

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação da decomposição assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído para a decomposição de fármacos anti-hipertensivos para posterior determinação de contaminantes inorgânicos

Eduarda Quadros Machado

Porto Alegre, dezembro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Eduarda Quadros Machado

Avaliação da decomposição assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído para a decomposição de fármacos anti-hipertensivos para posterior determinação de contaminantes inorgânicos

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção de grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Juliana Severo Fagundes Pereira

Orientadora

Porto Alegre, dezembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

À Profa. Dra. Juliana Severo Fagundes Pereira pela orientação, paciência e todo ensino proporcionado durante a minha formação como aluna.

Ao Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes pelas contribuições e por todo apoio durante os momentos de dificuldades e dúvidas na realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Fabiana Ernestina Barcellos, Tânia Mara Pizzolato e Diogo Pompéu de Moraes pelas contribuições na finalização deste trabalho.

Aos colegas do NUQA por toda ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho, especialmente aos colegas Juliana e Victor e a colega do Núcleo de Ciências Farmacêuticas Camila Sheid na ajuda com o desenvolvimento do trabalho.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) e ao Lucas Barnet pela disponibilidade do equipamento ICP-MS e auxílio da determinação de contaminantes inorgânicos, respectivamente.

Aos meus pais Paulo e Marluze e minha irmã Roberta pelo incentivo e por acreditarem em mim.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO	10
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Fármacos anti-hipertensivos e controle de qualidade.....	17
2.2 Métodos de preparo de amostras.....	21
2.2.1 <i>Decomposição com aquecimento convencional.....</i>	<i>21</i>
2.2.2 <i>Métodos de decomposição assistidos por radiação micro-ondas.....</i>	<i>25</i>
2.4 Determinação de metais em fármacos.....	32
2.4.1 <i>Espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor (CVG-AAS).....</i>	<i>32</i>
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Instrumentação.....	36
4.2 Materiais e reagentes.....	37
4.3 Amostras e materiais de referência certificados.....	38
4.4.1 <i>Decomposição assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído e com ácido concentrado.....</i>	<i>38</i>
4.4.2 <i>Ensaio limite para metais pesados – Método III.....</i>	<i>39</i>
4.5 Avaliação da eficiência de decomposição.....	40
4.6 Determinação de contaminantes inorgânicos em fármacos por AAS e ICP-MS.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
5.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído.....	48
5.2.2 <i>Avaliação da eficiência do método MW-AD com ácido diluído para outros fármacos.....</i>	<i>56</i>
5.3 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas com ácido concentrado.....	60
5.5 Comparação entre os métodos de preparo de amostras.....	65
5.6 Figuras de Mérito.....	70

5.6.1	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	70
5.6.2	<i>Exatidão do método</i>	71
6	CONCLUSÕES	74
7	REFERÊNCIAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de regeneração do HNO ₃ no interior do frasco.....	30
Figura 2. Fluxograma dos métodos de preparo de amostra recomendados pela Farmacopeia Brasileira.	44
Figura 3. Preparo de amostras segundo o Método III da Farmacopéia Brasileira.	47
Figura 4. Avaliação da concentração do ácido nítrico para a decomposição da LOS.....	50
Figura 5. Aspecto visual das soluções obtidas com diferentes volumes de H ₂ O ₂	53
Figura 6. Perfil do programa de aquecimento em função da temperatura	55
Figura 7. Avaliação da eficiência de decomposição para o fármaco Captopril em função da massa de amostra..	57
Figura 8. Avaliação da eficiência de decomposição para o fármaco Enalapril em função da massa de amostra.	58
Figura 9. Fluxograma dos métodos estudados para o preparo de amostra dos fármacos.....	66
Figura 10. Aspecto visual das soluções obtidas após MW-AD com ácido concentrado e MW-AD com ácido diluído.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos anti-hipertensivos mais utilizados no Brasil em percentual de uso.	18
Tabela 2. Legendas para a identificação das amostras.	38
Tabela 3. Parâmetros instrumentais para a determinação de As e Hg utilizando o sistema FIAS.	41
Tabela 4. Condições operacionais para determinação dos analitos por ICP-MS.	41
Tabela 5. Informações sobre os fármacos anti-hipertensivos.	43
Tabela 6. Programa de aquecimento do procedimento de decomposição em forno mufla.	46
Tabela 7. Programas de aquecimento avaliados para a decomposição dos fármacos.	54
Tabela 8. Resultados obtidos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a determinação de Hg e As por AAS (n=4).	61
Tabela 9. Resultados obtidos, em ng g^{-1} , após MW-AD com ácido concentrado e diluído e determinação por ICP-MS (n = 4).	63
Tabela 10. Limites permitidos de metais e não metais estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira para fármacos de uso oral, em $\mu\text{g g}^{-1}$	64
Tabela 11. Comparação dos teores de RCC e RA, em %, entre os métodos MW-AD com ácido concentrado e ácido diluído.	68
Tabela 12. Comparação dos métodos de preparo de amostras avaliados para a decomposição de fármacos anti-hipertensivos e determinação de contaminantes inorgânicos.	69
Tabela 13. Limites de detecção e limites de quantificação, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para As e Hg para a determinação por AAS (n = 10).	70
Tabela 14. Limites de quantificação, em ng g^{-1} , obtidos por ICP-MS após MW-AD com ácido concentrado e diluído (n = 4).	71
Tabela 15. Valores obtidos, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para a avaliação da exatidão do método com o CRM Nist 1567a.	72
Tabela 16. Valores obtidos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para a avaliação da exatidão do método com o CRM NIST 1643F.	72
Tabela 17. Ensaio de recuperação para As e Hg. Resultados em %. (n=3)	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS: Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês *“Atomic Absorption Spectrometry”*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AVC: Acidente Vascular Cerebral

BPFM: Boas Práticas de Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica

CAP: Captopril

CV-AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio, do inglês *“Cold Vapor– Atomic Absorption Spectrometry”*

ENA: Maleato de Enalapril

EP: Farmacopeia Europeia

ET - AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica, do inglês *“Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry”*

F-AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês *“Flame Atomic Absorption Spectrometry”*

FB: Farmacopeia Brasileira

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HG-AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos, do inglês *“Hydride Generation – Atomic Absorption Spectrometry”*

HPA: Sistema de Alta Pressão, do inglês *“high pressure asher system”*

ICP-MS: Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, *“Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”*.

ICP-OES: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *“inductively coupled plasma optical emission spectrometry”*

LD: Limite de Detecção.

LOS: Losartana Potássica

LQ: Limite de Quantificação

MIC: combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *“microwave-induced combustion”*

MW-AD: decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado, do inglês, *“microwave-assisted digestion”*.

PA: Pressão Arterial

PROP: Cloridrato de Propanolol

PTFE: Politetrafluoretileno

RA: Teor de Acidez Residual, do inglês, "*Residual Acidity*"

RCC: Teor de Carbono Residual, do inglês, "*Residual Carbon Content*"

RSD: Desvio Padrão Relativo, do inglês, "Relative Standard Deviation"

USP: Farmacopeia Americana

WHO: Organização Mundial da Saúde, do inglês, "World Health Organization"

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido o método de decomposição assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) com ácido diluído para fármacos anti-hipertensivos para posterior determinação de contaminantes inorgânicos. Arsênio e Hg foram determinados por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG-AAS) e Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Sr e V por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). O método de preparo de amostra foi inicialmente otimizado com o fármaco Losartana e após, as melhores condições foram aplicadas para os demais fármacos, tais como, Captopril, Maleato de enalapril e Cloridrato de propanolol. Foi feita a avaliação da concentração de HNO_3 (2,25 a 14 mol L^{-1}), volume de H_2O_2 (0 a 2 mL), tempo de aquecimento (10 a 30 min) e massa de amostra (para cada um dos fármacos estudados). Utilizando HNO_3 3,75 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 30% foi possível decompor 250, 700, 450 e 400 mg dos fármacos Losartana, Captopril, Maleato de enalapril e Cloridrato de propanolol, respectivamente, após 20 min de aquecimento por radiação micro-ondas (rampa de 10 min) a 900 W. A eficiência de decomposição foi avaliada através da determinação do teor de carbono residual (RCC) e acidez residual (RA), os quais variaram de 7 a 32,8% e 2,47 a 4,88 %, respectivamente. Mesmo para as soluções com altos valores de RCC não foram observadas interferências na etapa de determinação por ICP-MS. A exatidão do método foi avaliada com a análise de materiais de referência certificados (CRM) NIST 1567a (Wheat flor) e NIST 1463f (Trace elements in water) e foram obtidas concordâncias na faixa de 70 a 113% para Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Sr e V. Para comparação dos resultados, a decomposição assistida por radiação micro-ondas com ácido concentrado e o método de preparo de amostra recomendado pela Farmacopeia Brasileira (decomposição em forno mufla) também foram feitos. Tendo em vista as limitações do método recomendado pela Farmacopeia Brasileira para o controle de qualidade de fármacos anti-hipertensivos, a MW-AD com ácido diluído é uma alternativa promissora para a decomposição de fármacos, possibilitando a decomposição em menor tempo, e permitindo a obtenção de menores limites de detecção por para a determinação de contaminantes inorgânicos por técnicas espectrométricas.

Palavras-chave: *anti-hipertensivos, MW-AD, ácido diluído, contaminantes inorgânicos, ICP-MS.*

ABSTRACT

In this work, the microwave assisted digestion (MW-AD) with diluted acid was developed for antihypertensive drugs for subsequent determination of inorganic contaminants. Arsenic and Hg were determined by hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS) and Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Sr and V by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The sample preparation method was initially optimized with the drug Losartana and further, the best conditions were applied to the other drugs, such as Captopril, Enalapril maleate and Propranolol hydrochloride. Some parameters were evaluated as HNO₃ concentration (2.25 to 14 mol L⁻¹), volume of H₂O₂ (0 to 2 mL), heating time (10 to 30 min) and sample mass (for each drug studied) were evaluated). Using HNO₃ 3.75 mol L⁻¹ and 2 mL of 30% H₂O₂ it was possible to decompose 250, 700, 450 and 400 mg of Losartana, Captopril, Enalapril maleate and Propranolol Hhydrochloride, respectively, after 20 min of microwave heating (10 min ramp) at 900 W. Decomposition efficiency was evaluated by residual carbon content (RCC) and residual acidity (RA), which ranged from 7 to 32,8% and 2.47 to 4.88%, respectively. Even for solutions with high RCC values, no interferences were observed in the ICP-MS determination step (using an internal standard). Accuracy of the proposed method was checked by using certified reference materials (CRM) NIST 1567a (Wheat flour) and NIST 1463f (Trace elements in water), and agreements in the range of 70 to 113% were obtained for Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Sr and V. For results comparison, microwave assisted digestion using concentrated acid and sample preparation method recommended by the Brazilian Pharmacopoeia were also performed. In view of the limitations of the recommended method by the Brazilian Pharmacopoeia for the quality control of antihypertensive drugs, MW-AD with diluted acid is a promising alternative for sample preparation since sample digestion is performed in less time and making possible to obtain lower detection limits for inorganic contaminants by spectrometric techniques.

Keywords: *antihypertensives, MW-AD, diluted acid, inorganic contaminants, ICP-MS.*

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença que atinge mais de 1 bilhão de pessoas ao redor do mundo, sendo uma das principais causas de morte prematura.¹ Essa doença se caracteriza, principalmente, pela elevação da pressão arterial por um longo período de tempo. É considerado HAS quando os níveis de pressão arterial (PA) são maiores que 140 mmHg para a PA sistólica e maiores que 90 mmHg para a PA diastólica.² O desenvolvimento da doença se dá principalmente pelo elevado consumo de sal, alcoolismo, tabagismo, excesso de peso e o sedentarismo, podendo ser também por fatores genéticos e devido à outras doenças como diabetes e problemas renais.³

A HAS é uma doença silenciosa, não apresentando sintomas. Quando estes aparecem são caracterizados por dores de cabeça, sangramento do nariz, batimentos cardíacos irregulares, zumbidos no ouvido e dificuldades visuais. Em casos mais graves pode ocorrer náuseas, ansiedade, dores no peito, tremores musculares e fadiga¹ e pode levar ao desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares como o acidente vascular cerebral (AVC), derrames, insuficiência renal e cardíaca. O tratamento da HAS pode ser realizado com a mudança de hábitos, uma alimentação saudável e o uso de medicamentos anti-hipertensivos, o qual consiste em um tratamento contínuo e de longo prazo.^{1,4}

O controle de qualidade de medicamentos deve ser eficiente a fim de garantir que o fármaco comercializado esteja de acordo com as normas estabelecidas e garantir que o lote esteja de acordo com o padrão do medicamento. Para isso, existem compêndios oficiais que determinam quais os parâmetros de qualidade devem ser monitorados. Caso haja alguma divergência entre os limites estabelecidos pelas normas e a produção do fármaco pode haver ineficácia no tratamento e até mesmo uma intoxicação.⁵

Dentre os parâmetros avaliados no controle de qualidade de fármacos anti-hipertensivos, destacam-se os contaminantes inorgânicos, principalmente os metais pesados. Alguns deles são importantes para funções biológicas em plantas, animais e até mesmo humanos, como é o caso de Cu, Mo e Co que são oligoelementos. No entanto, outros metais como Cd, V, Cr e Ni, acumulam-se

nos tecidos internos do corpo e causam diversas doenças, podendo ser carcinogênicos dependendo da concentração. As impurezas metálicas podem ser incorporadas aos fármacos através de diversas fontes como água, os materiais metálicos e catalisadores usados na síntese, embalagens, além da incorporação durante alguns processos de manufatura.⁶ A presença de metais pesados nos fármacos pode causar efeitos adversos, como catalizar a degradação do fármaco e levar à formação de outros compostos indesejáveis.⁷

Para que esse controle seja feito, as indústrias farmacêuticas seguem normas descritas em compêndios oficiais, as Farmacopeias, as quais dispõem de informações técnicas como procedimentos, limites específicos, informações estruturais e características de cada princípio ativo produzido. As Farmacopeias são livros com informações técnicas utilizados por mais de 100 anos e, por esse motivo, há a necessidade de constante atualização quanto aos limites de impurezas e desenvolvimento de novos procedimentos de controle de qualidade à medida que ocorre o avanço da instrumentação analítica.⁸ Os métodos recomendados na Farmacopeia Brasileira para a determinação de contaminantes inorgânicos em fármacos anti-hipertensivos baseiam-se na precipitação dos metais, como Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn, na forma de sulfetos. A intensidade da coloração desenvolvida pela amostra é comparada visualmente com a intensidade de cor desenvolvida por um padrão de Pb de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, ambos precipitados da mesma maneira com o reagente tioacetamida.^{9,10} Previamente à etapa de comparação de cor com o padrão de chumbo, o método recomenda o preparo da amostra em várias etapas. Essas etapas consistem na carbonização da amostra em chapa de aquecimento com ácidos concentrados, decomposição em sistema aberto com forno mufla, decomposição em banho-maria, evaporação e redissolução em ácidos.^{11,12} Este método possui diversas desvantagens quando comparado a métodos atuais de preparo de amostras, como por exemplo, o uso de grandes volumes de ácidos concentrados, o que leva a maior geração de resíduos, a decomposição em sistema aberto, que por sua vez, pode levar à contaminações e perdas de elementos por volatilização, além de ser moroso¹³. Além disso, pela etapa de determinação ser feita por comparação visual, pode haver diversas variações relacionadas com o analista ou até mesmo a iluminação ambiente. A coloração desenvolvida na solução final é resultado do somatório de todos os contaminantes presentes na amostra, não

sendo possível identificar a concentração individual de cada elemento e as recuperações para vários elementos são bem baixas (em torno de 50%), como mostrado por Lewen *et al.*^{9,14,15}

Com base nestes aspectos, torna-se necessário desenvolver novos métodos de preparo de amostras que sejam adequados para decomposição de anti-hipertensivos alternativamente ao método recomendado pelas Farmacopeias. O método de decomposição de amostras assistido por radiação micro-ondas com uso de ácidos concentrados já é bem consolidado para a decomposição de diversas matrizes. Por operar em sistema fechado, as perdas de elementos por volatilização são minimizadas, há menor risco de contaminação quando comparado à decomposição em sistema aberto, dependendo do sistema utilizado para a decomposição pode operar em altas temperatura e pressão e o tempo de decomposição é reduzido devido ao aquecimento por radiação micro-ondas ocorrer mais rapidamente. Nos últimos anos, tem sido proposta a combinação da decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) com ácido diluído, pois além de aliar as vantagens do sistema fechado de decomposição, utiliza menores volumes e concentração de reagentes devido à regeneração do ácido nítrico durante o processo de decomposição.^{16,17}

O desenvolvimento de um método de preparo de amostras eficiente, que minimize as dificuldades observadas no método recomendado pelas Farmacopeias e que atenda às recomendações da Química Verde, é extremamente importante. Dessa forma, no presente trabalho foi desenvolvido o método de MW-AD com ácido diluído para a decomposição de Losartana potássica, Captopril, Maleato de enalapril e Cloridrato de propranolol, determinação de contaminantes inorgânicos como Ag, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cu, Cr, Hg, Mn, Mo, Ni, Sr e V por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e As e Hg por espectrometria de absorção atômica (AAS), respectivamente. Foi feita a otimização da massa de amostra, concentração de ácido, volume de H₂O₂ e o programa de aquecimento. Para avaliar a eficiência de decomposição foram avaliados os teores de carbono residual (RCC) e acidez residual (RA). Além disso, os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com os obtidos após o método de preparo

de amostra recomendado pela Farmacopeia Brasileira (decomposição em forno mufla) e com o método MW-AD com ácido concentrado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fármacos anti-hipertensivos e controle de qualidade

Problemas de pressão alta atingem bilhões de pessoas ao redor do mundo, sendo uma das maiores causas de morte de indivíduos em diversas faixas etárias a partir de 18 anos, tendo destaque para idosos. É estimado que 1 a cada 4 homens e 1 a cada 5 mulheres tem problemas com pressão alta. A elevação da pressão arterial se deve, principalmente, pelo estilo de vida, sedentarismo, hábitos alimentares, vícios relacionados ao álcool e tabagismo, entre outros fatores sociais e de desenvolvimento. Se a hipertensão não for controlada pode levar a complicações, ocasionando insuficiência cardíaca e renal, acidente vascular cerebral e em alguns casos cegueira. É uma doença prevenível que mata milhares de pessoas ao redor do mundo, em torno de 13% da população mundial. Pode ser controlada com o uso de medicamentos anti-hipertensivos e alterações no estilo de vida, como a prática de exercícios e o controle da alimentação, por exemplo.^{1,18}

Dentre os fármacos anti-hipertensivos mais utilizados no Brasil, destacam-se principalmente os apresentados na tabela 1, de acordo com pesquisas realizadas nos anos de 2013 e 2014. Cabe destacar que os mesmos fármacos são distribuídos para população gratuitamente através de um programa do Governo Federal (Farmácia Popular).¹⁹

Tabela 1. Fármacos anti-hipertensivos mais utilizados no Brasil em percentual de uso.

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

Adaptado de MENGUE *et al.*, 2016.¹⁸

Com o avanço da tecnologia, a capacidade de pesquisa, exploração e desenvolvimento de novos fármacos tornou-se cada vez mais acessível à indústria farmacêutica. Para a confirmação da segurança do fármaco desenvolvido, métodos são utilizados para garantir a confiabilidade e a qualidade do novo produto antes de sua comercialização.^{21,22} Dentre os aspectos mais importantes no controle de qualidade, as impurezas relacionadas ao processo de desenvolvimento e fabricação dos fármacos merecem destaque. Para assegurar a padronização, a identificação correta dos princípios ativos e excipientes fabricados e a consequente liberação do fármaco, alguns requisitos são estabelecidos por órgãos públicos por meio de normas como as Boas Práticas de Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica (BPFM), regulamentada pela ANVISA através da Resolução RDC número 17, de 16 de abril de 2010.²³ Esta resolução informa os procedimentos necessários para a verificação da eficácia de fabricação frente à vigilância sanitária.²⁴

Dentre as análises de maior importância no controle de qualidade de medicamentos, as impurezas metálicas que podem estar presentes no produto final é a de maior destaque. A presença destes elementos se dá devido a

contaminações que podem ocorrer através da matéria prima, dos materiais utilizados para a produção, dos catalisadores metálicos usados para a síntese, nos reagentes empregados na fabricação e limpeza de equipamentos, entre outras fontes de contaminação, como por exemplo, as embalagens.^{12,25}

A presença de contaminantes inorgânicos no produto final pode causar sérios riscos aos consumidores, principalmente em medicamentos de uso contínuo, como os anti-hipertensivos, pelo fato de alguns elementos serem potencialmente tóxicos mesmo em baixas concentrações. Desta forma, a presença de contaminantes inorgânicos pode causar problemas comportamentais, psicológicos, elevação da pressão sanguínea, insuficiência renal e reprodutiva e, em alguns casos, podem ser carcinogênicos.^{26,27} Por estes motivos, agências nacionais e internacionais são responsáveis por controlar o limite máximo permitido de alguns metais em produtos farmacêuticos, assim como recomendar os procedimentos de preparo das amostras e a forma de determinação dos contaminantes. Os compêndios oficiais que mais se destacam são as Farmacopeias Europeia (EP)²⁸, Americana (USP)^{10,29} e a Brasileira (FB)²⁰. Dentre os elementos listados pelas Farmacopeias, destacam-se metais como As, Cd, Pb e Hg. Além destes elementos, as farmacopeias recomendam também a determinação de metais utilizados na síntese dos fármacos.

Previamente à determinação, são indicados diferentes procedimentos:

Método I: o método consiste na dissolução da amostra em água e posterior adição da tioacetamida para a formação de sulfetos insolúveis de coloração característica. A coloração do precipitado é então comparada com a coloração do precipitado formado pela solução padrão de Pb.

Método II: as amostras são dissolvidas em solvente orgânico, dioxano ou acetona (com 15% de água) e precipitadas com tioacetamida para a formação de precipitados com enxofre, os quais possuem a coloração variando do amarelo ao preto dependendo da quantidade de metais estão presentes na amostra. A coloração do precipitado é então comparada com a coloração do precipitado formado pela solução padrão de Pb.

Método III: consiste na decomposição da amostra utilizando ácidos inorgânicos concentrados, variando entre a evaporação dos ácidos em baixas temperaturas, dissolução de resíduos sob aquecimento, incineração e em alguns casos filtração, até que toda a amostra esteja decomposta. Após, a amostra é colocada em contato com tioacetamida e a coloração do precipitado é então comparada com a coloração do precipitado formado pela solução padrão de Pb.

Método IV: a amostra é submetida à decomposição com agentes oxidantes em bloco digestor, atingindo temperaturas acima de 100 °C. O digerido é resfriado e é feita a adição de tioacetamida para a formação do precipitado. A coloração do precipitado é então comparada com a coloração do precipitado formado pela solução padrão de Pb.

Método V: caso os preparos indicados anteriormente não forem satisfatórios, utiliza-se a decomposição por via úmida em sistema fechado ou o método de combustão iniciada por radiação micro-ondas, onde após a decomposição, os digeridos são precipitados com tioacetamida e a coloração do precipitado é então comparada com a coloração do precipitado formado pela solução padrão de Pb.

A Farmacopeia americana, atualizada pela última vez em 2015, não recomenda mais a utilização de métodos envolvendo forno mufla e determinação por precipitação de sulfetos. A determinação de impurezas metálicas é recomendada após a decomposição em sistema fechado utilizando radiação micro-ondas por ICP-OES ou ICP-MS. Por outro lado, a Farmacopeia Brasileira, ainda recomenda a utilização dos métodos convencionais. Caso não seja possível realizar a decomposição dos fármacos utilizando esses métodos (I a IV) a alternativa é utilizar os métodos de decomposição em sistema fechado ou utilizando a MIC.¹⁰

No caso dos fármacos Losartana Potássica, Captopril, Maleato de Enalapril e Cloridrato de Propranolol, a Farmacopeia Brasileira recomenda o Método III para o preparo das amostras visando a posterior determinação de metais pesados.²⁰ Cabe destacar que para a escolha do método adequado para o preparo das amostras leva-se em conta o conhecimento do analista, os princípios de segurança e o conhecimento da matriz da amostra, caso a

monografia de cada fármaco não especifique o método a ser utilizado. Para todos os anti-hipertensivos utilizados neste trabalho, com exceção do Cloridrato de propranolol, o método de preparo de amostra é o Método III, recomendado na Farmacopeia Brasileira.

2.2 Métodos de preparo de amostras

Apesar das Farmacopeias indicarem os métodos de preparo de amostras que devem ser aplicados no controle de qualidade dos fármacos, muitas vezes é necessário desenvolver novas alternativas, de forma a garantir maior eficiência de decomposição, aliado a métodos que atendam aos princípios de Química Verde, como menor consumo de reagentes e geração de resíduos, por exemplo. Cabe destacar que muitos fármacos possuem matrizes complexas, sendo necessário utilizar métodos de preparo de amostras mais eficientes para garantir que os analitos estejam na forma livre em solução para posterior determinação. Neste sentido, nos últimos anos alguns métodos de preparo de amostras têm sido desenvolvidos para a decomposição de fármacos. Nesta revisão bibliográfica serão abordados somente os métodos de preparo de amostra empregados para amostras de fármacos.

2.2.1 Decomposição com aquecimento convencional

2.2.1.1 Decomposição por via seca

Na decomposição por via seca com aquecimento convencional, a amostra é colocada em um forno do tipo mufla e aquecida por várias horas a aproximadamente 450 a 550 °C. Quando a amostra é colocada sob altas temperaturas e em contato com o ar, todo o carbono da matriz é convertido a CO₂ e água, restando apenas os constituintes inorgânicos na forma de cinzas, constituídas basicamente de óxidos de metais que podem ser solubilizadas em ácidos diluídos para posterior determinação. Este método é capaz de decompor grandes massas de amostras sob condições atmosféricas utilizando cadinhos de um material resistente como platina ou porcelana.^{30, 31, 32}

Neste método muitas amostras podem ser decompostas concomitantemente utilizando grandes massas de amostra, o que possibilita a pré-concentração dos analitos nas cinzas após a decomposição. Para a análise das cinzas, é necessário a solubilização em ácidos adequados, geralmente HF,

que é capaz de solubilizar silicatos e óxidos ou misturas com ácidos oxidantes. Como o resíduo das cinzas é pouco, quando comparado a massa inicial, a quantidade de ácido necessária para a solubilização é menor. Porém, algumas desvantagens são observadas como a contaminação ambiente e contaminação cruzada, por ser um sistema aberto de decomposição e o alto tempo de decomposição. Além destas limitações, pode-se observar que com o aumento da temperatura alguns analitos podem ser perdidos devido às suas baixas temperaturas de volatilização, como é o caso do Hg, As e Se. Outro fator que pode interferir na decomposição eficiente da amostra é a possibilidade de retenção do analito nas paredes do recipiente que está sendo utilizado ou até mesmo a formação de compostos com silicatos ou óxidos presentes nas cinzas.³³ Para minimizar os erros associados à perdas por volatilização e a retenção dos analitos, são utilizados aditivos, geralmente ácidos inorgânicos como HNO₃ e H₂SO₄ ou sais como MgO e Mg(NO₃)₂ que auxiliam no processo de oxidação e convertem as espécies dos elementos voláteis em sulfatos não voláteis, evitando as perdas. Outro cuidado a ser tomado quando se utiliza a decomposição em sistema aberto em fornos do tipo mufla é o rápido aumento de temperatura que pode causar projeções e perda de amostra e por este motivo é recomendado trabalhar com rampas de aquecimento.^{20,33}

S. Razik *et al.* pesaram aproximadamente 1 g de amostras de plantas medicinais as quais estavam sendo estudadas, onde estas foram submetidas a 100-120 °C em chapa de aquecimento por 15 min e após, levadas a 500 °C por 2 h em forno mufla. Posteriormente, nas cinzas resultantes da decomposição foram adicionadas 10 gotas de água destilada e 4 mL de HNO₃ 8 mol L⁻¹ e levados à condição do aquecimento inicial até a secura. O resíduo foi, novamente, levado ao aquecimento a 500 °C por mais 1 hora e após o resfriamento foi feita a adição de HCl 6 mol L⁻¹ e foi feita a aferição com água destilada a 25 mL para a determinação de Cu, Zn, Mn, Fe, K, Ca, Mg, Al, Ba e B. Recuperações entre 91 a 102% foram obtidas por métodos espectrométricos utilizando espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) e espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) em 26 amostras de medicamentos fitoterápicos. Mesmo sendo um procedimento envolvendo diversas etapas, demandando um tempo muito elevado e com possibilidade de perda dos analitos por volatilização, adsorção, contaminação,

os autores relataram a possibilidade de utilizar elevadas massas de amostra e a possibilidade de dissolução das cinzas em pequenos volumes de ácidos, resultando em decomposições eficientes, sem resíduos sólidos e incolores.³⁴

2.2.1.2 *Decomposição por via úmida*

Este método é baseado na dissolução da amostra utilizando ácidos inorgânicos oxidantes e aquecimento. Pode ser realizado em blocos digestores ou até mesmo em chapas de aquecimento, sendo considerado um método simples e de fácil manuseio. Na maioria dos casos, amostras orgânicas não são decompostas totalmente quando apenas um ácido oxidante é utilizado, sendo necessário o emprego de uma mistura de ácidos e/ou a utilização de H₂O₂ em conjunto.²⁰ O HNO₃ é o ácido mais utilizado, tanto sozinho como em misturas com outros ácidos, isto porque é encontrado facilmente com alta pureza, tem um alto potencial de oxidação e pela formação de nitratos solúveis. Quando combinado com H₂SO₄ ou com HClO₄, a decomposição ocorre de forma mais efetiva já que o ponto de ebulição da solução é aumentado, além da formação de compostos intermediários de mais fácil decomposição. Outra mistura que contribui com o processo de decomposição, principalmente quando há a presença de materiais inorgânicos ou onde há elevada formação de cinzas, é a de HCl e HF que são capazes de decompor silicatos.³³

A escolha do ácido a ser utilizado é uma etapa crucial no preparo da amostra utilizando decomposição por via úmida, principalmente porque os analitos estarão na forma de íons após a decomposição, isso influencia significativamente na escolha da técnica de determinação a ser utilizada e as interferências que o ácido pode causar. Por utilizar aquecimento convencional, não são atingidas altas temperaturas quando comparada com o método de decomposição por via seca e, desta forma a perda de elementos por volatilização é menor.^{20,33}

Hooi-Hoon Ang, *et al* efetuaram a decomposição de fitoterápicos oriundos da Malásia para avaliar se estavam de acordo com as normas regulamentadoras. Para isso, utilizaram 1,5 g de amostra previamente moída com a adição de 25 mL de água régia que foram deixadas sob aquecimento em banho maria por um longo tempo (em torno de 6 a 8 h) até as amostras estarem completamente digeridas. Após a dissolução, as amostras foram resfriadas e aferidas ao volume

de 50 mL com água destilada para posterior determinação de Hg por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV-AAS). De acordo com a legislação do país o limite máximo de Hg em fitoterápicos é de 0,5 ppm e o estudo mostra que 36% das amostras ultrapassam os limites permitidos sendo encontrados de 0,52 a 5,30 ppm de Hg nos fitoterápicos.³⁵

2.2.1.3 Decomposição por via úmida em sistema fechado

Comparando com o procedimento de decomposição em sistema aberto por via úmida, a utilização de sistema fechado minimiza as perdas de analito por volatilização e contaminação. Neste método de decomposição ocorre o aumento na temperatura de ebulição dos ácidos utilizados devido ao aumento de pressão gerado no sistema em decorrência da utilização de frascos fechados, fazendo com que a eficiência de decomposição seja maior. A amostra é colocada em frascos adequados com a adição de ácidos inorgânicos e submetidos a aquecimento por condução. Durante o processo de decomposição, a pressão gerada no interior do frasco é aumentada fazendo com que a temperatura de ebulição do HNO₃ aumente, porém, a temperatura de trabalho limita-se ao material que está sendo utilizado. Frascos de politetrafluoretileno (PTFE) por exemplo, possibilitam trabalhar em uma faixa de aproximadamente 160 a 200 °C sem que ocorra nenhuma deformação no material.³³ Outra limitação da técnica é a massa de amostra que se restringe pela pressão máxima que pode ser suportada pelo frasco, já que durante a decomposição são gerados gases como NO_x e CO₂ provenientes da degradação da matéria orgânica.

Deve-se considerar, também, a quantidade de ácido necessária para a decomposição total a partir da massa de amostra a ser utilizada para que a decomposição seja completa. É recomendado para este tipo de método a utilização de até 0,2 g de amostra, justamente pelo cuidado a ser tomado com a pressão evitando acidentes que podem ser causados pelo aumento de pressão.³³

A decomposição por via úmida em sistema fechado foi proposta por S. Ahsan *et al*³⁶ para decomposição de suplementos de cálcio para posterior determinação de Cd por espectrometria de absorção atômica e atomização eletrotérmica (ET AAS) com a utilização de modificador químico. Os medicamentos foram decompostos por via úmida em sistema fechado utilizando

5 g de amostra, 3 mL de H₂O₂ 30%, e 1 mL de HNO₃ 0,05 mol L⁻¹ e aquecimento a 120 °C por 3 h em bloco digestor. Após, as soluções foram diluídas com água destilada a 10 mL. Também foi feita a análise direta da amostra com 0,2 g de amostra cominuída a 3 mm, diluída em 10 mL de água destilada e homogeneizada com agitador ultrassônico por 5 min. Recuperações de 103 a 106% foram obtidas para Cd, com desvio padrão relativo (RSD) de 5 a 17%. O limite de detecção (LD) encontrado para Cd foi de 17 pg mL⁻¹.

2.2.2 Métodos de decomposição assistidos por radiação micro-ondas

2.2.2.1 Combustão iniciada por micro-ondas

Métodos de combustão são baseados na decomposição da matéria orgânica na presença de oxigênio, onde esta é convertida a CO₂ e H₂O. O método de combustão iniciada por radiação micro-ondas (MIC) é realizado em frascos fechados de quartzo pressurizados com oxigênio. A amostra é colocada sobre um suporte de quartzo, juntamente com um disco de papel filtro umedecido com uma solução de nitrato de amônio, geralmente é utilizado NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹. A decomposição é realizada após a ignição da amostra pela incidência da radiação micro-ondas e, após a completa combustão, os vapores gerados são retidos em uma solução absorvedora colocada inicialmente no interior do frasco.

O início da combustão se dá pela interação das micro-ondas geradas com o nitrato de amônio presente no papel filtro, causando uma degradação exotérmica do papel filtro que, em contato com o ambiente rico em oxigênio, dá início ao processo de combustão da amostra. A queima ocorre de maneira rápida, aproximadamente, em 10 s. Quando a amostra entra em combustão ocorre um rápido aumento na temperatura do sistema, podendo atingir mais de 1200 °C.^{30,37} A pressão no interior do frasco durante a queima da amostra também aumenta rapidamente, podendo chegar a 50 bar de acordo com a matriz e a massa de amostra utilizada. Ao final da queima, a pressão no interior do frasco diminui e o sistema pode ser irradiado novamente com micro-ondas para que a solução absorvedora entre em ebulição e ao atingir a superfície mais fria do frasco, condense, gerando uma espécie de refluxo da solução no interior do frasco. Essa etapa de refluxo permite a lavagem mais eficiente do sistema e faz com que a absorção dos elementos na solução seja mais eficiente. Um ponto a ser observado com a utilização da MIC é a possibilidade de usar ácidos diluídos

e até mesmo água como solução absorvedora, a qual deve ser escolhida de acordo com o analito.^{12,30}

Como a decomposição por MIC está baseada em uma reação de combustão, o procedimento é bastante rápido, além de promover valores de RCC mais baixos devido a alta eficiência de decomposição. Por trabalhar em sistema fechado, as perdas por volatilização são mínimas ou inexistentes e há possibilidade de monitoramento da pressão e temperatura, o que é um aspecto importante por questão de segurança. Quando comparado com a combustão em sistema aberto, há uma limitação quanto a massa de amostra a ser utilizada, sendo recomendados até 1 g quando utilizada a MIC, justamente pelo limite de pressão no interior do frasco.^{33,38} No entanto, alguns trabalhos publicados na literatura já mostram que dependendo da matriz da amostra, massas maiores podem ser utilizadas.

Costa *et al* utilizaram a MIC para a decomposição de massas maiores que 1 g (1,1 g) de mel, utilizando 400 mg de celulose microcristalina e invólucro de polietileno para a posterior determinação de Br e I por ICP-MS. No procedimento foram utilizados 6 mL de NH_4OH 50 mmol L^{-1} como solução absorvedora, obtendo LD de 6 e 34 ng g^{-1} para I e Br, respectivamente. Para avaliar a eficiência da MIC, foi feito o RCC (< 1%) e para a avaliar a exatidão do método materiais de referência certificados (CRMs) foram utilizados, obtendo recuperações de 101 e 105% para Br e 98 e 106% para I.³⁹

A decomposição por MIC foi estudada por Nam *et al*³⁷ que avaliaram a eficiência de decomposição de produtos farmacêuticos para a determinação de metais classe 1 (As, Cd, Hg e Pb) e classe 2 (Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pd, Pt, V, Os, Rh, Ru e Ir), classificados pela Farmacopeia Americana por ICP-MS. Cerca de 400 a 700 mg de amostras de aspirina foram moídas e submetidas à decomposição por MIC utilizando 1,5 mol L^{-1} de NH_4NO_3 como iniciador de combustão, 5 mL de HNO_3 20% (v/v) como solução absorvedora e os frascos foram pressurizados com 20 bar de O_2 . O programa de aquecimento utilizado foi 1400 W por 1 min e 30 s min e 1000 W por aproximadamente 25 min para etapa de refluxo, seguido da etapa de resfriamento por 30 min. Para avaliar a eficiência da MIC, foram avaliados os teores de RCC os quais foram < 1% para todas as amostras. Recuperações de $100 \pm 5\%$ e limites de detecção menores que 0,01 $\mu\text{g/g}$ foram obtidos para todos analitos após a determinação por ICP-MS.

Barin *et al*⁴⁰ avaliaram o mesmo método para a decomposição de fármacos tricíclicos para a determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS. Usando comprimidos da amostra de 500 mg e 40 µL de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹ como iniciador de combustão, a solução absorvedora foi avaliada variando a concentração HNO₃ (1, 7 e 14,5 mol L⁻¹). Utilizando HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora, o método foi adequado para a decomposição dos fármacos tricíclicos por MIC para a determinação por ICP-MS, obtendo LD de 0,011, 0,002, 0,010 e 0,013 µg g⁻¹ para As, Cd, Hg e Pb, respectivamente. Para avaliar a eficiência de decomposição foi avaliado o RCC o qual foi menor que 1% para todas as amostras. O método ainda foi comparado ao método recomendado pela Farmacopeia Americana e com os métodos de MW-AD e o sistema de digestão em alta pressão (HPA). Para o método recomendado pela Farmacopeia Americana o qual recomenda a decomposição em sistema aberto em forno mufla a 500 - 600 °C, foi observada significativas perdas por volatilização de todos os analitos. Quando utilizado MW-AD como preparo de amostras, a decomposição não foi eficiente, sobrando resíduos sólidos ao final da decomposição. Os métodos mais eficientes para a decomposição dos fármacos tricíclicos foram MIC e HPA, porém quando utilizado o HPA com a massa de 500 mg foram observados resíduos sólidos, tendo que ser utilizada uma menor massa de amostra e maior tempo de decomposição. Sendo assim, o método de MIC foi considerado o mais adequado para a decomposição de fármacos tricíclicos para determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS obtendo recuperações na faixa de 94 a 103%.

2.2.2.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas

É conhecida e amplamente utilizada a decomposição de amostras orgânicas com a utilização de ácidos inorgânicos. Porém, quando utilizado sistema aberto e aquecimento convencional, observa-se algumas desvantagens como a limitação da decomposição pelo ponto de ebulição do ácido e principalmente a perda dos elementos por volatilização. Quando é utilizado sistema fechado, as perdas por volatilização são praticamente eliminadas.^{41,32}

Uma alternativa para o aquecimento mais rápido do sistema de decomposição é o uso de radiação micro-ondas. O processo de aquecimento

consiste na absorção da energia micro-ondas gerada e incidida sob uma fase líquida para que se dê o aquecimento através de fenômenos sinérgicos, fazendo com que a solução entre em ebulição de maneira mais rápida. Quando é utilizado um sistema fechado, é gerada uma pressão no interior do frasco reacional, fazendo com que a temperatura de ebulição da solução aumente.

Assim como os demais métodos que utilizam decomposição em sistemas fechados, um dos limitantes é a massa de amostra utilizada. Atualmente, os fornos comerciais possibilitam o monitoramento da temperatura e pressão, o que acaba permitindo a decomposição simultânea apenas de amostras semelhantes.³⁵

Muller *et al*⁴² compararam dois sistemas de decomposição assistidos por micro-ondas em câmara única de reação que trabalha em pressões máximas na faixa de 199 bar para a decomposição de Levodopa, Difosfato de primaquina, Cloridrato de propranolol e Sulfametoxazol. Após a decomposição foi feita a determinação de Cr, Cu, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V, por ICP-MS. No método utilizando câmara única de reação foram otimizadas a massa de amostra (100, 250 e 500 mg) e a solução de decomposição, onde foram avaliadas (i) 6 mL de HNO₃ concentrado, (ii) 6 mL de água régia (1,5 de HNO₃ + 4,5 HCl) e (iii) 6 mL de água régia invertida (1,5 mL de HCl + 4,5 mL de HNO₃) utilizando como programa de aquecimento de 10 min de rampa até 1400 W, 20 min de permanência em 1400 W e 20 min de resfriamento. Ao final das otimizações foi observado que quando foi utilizado água régia, a decomposição dos fármacos não foi eficiente, restando resíduos sólidos. Quando foi utilizado água régia invertida, apenas o fármaco Levodopa foi decomposto eficientemente. A decomposição de todos os fármacos foi completa quando foi utilizado somente HNO₃ concentrado na etapa de preparo das amostras. Na avaliação da massa de amostra foi observado que quando utilizadas massas de 500 mg, todos os fármacos, com exceção da Levodopa que apresentou RCC menor que 1%, apresentaram teores de C em solução maiores que 250 mg L⁻¹ o que pode ocasionar interferências na etapa de determinação por ICP-MS, principalmente na determinação de Cr e As. Sendo assim, a massa de amostra dos fármacos avaliados foi limitada em 250 mg. Sendo assim, foi possível através da decomposição assistida por radiação micro-ondas e sistema única de

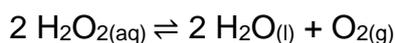
reação a decomposição de 500 mg de amostra utilizando HNO 14 mol L⁻¹ para a determinação de As, Cd, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb e V.⁴²

2.2.2.3 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído

Já se conhece as vantagens da utilização de HNO₃ concentrado para a decomposição de amostras orgânicas e inorgânicas. Essas vantagens estão associadas, principalmente, ao alto poder oxidante que o ácido apresenta.⁴³ A utilização de ácidos diluídos para a decomposição é uma alternativa viável para o preparo de amostras visando menor custo e menor geração de resíduos, atendendo à um dos princípios da Química Verde. Além disso, o uso de ácidos diluídos leva à diminuição dos valores de branco, as soluções são de mais fácil introdução nos equipamentos que operam com sistemas de nebulização, reduz etapas de diluição e os limites de detecção e quantificação são menores.^{44,41}

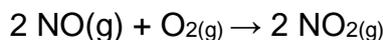
A eficiência de decomposição associada ao uso do ácido diluído se dá devido as altas temperatura da solução e pressão no interior do frasco, as quais são responsáveis pela capacidade de regeneração do ácido. Para que a regeneração ocorra é necessário basicamente duas condições: presença de O₂ na fase gasosa e um gradiente de temperatura entre a fase líquida e a fase vapor no interior do frasco de decomposição.⁴⁵ Esse gradiente de temperatura se dá pela diferença de temperatura entre a solução de decomposição, a qual absorve a radiação micro-ondas e aquece rapidamente e a fase vapor que está em uma temperatura menor por não absorver a radiação e aquecer mais lentamente.⁴⁶

Quando se utiliza volumes menores de ácido pode ser necessário utilizar reagentes auxiliares para garantir a completa decomposição da amostra. Um reagente de alto poder oxidativo que é comumente utilizado é o H₂O₂. Além de auxiliar no processo de decomposição, sua decomposição do leva à geração de O₂ e H₂O como mostra a reação abaixo:

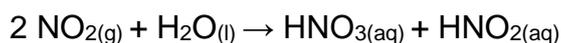


Como será mostrado a seguir, para que ocorra a regeneração do HNO₃, é necessária uma fonte de O₂. Sendo assim, o H₂O₂, além de auxiliar no processo de decomposição, serve como fonte de O₂ para a regeneração do HNO₃.

À medida que ocorre a decomposição da matéria orgânica são gerados vapores de CO_2 , H_2O e NO . O O_2 disponível na fase gasosa oxida o NO produzido, gerando NO_2 como mostram as reações abaixo:



O gradiente de temperatura entre a fase líquida e fase vapor no interior do frasco é responsável pela condensação do NO_2 produzido, o qual é reabsorvido formando novamente o HNO_3 , que acaba sendo regenerado:



O HNO_2 formado é absorvido em água, formando novamente NO e NO_2 que irão dar sequência ao ciclo de regeneração do HNO_3 ³⁰ como mostra a figura 1.

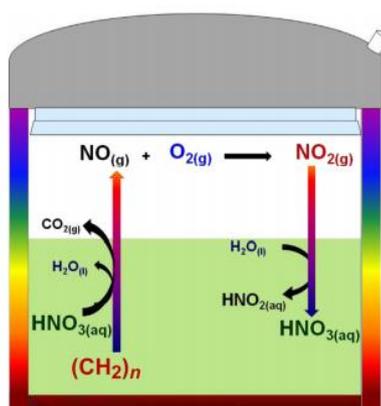


Figura 1. Processo de regeneração do HNO_3 no interior do frasco. Adaptado de Flores, E. M. M.³⁷

Este método de decomposição já foi empregado com sucesso para diversas matrizes, como combustíveis¹⁵, alimentos⁴⁷, plantas medicinais⁴¹ e fármacos¹⁵.

A eficiência do método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído já foi comprovada por Müller *et al*⁴¹ para a decomposição de plantas medicinais e determinação de As, Cd, e Pb por ICP-MS e Hg por IF-CVG. No trabalho, foram avaliadas massas de 300 a 500 mg de *Passiflora incarnata L.* e *Paullinia cupana* e HNO_3 2, 4, 7, 10 e 14 mol L^{-1} . O programa de aquecimento de 20 min a 1400 W de rampa até 200 °C, permanência de 20 min em 1400 W e 20 min de resfriamento. Para a avaliação

da eficiência do método foi realizado as medidas de RCC e RA para cada uma das amostras, onde foi obtido o RCC menor que 320 mg L⁻¹ de C para ambas as amostras e RA menor de 33% para *Passiflora* e menor de 22% para *Paullinia* quando utilizados 500 mg de amostra e HNO₃ 4 mol L⁻¹. Para avaliar a exatidão do método foram utilizados os CRMs Peach Leaves (NIST 1547) e Olive Leaves (BCR 065) encontrando concordância maior que 95% com os valores certificados. Além disso, os ensaios de recuperação obtiveram resultados entre 96 e 103%. Os LDs obtidos foram de 0,004 a 0,02 µg g⁻¹ os quais estão em concordância com os recomendados pela Farmacopeias Americana. Como método comparativo, foi feita a decomposição das amostras pelo método recomendado pela para cada uma das amostras. Utilizando o Método II da Farmacopeia Americana, a qual recomenda a utilização de ácidos concentrados, aquecimento convencional e forno mufla, foi observado pelos autores a perda de Hg e Pb por volatilização.⁹

O método utilizando decomposição por via úmida assistido por radiação micro-ondas e ácido diluído foi avaliado por Pinheiro¹⁵ *et al* para a decomposição de fármacos de diferentes classes, dentre eles um anti-hipertensivo. No trabalho, foram avaliadas 3 soluções de decomposição água-régia invertida (procedimento de referência), HNO₃ 2 e 7 mol L⁻¹ para a decomposição de 500 mg de fármacos de classes distintas para a determinação de contaminantes inorgânicos por ICP-OES e ICP-MS de acordo com os capítulos 232 e 233 da Farmacopeias Americana. Foi feita a avaliação da decomposição parcial e completa dos fármacos e as possíveis interferências causadas nas técnicas de determinação. As decomposições com ácido diluído 2 mol L⁻¹ e 7 mol L⁻¹ foram comparadas ao método de decomposição com água régia invertida. Quando comparados os métodos de decomposição, foi observado que das 9 amostras, 3 delas foram decompostas utilizando HNO₃ 7 mol L⁻¹ a 220 °C, enquanto 2 amostras decompueram totalmente com HNO₃ 2 mol L⁻¹. Cabe destacar que a amostra de anti-hipertensivo utilizada no trabalho não decompôs com nenhuma das soluções propostas. Interferências causadas pela presença de C em solução nas decomposições não foram observadas em nenhuma das soluções obtidas, sendo observadas apenas interferências de transporte ou efeitos energéticos no plasma, as quais foram contornadas com o uso de padrão interno. Durante o desenvolvimento do trabalho não foram observadas diferenças significativas

entre o método proposto e o método considerado referência (em um nível de confiança de 95%), obtendo recuperações entre 70 e 138% para a determinação em ICP-OES e 72 a 128% para ICP-MS e limites de detecção estando de acordo com a faixa estabelecida pela USP 232.

2.4 Determinação de metais em fármacos

Em fármacos, a determinação de metais pesados exige que as técnicas tenham um limite de detecção adequado, que seja capaz de atender os limites propostos pela legislação. Por este motivo, são utilizadas técnicas mais sensíveis, como espectrometria atômica e técnicas que utilizam plasma.

2.4.1 Espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor (CVG-AAS)

Na técnica de espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor, hidretos voláteis de elementos como, Sb, As, Bi, Pb, Sn, Se, Ge, Hg e Te, são formados a partir da reação química com ácidos diluídos e soluções redutoras como NaBH₄. A formação dos hidretos leva a conversão total do elemento da solução, assim é possível a introdução de 100% do analito no atomizador aumentando significativamente a sensibilidade da técnica.^{48, 49} As espécies voláteis são separadas da fase líquida, condensadas e carregadas até uma cela de quartzo aquecida por uma chama ou aquecimento eletrotérmico, que fica posicionada sobre o atomizador.

Como em todo o método analítico de determinação, há a influência de interferentes na etapa de determinação. Na geração química de vapor, as interferências são relacionadas a fase condensada, a fase gasosa e as interferências espectrais. Pode ocorrer na solução da amostra a presença de concomitantes geradores de hidretos, o que leva a formação incompleta do hidreto da espécie de interesse. Outro fator importante é o estado de oxidação em que o elemento se apresenta, podendo levar a formações lentas dos hidretos em estados de oxidação mais elevados e para garantir a formação total dos hidretos, etapas de pré-redução ou oxidação são necessárias.⁵⁰ É observado também que, em algumas soluções, ocorre a formação de espuma e precipitados que, juntamente com a quantidade e tipo de ácido utilizado inadequadamente no processo de redução, pode limitar a liberação dos hidretos. Interferências

espectrais são as menos encontradas na geração química de vapor, pois são contornadas, principalmente, pela separação efetiva dos analitos da matriz e pelos hidretos gerados absorverem apenas a radiação incidida sobre eles. ⁴⁸

2.4.2 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A determinação elementar por ICP-MS possui vantagens que superam as demais técnicas no sentido de limites de detecção, na faixa de ppt a ppb, e a possibilidade de determinação multielementar. Baseia-se na formação de espécies carregadas positivamente em um plasma de alta temperatura (aproximadamente 5500 °C) formado a partir da ionização de um gás inerte, como argônio. Após serem produzidos, os íons são transportados por diferença de pressão por cones metálicos com diâmetros muito pequenos, na faixa de 0,6 a 1,2 mm e direcionados para o separador de massas, constituído por barras magnéticas, no caso do quadrupolo por exemplo, onde são aplicadas campos elétricos e magnéticos em pulsos diferentes, ocorrendo a separação dos íons em função de sua m/z .^{51,52}

Por ser uma técnica de alta sensibilidade, há a tolerância em alguns aspectos como os níveis de sais e solventes que podem ser introduzidos no equipamento, pois podem ocorrer entupimentos, principalmente nos cones de amostragem. Outro problema causado por sais e solventes está relacionado com a formação e temperatura do plasma. Por exemplo, um excesso de sais a base de Na pode ocasionar a formação de um plasma de sódio devido a sua baixa energia de ionização, ocorrendo mais rapidamente que o Ar⁵⁴ Já o caso de um excesso de C em solução, acaba resfriando o plasma devido à alta energia necessária para a ionizá-lo, além de ocorrer a formação de espécies poliatômicas com o C de mesma m/z que o analito.^{53,54} Semelhante às espécies poliatômicas formadas, pode ocorrer interferências isobáricas, onde diferentes elementos podem ter isóbaros de mesma m/z , como por exemplo os isótopos ⁵⁸Ni e o ⁵⁸Fe.

A presença de ácidos concentrados, provoca sérias interferências na etapa de determinação pela alteração na viscosidade da solução e por sua capacidade corrosiva que pode causar danos sérios ao equipamento, sendo necessário uma etapa de diluição da amostra. O uso do padrão interno pode

contornar essas diferenças causadas na etapa de nebulização da amostra. Dessa forma, com um método de preparo de amostras eficiente, resultando baixos teores de RCC e RA as interferências nas etapas de determinação são minimizadas.

3 OBJETIVO

O objetivo principal do trabalho foi o desenvolvimento de um método de preparo de amostras para a decomposição de fármacos anti-hipertensivos utilizando decomposição assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído para a posterior determinação de As e Hg por CVG-AAS e Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Sr e V por ICP-MS.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- i) otimizar o método de decomposição assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído através do estudo da massa de amostra, concentração de ácido nítrico, volume de peróxido de hidrogênio, dentre outros;
- ii) avaliar a eficiência do método proposto através da determinação do teor de carbono residual e acidez nas soluções obtidas;
- iii) avaliar a exatidão do método proposto através do uso de materiais de referência certificados;
- iv) comparar o método desenvolvido com o método de decomposição assistida por radiação micro-ondas com ácido concentrado;
- v) comparar o método desenvolvido com o método recomendado pela Farmacopeia Brasileira (método III) baseados na decomposição em forno mufla.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

A decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado com ácido diluído foi realizada em forno de micro-ondas MultiwavePRO, marca Anton Paar, com rotor modelo 8NXQ80, equipado com oito frascos de quartzo com volume interno de 80 mL. O sistema possui sensores que permitem medir a temperatura e a pressão em tempo real, com temperatura e pressão máximas de trabalho limitadas em 280 °C e 80 bar, respectivamente. Este sistema também foi utilizado para decomposição das amostras por MW-AD com ácido concentrado.

Para a determinação de metais pesados através do Método III recomendado pela Farmacopeia Brasileira, foram utilizadas chapa de aquecimento (IKA, modelo C-MAG HS 7) com temperatura máxima de 250 °C e forno mufla (QUIMIS, modelo Q318).

As pesagens foram efetuadas em balança analítica digital com precisão de 0,00001 g, marca Mettler Toledo, modelo X5105, com capacidade máxima para 120 g.

Um titulador automático (Methrom, modelo Titrand 905) equipado com uma bureta de 20 mL (Dosino 800), agitador automático (801 Stirrer) e eletrodo de pH combinado para titulação em meio aquoso (LL Unitrode, modelo 6.0258.600) foram utilizados para a determinação da acidez residual das soluções finais obtidas após MW-AD com ácido diluído e ácido concentrado. Para determinação do teor de carbono orgânico total foi utilizado um analisador Multi N/C (AnalytikJena, modelo 2100S) com detector de infravermelho (Focus Radiation NDIR Detector®), equipado com auto amostrador (AS60).

A determinação de Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Sr e V foi feita por ICP-MS utilizando um equipamento modelo 7900 (Agilent Technologies), dotado de célula de colisão com gás hélio, câmara de nebulização tipo Scott de duplo passo e nebulizador concêntrico de vidro (MicroMist, Agilent).

Argônio com pureza de 99,996% (White Martins – Praxair) foi utilizado como gás principal, auxiliar e de nebulização. Para o ajuste das condições

experimentais do equipamento de ICP-MS foram monitoradas as m/z dos isótopos Li⁷, Y⁸⁹ e Tl²⁰⁵.

Para a determinação de As foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica AA-700 (Shimadzu) e Hg foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica AAnalyst 200 (Perkin Elmer) acoplado ao sistema FIAS 100 (Perkin Elmer). Para a determinação de As foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco operando a 193,7 nm e 12 mA. Para a determinação de Hg foi utilizada lâmpada de descarga sem eletrodo, operando em 253,7 nm e 200 mA.

4.2 Materiais e reagentes

Para o preparo de todas as soluções e amostras foi utilizada água purificada (com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C), em sistema Milli-Q® (Millipore).

Para a decomposição por MW-AD com ácido diluído e com ácido concentrado foram utilizados ácido nítrico 65% (m/m) (Merck), purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição em sistema sub-boiling (Berghof, modelo Distillacid BSB-939-IR). No método de MW-AD com ácido diluído também foi empregado peróxido de hidrogênio (Merck, 30%).

Para a avaliação da eficiência da decomposição através da determinação do teor de carbono orgânico total foram preparadas soluções de calibração na faixa de 0,5 a 500 mg L⁻¹ de C em água a partir de uma solução de hidrogenoftalato de potássio (Synth, 99,5%). Foram utilizadas como condições para a determinação do carbono orgânico total a temperatura do forno de 850 °C, para remoção do carbono inorgânico dissolvido foi purgado O₂ durante 3 min, 500 µL de amostra foram injetados e 10 min de integração de sinal.

A determinação de acidez residual foi realizada com uma solução de hidróxido de potássio (Vetec, 85%) 0,1 mol L⁻¹ previamente padronizada com biftalato de potássio (Synth, 99,5%) na mesma concentração.

Os reagentes tioacetamida (Vetec, 99%), ácido acético (Synth, 99,7%), hidróxido de amônio (Synth, 27%), glicerina (Alphatec, 99,5%), ácido sulfúrico (Merck, 95-97%), ácido clorídrico (Merck, 37%), ácido nítrico (Merck, 65%), acetato de amônio (Vetec, 98%) e hidróxido de sódio (Vetec, 99%), empregados na etapa de determinação de metais pesados por precipitação de sulfetos conforme recomendação da Farmacopeia Brasileira, foram de grau analítico.

4.3 Amostras e materiais de referência certificados

As amostras usadas nos experimentos foram princípios ativos adquiridos em farmácias de manipulação locais, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Cada uma delas foi identificada de acordo com as legendas mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Legendas para a identificação das amostras.

Fármaco	Legenda	Fórmula
Captopril	CAP	$C_9H_{15}NO_3S$
Cloridrato de propanolol	PROP	$C_{16}H_{21}NO_2.HCl$
Losartana potássica	LOS	$C_{22}H_{22}ClKN_6O$
Maleato de enalapril	ENA	$C_{20}H_{28}N_2O_5.C_4H_4O_4$

Para a avaliação da exatidão do método proposto foi utilizado material de referência certificado 1567a (wheat flour) da National Institute of Standards and Technology (NIST). Além disso, para avaliar a exatidão na etapa de determinação dos analitos por ICP-MS foi utilizado o CRM NIST 1643F (Trace elements in water).

4.4 Preparo das amostras

4.4.1 Decomposição assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído e com ácido concentrado

Para a decomposição das amostras por via úmida assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído, uma determinada massa de amostra (dependendo do fármaco) foi pesada e transferida para os frascos da decomposição. Em cada um dos frascos, foi adicionado 6 mL de HNO_3 3,75 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 e, logo após os frascos foram fechados, colocados no rotor e submetidos ao programa de aquecimento. O programa de aquecimento consistiu em 10 min de rampa até 1200 W, permanência por 20 min nesta potência e resfriamento a 0 W por 20 min. Ao final do programa de aquecimento, os frascos foram abertos e a solução transferida para frascos de polipropileno e aferidos a 25 mL com água destilada.

Para comparação dos resultados obtidos pelo método de preparo de amostra proposto, as amostras foram decompostas por MW-AD utilizando ácido concentrado. Para isso, a mesma massa de amostra utilizada no método de decomposição com ácido diluído foi pesada em papel de pesagem e transferida para os frascos de decomposição. Foi feita a adição de apenas 6 mL de HNO₃ aproximadamente 14 mol L⁻¹ sobre a amostra, os frascos foram fechados e colocados no rotor. O programa de aquecimento foi o mesmo utilizado para a decomposição com ácido diluído. Ao final do programa, os frascos foram abertos e a solução de cada um dos frascos de decomposição foi transferida para frascos de polipropileno e aferidas a 25 mL com água destilada.

4.4.2 Ensaio limite para metais pesados – Método III

O método recomendado pela Farmacopeia Brasileira foi realizado de acordo com a monografia de cada fármaco. Para todos eles, é recomendada a determinação de metais pesados através do Ensaio Limite para Metais Pesados após o preparo das amostras pelo Método III. Segundo recomendação das Farmacopeias, as amostras foram pesadas de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{2}{(1000l)}$$

Onde *l* é o limite permitido de metais pesados na amostra, em porcentagem (%).

Após pesadas, as amostras foram umedecidas com em torno de 3 a 4 gotas de H₂SO₄ concentrado com uma pipeta de Pasteur e, logo após, submetidas a incineração em baixa temperatura, em torno de 125 °C. Ao estarem totalmente carbonizadas, foram adicionados 2 mL de HNO₃ concentrado e 5 gotas de H₂SO₄ e submetidos novamente à aquecimento até vapores brancos desprenderem da amostra. Após os vapores desprenderem, as amostras foram submetidas a incineração em forno mufla em temperatura entre 500 e 600 °C.

Ao final da incineração, 4 mL de HCl concentrado foram adicionados aos cadinhos e esses foram submetidos ao aquecimento em banho-maria por 15 min com tampa. Passado o tempo, os cadinhos foram abertos e o ácido foi evaporado. O resíduo ao final da digestão foi, então, redissolvido com 1 gota de HCl concentrado e 10 mL de água quente e deixado em banho-maria por mais 2

min. A solução foi alcalinizada com NH_4OH , diluída a 25 mL com água ultra pura e o pH ajustado com CH_3COOH entre 3 e 4.

A determinação de As, Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pd, Pt, V, Ir, Os, Rh e Ru foi feita a partir da precipitação dos metais com tioacetamida para a formação dos respectivos sulfetos. Para o preparo da solução de tioacetamida, foram seguidas as normas da Farmacopeia Brasileira¹⁹, onde 4 gramas do sal foram pesados e solubilizados em 100 mL de água. Em 20 mL de glicerina, foram adicionados 0,2 mL da solução de tioacetamida preparada anteriormente e 1 mL de NaOH 1 mol L^{-1} e aquecido em banho-maria por 20 s.

Em cada uma das amostras decompostas e tratadas conforme mencionado anteriormente, foram adicionados 2 mL de solução tampão acetato de pH 3,5 e 1,2 mL da solução de tioacetamida em glicerina. Após um repouso por 2 min, a coloração da solução resultante foi comparada com a coloração desenvolvida por uma solução padrão de Pb de 10 mg L^{-1} a qual também passa pelo mesmo procedimento de precipitação com tioacetamida.

4.5 Avaliação da eficiência de decomposição

A avaliação da eficiência de decomposição para os métodos MW-AD com ácido diluído e com ácido concentrado foi feita a partir da determinação de RA e RCC nas amostras decompostas. Para a avaliação da RA as amostras foram tituladas em titulador automático com KOH 0,1 mol L^{-1} e expressas em percentual em relação ao conteúdo ácido inicial da decomposição. O teor de carbono restante na solução foi calculado considerando o teor de carbono orgânico total em solução, determinado nas amostras após decomposição, em relação ao teor de carbono orgânico total presente em cada amostra. O teor de C inicial de cada fármaco foi calculado a partir de sua fórmula molecular, indicada na respectiva monografia da Farmacopeia Brasileira, considerando que os princípios ativos são substâncias puras.

4.6 Determinação de contaminantes inorgânicos em fármacos por AAS e ICP-MS

A determinação de As e Hg foi realizada por espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor (CVG-AAS). Para As foi utilizada uma cela de quartzo, aquecida a 900 °C, NaBH_4 0,4% em NaOH 0,5% como agente

reductor e HCl 5 mol L⁻¹. Para a determinação de Hg a cela de quartzo foi aquecida a 100 °C e utilizados NaBH₄ 0,75% em NaOH 0,5% como agente reductor e HCl 1 mol L⁻¹. As curvas de calibração foram feitas com padrões monoelementares de 1 a 4 µg L⁻¹ para As e 1,5 a 20 µg L⁻¹ para Hg. As vazões dos reagentes e condições operacionais são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros instrumentais para a determinação de As e Hg utilizando o sistema FIAS.

Parâmetros FIAS	As	Hg
Comprimento de onda (nm)	193,7	253,7
Fluxo de NaBH ₄ (mL min ⁻¹)	2	3
Fluxo de HCl (mL min ⁻¹)	2	6,2
Fluxo de Ar (mL min ⁻¹)	70	50
Volume de amostra (µL)	500	500

A determinação de ¹⁰⁷Ag⁺, ¹³⁸Ba⁺, ²⁰⁹Bi⁺, ¹¹⁴Cd⁺, ⁵⁹Co⁺, ⁵³Cr⁺, ⁶³Cu⁺, ⁵⁵Mn⁺, ⁹⁸Mo⁺, ⁶⁰Ni⁺, ⁸⁸Sr⁺ e ⁵¹V⁺ foi realizada após otimizadas as condições operacionais do sistema automaticamente com uma solução Tunning, a qual monitora o sistema através das m/z de 7, 89 e 205, também foram monitoradas as taxas de formação de óxidos (m/z 156/140) e cargas duplas (m/z 70/140) nos modos sem gás de colisão (1,163 de formação de óxidos e 1,079% de carga dupla, respectivamente) e com gás de colisão (0,380 e 1,104%, respectivamente). O equipamento foi calibrado com soluções preparadas a partir de um padrão multielementar de concentrações de 0,1 a 10,0 µg L⁻¹. A tabela 4 mostra as condições operacionais otimizadas para as medidas por ICP-MS.

Tabela 4. Condições operacionais para determinação dos analitos por ICP-MS.

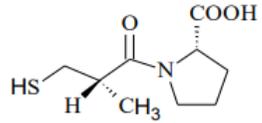
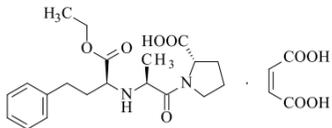
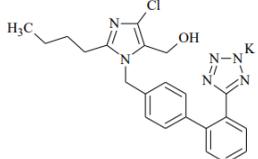
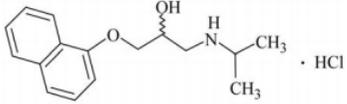
Parâmetros ICP-MS	
Potência do plasma (W)	1550
Vazão do gás principal (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,9
Vazão do gás nebulizador (L min ⁻¹)	1,03
Vazão de He (mL min ⁻¹)	4,3

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para o desenvolvimento deste trabalho foram escolhidos os fármacos anti-hipertensivos mais utilizados para o tratamento da hipertensão no Brasil.¹⁷. Foram utilizados os princípios ativos do Captopril, Cloridrato de propranolol, Maleato de enalapril, Hidroclorotiazida e Losartana potássica para os experimentos.

As otimizações do método de preparo de amostra proposto foram realizadas inicialmente com o fármaco Losartana, devido à complexidade de sua estrutura quando comparado aos demais fármacos. A Tabela 5 traz informações quanto a estrutura química, massa molar e porcentagem de carbono de cada uma das amostras estudadas neste trabalho.

Tabela 5. Informações sobre os fármacos anti-hipertensivos.

Fármaco	Fórmula	Massa molar, g mol ⁻¹	Estrutura	Teor de C, %	Solubilidade	Temperatura de Fusão, °C
Captopril	C ₉ H ₁₅ NO ₃ S	217,29		49,70	Facilmente solúvel em água e metanol. Solúvel em hidróxidos diluídos.	105 a 108
Maleato de enalapril	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₃ . C ₄ H ₄ O ₄	376,45		48,73	Ligeiramente solúvel em água, facilmente solúvel em metanol e hidróxidos diluídos.	143 a 145
Losartana potássica	C ₂₂ H ₂₂ ClKN ₆ O	461,01		57,27	Solúvel em água e álcool etílico	183,5 a 184,5
Cloridrato de propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂ .HCl	295,80		64,91	Solúvel em água e álcool etílico	163 a 166

As informações estruturais e massa molar foram obtidas da monografia descrita de cada fármaco na Farmacopeia Brasileira. O teor percentual de carbono presente em cada uma das amostras foi calculado a partir da fórmula molecular e da massa molar de cada fármaco, supondo que os princípios ativos são substâncias puras.

5.1 Ensaio limite para metais pesados após o preparo das amostras pelo Método III da Farmacopeia Brasileira

A determinação de metais pesados em fármacos é recomendada pela Farmacopeia Brasileira através da realização do Ensaio Limite para Metais Pesados que pode ser realizado por dois diferentes métodos, através da precipitação dos metais presentes na amostra em seus respectivos sulfetos ou por espectrometria atômica quando necessário utilizar métodos de decomposição utilizando micro-ondas. De acordo com a monografia de cada fármaco, um dos métodos deve ser escolhido para efetuar a determinação dos metais pesados. No fluxograma apresentado na Figura 2 são apresentados os

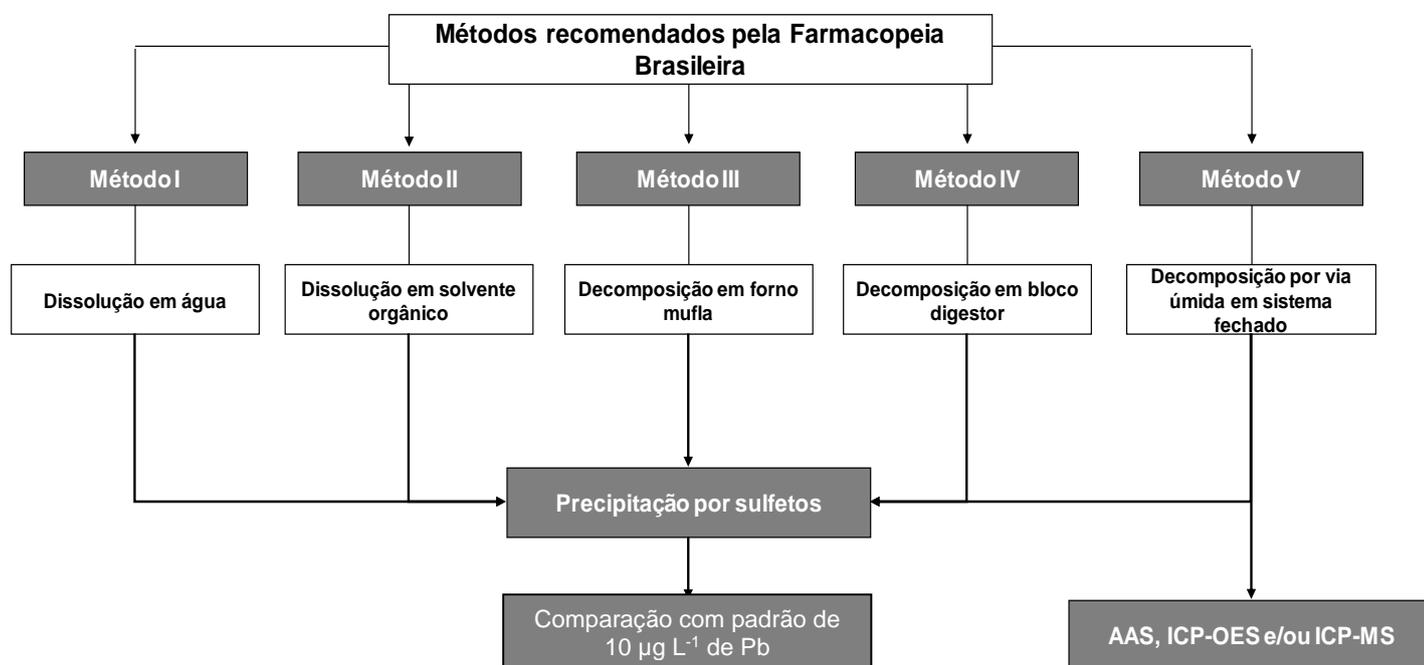


Figura 2. Fluxograma dos métodos de preparo de amostra recomendados pela Farmacopeia Brasileira.

métodos recomendados pela Farmacopeia Brasileira para a determinação de contaminantes inorgânicos em fármacos.

Para todos os fármacos utilizados neste trabalho, a Farmacopeia Brasileira recomenda a decomposição pelo método III. Para a decomposição das amostras dos fármacos estudados de acordo com o Método III, foram pesados em torno de 1 a 2 g de amostra, dependendo do limite de cada fármaco. Para CAP foram pesados 1 g, para ENA 2 g, LOS 2 g e PROP 1 g. Após a pesagem de cada fármaco cada um foi incinerado em chapa de aquecimento em baixa temperatura, por aproximadamente 3 h. Após a incineração, foram adicionadas 5 gotas de ácido sulfúrico e deixados em *overnight*. Alíquotas de 0,5 mL de HNO₃ foram adicionadas aos poucos nos carbonizados, até um volume total de 2 mL e submetidos à aquecimento a 125 °C, novamente, até que vapores brancos desprendessem, o que não foi observado mesmo depois de 2 h de aquecimento. Após, os cadinhos foram resfriados e submetidos à decomposição em mufla. A adição de HNO₃ nas amostras foi feita de maneira diferente do escrito o que pela Farmacopeia. Barin e colaboradores observaram que ao adicionar os 2 mL de HNO₃ aos fármacos, ocorre uma reação exotérmica levando a projeção da amostra, desta forma, o ácido foi adicionado em alíquotas de 0,5 mL. Ao ser colocada sob aquecimento, observaram o mesmo comportamento de projeção, por isso as amostras foram deixadas em *overnight*. Para evitar estes problemas, o procedimento foi desenvolvido de acordo com o trabalho de Barin.⁴⁰

Para a etapa da decomposição em forno mufla, os brancos foram submetidos a aquecimento, primeiramente a 125 °C e logo após a 300 °C a fim de evaporar inicialmente os ácidos concentrados e evitar a formação e liberação de vapores tóxicos durante a etapa de decomposição em mufla. As amostras foram então colocadas no forno mufla e deixadas até a completa carbonização, segundo o programa de aquecimento mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Programa de aquecimento do procedimento de decomposição em forno mufla.

Rampa, °C min⁻¹	Temperatura, °C	Tempo, min
15	300	60
20	600	180
-	50	-

Após a decomposição foi observado um resíduo branco nas amostras, dessa forma, elas foram deixadas por mais 40 min a 600 °C a fim de garantir a completa decomposição. Ao final desse tempo, não foi observada diferença no aspecto das amostras, sendo assim elas foram retiradas do forno mufla e submetidas às demais etapas do procedimento. As amostras foram resfriadas e nelas adicionados 4 mL de HCl 6 mol L⁻¹, após foram colocadas em banho-maria e digeridas com os frascos fechados por 15 min, as tampas foram retiradas e as soluções evaporadas. As amostras foram redissolvidas em 1 gota de HCl e 10 mL água destilada quente por 2 min e alcalinizadas com NH₄OH 6 mol L⁻¹ até pH de aproximadamente 3 a 4.

A determinação por precipitação por sulfeto é recomendada pela Farmacopeia para a determinação de As, Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pd, Pt, V, Ir, Os, Rh e Ru nas amostras através do ensaio limite para metais pesados. Para a formação dos precipitados de sulfeto, o pH das soluções foi ajustado em torno de 3 a 4 com fita de pH e a cada uma delas foi adicionado 2 mL de tampão de pH 4,0 e 1,2 mL de tioacetamida às quais foram deixadas em repouso durante 2 min até se desenvolver uma coloração. Após 2 min, não foi observado o desenvolvimento de coloração nas amostras. Este fato significa que a concentração de metais nas amostras é inferior a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, devido a coloração das amostras ser menos intensa que a coloração do padrão. O procedimento experimental realizado é mostrado na figura 3.

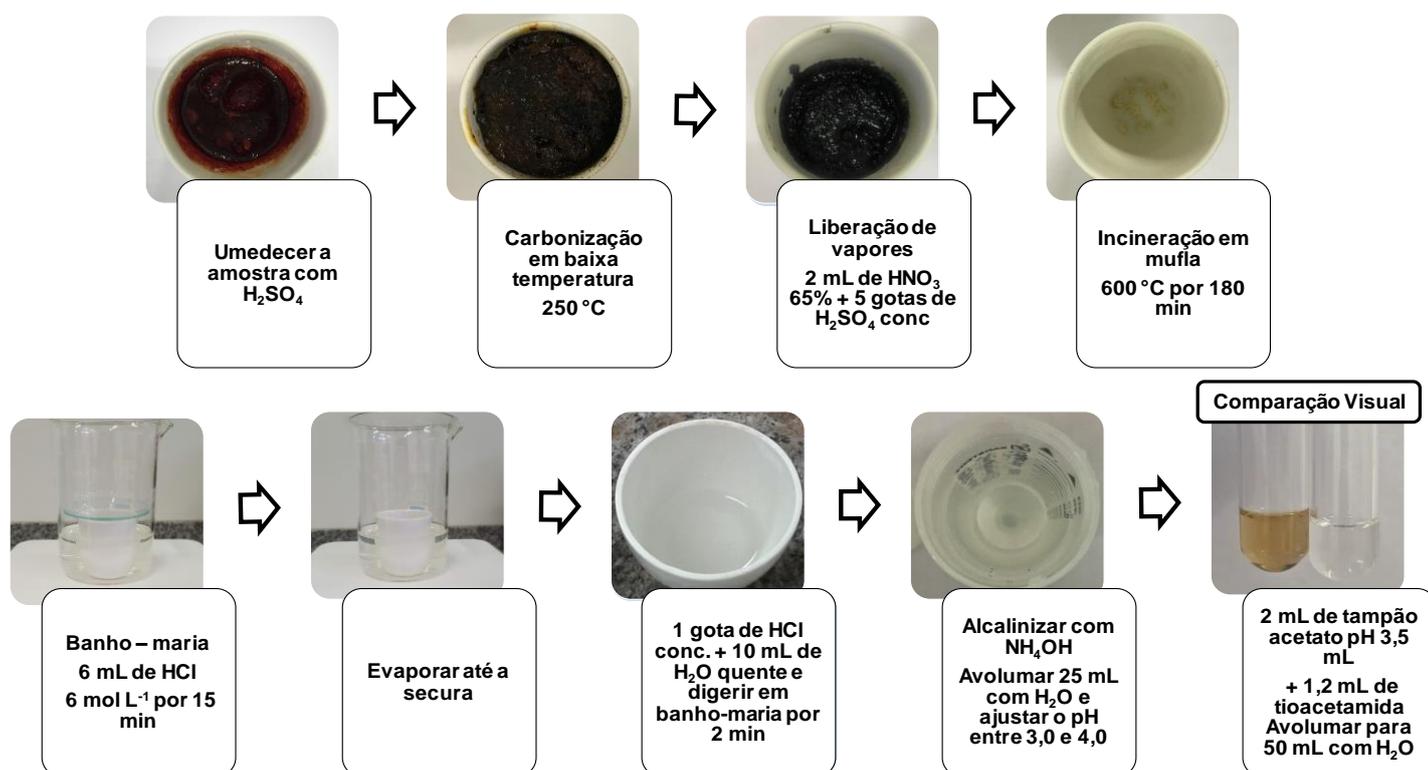


Figura 3. Preparo de amostras segundo o Método III da Farmacopéia Brasileira.

Por mais que o método indicado pela Farmacopeia Brasileira seja simples, de baixo custo e eficiente para a decomposição de anti-hipertensivos, como LOS, CAP, ENA e PROP sem a presença de resíduos sólidos e solução final límpida visualmente, possui desvantagens relacionadas as inúmeras etapas de

decomposição as quais utilizam chapa de aquecimento, banho-maria, forno mufla, os quais acarretam e um elevado tempo de decomposição, a utilização de reagentes concentrados em grandes quantidades, etapas de ajuste de pH anterior a precipitação, a qual fornece uma análise semi-quantitativa, onde não é possível identificar o elemento contaminante, nem a concentração na amostra. Além disso, as colorações dos precipitados de cada elemento são de tonalidades e intensidades diferentes da coloração obtida com a solução padrão de Pb, sem falar que muitos metais precipitam em concentrações muito maiores que $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Com base nas limitações encontradas tanto na etapa de preparo das amostras, como na etapa de determinação de metais pesados pelos métodos descritos na Farmacopeia Brasileira, torna-se evidente a necessidade de desenvolver novos métodos de preparo de amostras para fármacos visando a posterior determinação de contaminantes inorgânicos. Cabe destacar que nos últimos anos poucos trabalhos foram feitos na literatura com relação a este tema.

5.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído

O método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas utilizando ácido diluído necessita de O_2 como reagente auxiliar, sendo este responsável pela regeneração do HNO_3 utilizado. Dessa forma, foi utilizado H_2O_2 como fonte de oxigênio, um reagente de fácil acesso, baixo custo e facilmente encontrado em alta pureza. O sistema de decomposição fechado e a alta pressão é um dos principais responsáveis pela regeneração do ácido e consequente decomposição dos fármacos.

Por ser um método eficiente para a decomposição de diversas matrizes, a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído é estudada como uma alternativa viável para a decomposição e posterior determinação de metais pesados em fármacos. Este método possui diversas vantagens frente à decomposição com ácidos concentrados, como menores valores de branco, possibilidade de eliminação da etapa de diluição das amostras facilitando a determinação de metais em baixas concentrações já que os limites de detecção são, conseqüentemente, menores. Além disso, quando comparado ao Método III recomendado pela Farmacopeia Brasileira, possui as

vantagens de a decomposição ser feita em sistema fechado, o que diminui os riscos de perda dos elementos por volatilização e contaminação, e além disso, a pressão no interior do frasco faz com que o ponto de ebulição do ácido aumente e com isso a decomposição seja mais eficiente. Além desses aspectos, cabe ressaltar o uso de menores volumes de reagentes, principalmente concentrados, o tempo total do preparo das amostras e a geração de resíduos ser significativamente inferior.

Para que este método seja usado, foi necessária uma otimização de parâmetros como massa de amostra, concentração do ácido nítrico, volume de H₂O₂ e programa de aquecimento. Ao final, a eficiência da decomposição para cada um dos fármacos estudados foi avaliada através das determinações de RCC e RA.

Para as otimizações do método proposto foi utilizado o fármaco LOS o qual possui a estrutura mais complexa entre os fármacos estudados. Os parâmetros otimizados e os resultados obtidos estão descritos a seguir.

5.2.1. Avaliação da massa de amostra

A otimização da massa de amostra foi feita com o fármaco LOS, usando massas de 100, 250 e 300 mg com HNO₃ 14 mol L⁻¹. Inicialmente foi utilizado o programa de aquecimento adaptado de Müller⁴¹, com 10 min de rampa até 1200 W e permanência de 30 min nesta potência e 20 min de resfriamento. Os limites de temperatura e pressão foram ajustados em 280 °C e 80 bar, respectivamente.

Ao final da decomposição foi possível observar visualmente que utilizando 300 mg de LOS a decomposição não foi completa (resíduos sólidos da amostra permaneciam no frasco de decomposição). Por outro lado, as soluções obtidas com a decomposição de 100 e 250 mg de amostra, apresentaram aspecto límpido e desta forma, 250 mg de amostra foi adotada para ensaios seguintes. Em seguida, foi feita a determinação do RCC nas soluções e os resultados obtidos nas soluções após a decomposição de 100 e 250 mg foram de 14,22 ± 0,41% e 10,59 ± 1,51%, respectivamente. Como pode ser observado, quando houve um aumento na massa de amostra, o teor de carbono residual foi menor, o que não é esperado. Este comportamento pode estar associado ao fato de com o aumento da massa de amostra a pressão gerada no interior do frasco é

atingida mais rapidamente e conseqüentemente o aumento na temperatura de decomposição acaba sendo maior.

O teor de RA para a massa de 100 mg foi de $7,04 \pm 0,18\%$ e para a massa de 250 mg foi de $4,88 \pm 0,16\%$ mostrando que, conforme esperado, a decomposição de uma massa maior do fármaco consumiu uma quantidade maior de ácido e mesmo assim, a decomposição foi eficiente para 250 mg de amostra. Desta forma, considerando os baixos valores de RCC e RA em solução nos digeridos, a decomposição de até 250 mg de LOS foi considerada efetiva e esta condição foi adotada para os ensaios subsequentes.

5.2.1.2 Avaliação da concentração do ácido nítrico

Utilizando 250 mg de LOS, a concentração de ácido nítrico foi avaliada de maneira aleatória nas concentrações de 14, 10,5, 7,5, 5,25, 3,75 e 2,25 mol L⁻¹, juntamente com a adição de 2 mL de H₂O₂. Cabe destacar que o programa de aquecimento utilizado foi o mesmo mencionado anteriormente. Após a decomposição das amostras foi feita a determinação de RCC e RA nos digeridos. A figura 4 mostra a relação entre a concentração do ácido nítrico e a eficiência de decomposição através dos valores de RCC e RA nas soluções obtidas após a decomposição de 250 mg de LOS.

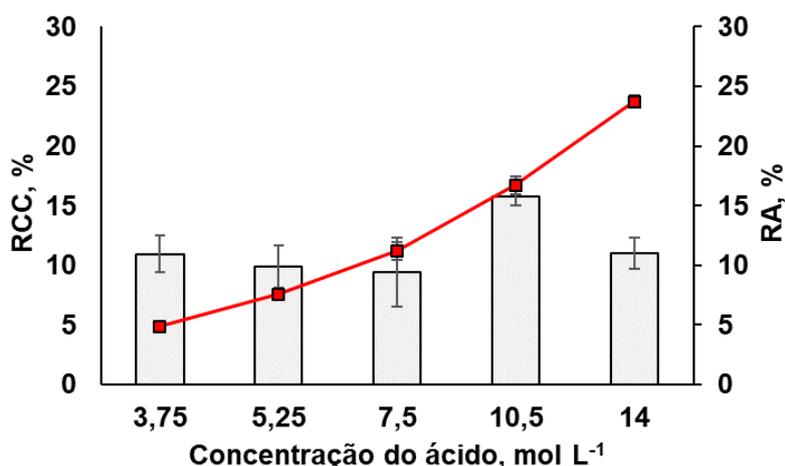


Figura 4. Avaliação da concentração do ácido nítrico para a decomposição da LOS. Decomposição feita com 250 mg de amostra e 2 mL de H₂O₂. As barras correspondem aos valores de RCC e a linha aos valores de RA.

No gráfico não foi mostrado os resultados obtidos para o HNO_3 2,25 mol L^{-1} devido a amostra não ter sido decomposta eficientemente, restando resíduos sólidos. Utilizando as outras concentrações de ácido nítrico, soluções finais com aspecto límpido foram obtidas. Com o uso de HNO_3 14, 10,5, 7,5, 5,25 e 3,75 mol L^{-1} os valores de RCC após a decomposição de 250 mg de LOS foram de $11,01 \pm 1,27\%$, $15,76 \pm 0,77\%$, $9,41 \pm 2,92\%$, $9,91 \pm 1,77\%$ e $10,96 \pm 1,51\%$, respectivamente. Além disso, foi observado que com o aumento crescente na concentração de ácido nítrico, os teores de RCC não foram diminuídos de forma significativa, indicando que concentrações inferiores do ácido são suficientes para promover a completa decomposição da amostra. Os valores de RCC obtidos em solução, mesmo com o uso de HNO_3 3,75 mol L^{-1} , podem ser considerados baixos e já indica que o método proposto possui potencial de ser empregado para a decomposição de matrizes complexas, como os fármacos, por exemplo.

A partir dos dados da determinação de acidez residual foi observado que a solução que apresentou o menor teor de ácido restante, foi a de 3,75 mol L^{-1} HNO_3 obtendo $4,88 \pm 0,15\%$ de ácido em solução quando comparada as demais soluções avaliadas. Desta forma, é possível inferir que neste caso a maior parte do ácido foi consumido na etapa de decomposição das amostras e apesar do ácido estar mais diluído, este foi regenerado, garantindo a decomposição eficiente mesmo com uso de menores concentrações de ácido.

Com base no que foi observado, o uso de ácido nítrico 3,75 mol L^{-1} foi considerado adequado para a decomposição de 250 mg de LOS e portanto, foi utilizado para os estudos seguintes.

Cabe destacar que a concentração adicionada inicialmente aos fármacos para a decomposição foram 6 mL de HNO_3 3,75 mol L^{-1} . Porém, ao adicionar 2 mL de H_2O_2 , o ácido previamente adicionado é diluído na solução de decomposição, resultando em uma concentração final em solução no frasco de 2,81 mol L^{-1} . Ao final da decomposição, os frascos foram aferidos, resultando em uma concentração ácida final na solução de 0,9 mol L^{-1} .

5.2.1.3 Avaliação do volume de H_2O_2

A utilização de H_2O_2 no método de decomposição com ácido diluído é de extrema importância, justamente por ser fonte de O_2 na fase gasosa no interior do frasco de decomposição, o qual é responsável pela regeneração do HNO_3 em solução. A avaliação da presença de H_2O_2 na decomposição foi feita variando o volume deste reagente a ser adicionado. O resultado foi feito inicialmente de forma visual, onde a solução que apresentasse resíduos em solução seria descartada. Dessa forma, foram avaliados os volumes de 1 e 2 mL de H_2O_2 para decomposição de 250 mg de LOS, juntamente com HNO_3 $3,75 \text{ mol L}^{-1}$, além do procedimento sem adição de peróxido de hidrogênio. Quando não foi utilizado o peróxido de hidrogênio e usando 1 mL, foi feita a adição de água para que o volume final da solução de decomposição fosse de 8 mL, o mesmo volume utilizado em todos os experimentos. O programa de aquecimento utilizado foi mantido com uso de 10 min de rampa até 1200 W e permanência de 30 min nesta potência. Após as decomposições foi observado que quando o H_2O_2 não foi adicionado, as amostras não foram decompostas, restando resíduos sólidos. O mesmo comportamento foi observado quando 1 mL de H_2O_2 foi usado nas decomposições, de maneira menos pronunciada, mas mesmo assim com presença de resíduos sólidos. A única solução que se mostrou adequada, sem resíduos sólidos e com o aspecto límpida, foi a solução obtida após a decomposição de 250 mg de LOS com 2 mL de H_2O_2 a qual apresentou RCC de $10,96 \pm 1,51\%$ e RA de $4,88 \pm 0,16\%$. A figura 5 mostra o aspecto visual das soluções obtidas após a decomposição de 250 mg de LOS com HNO_3 $3,75 \text{ mol L}^{-1}$ e com diferentes volumes de H_2O_2 .

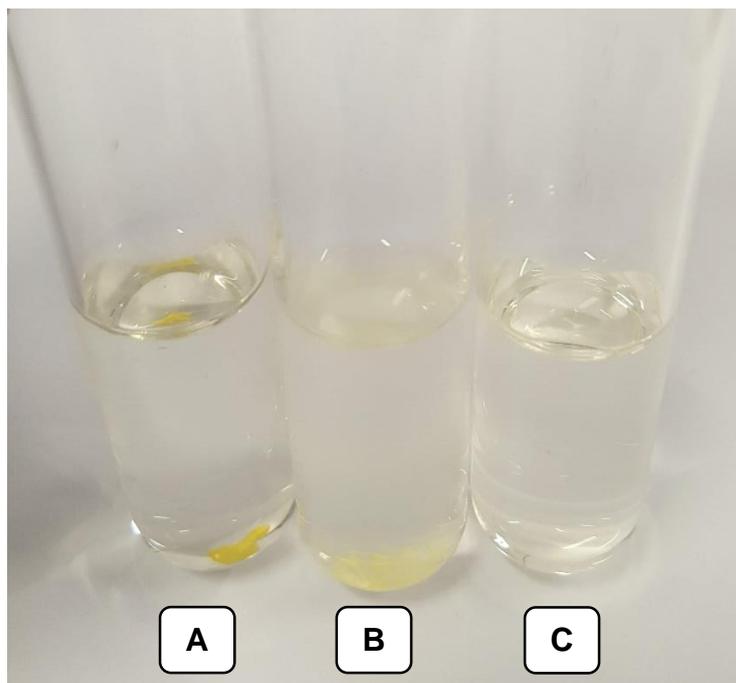
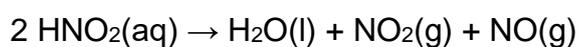
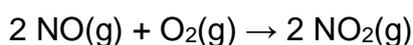


Figura 5. Aspecto visual das soluções obtidas com diferentes volumes de H₂O₂:
 A) sem adição de H₂O₂, B) adição de 1 mL de H₂O₂ e C) adição de 2 mL de H₂O₂.

A presença de H₂O₂ na solução de decomposição é extremamente importante principalmente por ser responsável pela regeneração do ácido nítrico, sendo fonte de O₂ no meio. Porém, além de ter a função de regenerar o ácido nítrico durante a decomposição, o alto poder oxidante do H₂O₂ é de extrema importância, como é observado nos experimentos, onde na ausência ou em baixa concentração de peróxido, as amostras não são decompostas eficientemente.⁵⁵

Na etapa de regeneração, o O₂ disponível é oriundo da decomposição do H₂O₂, onde seus principais produtos de decomposição são o O₂ e H₂O.³⁰ A reação de regeneração do HNO₃ na presença de O₂ é apresentada abaixo:



Com base nos resultados obtidos, todos os demais ensaios foram feitos utilizando 2 mL de H₂O₂ para decomposição das amostras juntamente com o HNO₃ 3,75 mol L⁻¹.

5.2.1.4 Avaliação do programa de aquecimento

O programa de aquecimento utilizado para a otimização de todos os parâmetros (massa de amostra, concentração de ácido nítrico e volume de H₂O₂) foi o programa 1 mostrado na tabela 5. Esse programa foi utilizado como referência a partir do trabalho realizado por Müller *et al.*⁴¹ Com base nele, foi variado o tempo de permanência de irradiação de forma a obter um procedimento de decomposição mais rápido. Desta forma, os outros programas de aquecimento foram avaliados utilizando 10 e 20 min de permanência a 1200 W (programas 2 e 3 da tabela 7).

Tabela 7. Programas de aquecimento avaliados para a decomposição dos fármacos.

Programa	Potência, W	Rampa, min	Permanência, min	Resfriamento, min
1	1200	10	30	20
2	1200	10	20	20
3	1200	10	10	20

As soluções resultantes da variação do programa de aquecimento foram avaliadas, inicialmente, de maneira visual. Apenas a solução obtida após a decomposição pelo programa 3 apresentou resíduos, indicando que o tempo de aquecimento adotado não foi suficiente para garantir a completa decomposição da amostra. Dessa forma, por demandar menor tempo para uma decomposição eficiente, foi escolhido o programa 2 utilizando 20 min de aquecimento. Neste caso, o teor de RCC na solução obtida após 20 min de aquecimento a 1200 W foi de 10,59 ± 1,51%, o que é considerado um baixo teor de RCC, indicando a elevada eficiência do método. A figura 6 mostra o perfil do programa de aquecimento obtido por MW-AD com ácido diluído após a decomposição de 250 mg de LOS, conforme parâmetros mencionados anteriormente.

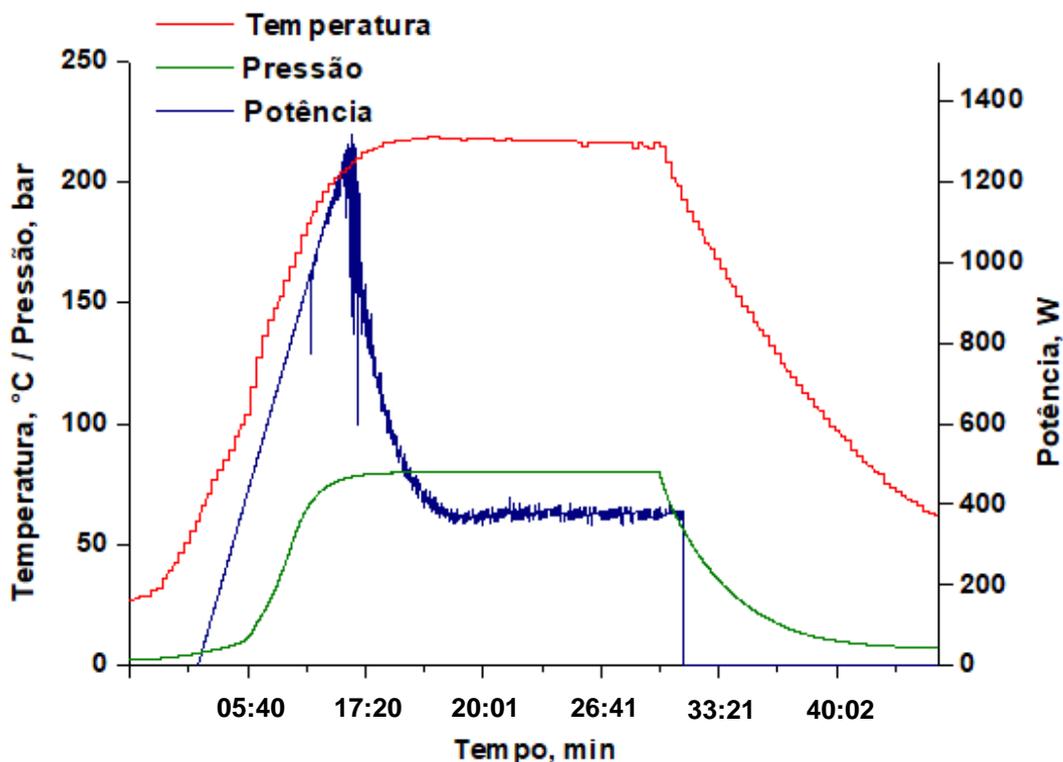


Figura 6. Perfil do programa de aquecimento em função da temperatura (vermelho), pressão (verde) e potência (azul).

Como pode-se observar na Figura 6, em aproximadamente 9 min a potência irradiada atinge um máximo de 1293 W e decai, não mantendo a potência em 1200 W. Durante o período de permanência a potência aplicada diminui ainda mais, estabilizando entre 350 e 400 W, aproximadamente. Dessa forma, não há a necessidade de aplicação de uma potência tão alta, podendo ser aplicada uma potência de 900 W, sem alterar a eficiência de decomposição. Desta forma, a potência foi alterada para 900 W, conforme recomendação do fabricante para uso de 4 frascos e o programa de aquecimento final otimizado foi de i) 10 min de rampa a 900 W, ii) 20 min de permanência e iii) 0 W por 20 min (resfriamento).

Com o programa de aquecimento otimizado, a pressão máxima (80 bar) para a decomposição de 250 mg do fármaco LOS foi atingida em aproximadamente 16 minutos, ou seja, nos 6 primeiros minutos da etapa de permanência, atingindo a temperatura de 221 °C a qual variou nesta faixa de temperatura até a etapa de resfriamento.

Com base nos estudos mostrados, as melhores condições de decomposição para 250 mg de LOS utilizando o método proposto foram obtidas

com o uso de HNO_3 $3,75 \text{ mol L}^{-1}$, 2 mL de H_2O_2 e programa de aquecimento mencionado anteriormente. Após, a aplicabilidade do método desenvolvido foi avaliada para os outros fármacos selecionados.

5.2.2 Avaliação da eficiência do método MW-AD com ácido diluído para outros fármacos

A partir das otimizações do procedimento de preparo de amostra por MW-AD com ácido diluído, já otimizados com o fármaco LOS, as massas dos demais fármacos utilizados no trabalho foram avaliadas. Este estudo foi feito para verificar se as outras amostras apresentavam comportamento similar, tendo em vista que todos possuem estruturas químicas diferentes. Desta forma, os estudos foram iniciados a partir de 250 mg de cada amostra e foi feito o aumento gradativo de massa de amostra, a cada 50 mg, de forma a obter um método eficiente para decompor a maior massa de amostra possível. Este fato é importante quando se trata da posterior avaliação de contaminantes presentes em baixas concentrações.

A cada decomposição foi feita a observação do perfil do programa de aquecimento de forma a monitorar as temperaturas atingidas e o aumento de pressão, de forma a garantir a segurança do operador. As decomposições foram feitas aumentando a massa de amostra até o limite máximo onde fosse possível observar a presença de resíduos sólidos no frasco, demonstrando decomposição não eficiente. A avaliação da eficiência de decomposição foi feita a partir dos teores de RCC e RA. Os resultados obtidos para as amostras estão discutidos a seguir.

Os resultados obtidos para o fármaco CAP estão mostrados na figura 7.

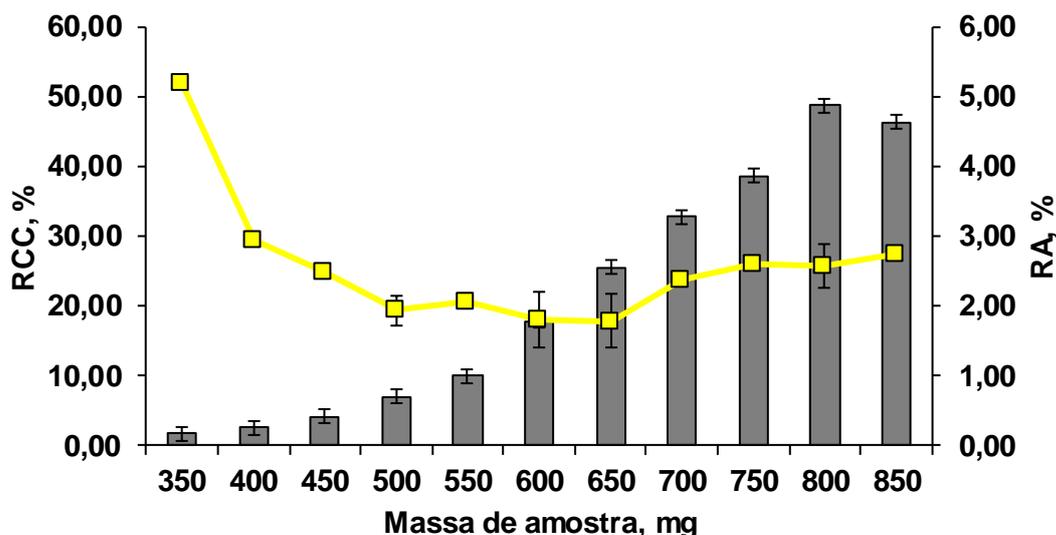


Figura 7. Avaliação da eficiência de decomposição para o fármaco Captopril em função da massa de amostra. Onde as barras correspondem aos valores de RCC e a linha aos valores de RA.

Pelos dados obtidos apenas efetuando a avaliação visual foi possível decompor até 850 mg de CAP sem haver resíduos sólidos na solução final, sendo esta condição considerada inicialmente adequada. No entanto, após a determinação do RCC nas soluções resultantes foi observado (figura 10) um teor de RCC bastante elevado, de $46,30 \pm 1,46\%$ e acidez residual de $2,75 \pm 0,09\%$ quando 850 mg de amostra foram decompostas, destacando a necessidade de um maior volume de ácido. Um teor de aproximadamente 46% de carbono, o que corresponde a aproximadamente $195,6 \text{ mg L}^{-1}$ de C em solução é considerado um valor alto supondo que quase 50% da amostra não é decomposta. Como mostrado por Barela¹⁵ interferências na etapa de determinação de metais por ICP-MS por influência de C começam a surgir em concentrações a partir de 150 mg L^{-1} para a determinação de Cr, por exemplo, onde pode ocorrer interferências devido a formação do íon poliatômico $^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}$ que coincide com a massa do ^{52}Cr . Além da possibilidade de formação de poliatômico, a presença de uma grande quantidade de C, pode causar um resfriamento no plasma, devido a sua alta energia de ionização e por esse motivo, não ter temperatura suficiente para ionizar os demais íons.⁵⁶

Sendo assim, a massa de amostra foi reduzida para 700 mg (o que corresponde a um RCC de $32,76 \pm 0,49\%$ e $113,88 \pm 1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de C em solução) minimizando interferências na etapa de determinação dos analitos.

O estudo da interferência por parte de elevadas concentrações de C em solução, está concordante com o que foi observado por Müller *et. al*⁴², onde foi feita a avaliação de interferências com concentrações crescentes de C, entre 125 e 2000 mg L^{-1} . Recuperações maiores que 130% foram obtidas para ^{52}Cr a partir de 500 mg L^{-1} de C, causada principalmente pela formação do poliatômico $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ e maiores que 109% para ^{53}Cr e ^{60}Ni em concentrações a partir de 2000 mg L^{-1} , assegurando dessa forma que a determinação dos analitos foi considerada livre de interferências usando soluções com até 250 mg L^{-1} de C.

Para o ENA (figura 8) resíduos sólidos foram observados quando massas de amostra superiores a 450 mg foram usadas.

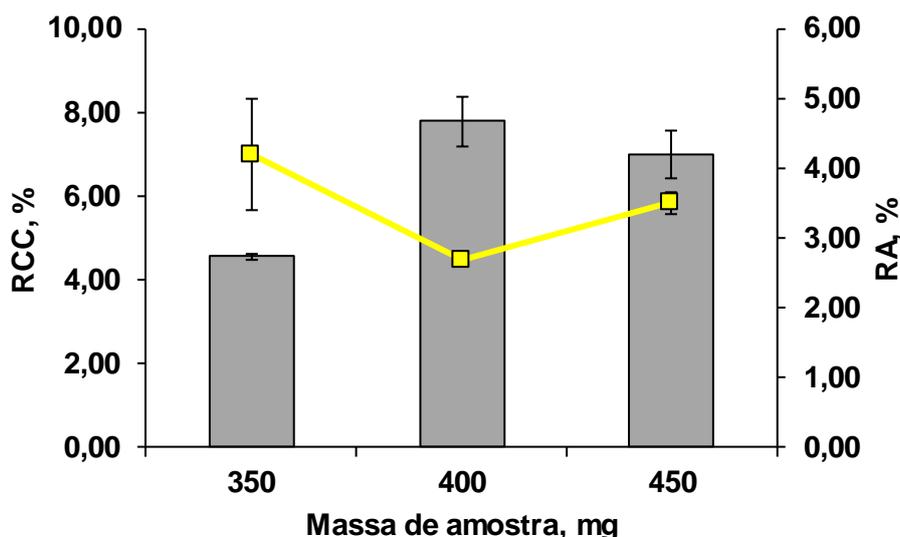


Figura 8. Avaliação da eficiência de decomposição para o fármaco Enalapril em função da massa de amostra. Onde as barras correspondem aos valores de RCC e a linha aos valores de RA.

Quando comparados os resultados de RCC e RA entre as massas de 400 e 450 mg onde não foi observada uma diferença significativa entre os valores (teste t, $p < 0,05$). Dessa forma, a massa utilizada nos experimentos foi a de 450 mg a qual apresentou RCC de $7,00 \pm 0,56\%$ e $3,5 \pm 0,16\%$ de RA..

A avaliação de massa para o fármaco PROP iniciou como os demais fármacos com 350 mg de amostra e variando a cada 50 mg. Assim, foi avaliado o RCC e RA após a decomposição de 350 e 400 mg, onde a partir de 450 mg foi observado resíduos sólidos após a decomposição.

Uma diminuição no valor de RA é observada com o aumento da massa, como é o esperado devido ao maior consumo de ácido para a decomposição de uma maior massa de amostra. O teor de RCC também tem o comportamento esperado, pois para uma maior massa de amostra, um maior teor de carbono é esperado. Obteve-se RCC de $22,62 \pm 0,35\%$ e RA $2,47 \pm 0,04\%$ quando utilizada a massa de 400 mg de PROP e $14,63 \pm 0,86\%$ de RCC e $4,29 \pm 0,12\%$ de RA para 300 mg, onde ambas as soluções são límpidas ao final da decomposição. Dessa forma, a fim de utilizar uma maior massa de amostra, foi utilizada a massa de 400 mg para o fármaco PROP.

Com a otimização do método e a avaliação da eficiência de decomposição dos diferentes fármacos, foi possível verificar a importância do desenvolvimento do método proposto em função de cada tipo de amostra, já que foram obtidas diferentes condições de massa máxima de amostra que puderam ser decompostas, a qual depende principalmente da estrutura de cada fármaco.

Com os resultados obtidos nas decomposições das amostras de fármacos anti-hipertensivos, foi possível a decomposição por MW-AD de até 700 mg utilizando ácido diluído. Obtendo teores de RCC na mesma faixa que os demais trabalhos mostrados na literatura, sem observar interferências por parte de C na etapa de determinação por ICP-MS.⁴¹ Como é comprovado no trabalho desenvolvido por Müller *et. al.* para a decomposição de 500 mg de plantas medicinais com teores de carbono residual menores que 320 mg L^{-1} não causaram interferências na determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS.⁴¹ O mesmo relato foi feito por Barela para a decomposição de biodiesel usando alta massa de amostra, em torno de 700 mg com HNO_3 7 mol L^{-1} e 2 mL de H_2O_2 onde foi observado a interferência de carbono para a determinação de Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V e Zn a partir de 150 mg L^{-1} de C em solução.¹⁵

De acordo com Araújo⁴³ em seu trabalho avaliando o efeito da concentração de ácido nítrico para a decomposição de plantas, o qual obteve um teor de carbono residual variando entre 7 e 11%, não foram observadas interferências nas determinações por ICP-OES para Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn,

P e Zn. Outros trabalhos relatados na literatura que utilizam ácido nítrico diluído com a utilização de H₂O₂ como reagente auxiliar para a decomposição de arroz⁵⁷, materiais biológicos⁵⁸, soja e derivados⁵⁹ e biodiesel¹⁵ também, não observaram interferências na etapa de determinação para a decomposição de diversas matrizes, possibilitando a decomposição de variadas massas de amostra, enfatizando a aplicabilidade do método. Como pode ser visto a partir dos resultados obtidos foi possível efetuar a decomposição de diferentes fármacos, com diferentes estruturas químicas, utilizando ácido nítrico 3,75 mol L⁻¹ e pequenos volumes de H₂O₂ (2 mL). Foi possível decompor massas relativamente elevadas de amostra, resultando em teores de carbono residual e acidez compatíveis com técnica de ICP-MS.

5.3 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas com ácido concentrado

A decomposição assistida por radiação micro-ondas e ácido concentrado é um método bem consolidado para a decomposição de matrizes orgânicas e inorgânicas. Para a decomposição de matrizes orgânicas é utilizado geralmente HNO₃, um ácido com alto poder oxidante. Aliado ao sistema fechado no qual há um aumento na temperatura e pressão do sistema a eficiência de decomposição é maior.³⁰

Como método comparativo ao proposto no trabalho, foi feita a decomposição dos fármacos estudados com ácido concentrado utilizando as condições otimizadas do método MW-AD com ácido diluído.

Para todos os fármacos, as soluções de decomposição com ácido concentrado mostraram um aspecto límpido, sem resíduos sólidos. Para a decomposição de 250 mg de LOS foram obtidos teores de RCC e RA de 8,16 ± 3,47% e 19,10 ± 0,32%, respectivamente. CAP é o fármaco com a maior massa de amostra decomposta, 700 mg, obtendo teores de RCC de 0,07 ± 0,04% e RA de 12,88 ± 0,12%. A decomposição de 450 mg de ENA resultou em valores de RCC de 10,53 ± 0,45% e RA de 17,12 ± 0,09%.

Teores de 20,41 ± 0,61% de RCC e 16,68 ± 0,31% de RA foram obtidos para a decomposição de 400 mg de PROP. Mesmo utilizando HNO₃ concentrado, PROP é o fármaco estudado com maiores teores de RCC. O mesmo comportamento foi observado por Müller *et al*⁴² para a decomposição de

500 mg do fármaco, obtendo teor de RCC de 32,1%. Eles justificam o maior teor de RCC com estrutura química do fármaco, a qual possui apenas um grupamento –OR ligado ao anel condensado, considerado um grupo de ativação moderado, o que confere ao PROP maior resistência química quando comparado aos demais fármacos estudados.

5.4 Determinação de contaminantes inorgânicos em fármacos

A determinação de contaminantes inorgânicos em fármacos foi realizada após as otimizações no método de decomposição e determinados por técnicas espectrométricas de absorção atômica e de massa. Para a determinação de Hg e As foi utilizada a técnica de CV-AAS e HG-AAS, respectivamente. Já a determinação de As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Sr e V foram feitas por ICP-MS.

Na tabela 8, são apresentados os valores obtidos para a determinação de Hg e As em fármacos anti-hipertensivos, foi possível observar que os valores encontrados estão abaixo do limite de quantificação. O limite de quantificação foi calculado considerando a recomendação da IUPAC, onde $LQ = 10s + \text{média dos brancos}$, onde s é o desvio padrão obtido após 10 leituras do branco

Tabela 8. Resultados obtidos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a determinação de Hg e As por AAS (n=4).

Amostra	Hg	As
CAP	< 0,287	< 0,013
ENA	< 0,540	< 0,024
LOS	< 0,974	< 0,044
PROP	< 0,606	< 0,027

Como foi possível observar, os resultados para a determinação de Hg e As nos fármacos foi abaixo dos limites de quantificação obtidos para os métodos.

Para a determinação por ICP-MS os isótopos monitorados foram: $^{107}\text{Ag}^+$, $^{138}\text{Ba}^+$, $^{209}\text{Bi}^+$, $^{114}\text{Cd}^+$, $^{59}\text{Co}^+$, $^{53}\text{Cr}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{55}\text{Mn}^+$, $^{98}\text{Mo}^+$, $^{60}\text{Ni}^+$, $^{88}\text{Sr}^+$ e $^{51}\text{V}^+$. Estes foram escolhidos de forma a minimizar interferências poliatômicas e isobáricas e apresentar elevada sensibilidade. Foi utilizado Rh como padrão interno e este foi adicionado à amostra por meio de um sistema por injeção em fluxo na

concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. A determinação foi feita em dois modos, sem gás de colisão e com gás de colisão e forma a contornar possíveis interferências poliatômicas causadas pelo excesso de Cl nas amostras, tendo em vista que várias amostras utilizadas neste trabalho são cloridratos.

Foi observado durante a determinação que, sem a utilização do gás de colisão houve interferência, principalmente na determinação de V e Cr, os quais obtiveram diferenças significativas. Essas diferenças foram observadas principalmente nos fármacos LOS e PROP os quais possuem Cl em sua composição (amostras são cloridratos), o que justifica o aumento na concentração devido à interferência de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ para ^{75}V que é monoisotópico e para o ^{53}Cr interferência por $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$.⁶⁰

Utilizando Rh como padrão interno e cela de colisão com He, os resultados para as amostras decompostas por MW-AD com ácido concentrado e ácido diluído são mostrados na tabela 9.

Tabela 9. Resultados obtidos, em ng g⁻¹, após MW-AD com ácido concentrado e diluído e determinação por ICP-MS (n = 4).

Elemento	Ácido diluído				Ácido concentrado			
	LOS	CAP	ENA	PROP	LOS	CAP	ENA	PROP
Ag	< 562	< 201	< 312	< 351	< 187	< 66,8	< 104	< 117
Ba	< 57,6	< 20,6	< 32,0	< 36,0	< 39,6	< 14,1	< 22,0	< 24,7
Bi	< 0,300	21,4 ± 0,9	< 0,167	< 0,187	< 1,57	21,3 ± 1,1	< 0,872	< 0,981
Cd	< 1,17	1,06 ± 0,2	< 0,650	< 0,731	< 2,88	< 1,03	< 1,60	< 1,80
Co	103 ± 5	< 0,79	< 1,23	< 1,39	102 ± 13	< 1,77	< 2,76	< 3,10
Cr	36 ± 0,8	161 ± 4	73 ± 20,1	71 ± 0,3	< 55,8	163 ± 6	59,1 ± 4,8	37,8 ± 2,1
Cu	< 77,9	< 8,04	< 43,3	< 48,7	< 114	< 40,5	< 63,1	< 71,0
Mn	< 89,1	< 27,8	< 49,5	< 55,7	< 136	< 48,6	< 75,7	< 85,1
Mo	< 70,1	174 ± 6	< 38,9	< 43,8	< 214	180 ± 10	< 119	< 134
Ni	125 ± 5	15,9 ± 2,3	15,2 ± 2,1	22,4 ± 2,7	113 ± 7	11,9 ± 1,4	13,2 ± 1,7	18,9 ± 2,6
Sr	< 43,6	< 15,6	< 24,2	< 27,3	< 210	< 75	< 117	< 131
V	18,8 ± 1,3	< 2,10	< 3,27	< 3,67	14,8 ± 2,1	< 1,44	< 2,24	< 2,52

Comparando os valores obtidos para a determinação dos contaminantes inorgânicos por MW-AD com ácido diluído e concentrado, para os elementos com valores maiores que os LQs, não há diferença significativa entre os resultados (teste t, $p < 0,05$), exceto para a determinação de Cr na amostra PROP para ambos os métodos. Além disso, analisando os resultados, é possível identificar que os valores para os demais elementos citados também são maiores que os LQs.⁶¹

De acordo com os limites máximos permitidos expressos pela Farmacopeia Brasileira (tabela 10) todos os elementos analisados estão abaixo dos limites.

Tabela 10. Limites permitidos de metais e não metais estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira para fármacos de uso oral, em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Elemento	Limite
Ag	NI
As	1,5
Ba	NI
Bi	NI
Cd	0,5
Co	NI
Cr	25
Cu	250
Hg	1,5
Mn	250
Mo	25
Ni	25
Sr	NI
V	25

NI: valor não informado

Resultados semelhantes foram obtidos por Müller *et. al* quando estes fizeram a decomposição de 500 mg de medicamentos das mais diversas classes com HNO_3 em sistema de decomposição por radiação micro-ondas e alta pressão, obtendo valores de RCC menores que 250 mg L^{-1} e LQ entre 0,001 a

0,015 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os resultados após a determinação de metais por ICP-MS foram para a maioria dos elementos e amostras menor que os limites permitidos pelas farmacopeias, exceto para os fármacos Captopril e Levodopa (medicamento utilizado para o tratamento de Parkinson) os quais apresentaram resultados maiores que os limites permitidos para Cr.

Elementos além dos descritos pela Farmacopeia Brasileira para a determinação por comparação visual na forma de sulfetos, foram possíveis de ser determinados por ICP-MS após a MW-AD com ácido diluído, como é o caso de Ag, Ba, Bi, Co e Sr os quais podem estarem presentes em embalagens ou instrumentos de manipulação.

Quando comparados o Método III da Farmacopeia e a MW-AD com ácido diluído, as diferenças são consideráveis. A utilização de menores volumes de reagentes e a possibilidade de usá-los diluídos acarretam menor geração de resíduos e maior segurança ao analista. O método de decomposição das amostras quando utilizado o sistema fechado, além de auxiliar no processo de regeneração do ácido nítrico para uma decomposição mais eficiente, evita a contaminação o que pode ocorrer na decomposição em mufla, por exemplo. Além disso, as várias etapas indicadas pelo método das Farmacopeias demandam elevado tempo em cada uma delas enquanto o procedimento de MW-AD com ácido diluído pode ser realizado em menos de uma hora. Quanto à determinação, o método de precipitação por sulfetos é ineficaz na identificação do interferente já que a coloração final desenvolvida é o somatório da coloração de todos os sulfetos gerados na amostra o que torna a determinação não quantitativa. A determinação realizada por ICP-MS e HG-AAS possibilita identificar os contaminantes individualmente, diferentemente da determinação por precipitação de sulfetos, onde ocorre a precipitação de todos os contaminantes formadores de sulfeto.

5.5 Comparação entre os métodos de preparo de amostras

A Figura 9 mostra as etapas envolvidas nos métodos de preparo de amostra avaliados para a decomposição de anti-hipertensivos.

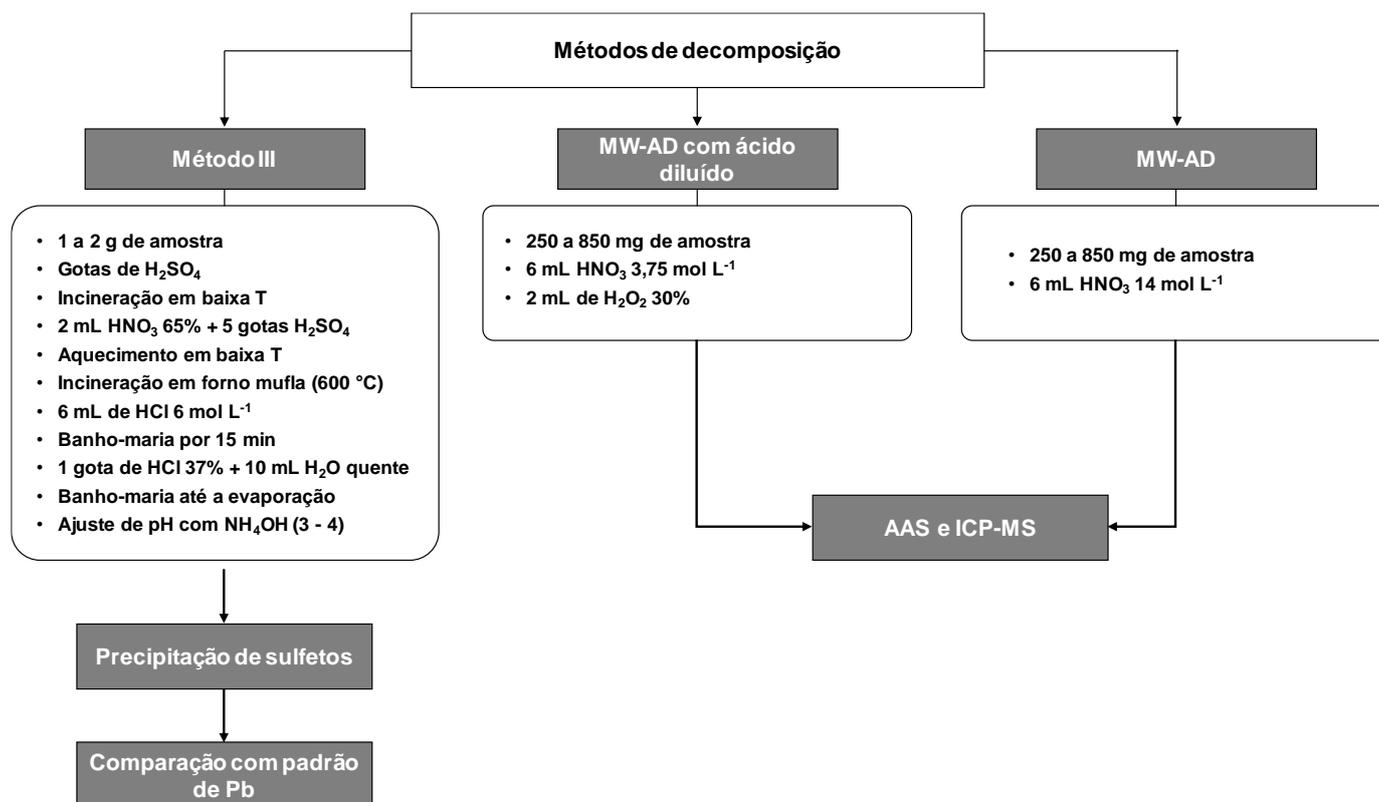


Figura 9. Fluxograma dos métodos estudados para o preparo de amostra dos fármacos.

O método recomendado pela Farmacopeia Brasileira envolve muito mais etapas que os métodos de decomposição por MW-AD. Além disso, os volumes de reagentes são maiores e há o emprego de vários reagentes (como H₂SO₄, HCl, HNO₃, NH₄OH, CH₃COOH, tampão CH₃COONa e C₂H₅NS), o que por sua vez pode acarretar em elevados valores de branco e contaminação. Uma diferença significativa nos métodos é o tempo de preparo das amostras pelo método da Farmacopeia que é muito maior (9,5 h) em comparação com o método proposto (1,5 h), diminuindo a frequência analítica. Além disso o método de determinação visual proposto pela Farmacopeia não possibilita a identificação e quantificação das espécies contaminantes. Como a comparação é feita comparando a cor desenvolvida com uma solução padrão de chumbo, onde a coloração é geralmente em tons mais escuros, a comparação é dificultada, sendo que os sulfetos de cada elemento possuem colorações diferentes. A possibilidade de determinação por técnicas espectrométricas após a

decomposição das amostras por MW-AD acarreta em melhora na sensibilidade, determinação simultânea e identificação de cada elemento, o que é uma vantagem frente à precipitação por sulfetos e comparação visual.

Quando comparados os métodos de MW-AD com ácido concentrado e MW-AD com ácido diluído, não foram observadas diferenças quanto ao aspecto final das soluções, como é possível ver na figura 10 para a amostra LOS. O tempo de preparo das amostras por MW-AD com ácido concentrado é semelhante ao método proposto.



Figura 10. Aspecto visual das soluções obtidas após A) MW-AD com ácido concentrado e B) MW-AD com ácido diluído.

Diferenças entre os métodos são observadas quanto aos teores de RCC e RA, como mostra a Tabela 11. Obviamente, quando utilizado ácido concentrado os teores de RCC são menores quando comparado ao ácido diluído, porém os teores de acidez residual são maiores, justamente pela elevada concentração do ácido.

Tabela 11. Comparação dos teores de RCC e RA, em %, entre os métodos MW-AD com ácido concentrado e ácido diluído.

Amostra	MW-AD - Ácido concentrado		MW-AD - Ácido diluído	
	RCC	RA	RCC	RA
CAP	0,07 ± 0,041	12,88 ± 0,12	32,76 ± 0,50	2,37 ± 0,06
ENA	10,53 ± 0,45	17,12 ± 0,09	7,0 ± 0,56	3,50 ± 0,16
LOS	8,48 ± 3,89	19,01 ± 0,32	10,59 ± 1,51	4,88 ± 0,16
PROP	20,40 ± 0,60	16,68 ± 0,31	22,61 ± 0,35	2,46 ± 0,04

Diferenças mais pronunciadas nos teores de RCC quando comparados os dois métodos foram observadas para o fármaco CAP o qual, quando utilizado ácido concentrado o teor de RCC foi inferior a 1% e quando utilizado o ácido diluído o resultado foi de aproximadamente 33%. Mesmo assim, a utilização da decomposição com ácido diluído não inviabiliza a determinação de contaminantes inorgânicos em fármacos, tanto por HG-AAS e CV-AAS como por ICP-MS, considerando o teor de C encontrado em solução, com base no que foi discutido na literatura.^{40,14} Cabe destacar que os teores de RA foram significativamente inferiores com o uso do método proposto, levando a um menor consumo de ácidos, geração de resíduos com menor acidez, bem como possibilidade de redução dos valores dos brancos e, conseqüentemente, obtenção de melhores limites de detecção e quantificação.

A tabela 12, mostra as principais diferenças quanto a massa utilizada em cada um dos métodos avaliados, as soluções ácidas, a concentração ácida final em solução, os teores de RCC e RA, o tempo envolvido em cada método, e a frequência analítica de cada método.

Tabela 12. Comparação dos métodos de preparo de amostras avaliados para a decomposição de fármacos anti-hipertensivos e determinação de contaminantes inorgânicos.

Parâmetros	Métodos de preparo de amostras		
	MW-AD Ácido Concentrado	MW-AD Ácido Diluído	Método III Farmacopeia Brasileira
Massa máxima de amostra, g	0,7	0,25 a 0,7	2
Solução utilizada	6 mL HNO ₃ 14 mol L ⁻¹	6 mL HNO ₃ 3,75 mol L ⁻¹ 2 mL H ₂ O ₂ 30%	2 mL HNO ₃ conc + 5 gotas H ₂ SO ₄ 4 mL HCl conc 10 mL H ₂ O quente Gotas de NH ₄ OH + CH ₃ COOH
Acidez residual, %	12,9 a 19,0	2,4 a 4,9	
Carbono Residual, %	0,07 a 20,40	7,0 a 32,8	
Tempo de Decomposição, h	1,5	1,5	14
Frequência Analítica, 10 h	12 amostras	12 amostras	6 amostras

Diferenças são muito notáveis principalmente nos métodos utilizando micro-ondas quando comparados aos métodos da Farmacopeia e as vantagens relacionadas são muitas. Entre os métodos de decomposição com micro-ondas a utilização de ácidos diluídos, reduz a geração de resíduos, e os valores de branco e conseqüentemente os LDs e LQs para alguns elementos são menores.

5.6 Figuras de Mérito

Como figuras de mérito foram avaliados os limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão para os métodos de MW-AD com ácido diluído e com ácido concentrado

5.6.1 Limites de detecção e quantificação

10 medidas consecutivas das soluções de branco dos métodos foram medidas para a determinação dos LD e LQ. A partir do desvio padrão (σ) das medidas, o LD foi calculado a partir da fórmula: $LD = 3s + \text{média das leituras do branco}$ e o LQ calculado $LQ = 10s + \text{média das leituras do branco}$. Os LDs e LQs determinados por AAS para As e Hg são mostrados na tabela 13.⁶²

Tabela 13. Limites de detecção e limites de quantificação, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para As e Hg para a determinação por AAS (n = 10).

Amostra	Hg		As	
	LD	LQ	LD	LQ
CAP	0,086	0,287	0,004	0,013
ENA	0,162	0,540	0,007	0,024
LOS	0,292	0,974	0,013	0,044
PROP	0,182	0,606	0,008	0,027

Os LQs obtidos por ICP-MS para cada uma das amostras após MW-AD com ácido concentrado e ácido diluído, são apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Limites de quantificação, em ng g⁻¹, obtidos por ICP-MS após MW-AD com ácido concentrado e diluído (n = 4).

Elemento	MW-AD – Ácido Diluído				MW-AD – Ácido Concentrado			
	LOS	CAP	ENA	PROP	LOS	CAP	ENA	PROP
Ag	562	201	312	351	187	66,8	104	117
Ba	57,6	20,6	32,0	36,0	39,6	14,1	22,0	24,7
Bi	0,300	0,107	0,167	0,187	1,57	0,561	0,872	0,981
Cd	1,17	0,418	0,650	0,731	2,88	1,03	1,60	1,80
Co	2,22	0,79	1,23	1,39	4,96	1,77	2,76	3,10
Cr	22,5	8,04	12,5	14,1	55,8	19,9	31,0	34,8
Cu	77,9	27,8	43,3	48,7	114	40,5	63,1	71,0
Mn	89,1	31,8	49,5	55,7	136	48,6	75,7	85,1
Mo	70,1	25,0	38,9	43,8	214	76,4	119	134
Ni	20,5	7,32	11,4	12,8	75,7	27,0	42,1	47,3
Sr	43,6	15,6	24,2	27,3	210	75,0	117	131
V	5,88	2,10	3,27	3,67	4,03	1,44	2,24	2,52

Como pode ser visto na tabela, os LQs obtidos para a MW-AD com ácido diluído foram menores do que os LQs obtidos para o ácido concentrado, exceto para Ag, Ba e V. Os menores valores de LQ para o ácido diluído para a maioria dos analitos estão relacionados, principalmente, com o menor volume de reagente, o que acarreta em menores valores de branco. Os maiores valores de LQ para V para o ácido diluído podem estar relacionados a adição de H₂O₂ ao qual o elemento é adicionado como catalizador.⁶¹ Mesmo assim, para os demais elementos, não foram observadas contaminações por parte do H₂O₂.

5.6.2 Exatidão do método

A validação do método de decomposição proposto foi realizada a partir da decomposição de um CRM nas mesmas condições das amostras, para tal foi utilizado o NIST 1567a (Wheat Flour), como mostra a tabela 15. Além disso, foram feitos ensaios de recuperação para avaliar a exatidão do método para As e Hg através da adição de 2,5 e 5 µg L⁻¹ de cada elemento, respectivamente.

Tabela 15. Valores obtidos, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para a avaliação da exatidão do método com o CRM Nist 1567a.

Elemento	Valor certificado	Valor encontrado	Concordância, %
Cd	0,026 \pm 0,002	0,020 \pm 0,0002	78
Co	0,006*	0,007 \pm 0,0001	114
Cu	2,1 \pm 0,2	1,693 \pm 0,024	81
Mn	9,4 \pm 0,9	8,038 \pm 0,001	85
Mo	0,048 \pm 0,03	0,413 \pm 0,002	86
V	0,011*	0,008 \pm 0,0002	70

* Valores informados.

Para avaliar o método de determinação por ICP-MS foi feita a medida do CRM NIST 1643F *Trace elements in water*. Os resultados são mostrados na tabela 16.

Tabela 16. Valores obtidos, em $\mu\text{g L}^{-1}$, para a avaliação da exatidão do método com o CRM NIST 1643F.

Elemento	Valor certificado	Valor encontrado	Concordância, %
Ag	0,97	0,86 \pm 0,03	89
Ba	518,2	510 \pm 3,89	98
Bi	12,62	12,07 \pm 0,06	96
Cd	5,89	5,70 \pm 0,03	97
Co	25,3	24,54 \pm 0,12	97
Cr	18,5	18,25 \pm 0,08	99
Cu	21,66	20,04 \pm 0,11	93
Mn	37,14	36,14 \pm 0,19	97
Mo	115,30	115,80 \pm 0,54	100
Ni	59,8	56,87 \pm 0,26	95
Sr	314	323,61 \pm 3,08	103
V	36,07	36,32 \pm 0,19	101

De acordo com os resultados obtidos não foi observado nenhuma interferência, obtendo concordâncias entre 93 e 103% para o CRM de água do

mar, o qual tem proporções semelhantes de CI quando comparados aos fármacos analisados.

As concordâncias para a determinação de As e Hg por AAS não puderam ser avaliadas devido aos valores informados no CRM (0,0005 e 0,006 g g⁻¹, respectivamente) estarem abaixo dos LQs do método.

De acordo com os resultados de concordância obtidos para o CRM 1567a, as recuperações entre 70 a 114% para a avaliação da exatidão do método de preparo de amostras, estão de acordo com os valores aceitos pela Farmacopeia e pela RDC 166 de 2017⁶³, sendo assim, o método de MW-AD com ácido diluído mostra-se eficiente para a decomposição de LOS, CAP, ENA e PROP. Já para a avaliação da exatidão do método de determinação por ICP-MS, pela avaliação do CRM *MRC – Trace elements in water*, com concordâncias entre 89 e 103%, também é possível dizer que é um método adequado para a determinação de contaminantes inorgânicos, de acordo com a Farmacopeia Brasileira.

Para avaliar a exatidão do método para a determinação de As e Hg, foram feitos ensaios de recuperação com a adição de 2,5 µg L⁻¹ para As e 5 µg L⁻¹ para Hg, os quais representam os pontos no centro da curva de calibração para os fármacos CAP e ENA, conforme mostra a tabela 17.

Tabela 17. Ensaio de recuperação para As e Hg. Resultados em %. (n=3)

Amostra	As	Hg
CAP	113	84
ENA	112	84

As recuperações obtidas para a determinação de As e Hg através de ensaio de recuperação, estão na faixa de 84% para Hg e 113% para As, que são valores considerados adequados e acordo com a Farmacopeia Americana (70 a 150%)⁶⁴, já que a Farmacopeia Brasileira não informa uma faixa de recuperação aceitável.

6 CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento do trabalho, foi possível propor um método mais moderno para o preparo de amostras de fármacos anti-hipertensivos para a determinação de contaminantes inorgânicos por métodos espectrométricos. Estes se destacam por apresentar diversas vantagens frente aos métodos recomendados pela Farmacopeia Brasileira, como as inúmeras etapas que envolvem o preparo de amostra, o tempo envolvido em cada uma das etapas, as quais são demoradas e morosas. Além disso, os métodos convencionais utilizam vários ácidos concentrados, decomposição em sistema aberto e com aquecimento convencional e determinação por método de comparação visual, o qual não é possível identificar e nem quantificar a espécie contaminante.

O método de decomposição assistida por radiação micro-ondas e ácido diluído mostra vantagens quanto a eficiente decomposição utilizando menores volumes de ácidos, evitando perdas por volatilização e contaminação e menores valores de branco e LD e LQ para a maioria dos elementos avaliados. Os teores de RCC ficam na faixa entre 7 e 32,8% sem haver interferências na etapa de determinação para massas entre 250 e 700 mg de fármaco, a qual depende principalmente de sua estrutura.

Além da comparação entre o método das farmacopeias, foi feita a decomposição assistida por MW-AD com ácido concentrado. Para ambos os métodos utilizando radiação micro-ondas foram obtidos LDs e LQs na faixa de ng g^{-1} para a determinação de Ag, Ba, Bi, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Mo, Ni, Sr, e V por ICP-MS e As e Hg por HG-AAS e CV-AAS.

O preparo de amostras de fármacos anti-hipertensivos por MW-AD com ácido diluído mostrou-se eficiente para a decomposição de fármacos com diferentes estruturas químicas utilizando a mesma concentração de ácido, volume de H_2O_2 e programa de aquecimento, variando apenas a massa de cada fármaco. Onde foi possível obter baixos valores de LQ e a quantificação de cada contaminante inorgânico na faixa de ng g^{-1} .

7 REFERÊNCIAS

- [1] World Health Organization, 2019. Acesso em: setembro de 2020, disponível em:<<https://www.who.int/health-topics/hypertension>>
- [2] Moraes, N. S. , Souza, J. A. G., Miranda, R. D., Hipertensão arterial, diabetes mellitus e síndrome metabólica: do conceito à terapêutica. Hypertension, diabetes mellitus and metabolic syndrome: from concept to therapy. Rev Bras Hipertens, 20,109, **2013**.
- [3] Malta, D. C., Bernal, R. T. I., Andrade, S., Araújo, S. C., Silva, M. M., Alves V. M. G., Prevalência e fatores associados com hipertensão arterial autorreferida em adultos brasileiros. Rev.de Saude Pub., 51, 1-10, **2017**.
- [4] Santos, M.V. R. O., Arraes, D. C., Oliveira L. B., Medeiros D. A. G. C., Novaes L., Araújo M., Compliance to treatment for hypertension: concepts, measurement, and innovative approach strategies. Rev. Soc. Bras. Clín. Méd, **2013**.
- [5] Pasa, C. R. Nemes, A. P. M., Stuhrik, C. C., Amaral, M. S., Kassab, N. M. Análise de medicamentos anti-hipertensivos contendo captopril , propranolol e losartana manipulados por farmácias de Campo Grande-MS. Rev. Bras. Farm., 89, 322, **2008**.
- [6] Maithani M., Raturi R., Sharma P., Gupta V., Bansal, P, Elemental impurities in pharmaceutical products adding fuel to the fire, Regulatory Toxicology and Pharmacology , 108, 1044352, **2019**
- [7] Kovaleva, E. L., Belanova, A. I., Panova, L. I., Zakharchenko, A. A., Current Requirements for Assessment of Elemental Impurities (Heavy Metals) in Medicines. Pharm. Chem. Journal, 52, 1, 84, **2018**.
- [8] Li, G., Schoneker, D., Ulman, K. L., Sturm, J. J., Thackery, L. M., Kauffman, J. F., Elemental impurities in pharmaceutical excipients. **Journal of Pharma.Scie.**, 104, 4197, **2015**.
- [9] Chahrour, O., Malone, J., Collins, M., Salmon, V.,Greenan, C., Bombardier, A., Ma, Z., Dunwoody, N., Development and validation of an ICP-MS method for the determination of elemental impurities in TP-6076 active pharmaceutical ingredient (API) according to USP <232/<233> . Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 145, 84, **2017**.

- [10] The United States pharmacopeia, chapter 233: elemental impurities - procedures, **2015**.
- [11] Destefano, T.; Thomas, R. From heavy metals testing to the measurement of elemental impurities in pharmaceuticals: Over 100 years in making the change. *Spectroscopy*, 33, 14, **2018**.
- [12] Barin, J. S., Mello, P. A., Mesko, M. F., Duarte, F. A., Flores, E. M. M., Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 4547, **2016**.
- [13] Lewen, N., Mathew, S., Schenkenberger, M., Raglione, T., A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 739, **2004**.
- [14] Vanhaecke, F.; Van Hoecke, K.; Catry, C., Optimization of sample preparation and a quadrupole ICP-MS measurement protocol for the determination of elemental impurities in pharmaceutical substances in compliance with USP guidelines. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27,1909, **2012**.
- [15] Barela, P. S., Silva, N. A., Pereira, J. S.F., Marques, J. C., Rodrigues, L. F. Moraes, D. P. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS. *Fuel*, 204, 85, **2017**.
- [16] Pinheiro, F. C., Barros, A. I., Nóbrega, J. A., Microwave-assisted sample preparation of medicines for determination of elemental impurities in compliance with United States Pharmacopeia: How simple can it be?, *Analytica Chimica Acta*, 1065, 1, **2019**.
- [17] Abegaz, T. M., Shehab, A., Gebreyohannes, E. A., Bhagavathula, A. S., Elnour, A. A., Nonadherence to antihypertensive drugs a systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 96, **2017**.
- [18] Mengue, S. S., Bertoldi, A. D., Ramos, L. R., Farias, M. R., Oliveira, M. A., Tavares, N. U. L., Arrais, P. S. D., Luiza, V. L., Pizzol, T. S. D., Access to and use of high blood pressure medications in Brazil. *Revista de Saude Publica*, 50, 1, **2016**.
- [19] Lista de Medicamentos disponíveis na Farmácia Popular. Disponível em <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/07/Lista-Medicamentos.pdf>>

[20] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, **2019**.

[21] Barata, S. C., Hauser-Davis, R. A., Luiz, A., Moreira, J. C., Challenges to the drug quality control in Brazil, *Cad. Saúde Colet.*, 25, 362, **2017**.

[22] Görög, S. Identification in drug quality control and drug research. *Trends in Analytical Chemistry*, 69, 114, **2015**.

[23] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N0 17 de 16 de abril de 2010: Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

Disponível em: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpseesp/bibliote/informe_eletronico/2010/iels.abr.10/iel73/U_RS-MS-ANVISA-RDC-17_160410.pdf> Acesso em: 20 fev 2019

[24] Amorim, S. R., Klier, A. H., Angelis, L. H., Quality control in the pharmaceutical industry: Identification of infrared spectroscopy., *Rev. Bras. Farm.*, 94, 234, **2013**.

[25] Barrera, E. G., Bazanella, D., Castro, P. W., Vale, M. G. R., Dessuy, M. B., Alternative method for chromium determination in pharmaceutical drugs by HR-CS GF AAS and direct analysis of solid samples, *Microchemical Journal*, 132, 365, **2017**.

[26] Rao, R. N., Talluri, M. V. N. K., An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals, 43, 1, **2007**.

[27] Venkateswarlu P., Gouthami B., An overview of recent applications of atomic absorption spectroscopy in determination of inorganic impurities in drugs and plants and its extracts, *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 1,19, **2015**.

[28] European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents, ICH guideline Q3D (R1) on elemental impurities. v. 31, n. March, 2019.

[29] The United States pharmacopeia, chapter 232: elemental impurities - procedures, **2017**.

[30] Flores, E. M. M, Microwave-Assited Sample Preparation for Trace Element Determination, Elsevier, **2014**.

[31] Hoenig, M.; De Kersabiec, A. M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: Present status. *Spectrochimica Acta - Part B*

Atomic Spectroscopy, 51, 1297, **1996**.

[32] SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, **2006**.

[33] Krug, F. J., Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar, EditSBQ, Sociedade Brasileira de Química, **2016**.

[34] Ražić, S., Onjia, A., Dogo, S., Slavković, L., Popović, A., Determination of metal content in some herbal drugs - Empirical and chemometric approach. Talanta, 67, 233, **2005**.

[35] Ang, H. H.; Lee, K. L.; Kiyoshi, M., Toxic metal determination in Smilax calophylla preparations in Malaysia. International Journal of Risk and Safety in Medicine, 1,19, **2004**.

[36] Ahsan, Shamim, 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, **1999**.

[37] Nam, K. H., Isensee, R., Infantino, G., Putyera, K., Wang, X., Microwave-induced combustion for ICP-MS: A generic approach to trace elemental analyses of pharmaceutical products. Spectroscopy, v. 26, **2011**.

[38] Flores, E. M. M., Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination, Elsevier, **2016**.

[39] V. C. Costa, R. S. Picoloto, C. A. Hartwig, P. A. Mello, E. M. M. Flores, M. F. Mesko, Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion, Anal Bioanal Chem, 407, 7957, **2015**

[40] Barin, J. S., Tischer, B., Picoloto, R. S., Antes, F. G., Da Silva, F. E.B., Fávero, P.R., Flores, E. M.M. Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: A critical study of digestion methods. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 29, 352, **2014**.

[41] Muller, A. L.H., Muller, E. I., Barin, J. S., Flores, E. M.M., Microwave-assisted digestion using diluted acids for toxic element determination in medicinal plants by ICP-MS in compliance with United States pharmacopeia requirements. Analytical Methods, **2015**.

[42] Muller, A. L.H., Oliveira, J. S.S., Mello, P. A., Muller, E. I., Flores, E. M.M. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active

pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. *Talanta*, 136, 161, **2015**.

[43] Araújo, G. C.L., Gonzalez, M.H., Ferreira, A. G., Nogueira, A. R. A., Nóbrega, J. A., Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57, 2121, **2002**

[44] Gonzalez, M. H., Souza, G. B., Oliveira, R. V., Forato, L. A., Nóbrega, J. A., Nogueira, A. R. A., Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. *Talanta*, 79, 396, **2009**.

[45] Santosa, H. M., Coutinho, J.P., Amorim F. A. C., Lôboa, I. P., Moreira, L. S., Nascimento, M. M., Jesusa R. M., Microwave-assisted digestion using diluted HNO₃ and H₂O₂ for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES, *Food Chemistry* 273, 159, **2019**.

[46] Bizzi, C. A., Nóbrega, J. A., Barin, J. S., Oliveira, J. S.S., Schmidt, L., Mello, P. A., Flores, E. M.M., Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure, *Analytica Chimica Acta* 837, 16, **2014**.

[47] Tarantino, T. B., Barbosa, I. S., Lima, D. C., Pereira, M. G., Teixeira, L. S.G., Korn, M. G. A., Microwave-Assisted Digestion Using Diluted Nitric Acid for Multi-element Determination in Rice by ICP OES and ICP-MS. *Food Analytical Methods*, 2017.

[48] BROEKAERT, J. A. C. *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas: Second Edition*, Wiley, **2006**.

[49] Takase, I., Pereira, H. B., Luna, A. S., Grinberg, P., Campos, R. C., A geração química de vapor em espectrometria atômica. *Química Nova*, 25, 1132, **2002**.

[50] Cerveira, C., Pozebon, D., Moraes, D. P., Silva, F. J. C., Speciation of inorganic arsenic in rice using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS), *Analytical Methods*, 7, 4528, **2015**.

[51] Ammann, A. A., Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): A versatile tool, *Journal of Mass Spectrometry*, 42, 419, **2007**.

[52] Thomas, R., **Practical Guide to ICP-MS**, Third Edition, CRC Press, 2013.

- [53] OLESIK, J. W. Elemental Analysis Using ICP-OES and ICP-MS. *Analytical Chemistry*, 63, **1991**
- [54] Giessmann, U.; Greb, U., High resolution ICP-MS - a new concept for elemental mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 350, 186, **1994**.
- [55] Mattos, I. L., Shiraishi, K. A., Braz, A., D., Fernandes, J. R., *Quimica Nova*, 3, 373-380, **2003**
- [56] Grindlay, G., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M., Vanhaecke, F., A systematic study on the influence of carbon in behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*, 86, 42-49, **2013**
- [57] Silva, I. J.S., Lavorante, A. F., Paim, A. P.S., Silva, M. J., Microwave-assisted digestion employing diluted nitric acid for mineral determination in rice by ICP OES, *Food Chemistry*, 319, 126435, **2020**.
- [58] Bizzi, C. A., Nóbrega, J. A., Barin, J. S., Oliveira, J. S.S., Schmidt, L., Mello, P. A., Flores, E. M.M., Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure. *Analytica Chimica Acta*, 837, 16, **2014**.
- [59] Barbosa, J. T. P., Santos, C. M.M., Peralva, V. N., Flores, E. M.M., Korn, M., Nóbrega, J. A., Korn, M. G. A., Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products, *Food Chemistry*, 175, 212, **2015**.
- [60] May, T. W.; Wiedmeyer, R. H., A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, 19, 150, **1998**.
- [61] Feasey, N. D., Morris, G. W., Processos de estabilização de soluções concentradas de peróxido de hidrogénio. Depositante: Interlox Chemicals Limited. PT 94728 B. Depósito: 17 de julho de 1990. Concessão: 13 de dezembro de 1996.
- [62] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). McNaught, A. D., Wilkinson, A. Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1997**.
- [63] ANVISA, RDC 166 de 24 de julho de **2017**.
- [64] Farmacopeia Americana, USP 38, Chemical Tests, 233 - Elemental Impurities - Procedures, **2015**.