para a determinação de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb e Sn.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa de aquecimento (°C s ⁻¹)	Tempo de permanência (s)	Vazão de argônio (L min ⁻¹)
Secagem	130	20	40	2
Pirólise	800-1200*	5	30	2
Atomização	1600-2400*	3000	6**	interrompido
Limpeza	2600	500	8	2

* variável para cada elemento (ver Tabela 12 do item 4.2, Resultados e Discussão)

** 10 s para Cu

3.5.3. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR ICP-MS E ICP-OES

A determinação de metais pesados por ICP-MS e ICP-OES foi efetuada através da diluição das amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina na concentração de 1 ou 10% (m/v) em água ou em HNO₃ 1% (v/v). Já as amostras de carbamazepina foram decompostas previamente à etapa de determinação. Para ICP-MS e ICP-OES, foram ajustadas a potência do gerador de rádio frequência (1400 e 1300 W), vazão de argônio principal (15 L min⁻¹), vazão de argônio auxiliar (1,2 e 1,11 L min⁻¹) e do nebulizador (0,2 e 0,65 L min⁻¹). Para todas as medidas por ICP-OES foi empregada a configuração axial.

Na Tabela 7 estão descritos os isótopos e os comprimentos de onda utilizados nas determinações de metais pesados por ICP-MS e ICP-OES, respectivamente.

Tabela 7. Razão massa/carga e comprimentos de onda empregados para determinação de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Mo, Pb, Sb e Sn por ICP-MS e ICP-OES (vista axial), respectivamente.

Elemento	ICP-MS	ICP-OES
	Razão massa/carga (m/z)	Comprimento de onda (nm)
Ag	107; 109	328,068(I); 338,289(I)
As	75	188,979(I)
Bi	209	223,061(I)
Cd	111; 114	228,802(I)
Cu	63; 65	324,752(I); 327,393(I)
Hg	200; 202	---
Mo	95; 96; 98	202,031(II); 203,845(II)
Pb	206; 207; 208	217,000(I); 283,306(I)
Sb	121; 123	217,582(I)
Sn	118; 120	189,927(I); 235,485(I); 283,998(I)

3.6. PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS

3.6.1. DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA

3.6.1.1. Decomposição em sistema aberto por via úmida com aquecimento convencional

Os ensaios de decomposição de carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina em bloco de aquecimento foram feitos empregando-se cerca de 90 a 100 mg de amostra e 8 mL de HNO₃ concentrado. A temperatura do bloco de aquecimento empregada foi 130 °C, durante um período de 2 h.

Já o procedimento farmacopéico de decomposição por via úmida em sistema aberto com aquecimento convencional foi efetuado de acordo com o Método III da USP 30. Para tanto, cerca de 2 g de amostra de amostra foram transferidas para um frasco de Kjeldahl de 100 mL posicionado em um ângulo de 45° para o interior da capela de exaustão. Após, a amostra foi umedecida com uma alíquota da mistura de 8 mL de H₂SO₄ e 10 mL de HNO₃ e brandamente aquecida até a reação iniciar. Posteriormente, foram adicionadas outras alíquotas da mistura até que 18 mL desta

tenham sido utilizados. A partir deste momento, a intensidade de aquecimento foi aumentada até a mistura escurecer. Após resfriamento, 2 mL de HNO₃ foram adicionados e aqueceu-se novamente até escurecimento. Mais HNO₃ foi adicionado até que o escurecimento não fosse mais observado. Após, aqueceu-se intensamente até o aparecimento de fumos brancos, densos. Cerca de 5 mL de H₂O foram adicionados após resfriamento. A mistura foi, então, aquecida, com produção de fumos brancos densos até a redução de volume a poucos mililitros.

3.6.1.2. Decomposição em sistema fechado por via úmida com aquecimento convencional “High Pressure Asher” (HPA)

A decomposição das amostras de carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina foram feitos empregando-se cerca de 85 a 190 mg de amostra e 3 mL de HNO₃. Os diferentes programas de aquecimento são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Programas de aquecimento empregados para decomposição das amostras pelo sistema HPA.

Programa de aquecimento	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (min)	Tempo de permanência (min)
HPA 1	280	90	120
HPA 2	320	100	120
HPA 3	320	100	180

3.6.1.3. Decomposição assistida por microondas em sistema fechado

Os ensaios de decomposição de carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina foram feitos empregando-se cerca de 90 a 100 mg de amostra e 8 mL de HNO₃ concentrado.

O programa de irradiação de microondas utilizado está descrito na Tabela 9. A temperatura e pressão máximas selecionadas foram de 220 °C e 35 bar, respectivamente. Este programa foi aplicado com algumas variações no tempo da

última etapa de irradiação, perfazendo até 60 minutos para alguns ensaios. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada permanecendo, assim, a etapa de 20 minutos.

Tabela 9. Programa de irradiação de microondas empregado para decomposição da amostras.

Potência (W)	Tempo de irradiação (min)	T1 (°C) *	T2 (°C) **	P (bar) ***
500	5	220	130	35
800	5	220	130	35
1100	20	220	130	35

* T1 = temperatura máxima, controlada pelo sensor interno de temperatura

** T2 = temperatura máxima, controlada pelo sensor externo de temperatura

*** P = pressão máxima, controlada pelo sensor interno de pressão

3.6.2. DECOMPOSIÇÃO POR COMBUSTÃO

3.6.2.1. Decomposição em sistema aberto em forno tipo mufla

A decomposição das três substâncias estudadas constante na Farmacopéia Americana (USP 30, 2007) segue exatamente o mesmo procedimento. Foram transferidos 4 g de amostra para um cadinho, seguida da adição de ácido sulfúrico suficiente para umedecer toda a amostra, seguido do aquecimento cuidadoso em baixa temperatura até carbonização. Após, aproximadamente 2 mL de ácido nítrico e 5 gotas de ácido sulfúrico foram adicionados. A amostra foi cuidadosamente aquecida, até que fumos brancos não fossem mais visualizados. Posteriormente, a amostra foi calcinada em mufla em temperatura entre 500 e 600 °C por, no máximo, 2 h até eliminação do carbono. Após resfriamento, foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico 6 mol L⁻¹ e após cobrir o cadinho seguiu-se o aquecimento em banho-maria por 10 min. Depois de resfriada, a solução foi transferida para um frasco de polipropileno, lavando o cadinho novamente com outra porção de 5 mL de ácido clorídrico 6 mol L⁻¹ e feita a aferição a 50 mL.

3.6.2.2. Decomposição em sistema fechado por combustão iniciada por microondas

O procedimento para combustão em sistema fechado assistida por microondas utilizado neste trabalho, difere do sistema comercial apenas pela utilização do suporte para a amostra. As amostras foram prensadas para que ficassem na forma de uma pastilha com 13 mm de diâmetro. Um disco de papel filtro foi colocado no suporte sobre o qual foi posicionada a amostra previamente comprimida. Subseqüentemente, foi feita a adição de 50 μL de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} . Foi estudado o uso de diferentes concentrações de HNO_3 como soluções absorvedoras. O volume escolhido de solução absorvedora (6 mL) corresponde ao volume mínimo recomendado pelo fabricante do forno para o tipo de frasco utilizado. Posteriormente, o suporte contendo a amostra foi inserido com auxílio de uma haste no interior do frasco de quartzo, já contendo a solução absorvedora. Imediatamente após o fechamento do frasco de quartzo com a tampa de PTFE, este era encaixado e preso no rotor. Desta forma, o frasco é mantido fixo durante a etapa de pressurização com oxigênio. Como não foram feitas modificações no sistema de controle de pressão original do rotor, foi possível monitorar a variação de pressão durante todo o processo de decomposição (pressurização inicial, combustão e refluxo).

A etapa de pressurização foi efetuada através de uma ponteira de PTFE, adaptada para facilitar o encaixe e que foi inserida no orifício utilizado para efetuar o alívio de pressão. Para garantir a entrada de oxigênio durante a etapa de pressurização é necessário que a válvula que controla o escapamento dos gases esteja aberta para que, assim, o frasco possa ser preenchido com oxigênio. Para que ocorra o equilíbrio entre a pressão interna do frasco e a pressão de pressurização, aproximadamente 2 min são necessários nesta etapa. Após este tempo, a válvula é fechada e a ponteira removida. A pressão de trabalho adotada foi de 25 bar. A seguir, o rotor com quatro frascos era levado à cavidade do forno de microondas e submetido ao programa selecionado. Na Tabela 10 são demonstrados os programas utilizados.

Tabela 10. Programas de aquecimento utilizados. A taxa de aumento de pressão máxima foi 3 bar s^{-1} , a temperatura máxima 280 °C e a pressão máxima 80 bar.

Potência (W)	Tempo (min)	Ventilação
1400	5	2
0	20	3

Após o término do programa o rotor era levado até uma capela de exaustão para alívio da pressão. Esta etapa foi feita de forma lenta para que não houvesse projeção dos gases condensados na tampa ou, até mesmo, da própria solução absorvedora.

Assim que a pressão interna era completamente aliviada, a válvula de escape dos gases era novamente fechada e os frascos eram agitados manualmente com movimentos circulares para que ocorresse, assim, a lavagem das paredes do frasco e do suporte. A lavagem do sistema com a própria solução absorvedora foi feita para garantir que elementos presentes na fração condensada dos gases resultantes do processo de combustão fossem totalmente absorvidos. Além disso, uma pré-lavagem já tinha sido feita pelo refluxo da solução absorvedora durante o programa de aquecimento. Os frascos de quartzo foram, finalmente, lavados com H₂O a solução resultante era, então, transferida para frascos de polipropileno e aferida ao volume final de 50 mL com H₂O Milli-Q.

Para a melhor funcionalidade do procedimento de combustão o programa de controle original foi modificado, permitindo, assim, uma maior variação na taxa de controle de pressão em função do tempo. Esta taxa pode ser alterada de acordo com a necessidade do procedimento de decomposição. O programa de aquecimento utilizado foi a versão v1.27-synt, a qual permite uma taxa de variação de 0,1 a 3 bar s⁻¹. A utilização da taxa em 3 bar s⁻¹ facilita o processo de combustão, pois o sistema de segurança do equipamento permite assim um maior aumento de pressão em um curto período de tempo, sem que ocorra pausa na irradiação das microondas.

3.7. CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DA DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA

Durante a realização de ensaios preliminares de decomposição das amostras de fármacos tricíclicos estudadas por via úmida, um precipitado foi observado nos digeridos para as amostras de cloridrato de amitriptilina, cloridrato de imipramina e carbamazepina. Entretanto, apenas os precipitados obtidos na decomposição das amostras de carbamazepina foram estudados através da utilização de diferentes métodos analíticos para caracterização.

Sendo assim, os resíduos presentes após a decomposição das amostras por via úmida foram separados, primeiramente, por filtração do digerido obtido. Após, uma etapa de lavagem com água foi efetuada até que o filtrado estivesse com pH superior a 5. Posteriormente, o resíduo retido no papel filtro foi seco à temperatura ambiente por 2 h e armazenado em frascos de polipropileno.

Os resíduos foram caracterizados empregando-se as técnicas de espectrofotometria UV-Vis, cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C).

3.7.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível

As amostras foram dissolvidas em metanol na concentração de 10 mg L^{-1} . Após, foi efetuada a varredura do espectro de absorção na região do ultravioleta e visível, de 220 a 580 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer, mod. lambda 25).

3.7.2. Cromatografia a líquido de alta eficiência

Foi utilizado um cromatógrafo à líquido no modo isocrático (Perkin Elmer Series 200) com detector na região do ultravioleta (230 nm). A coluna empregada foi de octadecilsilano (C18) com partículas de $5 \mu\text{m}$ de diâmetro, comprimento de 15 cm e diâmetro interno de 4,2 mm. A fase móvel foi composta por uma mistura de metanol e água na proporção 70:30, com fluxo de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$. O tempo para eluição foi 30 min.

As amostras dos resíduos remanescentes da decomposição por via úmida foram dissolvidas em metanol na concentração de 100 mg L^{-1} . Em todas as injeções foi utilizada uma alça de amostragem de $20 \mu\text{L}$.

3.7.3. Espectroscopia no Infravermelho

Cerca de 2 a 5 mg das amostras foram trituradas com aproximadamente 300 mg de KBr em gral de ágata e, posteriormente, prensadas (2 T) por 1 min para formar uma pastilha. Esta foi, então, introduzida no equipamento e o espectro registrado na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Em todos os espectros a amostra teve sua concentração ajustada para a transmitância situar-se entre 5 e 25%, conforme recomendação da Farmacopéia Brasileira. (Farmacopéia Brasileira, V.2.14-4)

3.7.4. Ressonância Magnética Nuclear

As amostras foram dissolvidas em metanol e dimetilsulfóxido deuterados para os espectros de ^1H e ^{13}C , respectivamente. Já para as amostras de carbamazepina obtidas após a reação com ácido nítrico, problemas de solubilidade com dimetilsulfóxido foram observados. O espectro de ^1H foi efetuado dissolvendo a amostra em metanol, enquanto que para o espectro de ^{13}C a amostra foi dissolvida na mistura de partes iguais de dimetilsulfóxido e acetona, com um tempo de aquisição de sinal de 14 horas. Todos os experimentos foram realizados em equipamento de 300 MHz.

3.8. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONO RESIDUAL

A determinação do teor de carbono residual após a decomposição foi efetuada com base no procedimento descrito por Gouveia *et al.*⁴⁸ As determinações foram conduzidas em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente

acoplado e vista axial (Spectro Ciros CCD). Os comprimentos de onda de emissão utilizados para a determinação de carbono foram 193,091 e 247,856 nm. Como padrão interno, ítrio foi adicionado às amostras e padrões, perfazendo a concentração de 1 mg L⁻¹, sendo este monitorado em 371,030 nm. Imediatamente antes da determinação, uma alíquota de 10 mL da amostra contendo padrão interno, foi submetida a ultra-som por 1 minuto (130 W, 20 kHz, modelo VCX 130 PB, Sonics, EUA, www.sonics.biz) para a remoção do CO₂ dissolvido na solução.

A seguir, um esquema simplificado dos procedimentos avaliados neste trabalho é apresentado (Figura 2).

⁴⁸ GOUVEIA, S.T., SILVA, F.V., COSTA, L.M., NOGUEIRA, A.R.A., NÓBREGA, J.A., *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 269-275.

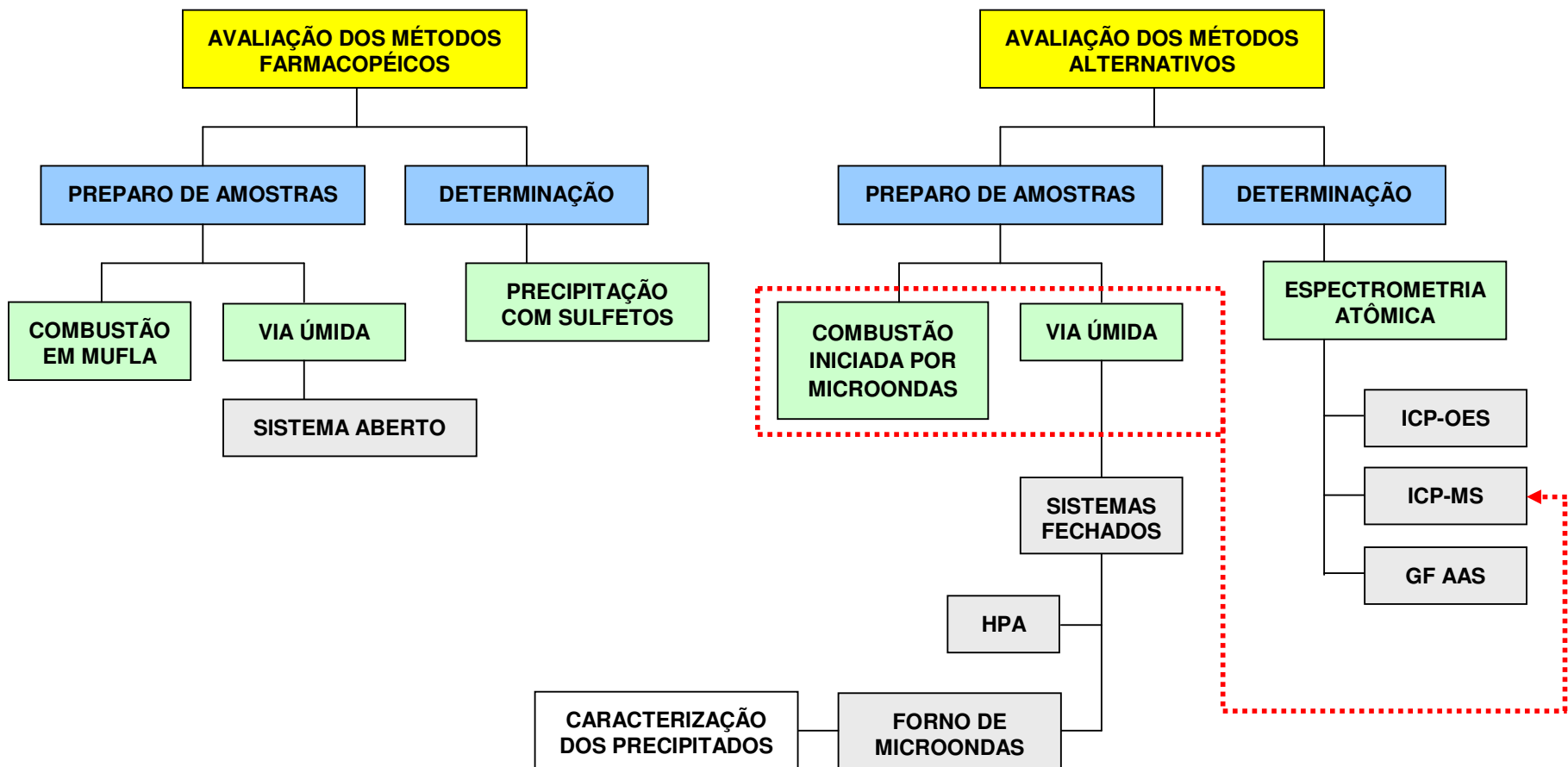


Figura 2. Esquema simplificado dos procedimentos analíticos estudados.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados encontram-se subdivididos em quatro partes. Primeiramente, o método de determinação de metais pesados descrito na USP 30 foi avaliado nas etapas de determinação por precipitação de sulfetos e preparo das amostras em mufla e por via úmida para amostras de fármacos tricíclicos. Uma vez que problemas foram observados em ambas etapas, procedimentos alternativos foram estudados para as etapas de determinação e preparo das amostras, compreendendo a segunda, terceira e quarta partes deste trabalho. Ainda, buscou-se compreender a dificuldade observada na decomposição de fármacos tricíclicos por via úmida com ácido nítrico.










4.1. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPÉICOS DE DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS












Conforme citado anteriormente (item 2.2.1. *Revisão*), os métodos farmacopéicos para a determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos são bastante semelhantes em relação às etapas de preparo e de determinação. Assim, neste item, uma avaliação crítica destas etapas é efetuada visando demonstrar sua adequabilidade para a determinação de metais pesados. Desta forma, testes com soluções analíticas dos elementos que tipicamente respondem ao íon sulfeto e ensaios de recuperação foram realizados para avaliar a etapa de determinação e preparo de amostras, respectivamente.

4.1.1. ENSAIO-LIMITE PARA METAIS PESADOS

Normalmente, o procedimento farmacopéico se presta à determinação simultânea dos metais eventualmente presentes na amostra. Entretanto, poucas informações acerca da resposta para cada elemento estão disponíveis nos compêndios oficiais e na literatura. Assim, para avaliação preliminar do procedimento recomendado, foi efetuada a determinação de metais pesados através da precipitação de sulfetos para soluções analíticas contendo os metais que tipicamente respondem ao teste, conforme descrito na USP 30 (2007), conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11. Precipitados obtidos no ensaio-limite para metais pesados descrito na farmacopéia americana (USP 30, 2007) com soluções analíticas de diferentes elementos. Cada par de tubos corresponde ao branco (à direita) e aos precipitados das soluções de metais tratados com tioacetamida (à esquerda).

Elemento	Precipitado (sulfeto)	Elemento	Precipitado (sulfeto)	Pb 40 µg
Ag(I) 1000 µg		Hg(II) 1000 µg		
As(III) 5000 µg		Mo(VI) 5000 µg		
As(V) 5000 µg		Pb(II) 1000 µg		

Elemento	Precipitado (sulfeto)	Elemento	Precipitado (sulfeto)	Pb 40 µg
Bi(III) 5000 µg		Sn(IV) 5000 µg		
Cd(II) 5000 µg		Sb(III) 5000 µg		
Cu(I) 5000 µg		Sb(V) 5000 µg		
Cu(II) 5000 µg				

Analisando a Tabela 11, pode-se perceber que, com exceção do Pb(II), que é o elemento empregado como padrão (massa de 40 µg) para os fármacos estudados, somente Ag e Hg(II) respondem bem ao ensaio farmacopéico, ainda que 1000 µg de Hg(II) sejam necessários para equivaler à cor de apenas 40 µg de Pb(II). Para As(III), As(V) e Mo(VI) praticamente nenhuma cor foi observada, mesmo com quantidades tão elevadas quanto 5000 µg. Já para Cd, Cu(I), Cu(II), Sb(III) e Sb(V) a cor formada com 5000 µg é menos intensa que aquela desenvolvida pelo padrão de Pb. As soluções de Bi, e Sn(IV) apresentaram turvação durante o ajuste de pH e resultados conclusivos não puderam ser obtidos.

Desta forma, podemos inferir que, caso a amostra apresente como contaminantes As(III), As(V), Cu(I), Cu(II), Mo(VI), Sb(III) e Sb(V) em uma concentração 125 vezes superior ao padrão descrito na monografia, o teste não será capaz de detectar estes elementos. Da mesma forma, Hg(II) só será detectado se estiver em concentração superior a 25 vezes em relação à concentração do padrão farmacopéico. Se o Método II for empregado, este elemento provavelmente será perdido no preparo da amostra em mufla, impossibilitando sua determinação. Portanto, os únicos elementos que apresentariam resultados satisfatórios seriam Ag e Pb(II). É importante destacar que os resultados obtidos podem ser ainda piores na presença da matriz da amostra devido a eventuais interferências na precipitação e na comparação de cor.

4.1.2. PREPARO DE AMOSTRA POR DECOMPOSIÇÃO EM MUFLA E POR VIA ÚMIDA EM SISTEMA ABERTO

O procedimento farmacopéico de decomposição em mufla apresentou alguns problemas, em especial, na etapa de adição de 2 mL ácido nítrico, que promoveu uma reação exotérmica bastante violenta com as amostras e conseqüente perda parcial das mesmas por projeção. Assim, optou-se por diminuir a quantidade de amostra de 4 g para 2 g e adicionar os 2 mL de HNO₃ em quatro porções de 0,5 mL, esperando a amostra arrefecer antes da adição de cada alíquota. Entretanto, quando as amostras foram aquecidas, novamente foi observado o mesmo problema. Assim, optou-se por

deixar as amostras em repouso até o próximo dia (*“overnight”*), para, enfim, dar prosseguimento à decomposição.

Apesar do procedimento de decomposição em mufla apresentar boa eficiência de decomposição, este pode estar sujeito a problemas de perdas e/ou contaminação, pelo fato de se tratar de um sistema aberto e que envolve elevadas temperaturas. Para avaliar a possibilidade deste processo introduzir erros analíticos, foi efetuado um ensaio de recuperação (adição de 5 μg de cada elemento) aplicado ao procedimento de decomposição descrito para carbamazepina e cloridrato de amitriptilina na USP 30 (Método II), conforme demonstrado na Figura 2:

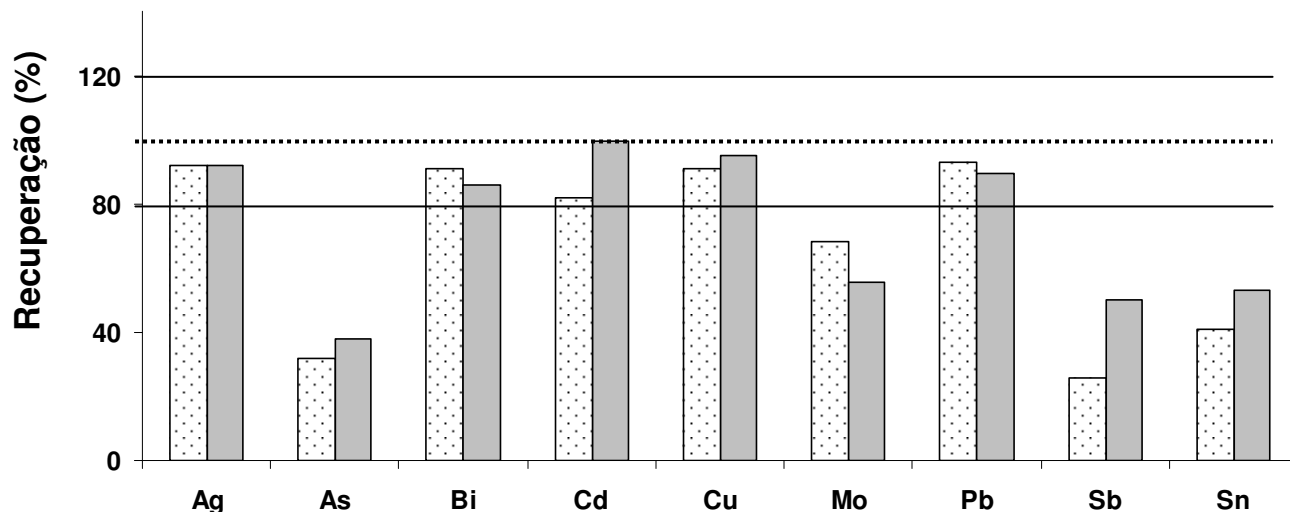


Figura 3. Recuperações obtidas após a decomposição de cloridrato de amitriptilina (branco) e carbamazepina (cinza) pelo Método II da USP 30 (2007). As determinações foram efetuadas por ICP-OES. A quantidade de analito adicionada nas amostras é equivalente a 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cada elemento.

Analisando a Figura 3, pode-se verificar que bons resultados foram obtidos apenas para Ag, Bi, Cd, Cu e Pb em ambas amostras. Já para As, Mo, Sb e Sn, perdas

significativas foram observadas. Portanto, dos 10 elementos do grupo metais pesados que tipicamente respondem ao íon sulfeto na etapa de determinação, 5 são perdidos em quantidades significativas na etapa de preparo de amostras por decomposição em mufla. Ao comparar estes resultados com aqueles obtidos por Lewen *et al.*⁶⁹ percebe-se boa concordância para Ag, As, Mo e Sb e diferença para Bi, Cd e Pb. Esta diferença pode ser explicada pelo fato das amostras analisadas, dos cadinhos e da mufla utilizada serem diferentes, o que pode influenciar os resultados obtidos.

Com relação às recuperações obtidas para amostras de cloridrato de amitriptilina, com exceção para Mo, todos os outros elementos apresentaram valores iguais ou inferiores em relação à carbamazepina. Estas perdas podem ser atribuídas a volatilização dos analitos através da formação de cloretos voláteis,^{23,103} uma vez que 11,3% da matriz da amostra é composta por cloro, o que representa, aproximadamente, 450 mg de cloro no cadinho.

Uma vez que o Método II da USP 30 mostrou-se inadequado para as amostras estudadas, optou-se por efetuar o preparo de amostras recomendado no Método III, que é praticamente igual ao método “F” da EP e ao método Método III da FB (íon sulfeto). O método “F” da EP é recomendado para a decomposição de amostras de cloridrato de amitriptilina e consiste na decomposição por via úmida empregando H₂SO₄ e HNO₃ em frasco de Kjeldahl. Para todas substâncias estudadas (carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina), a decomposição foi incompleta, com formação de um precipitado, conforme mostrado na Figura 4.

⁶⁹ LEWEN, N., MATHEW, S., SCHENKENBERGER, M., RAGLIONE, T., J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 739-752.

²³ BOCK, R., Handbook of decomposition methods in analytical chemistry, Wiley, New York, 1979.

¹⁰³ SULCEK, Z., POVONDRA, P., Methods of Decomposition in Inorganic Analysis, CRC Press, Boca Raton, USA (1989).



Figura 4. Digerido obtido após o preparo da amostra segundo o Método III da USP 30 para o cloridrato de amitriptilina.

Baseado nos resultados obtidos pode-se inferir que os métodos farmacopéicos tanto de preparo de amostras quanto de determinação são limitados para a determinação de metais pesados em fármacos tricíclicos, apesar de serem recomendados para tanto nas 3 farmacopéias empregadas neste trabalho.

Portanto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos que possam fornecer resultados quantitativos e reprodutíveis. Dentre os vários métodos disponíveis para tanto, são propostos a seguir três métodos de determinação de metais pesados por espectrometria atômica, GF AAS, ICP-OES e ICP-MS. Além disso, diferentes métodos de preparo de amostras por via úmida e por combustão são avaliados para a decomposição destes fármacos e posterior adequabilidade para determinação pelas técnicas instrumentais citadas.

4.2. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR GF AAS

Para a realização das curvas de pirólise e atomização nas amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina, efetuou-se a dissolução direta em água, uma

vez que as amostras são bastante solúveis, não necessitando da etapa prévia de decomposição. Posteriormente, com as temperaturas de pirólise e atomização estabelecidas para cada elemento, foi feita a determinação nas amostras de carbamazepina, porém, através da introdução direta da amostra sólida. Apesar de existirem na literatura vários dados sobre as curvas de pirólise e atomização para soluções analíticas de metais pesados, os mesmos foram repetidos neste trabalho para avaliação do comportamento térmico e verificar a possibilidade de calibração com soluções aquosas. Com base nestes dados, buscou-se simplificar o procedimento e tentar estabelecer um método geral para determinação de metais pesados por GF AAS.

Dentre os diferentes elementos estudados, observou-se através das curvas de pirólise e atomização que:

- Ag e Cu podem ser determinados sem a utilização de modificadores químicos, conforme mostrado para Ag na Figura 5 e Cu na Figura 27, em anexo.
- Cd e Pb necessitam da utilização de modificador, uma vez que ambos elementos são voláteis e podem ser perdidos na etapa de pirólise, como demonstrado nas Figuras 6 e 7 para Pb e nas Figuras 8, 9 e 10 para Cd .
- para As, Bi, Sn e Sb, mesmo com Pd como modificador para soluções 10% (m/v), distúrbios na linha de base foram observados e a determinação só foi possível quando as amostras foram diluídas para 1% (m/v) empregando modificador químico, como observado na Figura 11 para Sb. As curvas de pirólise e atomização para os demais elementos encontram-se em anexo.

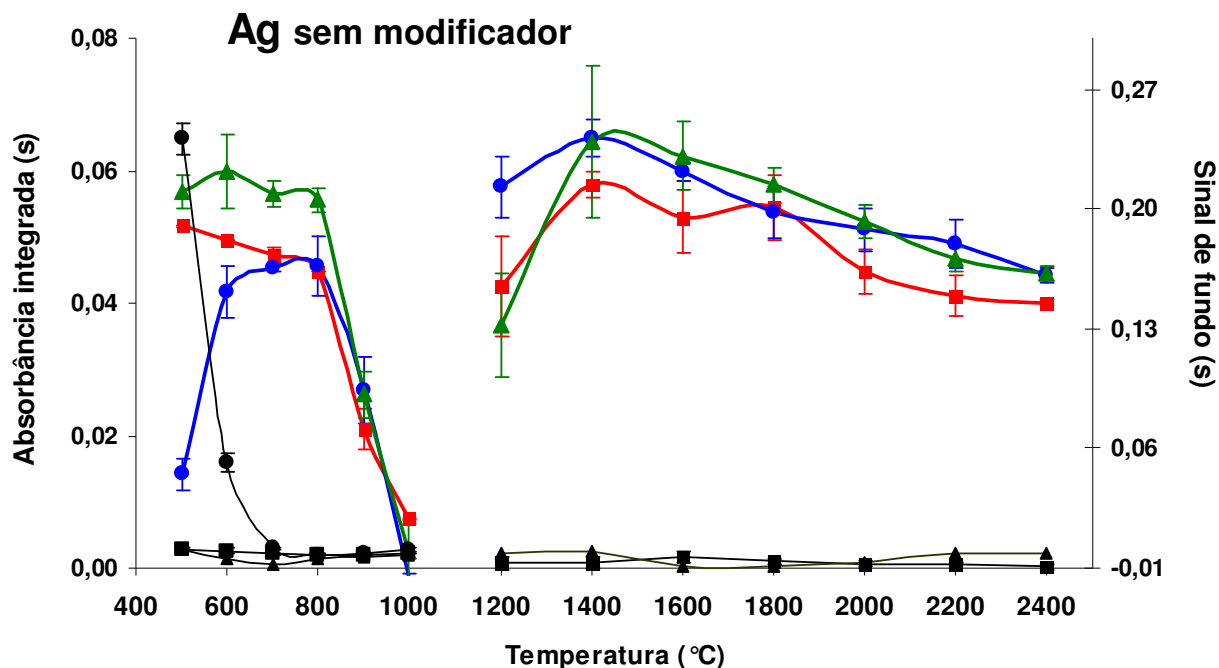


Figura 5. Curvas de pirólise e atomização obtidas sem modificador químico para solução analítica de Ag (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Ag adicionada nas amostras é equivalente à concentração de $0,025 \mu\text{g g}^{-1}$.

Analisando a Figura 5, é possível observar que o comportamento térmico das amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina é semelhante ao comportamento da solução analítica de Ag. Na etapa de pirólise, pode-se perceber a presença de sinal de fundo elevado em $500 \text{ }^\circ\text{C}$, que é eliminado em $700 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura máxima sem perdas do analito ocorre em $800 \text{ }^\circ\text{C}$. Para atomização, apesar das temperaturas de 1400 e $1600 \text{ }^\circ\text{C}$ apresentarem maior resposta, uma maior repetibilidade é obtida na temperatura de $1800 \text{ }^\circ\text{C}$. A massa característica encontrada foi de $2,5 \text{ pg}$.

Resultados semelhantes foram obtidos para Cu (Figura 27, em anexo), onde um sinal de fundo elevado foi observado em $500 \text{ }^\circ\text{C}$ que, apesar de estar dentro da faixa de correção do equipamento é, praticamente, eliminado em $600 \text{ }^\circ\text{C}$. Entretanto, quando a

temperatura de pirólise ultrapassa 1200 °C o sinal de fundo começa a aumentar, porém dentro da faixa de correção do equipamento. Um perfil semelhante é observado para as amostras quando a temperatura de atomização ultrapassa 2200 °C. Este aumento do sinal do fundo pode ser explicado pela volatilização concomitante de resíduos da matriz que não são eliminados na etapa de pirólise juntamente com o analito. Na etapa de atomização, em temperaturas inferiores à 2400 °C o perfil de sinal obtido foi bastante alongado, necessitando de tempos de integração do sinal de cerca de 10 segundos. Assim, as temperaturas mais adequadas de pirólise e atomização foram 1200 °C e 2400 °C. A massa característica encontrada foi de 8,6 pg.

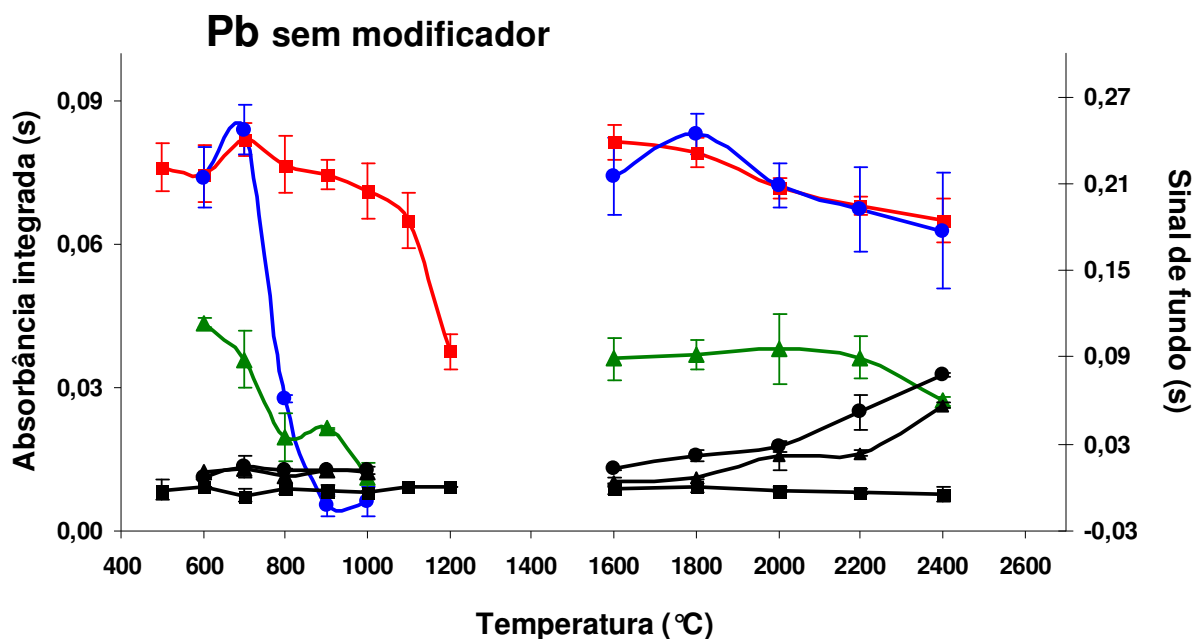


Figura 6. Curvas de pirólise e atomização obtidas sem modificador químico para solução analítica de Pb (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Pb adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 0,15 µg g⁻¹.

Analisando a Figura 6, é possível verificar que, na presença da amostra, chumbo é perdido na etapa de pirólise em temperaturas inferiores a 800 °C. Sendo assim, a adição de modificador foi avaliada, conforme demonstrado na Figura 7.

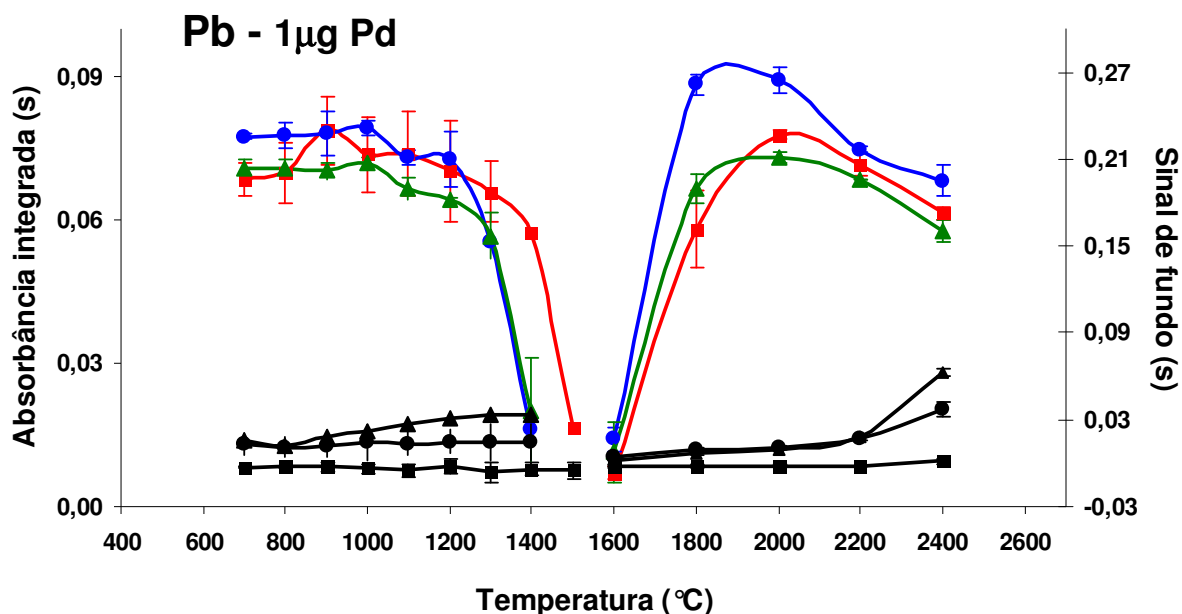


Figura 7. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 1 µg de Pd para solução analítica de Pb (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Pb adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 0,15 µg g⁻¹.

Analisando a Figura 7, pode-se perceber que com a adição de 1 µg de Pd, chumbo é estabilizado na etapa de pirólise até a temperatura de 1200 °C para as amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina na concentração de 10% (m/v). Abaixo de 700 °C de temperatura de pirólise ocorreram distúrbios na linha de base e as curvas de pirólise e atomização não puderam ser realizadas. Para a etapa de

atomização, a temperatura de 2000 °C foi estabelecida, uma vez que apresenta a melhor resposta. A massa característica encontrada foi de 17,8 pg.

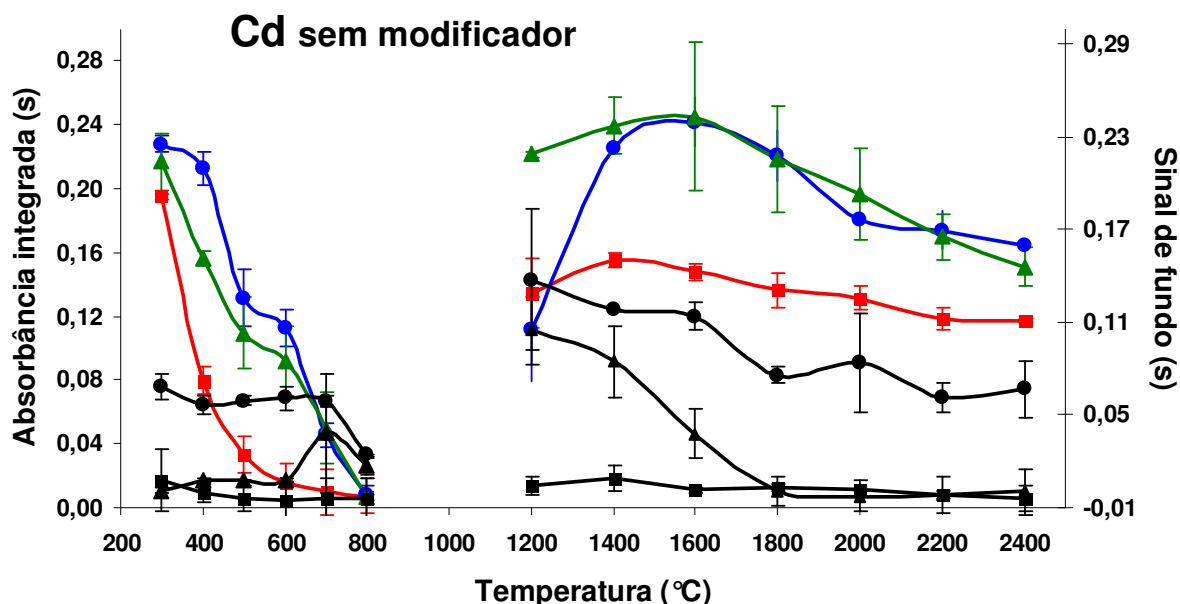


Figura 8. Curvas de pirólise e atomização obtidas sem modificador químico para solução analítica de Cd (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Cd adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 0,0125 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Já para Cd, mesmo em temperaturas de pirólise baixas como 500 °C o elemento é perdido tanto para soluções analíticas quanto para soluções das amostras, conforme demonstrado na Figura 8. Sendo assim, Pd foi adicionado com o objetivo de estabilizar termicamente o analito, como demonstrado nas Figuras 9 e 10.

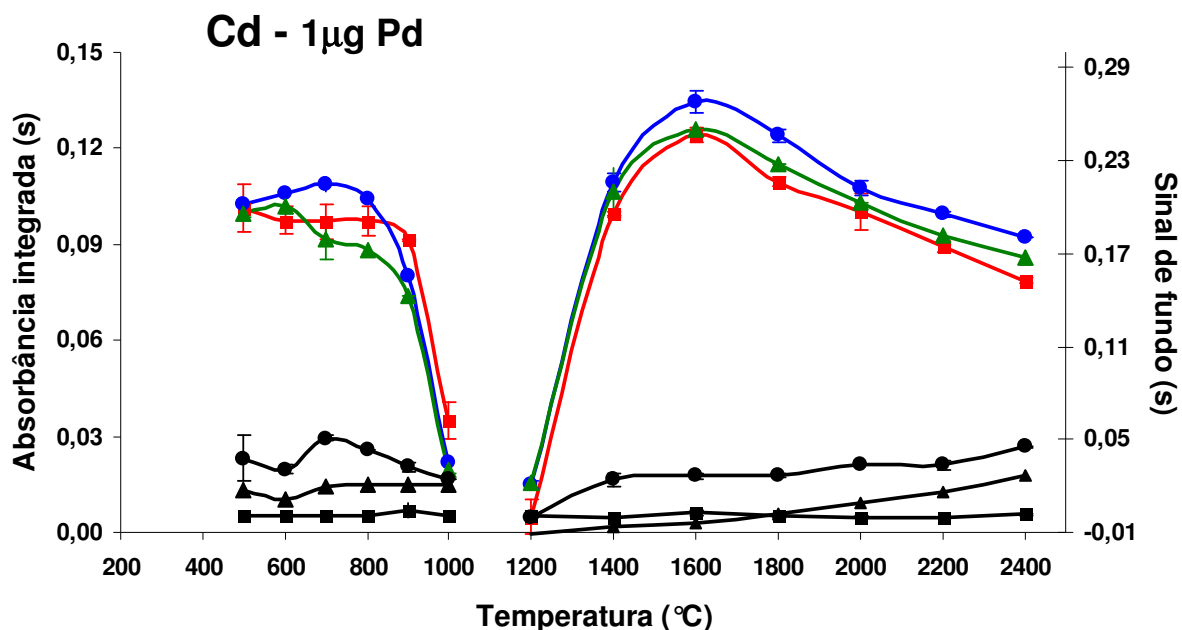


Figura 9. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 1 µg de Pd para solução analítica de Cd (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Cd adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 0,0125 µg g⁻¹.

Com a adição de 1 µg de Pd, pode-se perceber que Cd é estabilizado na etapa de pirólise até a temperatura de 800 °C para as amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina na concentração de 10% (m/v). Para a etapa de atomização, a temperatura de 1600 °C foi estabelecida, uma vez que apresenta a melhor resposta. A massa característica encontrada foi de 0,75 pg.

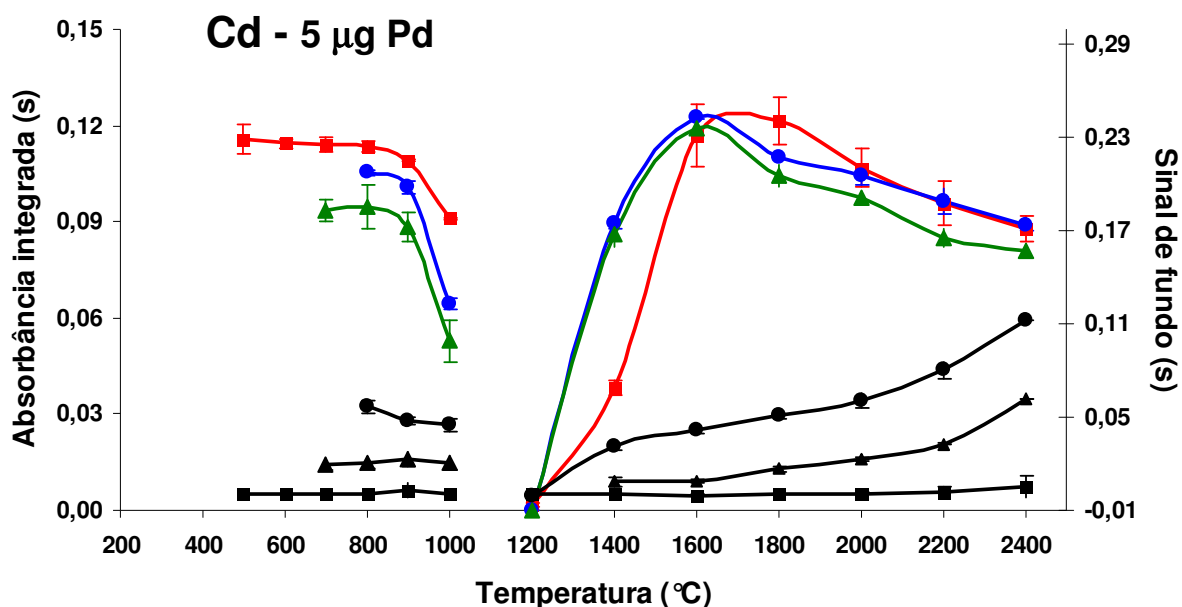


Figura 10. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 5 µg de Pd para solução analítica de Cd (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Cd adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 0,0125 µg g⁻¹.

Entretanto, quando 5 µg de Pd são adicionados, o analito é estabilizado termicamente até 900 °C, mas problemas de correção foram observados em temperaturas inferiores à 700 °C e 800 °C para o cloridrato de imipramina e cloridrato de amitriptilina, respectivamente. Uma possível explicação é que o excesso de Pd além de estabilizar o analito pode acabar estabilizando termicamente também a matriz que é volatilizada na etapa de atomização. Portanto, a quantidade de Pd que apresenta melhor resposta para Cd é 1 µg.

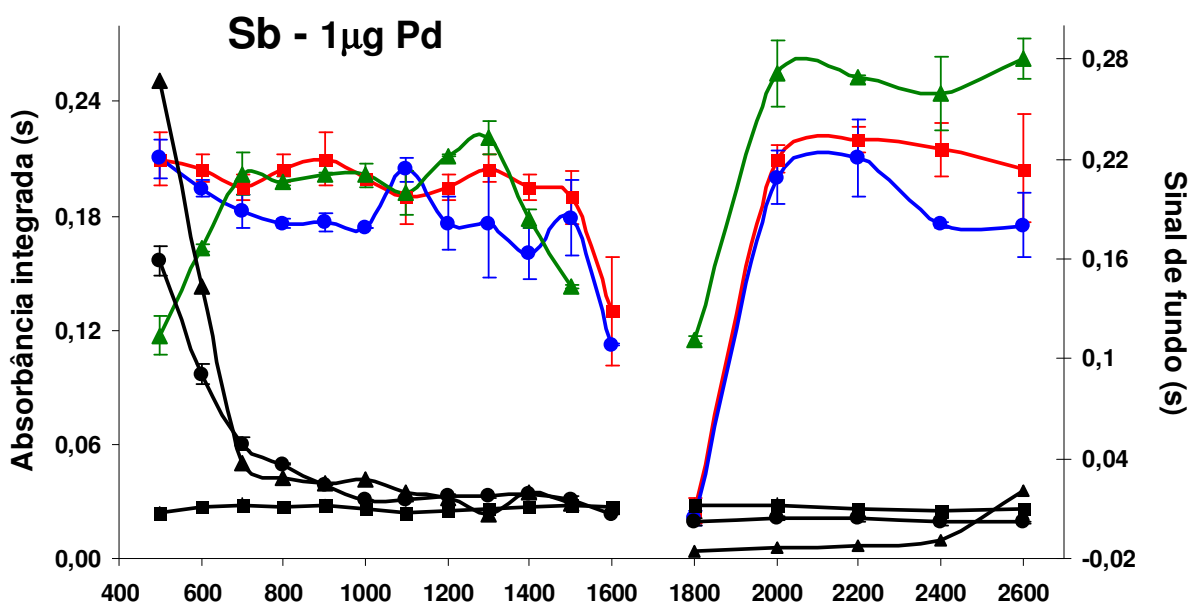


Figura 11. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 1 µg de Pd para solução analítica de Sb (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 1% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Sb adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 10,0 µg g⁻¹.

De acordo com a Figura 11, pode-se perceber a presença de sinal de fundo elevado na etapa de pirólise em 500 °C, que é eliminado em 700 °C. A temperatura de pirólise pode ser estendida até 1400 °C sem perdas significativas do analito. Para atomização, a temperatura escolhida foi de 2200 °C. A massa característica encontrada para Sb foi de 29,3 pg.

Para As, Bi e Sn resultados semelhantes foram obtidos. Entretanto, para As (Figura 28, em anexo), é possível observar que o comportamento térmico das amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina é ligeiramente diferente ao comportamento da solução analítica de As, porém, sem afetar a quantificação. Na etapa de pirólise, pode-se perceber a presença de sinal de fundo elevado em 500 °C, que é eliminado em 700 °C. A temperatura de pirólise pode ser estendida até 1600 °C sem

perdas significativas do analito. Para atomização, a temperatura escolhida foi de 2400 °C. A massa característica encontrada para As foi de 35,8 pg.

Com a adição de 1 µg de Pd, bismuto é estabilizado na etapa de pirólise até a temperatura de 1200 °C, conforme demonstrado na Figura 29, em anexo. Abaixo de 700 °C e 800 °C de temperatura de pirólise ocorreram distúrbios na linha de base e a otimização não foi possível de ser realizada para as amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina, respectivamente. Para a etapa de atomização, a temperatura de 2000 °C foi estabelecida, uma vez que apresenta a melhor resposta. A massa característica para Bi encontrada foi de 33,3 pg.

Para estanho (Figura 30, em anexo), foi observado a presença de sinal de fundo elevado para amostras de cloridrato de imipramina 1% (m/v) na etapa de pirólise em 500 °C, que é reduzido em temperaturas de pirólise mais altas. A pirólise pode ser estendida até 1500 °C sem perdas significativas do analito. Para atomização, a temperatura escolhida foi de 2400 °C. A massa característica encontrada para Sn foi de 41,7 pg.

Devido às interferências observadas em temperaturas inferiores à 500 °C na determinação de As, Bi, Sb e Sn nas soluções de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina 10% (m/v), as amostras tiveram de ser diluídas para concentração de 1% (m/v) para a determinação destes elementos. Para tentar identificar alguma possível causa da interferência, como, por exemplo, a presença residual de matriz após a etapa de pirólise, foi efetuada a análise de termogravimetria para determinação das perdas de massa em função da temperatura das substâncias estudadas, conforme demonstrado na Figura 12.

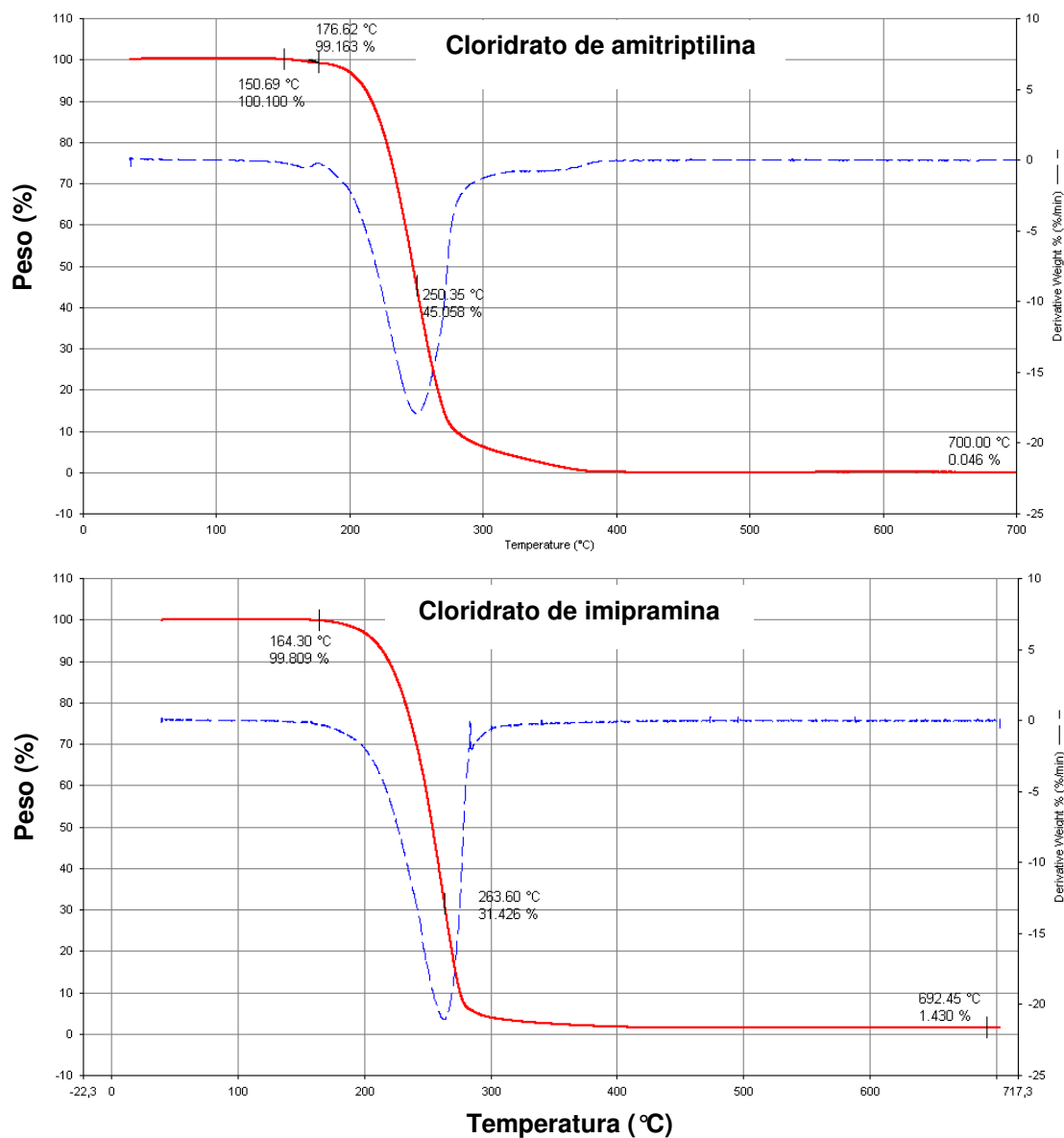


Figura 12. Perfil termogravimétrico das amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina obtido em analisador termogravimétrico. A linha vermelha indica porcentagem de massa perdida com o aumento da temperatura, enquanto que a linha azul indica a temperatura em que há maior perda de massa.

Para o cloridrato de amitriptilina, é possível afirmar que o mesmo começa a perder quantidade significativa de massa a partir de 176 °C e, também, que a maior taxa de perda de massa ocorre em 250 °C. Em temperaturas próximas a 400 °C, não há mais perda significativa de massa e, próximo a 700 °C, praticamente toda a amostra foi volatilizada, restando, apenas, cerca de 0,05% da massa inicial de amostra. Já para o cloridrato de imipramina, um perfil semelhante é observado, porém, cerca de 1,5% da massa inicial da amostra permanece após aquecimento até 700 °C em atmosfera inerte (N₂). Uma vez que as condições estudadas no analisador termogravimétrico são diferentes daquelas empregadas em GF AAS, foi efetuada uma análise termogravimétrica no próprio equipamento de GF AAS, porém, empregando o sistema de análise direta de sólidos do mesmo fabricante e fluxo de argônio. A maior diferença entre os dois procedimentos se dá na razão de aquecimento. Enquanto que para o analisador termogravimétrico a rampa de aumento de temperatura foi da ordem de 10 °C min⁻¹, para GF AAS, foi utilizado 5 °C s⁻¹ na etapa de pirólise. Os resultados obtidos para amostras de cloridrato de imipramina sem e com modificador estão mostrados na Figura 13.

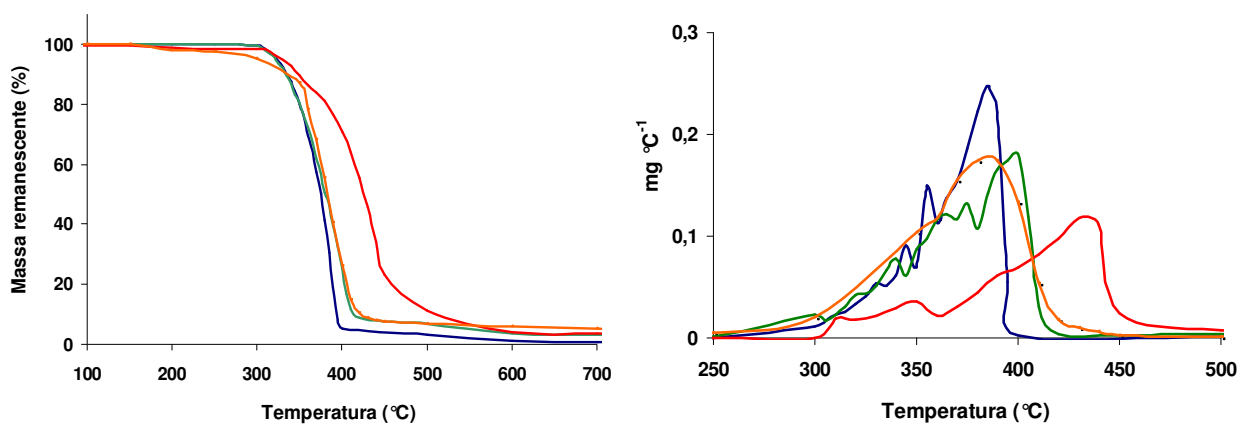


Figura 13. Perfil termogravimétrico de amostras de cloridrato de imipramina obtido usando GF AAS com fluxo de argônio durante a pirólise de 2,0 L min⁻¹ sem Pd (**azul**), 2,0 L min⁻¹ com Pd (**laranja**), 1,0 L min⁻¹ sem Pd (**verde**) e sem fluxo e sem Pd (**vermelho**).

Conforme mostrado na Figura 13, o fluxo de argônio durante a etapa de pirólise, bem como a presença de modificador, influenciam na decomposição térmica das amostras de cloridrato de imipramina. Se o fluxo de argônio for diminuído durante a etapa de pirólise, aparentemente a decomposição da substância ocorre de modo mais lento e, também, em uma faixa de temperatura maior. A presença de paládio durante a decomposição térmica do cloridrato de imipramina apresenta efeito semelhante, estabilizando termicamente a matriz, o que pode causar interferências, como citado anteriormente, p. ex., para Bi e Cd. Além disso, com este experimento foi possível verificar uma discrepância de mais de 100 °C entre a perda de massa avaliada pelo analisador termogravimétrico e por GF AAS, devido, principalmente, à diferença da razão de aquecimento e vazão dos gases inertes.

A vida útil apresentada pelo forno de grafite durante a realização dos experimentos foi, em média, de cerca de 500 ciclos de aquecimento. Conforme demonstrado na Figura 14, pode-se observar que o desgaste do tubo de grafite ocorreu essencialmente na parte externa (Figura 14 “A” e “B”), enquanto que a parte interna praticamente não sofreu desgaste (Figura 14 “C”). Já para a plataforma de L'vov, foi observada a formação de uma camada que recobre a plataforma (Figura 14 “D”). Entretanto, nenhuma modificação nos sinais analíticos obtidos foi observada.

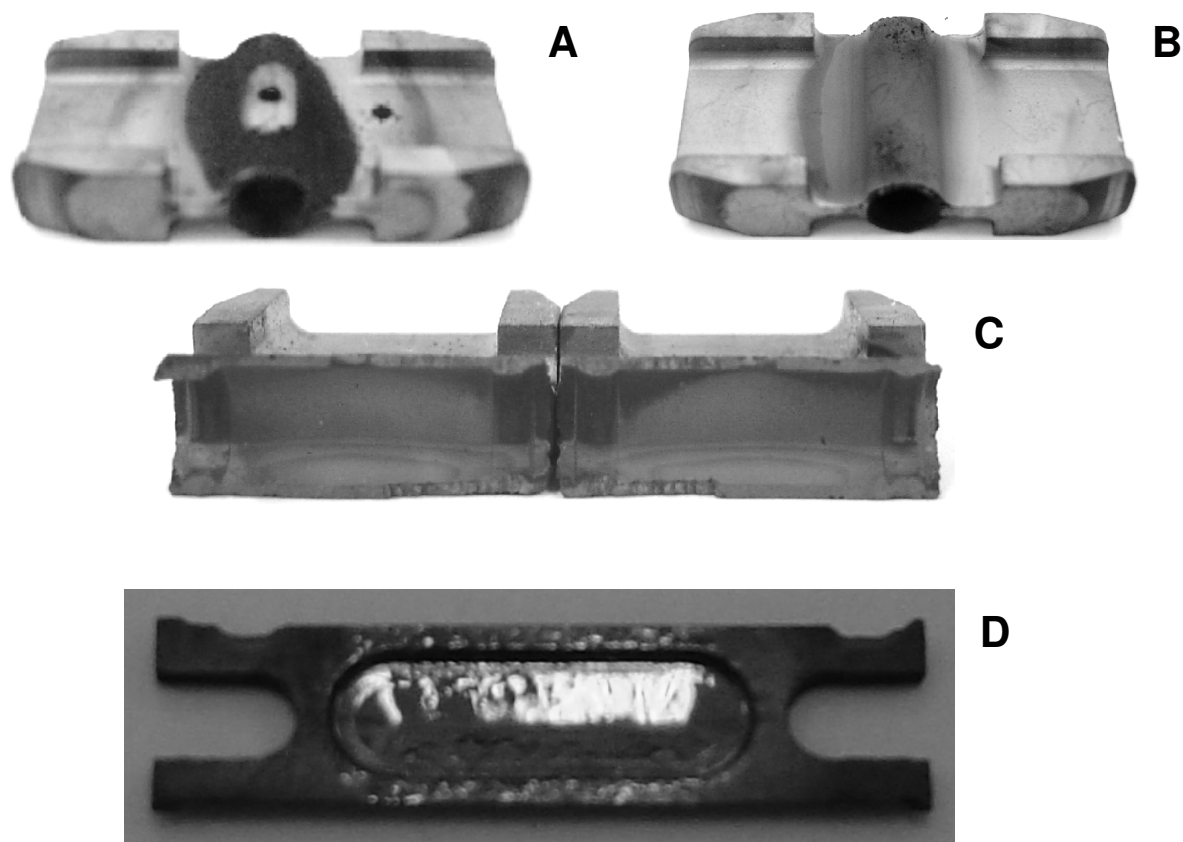


Figura 14. Forno de grafite empregado para as determinações de metais pesados em cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina após 500 ciclos de aquecimento. A: vista superior; B: vista inferior; C: corte longitudinal com vista da região interna; D: vista superior da plataforma de L'vov.

Na Tabela 12, estão demonstradas as condições otimizadas para a determinação de Ag, As, bi, Cd, Cu, Pb, Sb e Sn nas amostras de cloridrato de amitriptilina, cloridrato de imipramina e carbamazepina. É importante destacar que para a carbamazepina, há a necessidade da introdução da amostra sólida no equipamento, devido à baixa solubilidade da amostra em solventes aquosos, o que diminui, conseqüentemente, os limites de detecção para As, Bi, Sb, e Sn em relação à introdução de solução (1%). Isto faz com que o procedimento seja mais demorado em relação ao sistema de introdução de amostras líquidas, pois a amostra precisa ser pesada antes de cada determinação, o

que implica em mais tempo para a realização das análises. Além disso, atualmente, apenas um fabricante de espectrômetros de absorção atômica com forno de grafite comercializa este sistema, o que limita ainda mais sua utilização. Entretanto, em ambos procedimentos, dissolução em água ou introdução direta da amostra sólida, não há a necessidade da decomposição prévia da amostra, o que pode representar uma diminuição de tempo, custos e de riscos de perdas e/ou contaminação.

Tabela 12. Resumo das condições ótimas para a determinação de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb e Sn em cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina.

Analito	Concentração da amostra % (m/v)	T _{PIRÓLISE} (°C)	T _{ATOMIZAÇÃO} (°C)	Modificador	Limites de detecção (µg g ⁻¹)
Ag	10	800	1800	---	0,003
As	1	1200	2400	1 µg Pd	1,0*
Bi	1	1200	2200	1 µg Pd	1,1*
Cd	10	800	1600	1 µg Pd	0,001
Cu	10	1200	2400	---	0,016
Pb	10	1200	2000	1 µg Pd	0,004
Sb	1	1200	2200	1 µg Pd	1,0*
Sn	1	1200	2400	1 µg Pd	0,9*

* para carbamazepina os LD's ficam em torno de 0,1 µg g⁻¹ devido à introdução das amostras sólidas.

Por fim, um ensaio de recuperação foi efetuado nas amostras de cloridrato de amitriptilina, cloridrato de imipramina e carbamazepina, conforme demonstrado na Figura 15. Dos oito elementos estudados, todos apresentaram resultados satisfatórios (recuperação entre 80 e 120%) empregando as condições analíticas estudadas.

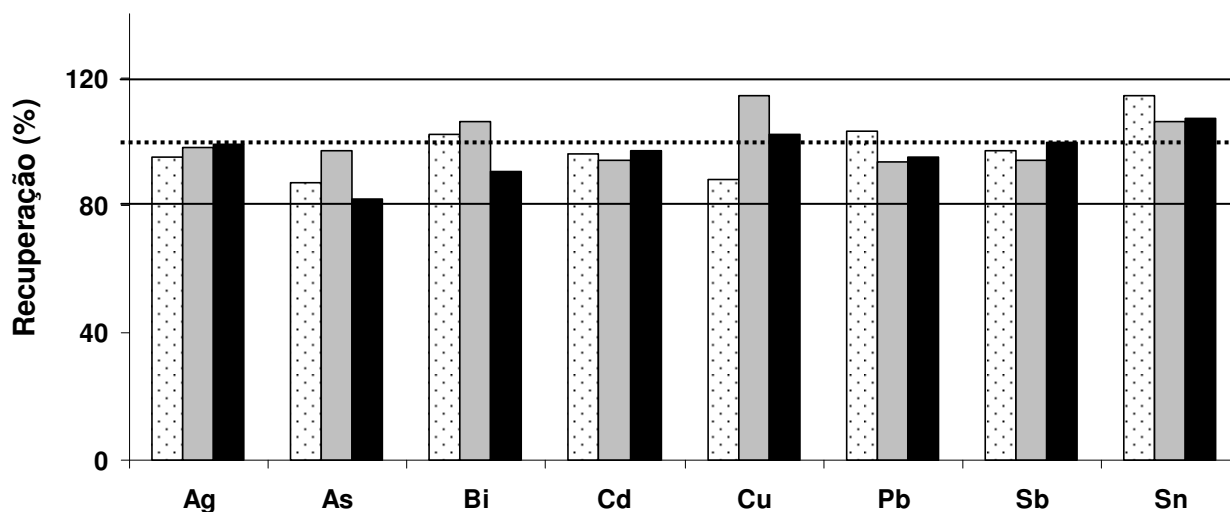


Figura 15. Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por GF AAS em cloridrato de amitriptilina (branco), cloridrato de imipramina (cinza) e carbamazepina (preto). As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% de recuperação e a linha intermitente recuperação de 100%.

4.3. DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS POR ICP-OES E ICP-MS

O procedimento para a determinação de metais pesados foi, praticamente, o mesmo para ambas as técnicas, ICP-OES e ICP-MS. As amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina foram dissolvidas em água ou HNO_3 diluído enquanto que as amostras de carbamazepina foram digeridas previamente por combustão iniciada por microondas. Entretanto, para as determinações por ICP-OES, não foi possível a dissolução das amostras em HNO_3 , pois as mesmas na concentração de 1% (m/v) apresentaram turvação e formação de precipitados, o que não é observado para amostras na concentração de 0,1% (m/v), empregadas para as determinações por ICP-MS. Nas Figuras 16, 17 e 18 estão demonstradas as recuperações obtidas em amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina na determinação de metais pesados por ICP-MS e ICP-OES. O intervalo de aceitação para as recuperações foi estabelecido arbitrariamente, entre 80 e 120%.

Para ICP-MS, bons resultados foram obtidos para praticamente todos os isótopos dos elementos estudados no ensaio de recuperação. É importante destacar que para Hg alguns problemas de efeito de memória entre as leituras foram observados. Sendo assim, entre cada determinação uma solução de HNO₃ 5% (v/v) foi aspirada por 5 minutos para limpeza do sistema de introdução da amostra. Arsênio não foi determinado por ICP-MS devido à interferência do cloro, presente na solução a partir da amostra.

Nos ensaios de recuperação por ICP-OES, três linhas de emissão apresentaram problemas de interferências. Para Sb, outras linhas foram avaliadas, mas a sensibilidade alcançada foi insuficiente, o que inviabilizou a determinação deste elemento por ICP-OES nos fármacos estudados. Já para Sn, os problemas de interferências observados nas linhas 189,927 e 235,485 não ocorreram na linha 283,998.

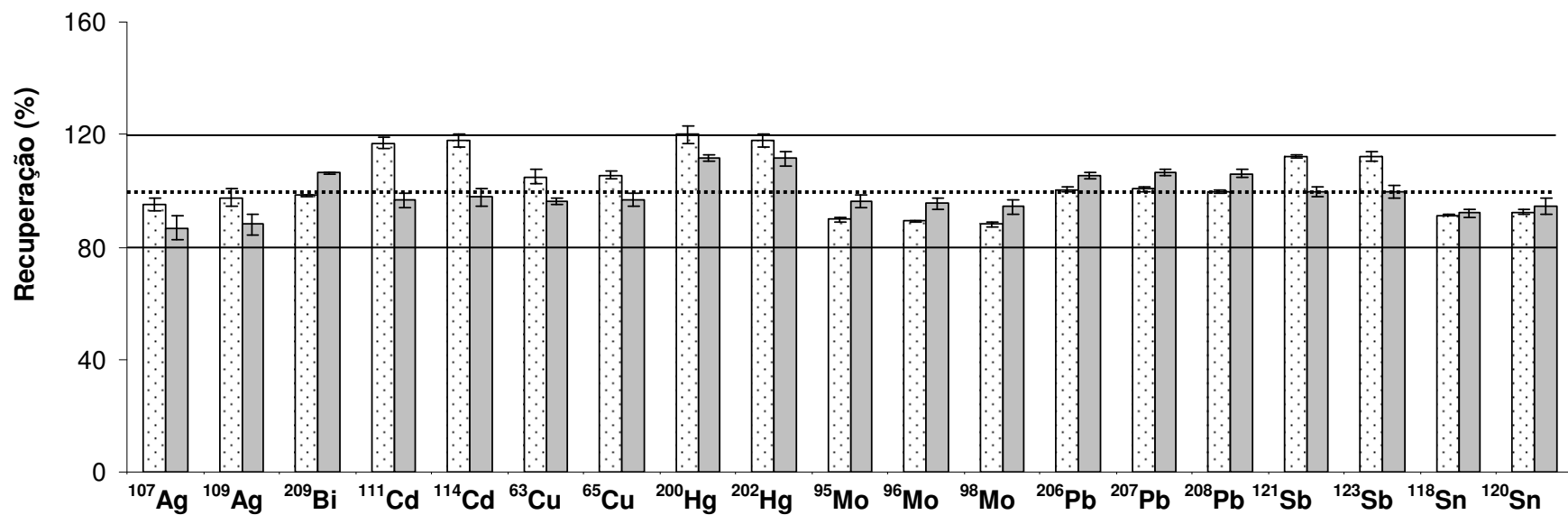


Figura 16. Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por ICP-MS em cloridrato de amitriptilina 0,1% (m/v) com diluição em H₂O (branco) e HNO₃ 4% (em cinza). As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% de recuperação e a linha intermitente a recuperação de 100%. A quantidade de analito adicionada é equivalente à concentração de 10 µg L⁻¹ na solução e 10 µg g⁻¹ na amostra sólida.

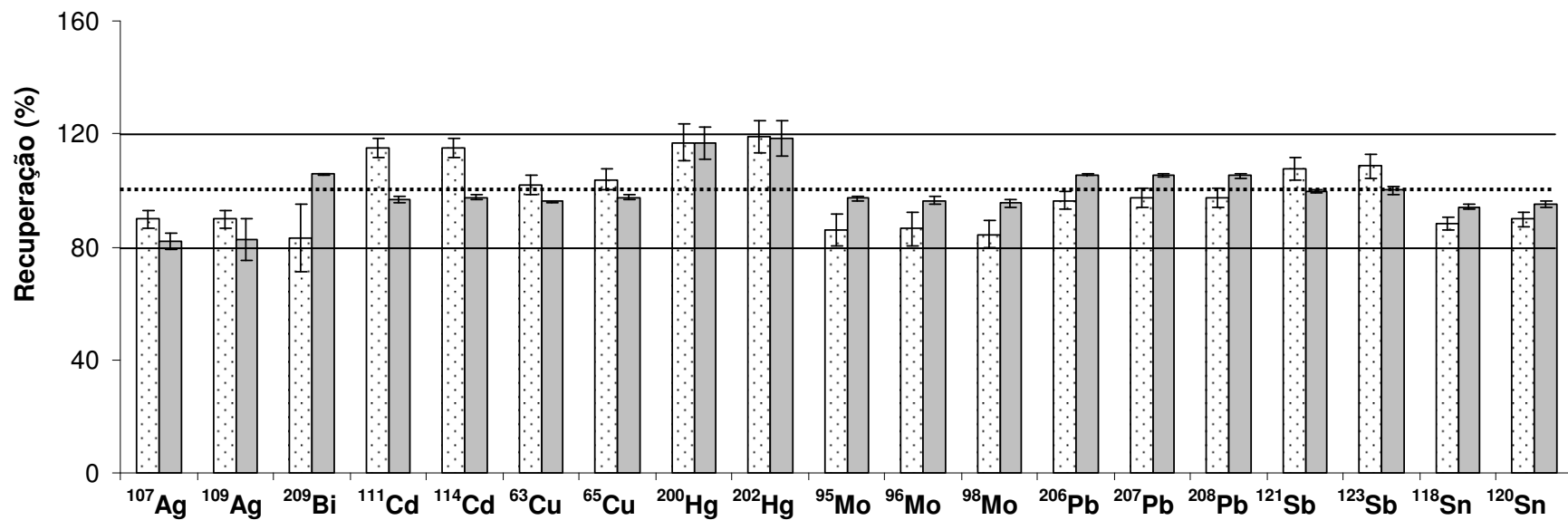


Figura 17. Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por ICP-MS em cloridrato de imipramina 0,1% (m/v) com diluição em H₂O (em preto) e HNO₃ 4% (em cinza). As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% de recuperação e a linha intermitente a recuperação de 100%. A quantidade de analito adicionada é equivalente à concentração de 10 µg L⁻¹ na solução e 10 µg g⁻¹ na amostra sólida.

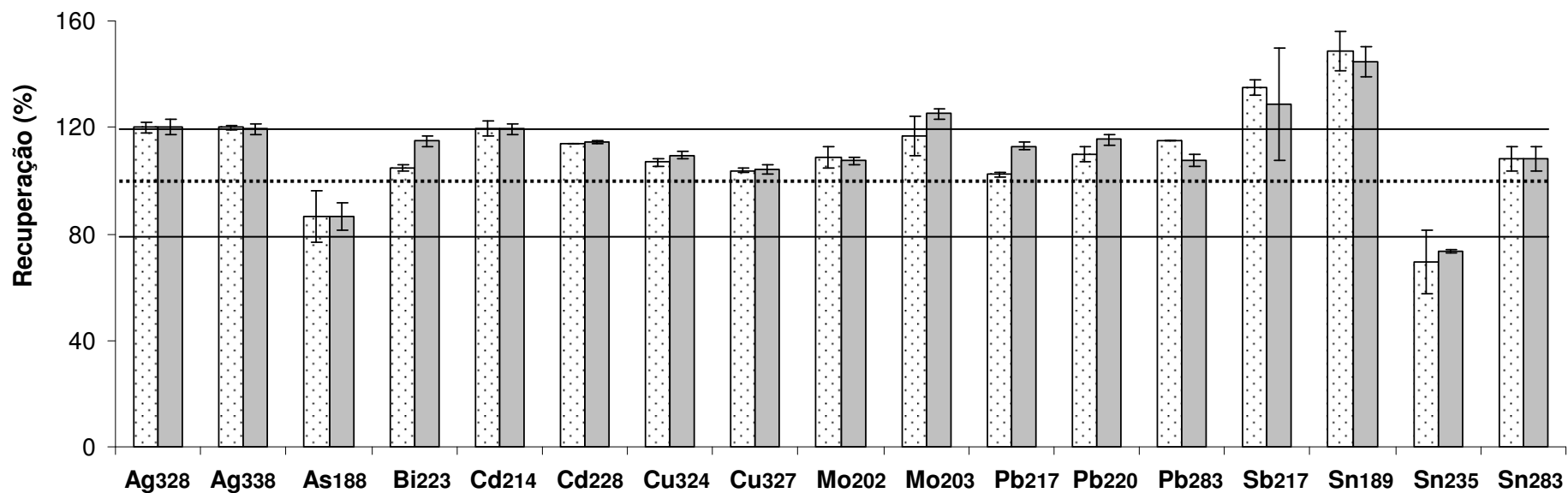


Figura 18. Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por ICP-OES em cloridrato de amitriptilina (em branco) e cloridrato de imipramina (em cinza) 1% (m/v) com diluição em H₂O. As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% de recuperação e a linha intermitente a recuperação de 100%. A quantidade de analito adicionada é equivalente à concentração de 50 µg L⁻¹ na solução e 5 µg g⁻¹ na amostra sólida.

4.4. PREPARO DE AMOSTRAS

Uma vez que os métodos farmacopéicos de decomposição em mufla e por via úmida não mostraram resultados satisfatórios para as amostras estudadas, a seguir diferentes procedimentos de decomposição são avaliados envolvendo, principalmente, sistemas fechados.

4.4.1. DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS POR VIA ÚMIDA

Para a decomposição das amostras de carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina, foram empregados diferentes procedimentos por via úmida e por combustão, conforme descrito no item 3.6 da seção *Materiais e Métodos*.

Na decomposição por via úmida, primeiramente, foi empregado apenas HNO₃ como oxidante. No bloco digestor e no sistema de decomposição assistida por microondas, um precipitado é observado para as três amostras, indicando que o processo de decomposição foi incompleto, conforme descrito na Tabela 13.

Tabela 13. Eficiência de decomposição de carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina em sistemas de decomposição por via úmida. As massas de amostra e as condições empregadas estão entre parênteses.

Amostra	Bloco digestor (150 °C, 2h)	Microondas (220 °C, 0,5h)	HPA 1 (280 °C, 2h)	HPA 2 (320 °C, 2h)	HPA 3 (320 °C, 3h)
Carbamazepina	Resíduo sólido (100 mg)	Resíduo sólido (100 mg)	Resíduo sólido (190 mg)	Resíduo sólido (190 mg)	CR = 0,6% (88 mg)
Cloridrato de amitriptilina	Resíduo sólido (100 mg)	Resíduo sólido (100 mg)	Resíduo sólido (190 mg)	CR = 11,2% (190 mg)	CR = 0,5% (85 mg)
Cloridrato de imipramina	Resíduo sólido (100 mg)	Resíduo sólido (100 mg)	CR = 1,2% (110 mg)	CR = 0,6% (100 mg)	---

CR = carbono residual

Já para a decomposição por HPA, apenas ácido nítrico foi empregado para as decomposições em três programas de decomposição diferentes. Quando foi usada a temperatura de 280 °C por duas horas, a decomposição foi efetiva apenas para o cloridrato de imipramina, enquanto que para a carbamazepina e o cloridrato de amitriptilina um resíduo foi observado. Sendo assim, a temperatura de decomposição foi aumentada para 320 °C por um período de duas horas, o que levou a decomposição parcial do cloridrato de amitriptilina, mas nenhum efeito significativo foi verificado para a carbamazepina. Desta forma, o tempo de decomposição foi aumentado para três horas e a quantidade de amostra reduzida para metade. Nesta condições, todas as amostras foram decompostas, apresentando teores de carbono residual inferiores a 1% (Tabela 13).

4.4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS OBTIDOS NOS PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA

Conforme comentado anteriormente, para alguns procedimentos de decomposição por via úmida, foi observada a presença de um resíduo após o processo de oxidação empregando ácido nítrico. Sendo assim, este precipitado foi isolado e posteriormente caracterizado com o objetivo de identificar as espécies refratárias resultantes.

Para tanto, primeiramente, foi efetuada a verificação do número de espécies formadas por cromatografia à líquido de alta eficiência com detector espectrofotométrico na região do ultravioleta. Posteriormente, foram realizadas análises por ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13, além de espectroscopia no infravermelho para tentar elucidar a estrutura formada.

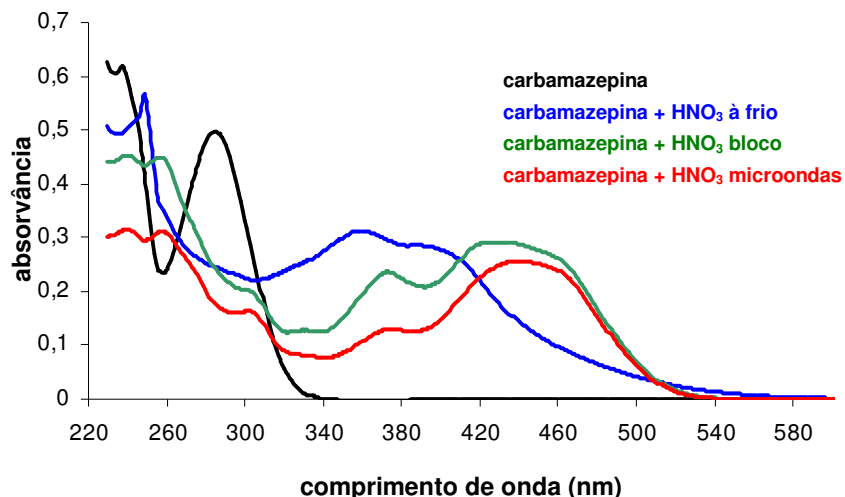


Figura 19. Espectros obtidos na região da radiação ultravioleta e visível para as amostras de carbamazepina em diferentes condições de preparo das amostras.

Analisando a Figura 19, pode-se perceber que todas as substâncias apresentam absorção intensa em 230 nm, e que as amostras de carbamazepina após a reação com ácido nítrico concentrado têm seus espectros de absorção estendidos até a região do visível, possivelmente devido a nitração da carbamazepina. Também, pode-se notar que o espectro das amostras com HNO₃ quando aquecidas em bloco de aquecimento em sistema aberto e com microondas em sistema fechado são bastante semelhantes, apesar da grande diferença de temperatura entre os dois sistemas.

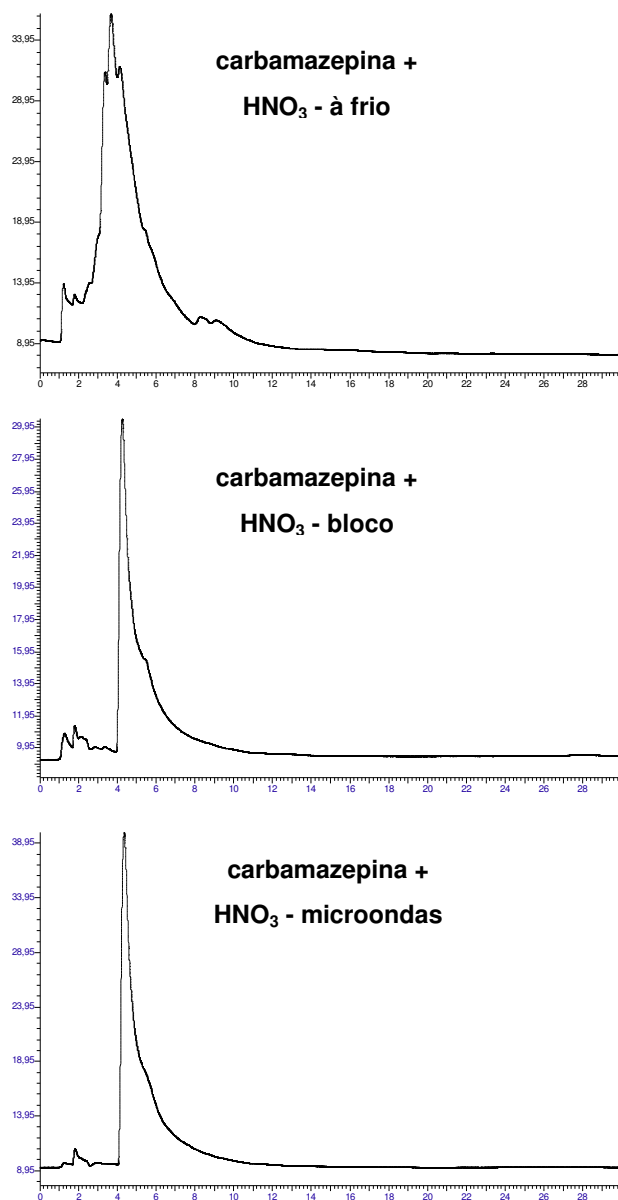


Figura 20. Cromatogramas obtidos para as amostras de carbamazepina em diferentes condições de preparo das amostras. Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel metanol:água (70:30), fluxo 1,5 ml min⁻¹, 30 min, concentração da amostra 100 mg L⁻¹, detector UV 230 nm.

De acordo com os cromatogramas obtidos, pode-se inferir que quando a carbamazepina reage com HNO₃ à frio, pelo menos três produtos são formados em quantidades significativas. Porém, quando aquecida com HNO₃ em bloco de aquecimento ou microondas, aparentemente um único produto foi formado, com perfil cromatográfico muito semelhante. Cabe ressaltar que o procedimento adotado

por HPLC apresenta uma informação apenas indicativa e não decisiva em relação ao número de espécies formadas.

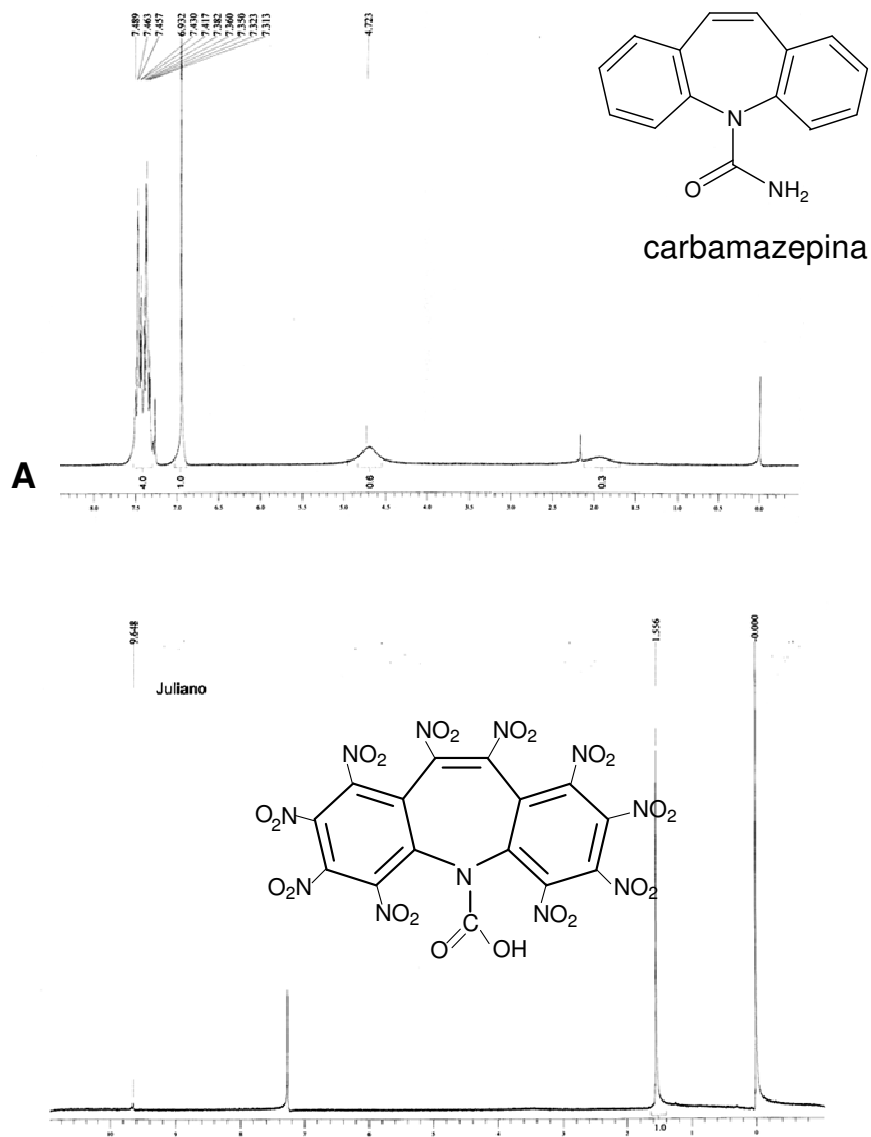


Figura 21. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H para amostras de carbamazepina (A) e carbamazepina após reação com HNO_3 em forno de microondas (B).

O espectro de ^1H mostra que a substância original, carbamazepina, apresenta prótons aromáticos na região em torno de 7,4, que desaparecem quando a amostra reage com HNO_3 sob aquecimento com microondas, conforme demonstrado na

Figura 21. Isto indica que após o aquecimento a carbamazepina tem seus prótons aromáticos substituídos. Da mesma forma, o sinal em 6,9 observado para os dois hidrogênios dos carbonos da dupla ligação do anel de 7 membros da carbamazepina desaparecem quando a amostra reage com HNO_3 sob aquecimento com microondas, indicando nitração destes carbonos. Além disso, o hidrogênio do grupamento amida observado em 4,7 para a carbamazepina não se encontra presente quando a amostra reage com HNO_3 .

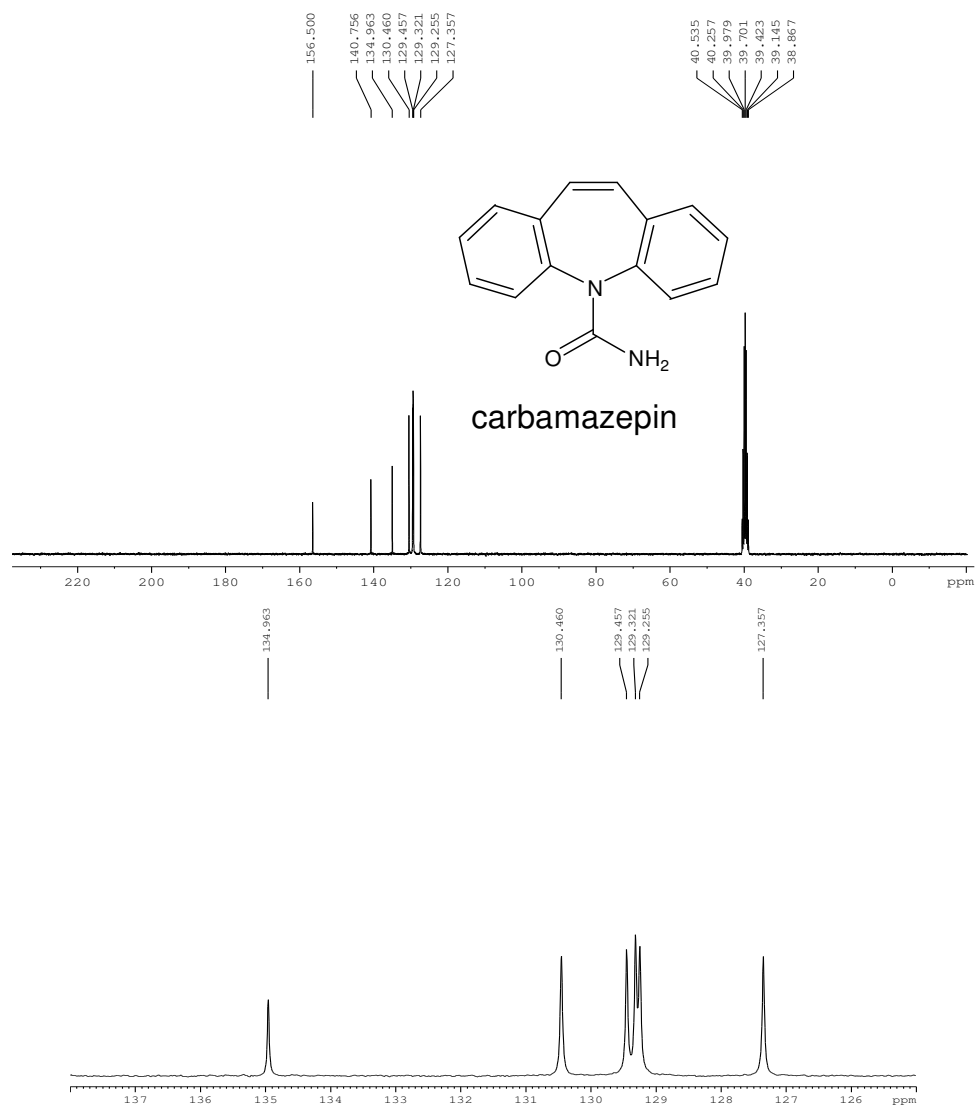


Figura 22. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C para amostras de carbamazepina.

De acordo com a Figura 22, é possível identificar os carbonos da estrutura da carbamazepina. Em 156,5 foi observado um carbono referente a a carbonila. Os demais carbonos, devido à simetria da molécula, aparecem com apenas um sinal representando dois carbonos idênticos. Desta forma, pode-se dizer que os carbonos referentes à estrutura aromática aparecem na região compreendida entre 127 e 135 e que os carbonos da dupla ligação do anel de 7 membros da carbamazepina aparecem em 140,8.

Já para a amostra após a reação com ácido nítrico, pode-se verificar a presença de um carbono referente a um ácido carboxílico em 174,3, conforme demonstrado na Figura 26. A presença do grupamento ácido pode ser confirmada no espectro de infravermelho, conforme demonstrado na Figura 23. Entretanto, apenas seis sinais são observados na região compreendida entre 123 e 142. Considerando que o produto formado seja simétrico, pode-se supor que estes sinais correspondam a, pelo menos, 12 carbonos, em especial aqueles dos dois anéis aromáticos.

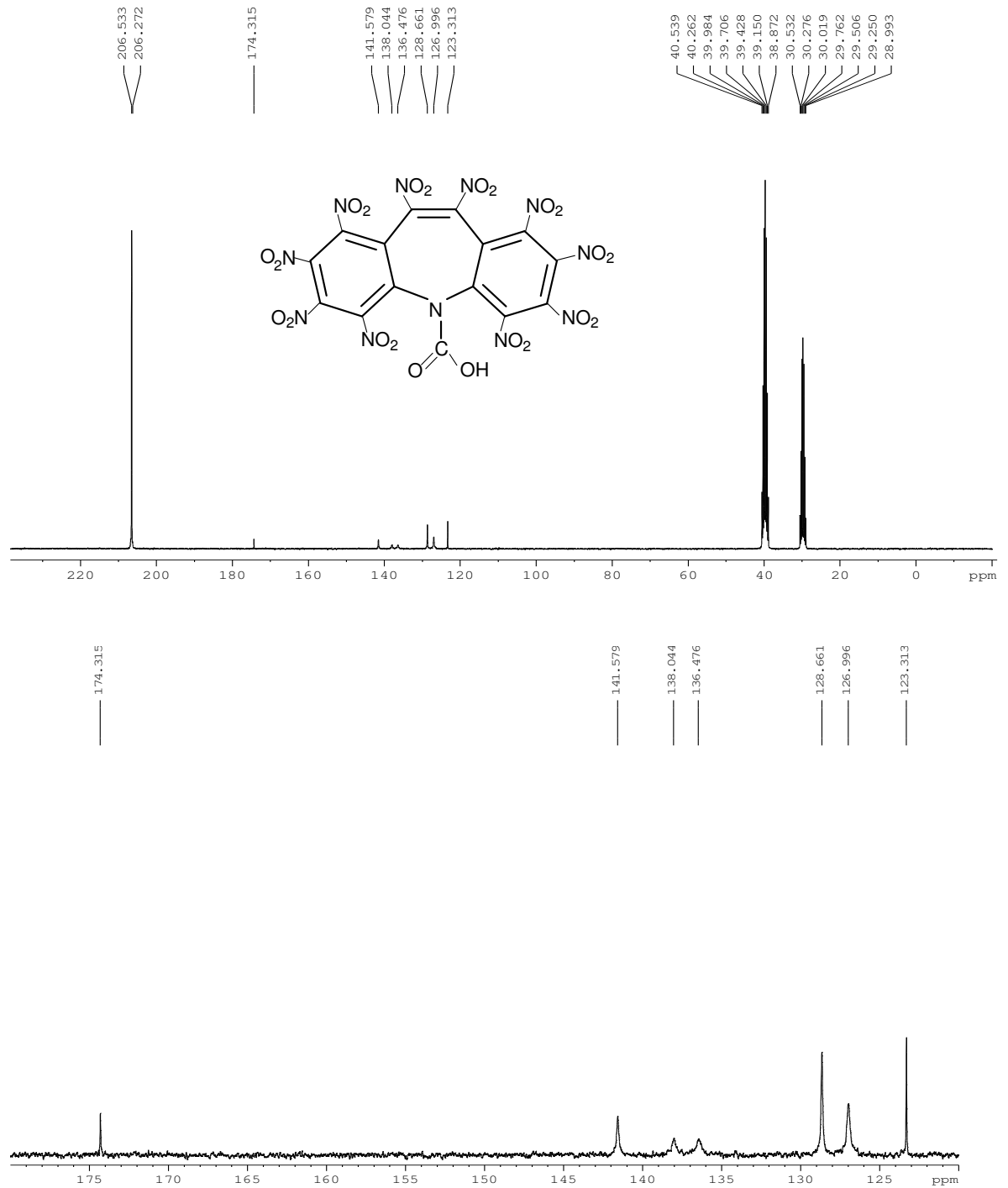


Figura 23. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C para amostras de carbamazepina após a reação com ácido nítrico.

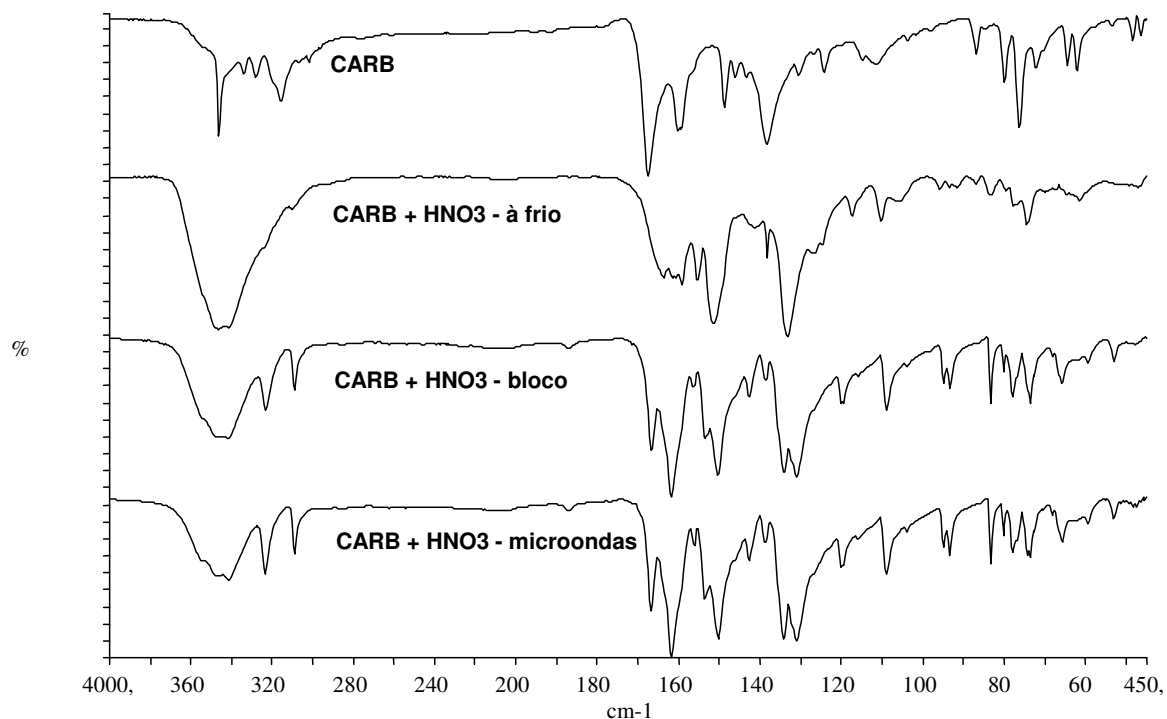


Figura 24. Espectros de infravermelho obtidos para as amostras de carbamazepina em diferentes condições de preparo das amostras.

Os espectros de infravermelho descritos na Figura 24 demonstram que há uma semelhança significativa entre os espectros de carbamazepina com HNO₃ aquecida em bloco de aquecimento e com microondas, indicando a formação de um produto comum e, caso tenha formado mais de um, em proporções similares. Ainda, é possível observar uma banda acima de 3500 cm⁻¹ e outra próxima a 1600 cm⁻¹, indicando a presença de um ácido carboxílico na molécula resultante da reação do HNO₃ com a carbamazepina.

Baseado nas evidências mostradas na caracterização dos precipitados da decomposição da carbamazepina com HNO₃, é possível suspeitar da formação de uma estrutura química em que os hidrogênios são substituídos por grupos nitro e que o grupo amida presente na molécula pode ter sido transformado em ácido carboxílico, conforme demonstrado na Figura 25.

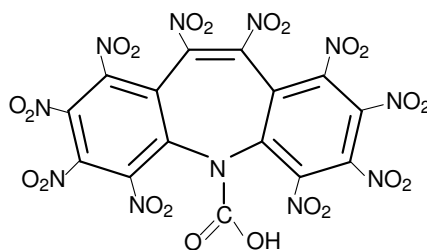


Figura 25. Possível estrutura formada após a reação do HNO₃ com a carbamazepina

Considerando que muitos fármacos tricíclicos apresentam estrutura química semelhante às amostras estudadas, é possível afirmar que problemas de decomposição podem ser esperados para algumas substâncias desta classe. Portanto, os problemas observados neste trabalho para a decomposição destas amostras pode não ser apenas pontual, mas generalizado para vários fármacos, o que aponta a necessidade de investigação mais detalhada.

4.4.2. DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS POR COMBUSTÃO

Com exceção da decomposição por HPA, os procedimentos de decomposição por via úmida avaliados apresentaram um resíduo após a decomposição, mostrando a dificuldade da decomposição dos fármacos tricíclicos. Assim, procurou-se avaliar outro procedimento que permita a decomposição destas amostras em maior quantidade, de maneira rápida e com maior capacidade de processamento de amostras por ciclo de decomposição. Portanto, a seguir seguem os resultados obtidos pela combustão iniciada por microondas que atende, pelo menos em parte, estes requisitos.

Para todos os procedimentos o teor de carbono residual foi inferior a 2%. Entretanto, uma pequena diferença de valores de carbono residual foi observada entre a decomposição por combustão iniciada por microondas utilizando ácido nítrico concentrado ou diluído como solução absorvedora, conforme demonstrado na Tabela 14.

Tabela 14. Eficiência de decomposição da carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina para procedimentos baseados no processo de combustão. condições empregadas estão entre parênteses.

Amostra	Carbono residual (%)			
	Mufila	MIC com refluxo	MIC com refluxo	MIC com refluxo
	(500-600 °C, 2 h)	(HNO ₃ 1 M, 10 min)	(HNO ₃ 7 M, 10 min)	(HNO ₃ 14 M, 10 min)
Carbamazepina	0,3	1,8	1,1	0,8
Cloridrato de amitriptilina	0,4	1,5	1,0	0,4
Cloridrato de imipramina	0,4	1,6	1,4	0,7

Uma vez que as amostras de carbamazepina não são solúveis em água e que problemas de decomposição podem ocorrer por via úmida, a digestão por combustão passa ser uma alternativa interessante. Entretanto, como o método de decomposição por combustão em mufla descrito nas farmacopéias apresentou perdas de alguns elementos, a combustão iniciada por microondas foi avaliada para a decomposição de carbamazepina, conforme demonstrado na Figura 26.

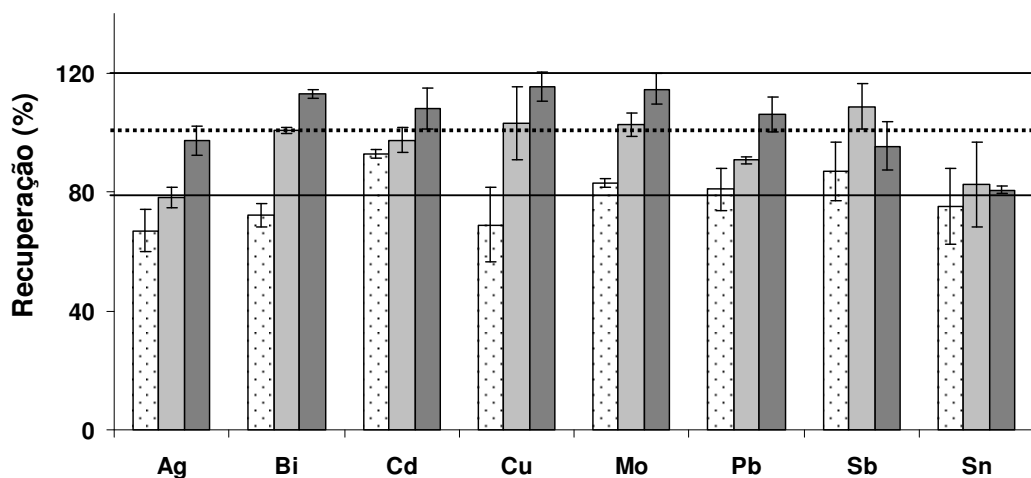


Figura 26. Recuperações obtidas para a determinação de metais pesados por ICP-MS em carbamazepina após combustão iniciada por microondas empregando como solução absorvedora HNO₃ 1 mol L⁻¹ (branco), HNO₃ 7 mol L⁻¹ (cinza claro) e HNO₃ 14 mol L⁻¹ (cinza escuro). As linhas sólidas representam o limite de 80 a 120% e a linha intermitente recuperação de 100%. A quantidade de analito adicionada equivale a 5 µg L⁻¹ na solução e 0,5 µg g⁻¹ na amostra sólida.

De acordo com a Figura 26, pode-se observar que com o aumento da concentração de HNO_3 , as recuperações também são aumentadas. Cabe ressaltar, que as concentrações envolvidas são relativamente baixas devido ao fato da dificuldade de se fazer a adição de analito em maior quantidade nas amostras de carbamazepina, uma vez que os comprimidos desta sofrem deformação quando o volume adicionado for grande, prejudicando o processo de queima das amostras. Mesmo assim, utilizando HNO_3 14 mol L^{-1} , boas recuperações são obtidas para todos os elementos estudados.

4.5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados obtidos na avaliação dos métodos farmacopéicos demonstram que a limitação observada nas etapas de determinação e preparo de amostras podem ser estendidas a outras substâncias. Portanto, a necessidade de investigação de métodos alternativos para a determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos é iminente. Entretanto, a proposição de novas metodologias que possam ser utilizadas de maneira generalizada é uma tarefa difícil, dada a particularidade de cada fármaco, forma farmacêutica e técnica analítica utilizada. Neste trabalho, mesmo que apenas 3 substâncias tenham sido avaliadas, pode-se dizer que alguns avanços foram obtidos para o desenvolvimento de metodologias de cunho geral. Sendo assim, a seguir alguns aspectos neste sentido são destacados.

Para amostras solúveis em solventes aquosos, os procedimentos para a determinação de metais pesados por GF AAS, ICP-OES e ICP-MS são bastante simples, bastando a introdução das amostras nos espectrômetros com as condições analíticas previamente estabelecidas. Isto pode ser muito importante para a proposição de uma metodologia geral, uma vez que grande parte dos fármacos são apresentados na forma de sais solúveis em água e, em princípio, as condições analíticas estabelecidas aqui podem ser empregadas para outras amostras com mínimas modificações.

Para amostras insolúveis em solventes aquosos, a etapa de decomposição é imprescindível para as técnicas de ICP-OES e ICP-MS. Para tanto, o uso de sistemas fechados mostrou-se adequado, destacando-se a decomposição por via úmida em sistema de alta pressão e temperatura (HPA) e a combustão iniciada por

microondas, que mostraram serem eficientes mesmo para a decomposição de amostras refratárias como os fármacos tricíclicos. Porém, ambos equipamentos são comercializados por apenas uma empresa, o que limita sua aplicabilidade. Já para GF AAS, existe a possibilidade de determinação direta na amostra sólida, como realizado para a carbamazepina. Entretanto, o mesmo problema aparece, ou seja, apenas um fabricante de equipamento de GF AAS comercializa este sistema de introdução de amostras sólidas.

Um aspecto importante de ser destacado na determinação por GF AAS é que o equipamento utilizado neste trabalho opera com sistema de correção de sinal de fundo com lâmpada de deutério, que é bem menos eficiente que o sistema de correção por efeito Zeeman, porém mais baratos e difundidos. Sendo assim, pode-se dizer que os procedimentos aqui desenvolvidos podem ser aplicados sem maiores dificuldades em equipamentos com correção de fundo por efeito Zeeman.

5. CONCLUSÃO

De um modo geral, pode-se afirmar que os procedimentos farmacopéicos de determinação de metais pesados em fármacos tricíclicos apresentaram problemas relacionados às etapas de preparo de amostras e de determinação. Na decomposição em mufla, vários elementos foram perdidos durante a decomposição e por via úmida um precipitado orgânico foi observado. Já na etapa de determinação por precipitação com sulfetos, empregando soluções analíticas dos elementos Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn, apenas Ag e Pb tiveram respostas satisfatórias. Todos os demais passariam o teste mesmo em concentrações 25 vezes mais elevadas que o padrão de referência (Pb).

Como alternativa, os métodos de espectrometria atômica apresentaram bons resultados. Para GF AAS, a determinação de metais pesados foi possível de ser realizada para 8 elementos sem a necessidade da decomposição prévia das amostras. Bons resultados foram obtidos tanto com o sistema de introdução de amostras líquidas quanto sólidas. Entretanto, para efetuar a determinação por ICP-OES ou ICP-MS, a decomposição das amostras de carbamazepina é indispensável. Para tanto, dos sistemas de decomposição avaliados, apenas a decomposição nos sistemas HPA (a 320 °C) e a combustão iniciada por microondas foi adequada. Já para as amostras de cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina a diluição direta em água foi suficiente.

A dificuldade de decomposição de fármacos tricíclicos com ácido nítrico pode estar relacionada à estrutura aromática comum destes fármacos. Uma vez que vários outros fármacos apresentam estrutura semelhante, os mesmos problemas podem ser observados para estas substâncias.

Cabe ressaltar que, na literatura, poucos trabalhos foram encontrados visando a avaliação dos métodos farmacopéicos e a proposição de alternativas utilizando métodos de espectrometria atômica. Neste sentido, o presente trabalho trouxe a necessidade de reflexão acerca dos procedimentos hoje adotados como oficiais e mostrou o potencial e algumas limitações das técnicas de espectrometria atômica

como ferramentas analíticas para a determinação de metais em produtos farmacêuticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABARCA A., CANFRANC E., SIERRA I., MARINA M.L., A validated flame AAS method for determining magnesium in a multivitamin pharmaceutical preparation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 941-945.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Resolução RDC Nº 79, de 11 de abril de 2003; Resolução RDC Nº 169, de 21 de agosto de 2006.
3. AHSAN, S., KANECO, S., OHTA, K., MIZUNO, T., SUZUKI, T., MIYADA, M., TANIGUCHI, Y., Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead in calcium drug samples by direct atomization technique, *Anal. Chim. Acta* 362 (1998) 279-284.
4. AHSAN, S., KANECO, S., OHTA, K., MIZUNO, T., TANIGUCHI, Y., Direct determination of cadmium in calcium drug samples using electrothermal atomic absorption spectrometry with a metal tube atomizer and thiourea as a matrix modifier, *Talanta* 48 (1999) 63-69.
5. AHUJA, S., ALSANTE K.M., (Editors), *Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals*, Academic Press-Elsevier, New York, USA, 2003.
6. AHUJA, S., *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*, Marcel Dekker, New York, USA, 1998.
7. ALEXIU, V., CHIRTOP, E., VLADESCU, L., SIMION, M., Determination of mercury in pharmaceuticals by graphite furnace atomic absorption spectrometry with chemical modifier, *Acta Chim. Slov.* 51 (2004) 361-372.
8. AMIN, M.N., KANECO, S., SUZUKI, T., OHTA, K., Slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometric determination of copper in herbal medicine samples with a molybdenum tube atomizer, *Microchem. J.* 74 (2003) 181-186.
9. AMIN, M.N., KANECO, S., SUZUKI, T., TANIGUCHI, Y., OHTA, K., Determination of manganese in herbal medicine samples by slurry-sampling electrothermal atomic absorption spectrometry with a metal tube atomizer, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 205-208.

-
10. ANDERSON, R., *Sample Pretreatment and Separation, Analytical Chemistry by Open Learning* (1987) John Wiley & Sons.
 11. ANG, H.H., LEE, E.L., CHEANG, H.S., *Determination of Mercury by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrophotometer in Tongkat Ali Preparations Obtained in Malaysia, Int. J. Toxicol.*, 23 (2004) 65-71,.
 12. ANG, H.H., LEE, E.L., MATSUMOTO, K., *Analysis of lead content in herbal preparations in Malaysia, Human Exp. Toxicol.* 22 (2003) 445 -451.
 13. ANTONIA A., ALLEN L.B., *Extraction and analysis of lead in sweeteners by flow-injection Donnan dialysis with flame atomic absorption spectrometry, J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4615-4618.
 14. ARIZA, J.L.G., MORALES, E., SÁNCHEZ-RODAS, D., GIRÁLDEZ, I., *Stability of chemical species in environmental matrices, Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 200-209.
 15. ARRUDA (ED.), M.A.Z., *Trends in Sample Preparation, Nova Science Publishers, Hauppauge, 2006.*
 16. BARBOSA J.R., F., PALMER, C., KRUG, F.J., PARSONS, P.J., *Determination of total mercury in whole blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry with room temperature digestion using tetramethylammonium hydroxide, J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1000-1005.
 17. BAREFOOT, R.R., VANLOON, J.C., *Determination of platinum and gold in anticancer and antiarthritic drugs and metabolites, Anal. Chim. Acta* 334 (1996) 5-14.
 18. BARIN, J.S., FLORES, E.M.M., KNAPP, G., *Trends in sample preparation using combustion techniques, In: M.A.Z. Arruda (Ed.), Trends in Sample Preparation, Nova Science Publishers, Hauppauge, 2006.*
 19. BERMEJO-BARRERA, P., MOREDA-PIÑEIRO, A., MOREDA-PIÑEIRO, J., BERMEJO-BARRERA, A., *Determination of lead in illicit drugs by electrothermal atomic absorption spectrometry using palladium as chemical modifier, Anal. Chim. Acta* 310 (1995) 355-367.
 20. BERMEJO-BARRERA, P., MOREDA-PIÑEIRO, A., MOREDA-PIÑEIRO, J., BERMEJO-BARRERA, A., *Determination of traces of chromium in cocaine and heroin by flameless atomic absorption spectrometry, Talanta* 43 (1996) 77-87.
 21. BERMEJO-BARRERA, P., MOREDA-PIÑEIRO, A., MOREDA-PIÑEIRO, J., BERMEJO-BARRERA, A., *Effectiveness of palladium as a chemical modifier for direct silver and manganese determination in cocaine and heroin by electrothermal atomic absorption spectrometry, Talanta* 43 (1996) 1783-1792.

-
22. BIN, C., XIAORU, W., LEE, F.S.C., Pyrolysis coupled with atomic absorption spectrometry for the determination of mercury in Chinese medicinal materials, *Anal. Chim. Acta* 447 (2001) 161-169.
23. BOCK, R., Handbook of decomposition methods in analytical chemistry, translated and revised by I.L. Marr, Wiley, New York, 1979.
24. BOROWSKI, K.J., SCHOENFELD, C., Expanding the limits of closed-vessel microwave sample preparation, *Am. Lab.* 38 (2006) 26.
25. BROUWERS, E.E.M., TIBBEN, M.M., JOERGER, M., TELLINGEN, O., ROSING, H., SCHELLENS, J.H.M., BEIJNEN, J. H. Determination of oxaliplatin in human plasma and plasma ultrafiltrate by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1484–1490.
26. BUDIC, B., KLEMENC, S., Determination of trace elements in heroin by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using ultrasonic nebulization, *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 681-688.
27. CABON, J.Y., LE BIHAN, A., Interference of salts on the determination of lead by electrothermal atomic absorption spectrometry - ion chromatographic study, *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 619-631.
28. CANFRANC, E., ABARCA, A., SIERRA, I., MARINA, M.L., Determination of iron and molybdenum in a dietetic preparation by flame AAS after dry-ashing, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 103-108.
29. CHAKRABORTY, R., DAS, A.K., CERVERA, M.L., DE LA GUARDIA, M., Literature study of microwave-assisted digestion using electrothermal atomic absorption spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.* 355 (1996) 99-111.
30. CHOUDHURY, R.P., KUMAR, A., GARG, A.N., Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 825-832.
31. CHUANG, I.C., HUANG, Y.L., LIN, T.H., Determination of lead and cadmium in chinese crude drugs by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Anal. Sci.* 15 (1999) 1133-1136.
32. COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, <http://www.farmacopeia.org.br>, acessado em 19 de janeiro de 2007.

-
33. DAMKRÖGER, G., GROTE, M., JANSSEN, E., Comparison of sample digestion procedures for the determination of arsenic in certified marine samples using the FI-HG-AAS technique, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 817-821.
34. EL REIS, M.A., ABOU ATTIA, F.M., KENAWY, I.M.M., Indirect determination of captopril by AAS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 249-254.
35. EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4th Edition, Council of Europe, Strasbourg, France, 2004.
36. EVANS, E.H., GIGLIO, J.J., Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. A review, *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 1-18.
37. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^a Edição, Parte I, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1988.
38. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^a Edição, Parte II, Fascículo 4, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2002.
39. FLORES, E.M.M., BARIN, J.S., MESKO, M.F., KNAPP, G., Sample preparation methods based on combustion reactions in closed vessels - A brief overview and recent applications, *Spectrochim. Acta Part B* 62 (2007) 1051-1064.
40. FLORES, E.M.M., BARIN, J.S., PANIZ, J.N.G., MEDEIROS, J.A., KNAPP, G., Microwave-assisted sample combustion: a technique for sample preparation in trace element determination, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3525-3529.
41. FLORES, E.M.M., BITTENCOURT, C.F., LAPORTA, L.V., BARIN, J.S., Controle de metais pesados em produtos farmacêuticos: aspectos analíticos relevantes, *Pharm. Tech.* 4 (2000) 9-13.
42. FLORES, E.M.M., SILVA, F.E.B., SANTOS, E.P., PAULA, F.R., BARIN, J.S., ZANELLA, R., DRESSLER, V.L., BITTENCOURT, C.F., Determination of total arsenic by batch hydride generation atomic absorption spectrometry in injectable drugs containing high levels of Sb(V) as N-methylglucamine antimonate, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2095-2102.
43. GIL, R.A., CERUTTI, S., GASQUEZ, J.A., OLSINA, R.A., MARTINEZ, L.D., On-line preconcentration and determination of chromium in parenteral solutions by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 531-535.
44. GOMEZ, M.R., CERUTTI, S., OLSINA, R.A., SILVA, M.F., MARTINEZ, L.D., Metal content monitoring in *Hypericum perforatum* pharmaceutical derivatives by atomic absorption and emission spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 569-576.

-
45. GÖRÖG, S., The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 755-757.
46. GÖRÖG, S., (Editor), *Drug-Impurity Profiling*, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 743-840.
47. GÖRÖG, S., (Editor), *Identification and determination of impurities in drugs*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2000.
48. GOUVEIA, S.T., SILVA, F.V., COSTA, L.M., NOGUEIRA, A.R.A., NÓBREGA, J.A., Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations, *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 269-275.
49. GROTTI, M., LEARDI, R., FRACHE, R., Combined effects of inorganic acids in inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1915-1924.
50. HASSAN, S.S.M., *Organic analysis using atomic absorption spectrometry*, Ellis Horwood Limited, 1984.
51. HAWKES, S.J., What Is a "Heavy Metal"?, *J. Chem. Ed.* 74 (1997) 1374.
52. HENRIFARMA PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS LTDA, São Paulo - SP; VALDEQUÍMICA PRODUTOS QUÍMICOS LTDA, São Paulo – SP.
53. HOENIG, M., BAETEN, H., VANHENTENRIJK, S., VASSILEVA, E., QUEVAUVILLER, P., Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 85-94.
54. IYENGAR, G.V., SUBRAMANIAN, K.S., WOITTIEZ, J.R.W., *Element analysis of biological samples - principles and practice*, CRC Press, Boca Raton, 1997.
55. JARVIS, K.E, GRAY, A.L., HOUK, R.S., *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Blackie, New York, 1992.
56. JIA, X., WANG, T., BU, X., TU, Q., SPENCER, S. Determination of ruthenium in pharmaceutical compounds by graphite furnace atomic absorption spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 43-47.
57. JIA, X., WANG, T., WU, J., Determination of palladium by graphite furnace atomic absorption spectroscopy without matrix matching, *Talanta* 54 (2001) 741-751.

-
58. JORHEM, L., Dry ashing, sources of error, and performance evaluation in AAS, *Mikrochim. Acta* 119 (1995) 211-218.
59. KELKÓ-LÉVAI, A., LÁSZTITY, A., ZIH-PERÉNYI, K., HORVÁTH, Z., Graphite furnace atomic absorption spectrometry determination and on-line preconcentration of palladium, *Microchem. J.* 58 (1998) 272-280.
60. KELKÓ-LÉVAI, A., VARGA, I., ZIH-PERENYI, K., LÁSZTITY, A., Determination of trace elements in pharmaceutical substances by graphite furnace atomic absorption spectrometry and total reflection X-ray fluorescence after flow injection ion-exchange preconcentration, *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 827-833.
61. KINGSTON, H.M. (SKIP), HASWELL (EDS.), S.J., *Microwave-Enhanced Chemistry. Fundamentals, Sample Preparation, and Applications*, American Chemical Society, Washington, 1997.
62. KINGSTON, H.M., JASSIE, L.B., Microwave energy for acid decomposition at elevated temperatures and pressures using biological and botanical samples, *Anal. Chem.* 58 (1986) 2534-2541.
63. KRUG, F.J., Apostila "Métodos de Preparo de Amostras – Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar", VI Workshop sobre Preparo de Amostras, 25 a 28 de Abril de 2006, Santa Maria - RS.
64. LAMBLE, K., HILL, S.J., Determination of trace-metals in tea using both microwave digestion at atmospheric-pressure and inductively-coupled plasma-atomic emission-spectrometry, *Analyst* 120 (1995) 413-417.
65. LAMBLE, K.J., HILL, S.J., Microwave digestion procedures for environmental matrices, *Analyst* 123 (1998) 103R-133R.
66. LÁSZTITY, A., KELKÓ-LÉVAI, A., VARGA, I., ZIH-PERÉNYI, K., BERTALAN, E., Development of atomic spectrometric methods for trace metal analysis of pharmaceuticals, *Microchem. J.* 73 (2002) 59-63.
67. LÁSZTITY, A., KELKÓ-LÉVAI, A., ZIH-PERÉNYI, K., VARGA, I., Flow-injection preconcentration and graphite furnace atomic absorption spectrometric determination of platinum, *Talanta* 59 (2003) 393-398.
68. LEVINE, K.E., BATCHELOR, J.D., RHOADES, C.B., JONES, B.T. Evaluation of a high pressure, high temperature microwave digestion system, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 40-59.

-
69. LEWEN, N., MATHEW, S., SCHENKENBERGER, M., RAGLIONE, T., A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 739-752.
70. LEWEN, N., SCHENKENBERGER, M., LARKIN, T., CONDER, S., BRITAIN, H.G., The determination of palladium in fosinopril sodium (monopril) by ICP-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 879-883.
71. LIMA, E.C., KRUG, F.J., ARRUDA, M.A.Z., Direct determination of lead in sweet fruit-flavored powder drinks by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 53 (1998) 601-611.
72. MAGALHÃES, C.E.C., FLORES, E.M.M., KRUG, F.J., BARIN, J.S., MESKO, M.F., Decomposição de materiais orgânicos por combustão, em: F.J. Krug, Apostila "Métodos de Preparo de Amostras – Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar", VI Workshop sobre Preparo de Amostras, 25 a 28 de Abril de 2006, Santa Maria – RS.
73. MAICHIN, B., ZISCHKA, M., KNAPP, G., Pressurized wet digestion in open vessels, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 715-720.
74. MATTOS, J.C.P., NUNES, A.M., MARTINS, A.F., DRESSLER, V.L., FLORES, E.M.M., Influence of citric acid as chemical modifier for lead determination in dietary calcium supplement samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 687-692.
75. MATUSIEWICZ, H., Wet digestion methods, in: Z. Mester, R.E. Sturgeon (Eds.), *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003, pp.193-233.
76. MAY, T.W., WIEDMEYER, R.H., A table of polyatomic interferences in ICP-MS, *At. Spectrosc.* 19 (1998) 150-155.
77. MESKO, M.F., MORAES, D.P., BARIN, J.S., DRESSLER, V.L., KNAPP, G., FLORES, E.M.M., Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique, *Microchem. J.* 82 (2006) 183-188.
78. MESTER, Z., STURGEON, R.E. (Eds.), *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
79. MILACIC, R., BENEDIK, M., Determination of trace elements in large series of spent peritoneal dialysis fluids by atomic absorption spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1999) 1029-1035.
80. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana, FUNASA, Brasília, Brasil, 1999.

-
81. MONTASER, A., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Wiley-VHC, New York, 1998.
82. NIEMELA, M., KOLA, H., EILOLA, K., PERAMAKI, P., Development of analytical methods for the determination of sub-ppm concentrations of palladium and iron in methotrexate, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 433-439.
83. NÓBREGA, J.A., SANTOS, M.C., SOUSA, R.A., CADORE, S., BARNES, R.M., TATRO, M., Sample preparation in alkaline media, *Spectrochim. Acta Part B* 61 (2006) 465-495.
84. NÓBREGA, J.A., TREVIZAN, L.C. ARAÚJO, G.C.L., NOGUEIRA, A.R.A., Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1855-1876.
85. NOLTE, J., *ICP Emission Spectrometry, A Practical Guide*, Wiley-VCH Verlag, Alemanha, 2003.
86. ONG, E.S., YONG, Y.L., WOO, S.O., KEE, L.K., Determination of mercury in chinese-prepared medicine using closed vessel microwave digestion with cold-vapor atomic absorption spectrometry, *Anal. Sci.* 16 (2000) 391-395.
87. OZCAN, M., AKMAN, S., Investigation of the effect of some inorganic salts on the determination of tin in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 509-515.
88. POPINSKA, K., KIERKUS, J., LYSZKOWSKA, M., SOCHA, J., PIETRASZEK, E., KMIOTEK, W., KSIAZYK, J., Aluminum contamination of parenteral nutrition additives, amino acid solutions, and lipid emulsions, *Nutrition* 15 (1999) 683-686.
89. QI, L., HUIRONG, L., Determination of lead in natural herbal medicines by flame atomic absorption spectrometry with a slotted, sputtered quartz tube, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 1203-1205.
90. RAMAN, P., PATINO, L.C., NAIR, M.G., Evaluation of metal and microbial contamination in botanical supplements, *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 7822-7827.
91. RAZIC, S., DOGO, S., SLAVKOVIC, L., POPOVIC, A., Inorganic analysis of herbal drugs. Part I. Metal determination in herbal drugs originating from medicinal plants of the family *Lamiaceae*, *J. Serb. Chem. Soc.* 70 (11) 1347-1355 (2005).
92. RAZIC, S., ONJIA, A., DOGO, S., SLAVKOVIC, L., POPOVIC, A., Determination of metal content in some herbal drugs - Empirical and chemometric approach, *Talanta* 67 (2005) 233-239.
93. RAZIC, S., ONJIA, A., POTKONJAK, B., Trace element analysis of *Echinacea purpurea* – herbal medicinal, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 845-850.

-
94. REID, H.J., GREENFIELD, S., EDMONDS, T.E., Investigation of decomposition products of microwave digestion of food samples, *Analyst* 120 (1995) 1543-1548.
95. RESANO, M., GARCIA-RUIZ, E., CRESPO, C., VANHAECKE, F., BELARRA, M.A., Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for palladium determination at trace and ultratrace levels, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 18 (2003) 1477-1484.
96. SALVADOR, A., PASCUAL-MARTÍ, M.C., ARAGÓ, E., CHISVERT, A., MARCH, J.G., Determination of selenium, zinc and cadmium in antidandruff shampoos by atomic spectrometry after microwave assisted sample digestion, *Talanta* 51 (2000) 1171-1177.
97. SCANCAR, J., MILACIC, R., BENEDIK, M., BUKOVEC, P., Optimisation of parameters for determination of rubidium in spent CAPD fluids by flame and electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 423-428.
98. SILVA JR, J.B., Antimoniato de meglumina, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34 (2001) 103-105.
99. SMITH, F.E., ARSENAULT, E.A., Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry, *Talanta* 43 (1996) 1207-1268.
100. SOLTYK, K., LOZAK, A., OSTAPCZUK, P., FIJALEK, Z., Determination of chromium and selected elements in multimineral and multivitamin preparations and in pharmaceutical raw material, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 425-432.
101. SOMBRA, L.L., LUCONI, M.O., FERNÁNDEZ, L.P., OLSINA, R.A., SILVA, M.F., MARTÍNEZ, L.D., Assesment of trace aluminium content in parenteral solutions by combined cloud point preconcentration-flow injection inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1451-1458.
102. STOICA, A.I., PELTEA, M., BAIULESCU, G.E., IONICA, M., Determination of cobalt in pharmaceutical products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 653-656.
103. SULCEK, Z., POVONDRA, P., *Methods of Decomposition in Inorganic Analysis*, CRC Press, Boca Raton, USA (1989).
104. SUN, H., GAO, Y., YUAN, C., ZHANG, Y., YANG, L., ZHANG, D., Determination of trace lead in chinese herbs by derivative flame atomic absorption spectrometry using na atom-trapping technique, *Anal. Sci.* 18 (2002) 325-328.

-
105. TAKARA, E.A., PASINI-CABELLO, S.D., CERUTTI, S., GASQUEZ, J.A., MARTINEZ, L.D., On-line preconcentration/determination of copper in parenteral solutions using activated carbon by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 735-739.
106. THE MERCK INDEX, Thirteenth Edition on CD-ROM, White House Station, New Jersey, USA 2001.
107. THE PHARMACOPOEIA OF UNITED STATES OF AMERICA, 11th ed., Mack Printing Company, Easton, PA, 1936.
108. TODOLI, J.L., MERMET, J.M., Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 895-929.
109. UNITED STATES PHARMACOPEIA 30, USP Convention Inc., Rockville, MD, USA, 2007.
110. VINAS, P., CAMPILLO, N., LÓPEZ-GARCIA, I., CÓRDOBA, M.H., Speciation of vitamin B-12 analogues by liquid chromatography with flame atomic absorption spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta* 318 (1996) 319-325.
111. WAGNER, G., Basic approaches and methods for quality assurance and quality control in sample collection and storage for environmental monitoring, *Sci. Tot. Environ.* 176 (1995) 63-71.
112. WANG, T., GE, Z., WU, J., LI, B., LIANG, A., Determination of tungsten in bulk drug substance and intermediates by ICP-AES and ICP-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 937-943.
113. WANG, T., WALDEN, S., EGAN, R., Development and validation of a general non-digestive method for determination of palladium in bulk pharmaceutical chemicals and their synthetic intermediates by graphite furnace atomic absorption spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 593-599.
114. WANG, T., WU, J., HARTMAN, R., JIA, X., EGAN, R.S., A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 867-890.
115. WASILEWSKA, M., GOESSLER, W., ZISCHKA, M., MAICHIN, B., KNAPP, G., Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1121-1125.
116. WELZ, B., SPERLING, M., Atomic Absorption Spectrometry, VHC, 3a. ed., Weinheim, Alemanha, 1999.

-
117. WHITE, R.T., KETTISCH, P., KAINRATH, P., The high pressure asher: a high-performance sample decomposition system as an alternative to microwave-assisted digestion, *At. Spectrosc.* 19 (1998) 187-192.
118. WU, X., SUN, D, ZHANG, Z., WANG, X., GONG, H., HONG, J., LEE, F.S.C., Analysis and leaching characteristics of mercury and arsenic in Chinese medicinal material, *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 311-323.
119. WUILLLOUD, G.M., WUILLLOUD, J.C.A., WUILLLOUD, R.G., SILVA, M.F., OLSINA, R.A., MARTINEZ, L.D., Cloud point extraction of vanadium in parenteral solutions using nonionic surfactant (PONPE 5.0) and determination by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Talanta* 58 (2002) 619-627.
120. WUILLLOUD, G.M., WUILLLOUD, R.G., WUILLLOUD, J.C.A., OLSINA, R.A., MARTINEZ, L.D., On-line preconcentration and determination of chromium in parenteral solutions by flow injection-flame atomic absorption spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 117-124.
121. WÜRFELS M., JACKWERTH, E., STOEPLER, M., About the problem of disturbances of inverse voltammetric trace analysis after pressure decomposition of biological samples. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 329 (1987) 459-461.
122. WÜRFELS, M., JACKWERTH, E., STOEPLER, M., Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid - 1. Carbon conversion during sample decomposition, *Anal. Chim. Acta* 226 (1989) 1-16.
123. WÜRFELS, M., JACKWERTH, E., STOEPLER, M., Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid - 2. Influence of reaction-products on inverse voltammetric element determination, *Anal. Chim. Acta* 226 (1989) 17-30.
124. WÜRFELS, M., Voltammetric determination of metal traces in marine samples after nitric acid decomposition, *Mar. Chem.* 28 (1989) 259-264.
125. YANG, Z., HOU, X.D., JONES, B.T., Determination of platinum in clinical samples, *Appl. Spectrosc. Rev.* 37 (2002) 57-88.
126. YEBRA, M.C., Continuous automatic determinations of organic compounds by flow-injection atomic absorption spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 629-641.
127. ZACHARIADIS, G.A., KAPSIMALI, D.C., Development of a rapid multi-element method of analysis of antitussive syrups by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and direct sample introduction, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1212-1219.

-
128. ZACHARIADIS, G.A., RAIDOU, E.S., THEMELIS, D.G., STRATIS, J.A., Determination of mineral content of active dry yeast used in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 463-473.
129. ZHANG, D.Q., YANG, L.L., SUN, H.W., Determination of mercury by cold vapour atomic absorption spectrometry with derivative signal processing, *Anal. Chim. Acta* 395 (1999) 173-178.
130. ZHE-MING, N., BIN, H., HENG-BIN, H., Minimization of sulphate interferences in selenium determination by furnace atomic absorption spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part B* 49 (1994) 947-953.
131. ZISCHKA, M., KETTISCH, P., SCHALK, A., KNAPP, G., Closed vessel microwave-assisted wet digestion with simultaneous control of pressure and temperature in all vessels, *Fresenius J. Anal. Chem* 361 (1998) 90-95.

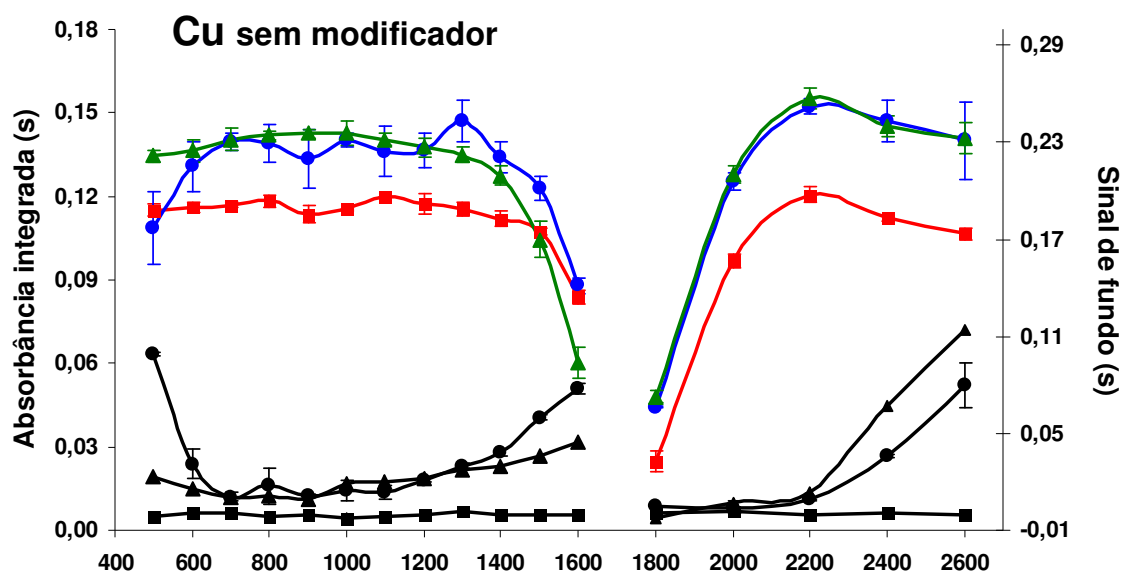


Figura 27. Curvas de pirólise e atomização obtidas sem modificador químico para solução analítica de Cu (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 10% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Cu adicionada nas amostras é equivalente à concentração de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$.

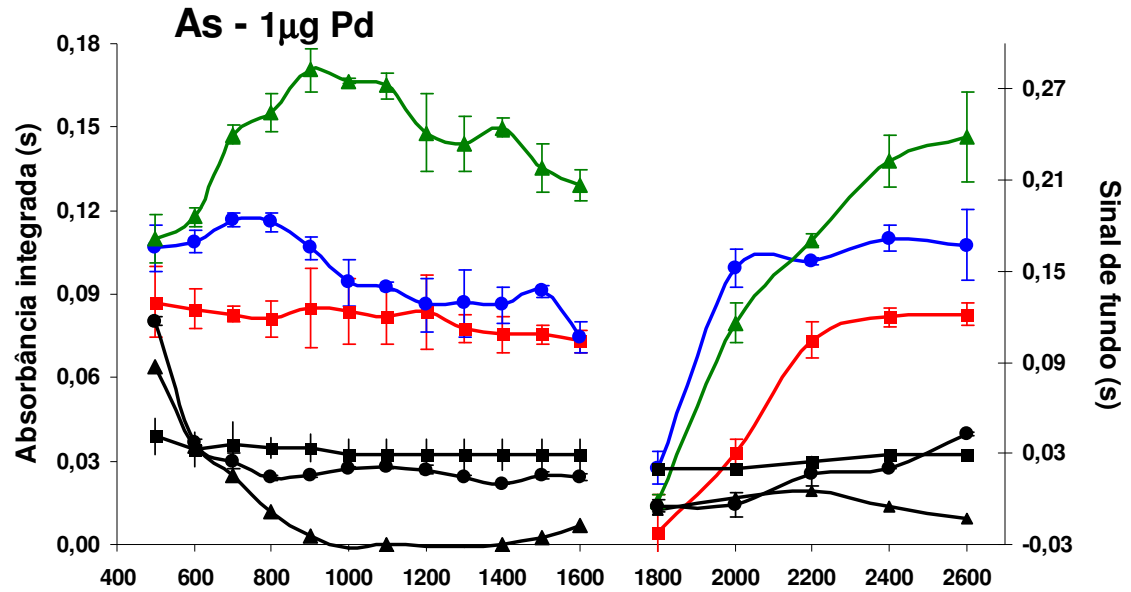


Figura 28. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 1 µg de Pd para solução analítica de As (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 1% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de As adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 10,0 µg g⁻¹.

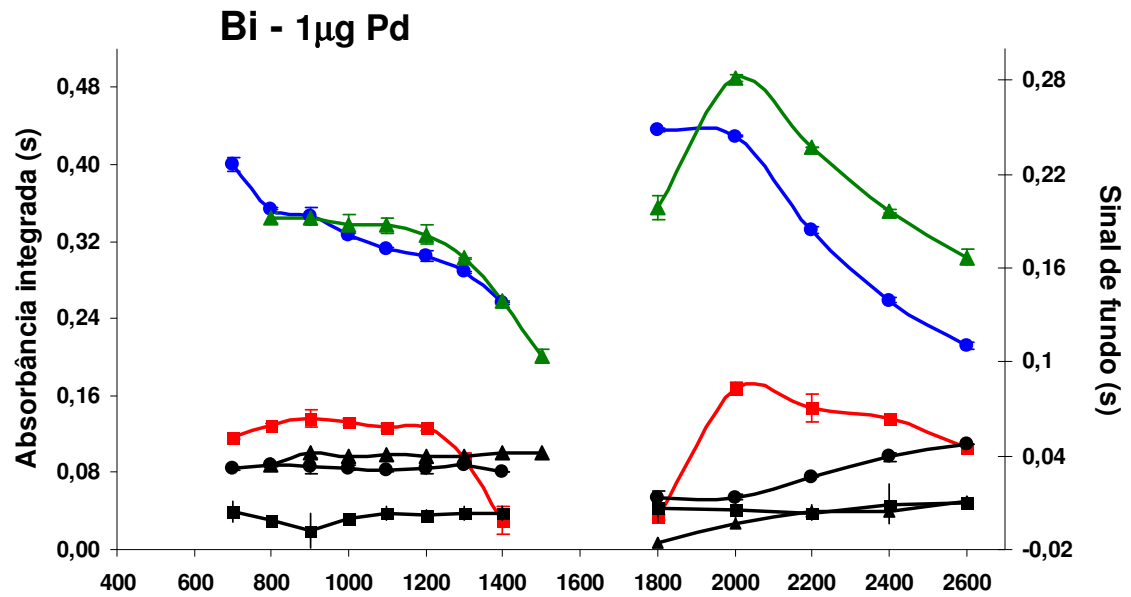


Figura 29. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 1 μ g de Pd para solução analítica de Bi (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 1% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado (n=3). A quantidade de Bi adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 15,0 μ g g⁻¹.

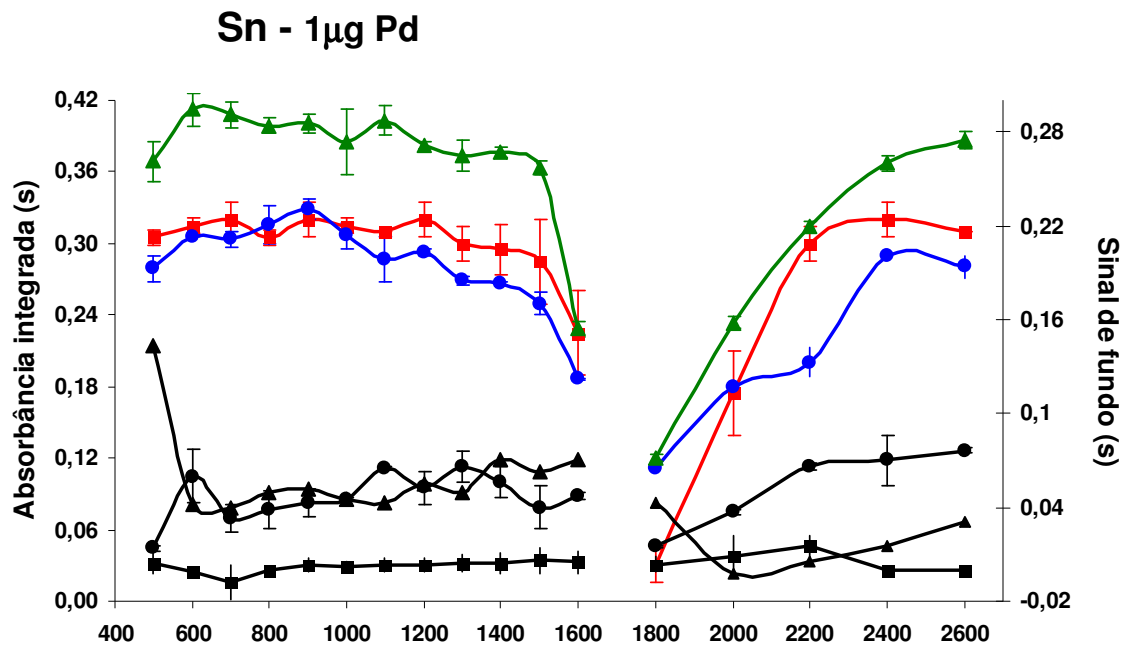


Figura 30. Curvas de pirólise e atomização obtidas com 1 μ g de Pd para solução analítica de Sn (■), cloridrato de amitriptilina (●) cloridrato de imipramina (▲) na concentração de 1% (m/v). O sinal de fundo está representado pelos mesmos símbolos, porém, em preto. Cada ponto representa a média e as barras de erro representam o desvio padrão observado ($n=3$). A quantidade de Cd adicionada nas amostras é equivalente à concentração de 20 μ g g^{-1} .