

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

PAULA WESP CASTRO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE
CROMO EM MEDICAMENTOS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
ATÔMICA**

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

PAULA WESP CASTRO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE
CROMO EM MEDICAMENTOS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
ATÔMICA**

Trabalho de conclusão apresentado junto à
atividade de ensino “Trabalho de Conclusão
de Curso - Química” do curso de Química,
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Bacharel em Química

Profa. Dra. Morgana Bazzan Dessuy
Orientadora

Porto Alegre, 2015

Dedico este trabalho aos meus amados pais.
Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jorge e Rosana, e aos meus irmãos, Alexandre e Ana, e ao cunhado João Batista, por todo apoio, compreensão e carinho.

À Professora Dr. Morgana Dessuy, por todo apoio, orientação e por acreditar em mim para a realização deste trabalho.

À Professora Dr. Maria Goreti, por disponibilizar seu laboratório para realização do trabalho.

Aos colegas de trabalho da Farmacia Sanar, por disponibilizarem as amostras, compreenderem as faltas e sempre me apoiarem nos momentos críticos.

Aos colegas do Laboratório de Análise de Traços da UFRGS por me receberem, ajudarem com as dúvidas e por tornar os momentos de análise mais descontraídos.

Às amigas, Thayse, Danielli, Amanda, Marianna L., e Mariana R., por entenderem a falta de tempo, e ao mesmo tempo apoiarem as minhas realizaoes.

RESUMO

Considerando-se o grande consumo de medicamentos nos dias de hoje, é importante que sejam realizados testes de qualidade em matérias-primas e produtos farmacêuticos prontos. Neste trabalho foi desenvolvido um método analítico simples e rápido para a quantificação de cromo em medicamentos pela análise direta de amostras sólidas utilizando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, visando minimizar o preparo de amostras. Para tanto, foi utilizada a técnica de espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução com forno de grafite (HR-CS GF AAS), com acessório para análise direta de sólidos. Parâmetros como massa de amostra a ser utilizada, temperaturas de pirólise e atomização foram otimizados. A curva de calibração foi construída utilizando soluções padrão aquosas. A massa característica e o limite de detecção obtidos para o método foram de, respectivamente, 2 pg e 0,83 ng.g⁻¹. Os resultados obtidos para os testes de recuperação variaram entre 86 a 96%, e os valores encontrados na análise do material de referência certificado foram concordantes com o valor certificado, ficando dentro do intervalo de confiança de 95% do teste *student t*. Os resultados comprovam que é possível a determinação de cromo por HR-CS GF AAS, por análise direta de amostras sólidas, de forma confiável e relativamente fácil, se comparada com outras técnicas que requerem maiores recursos e tempo de análise.

Palavras-chave: cromo, medicamentos, espectrometria de absorção atômica de alta resolução com forno de grafite, análise direta de amostras sólidas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS). No esquema, estão representados: (1) lâmpada de arco curto de Xe; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabolóides; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede echelle e (9) detector CCD. (Adaptada de Borges <i>et al.</i> , 2005).....	19
Figura 2 - Variação do valor de absorvância integrada do cromo com a quantidade de amostra de furosemida (Pharma Nostra). Tp 1200 °C, Ta 2600 °C.	31
Figura 3 - Variação do valor de absorvância integrada do cromo com a mudança de massa de amostra de sinvastatina (Legrand). Tp 1200 °C, Ta 2600 °C.	32
Figura 4- Curvas de pirólise para cromo na (●) amostra de sinvastatina, Legrand, absorvância normalizada para 0,5 mg, (▼) amostra de sinvastatina, Gemini, absorvância normalizada para 0,5 mg, (▲) amostra de furosemida, P. Nostra, absorvância normalizada para 0,5 mg, e (■) 100 pg de Cr em 10 µL de solução padrão em 0,014 mol.L ⁻¹ HNO ₃ . Ta=2600°C.	33
Figura 5- Curvas de atomização para (●) amostra de sinvastatina, Legrand, absorvância normalizada para 0,5 mg, (■) 100 pg de Cr em 10 µL de solução padrão em 0,014 mol.L ⁻¹ HNO ₃ . Tp= 1200°C.....	34
Figura 6 - Perfis de absorção atômica para o cromo na solução padrão de 10µL.L ⁻¹ : (—) A _{int} =0,17886, Ta= 2400°C, (—) A _{int} = 0,18775, Ta= 2500°C, (—) A _{int} = 0,17315, Ta= 2600°C.	35
Figura 7 - Perfis de absorção atômica para o cromo em amostras de sinvastatina, Legrand: (—) 0,471 mg de sinvastatina, A _{int} =0,17886 s, Ta= 2400°C, (—) 0,418 mg de sinvastatina, A _{int} = 0,18775 s, Ta= 2500°C, (—)0,368 mg de sinvastatina, A _{int} = 0,17315 s, Ta= 2600°C....	35
Figura 8 - Curva de calibração para os padrões aquosos de cromo. Tp= 1200 °C, Ta= 2600 °C.	36
Figura 9 - Amostra de atenolol, Biosintética. Tp= 1200 °C, Ta= 2600 °C.....	40
Figura 10 - Amostra de atenolol, Pharma Nostra. Tp= 1200 °C, Ta= 2600 °C.....	40
Figura 11 - Padrão de cromo, 100 µg.L ⁻¹ . Tp= 1200 °C, Ta= 2600 °C.	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR) para o cromo, recomendados pela ANVISA, em 2005.	14
TABELA 2 - Lista de medicamentos, com seus respectivos excipientes, obtidos de indústrias farmacêuticas na forma de comprimidos.	25
TABELA 3 - Amostras de princípio ativo, e suas respectivas características, matérias-primas obtidas diretamente do fornecedor na farmácia de manipulação.	25
TABELA 4 - Programa de aquecimento do forno de grafite para determinação de cromo.	26
TABELA 5 - Parâmetros de mérito para determinação de cromo em amostras de medicamentos.	37
TABELA 6 - Resultados do teste de recuperação de cromo após adição de padrão de cromo junto à amostra.	38
TABELA 7 - Resultados para as concentrações de cromo encontradas nas amostras utilizando análise direta de amostras sólidas com GF AAS.	39
TABELA 8 - Resultados da quantidade em massa de cromo por comprimido de amostra. Desvio padrão calculado para cinco comprimidos.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA.....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AAS.....	Espectrometria de absorção atômica (do inglês: <i>Atomic absorption spectrometry</i>).
CRM.....	Material de referência certificado (do inglês: <i>Certified Reference Material</i>)
GF AAS.....	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês: <i>Graphite furnace AAS</i>).
F AAS.....	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês: <i>Flame AAS</i>).
HG AAS.....	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (do inglês: <i>Hydride generation AAS</i>).
LS AAS.....	Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (do inglês: <i>Line source AAS</i>).
CV AAS.....	Espectrometria de absorção atômica com vapor frio (do inglês: <i>Cold vapor atomic absorption spectrometry</i>)
HR-CS AAS...	Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (do inglês: <i>High-resolution continuum source atomic absorption spectrometry</i>).
CCD.....	Dispositivo de carga acoplada
HR-CS GF AAS.....	Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução com forno de grafite (do inglês: <i>High-resolution continuum source graphite furnace AAS</i>).
Tp.....	Temperatura de pirólise
Ta.....	Temperatura de atomização
SS-GF AAS....	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite por amostragem sólida (do inglês: <i>Solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
RSD.....	Desvio padrão relativo (do inglês: <i>relative standard deviation</i>)
LOD.....	Limite de detecção (do inglês: <i>limit of detection</i>)
LOQ.....	Limite de quantificação (do inglês: <i>limit of quantification</i>)
IDR.....	Ingestão diária recomendada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Geral.....	11
2.2 Específicos	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 Contaminação por metais pesados em medicamentos	12
3.2 Contaminação por cromo em medicamentos	13
3.3 Métodos para o controle de metais pesados em produtos farmacêuticos segundo a Farmacopeia Brasileira.....	14
3.3.1 Método do ensaio limite	15
3.3.2 Espectrometria de absorção atômica	15
3.4 Técnicas de espectrometria de absorção atômica para determinação de metais pesados	16
3.4.1 Espectrometria de absorção atômica: o conceito.....	17
3.4.2 GF AAS	20
3.5 Determinação de cromo em medicamentos por GF AAS	22
4 PARTE EXPERIMENTAL	24
4.1 Materiais e reagentes.....	24
4.2 Amostras e preparo de amostras	24
4.3 Equipamentos.....	26
4.4 Validação do método	27
4.4.1 Linearidade e faixa de aplicação	27
4.4.2 Limite de detecção, limite de quantificação e Massa característica	28
4.4.3 Exatidão	28
4.4.4 Precisão.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Estudos de massas.....	31
5.2 Otimização do programa de aquecimento do forno de grafite.....	32
5.3 Validação do método	36
5.3.1 Curva de calibração, LOD, LOQ e m_0	36
5.3.2 Exatidão	37
5.3.3 Precisão.....	38
5.4 Determinação de cromo nas amostras.....	38
6 CONCLUSÃO.....	42
7 REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de medicamentos é fundamental para a segurança dos pacientes que os usam. Este controle deve ser realizado tanto nos produtos farmacêuticos prontos, quanto na matéria-prima utilizada pelas indústrias farmacêuticas. Os parâmetros de qualidade são estabelecidos pelas farmacopeias que, na sua maioria, utilizam ensaios de identificação, doseamento e pureza em suas monografias.

Dentre as inúmeras impurezas que podem ser encontradas em medicamentos, a presença de metais pesados em medicamentos tem sido alvo de recentes pesquisas. Atualmente, a determinação desses elementos em produtos farmacêuticos é feita utilizando dois métodos indicados pela Farmacopeia Brasileira: o ensaio limite por formação de partículas sólidas ou pela determinação por espectrometria atômica.

O ensaio limite consiste na formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, e posteriormente, a comparação visual da intensidade da cor nas preparações da amostra e do padrão, ou seja, o ensaio é semi-quantitativo, e possibilita somente afirmar se a amostra contém ou não metais pesados, representando o somatório da concentração dos elementos que estão presentes na amostra, e não quais elementos estão presentes e nem suas concentrações específicas. Devido à baixa seletividade e sensibilidade, estes ensaios baseados na precipitação, não são suficientes para a determinação de baixas concentrações de impurezas inorgânicas, sugerindo que técnicas instrumentais venham a ser mais adequadas ao controle de qualidade de produtos farmacêuticos. Deste modo, o método por espectrometria atômica é o mais recomendado, pois possibilita a quantificação de cada elemento contaminante na amostra, sendo assim, possível a comparação com os valores estabelecidos para cada tipo de forma farmacêutica e cada elemento estudado. A espectrometria de absorção atômica evita os erros inerentes que o ensaio limite está sujeito, devido ser uma técnica que depende do operador e das condições de luminosidade do ambiente.

A técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS) é recomendada pela Farmacopeia Brasileira para determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V em medicamentos, e consiste, basicamente, de quatro técnicas: a espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS), espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HG AAS), espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).

A técnica de GF AAS tem sido a técnica mais empregada para determinação de elementos traço na área farmacêutica, por apresentar elevada sensibilidade. A Farmacopeia

Brasileira recomenda a utilização da GF AAS aliada, geralmente, a um pré-tratamento da amostra, como decomposição ou a diluição da mesma em solvente apropriado. Entretanto, isto faz com que o tempo de análise aumente devido aos procedimentos prévios à análise em si, além de provocar a diluição da amostra.

Devido ao menor tempo de análise, e a facilidade, a técnica de análise direta de sólidos em espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (SS-GF AAS) tem sido empregada para determinação de elementos traço. Esse tipo de análise reduz erros relacionados ao pré-tratamento da amostra, como perda de analito ou contaminação da amostra e, uma vez que a amostra não sofre diluição, há uma melhora considerável nos limites de detecção. Recentemente, com o surgimento da técnica de GF AAS de alta resolução com fonte contínua (HR-CS GF AAS), o emprego da análise direta de amostras se tornou ainda mais viável e consolidado, uma vez que esta técnica tem maior potencial para identificação e correção de interferências espectrais. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um método analítico para determinação de cromo em alguns tipos de medicamentos utilizando a análise direta de amostras sólidas por HR-CS GF AAS, visto que, este elemento além de ser essencial para o organismo humano, também pode se tornar tóxico se ingerido em concentrações elevadas.

Para o desenvolvimento do método, foi realizada uma pesquisa sobre a técnica a ser utilizada, escolheu-se alguns medicamentos mais consumidos atualmente no Brasil, e a fez-se a realização da otimização do método, analisando a viabilidade do uso de amostragem direta de sólidos para análise e calibração com soluções padrão aquosas. Especial atenção foi dada para a otimização do programa de temperatura e a validação do método, por meio do estabelecimento de diferentes parâmetros de mérito, tais como limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolvimento de um método analítico para a determinação de cromo em amostras de medicamentos (comprimidos obtidos industrialmente e matéria-prima pura) através da análise direta de amostras sólidas usando a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua por forno de grafite.

2.2 Específicos

- 1- Realizar uma pesquisa inicial sobre a técnica a ser utilizada, sobre o impacto da presença de cromo em medicamentos, e estabelecer alguns medicamentos de maior uso entre a população para serem analisados.
- 2- Otimização do método analítico para determinação de cromo: estudo da viabilidade do uso da análise direta de amostras sólidas, estudo da influência da massa de amostra, otimização do programa de temperatura e validação do método.
- 3- Determinar, quantitativamente, cromo, em todos os medicamentos utilizando a técnica de HR-CS GF AAS e comparar os resultados obtidos com os limites permitidos pela Farmacopeia Brasileira.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Contaminação por metais pesados em medicamentos

Os metais pesados apresentam inúmeras definições, e são geralmente associados à ideia de uma substância tóxica. Duffus (2002), em um relatório técnico apresentado à União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), relatou os resultados de sua extensa revisão bibliográfica sobre o assunto, e relacionou a sua definição de metais pesados as propriedades químicas de cada elemento, definindo como um elemento pesado àquele que apresenta massa específica entre 3,5 e 7,0 g/cm³, e massa atômica e número atômico elevados. Mas, Hawkes (1997) já havia definido metal pesado da mesma forma que Duffus, como sendo os elementos contidos nos grupos 3 a 16, porém, observou que estes metais além de apresentarem as propriedades químicas citadas anteriormente, também apresentavam como propriedades importantes a formação de sulfetos e hidróxidos insolúveis, a formação de sais que geram soluções aquosas coloridas e a formação de complexos coloridos. (HAWKES, 1997). Esta classificação de metais pesados, usada por Hawkes, abrange diversos elementos importantes do ponto de vista toxicológico, tais como o cromo, níquel, paládio e zinco, cujo risco de estarem presentes em produtos farmacêuticos são elevados.

Os medicamentos usados no tratamento de enfermidades, só são considerados seguros quando são obtidos a partir de uma matéria-prima de qualidade. Os parâmetros de qualidade empregados estão descritos nas Farmacopeias, que na sua maioria, utilizam de ensaios analíticos para o controle de qualidade. A determinação da concentração de um determinado fármaco ou das impurezas pode ser feita através da utilização de diferentes métodos, que podem ser classificados em seletivos e não-seletivos.

Nos últimos anos, a utilização de métodos não-seletivos vem decrescendo consideravelmente, devido ao grande desenvolvimento dos métodos instrumentais analíticos, que permitem a identificação e quantificação de elementos e impurezas em amostras de forma individual. Desta forma, a caracterização de impurezas tem se tornado a mais importante atividade na garantia da qualidade de fármacos. (BARIN, 2007).

Para a devida comercialização, um fármaco deve passar por testes onde serão avaliados os efeitos farmacológicos e toxicológicos, considerando-se a relação risco/benefício que o mesmo ofereceria ao paciente. Os efeitos colaterais que podem ser ocasionados pelos fármacos consumidos, podem ter sua origem através de propriedades indesejadas, inerentes aos fármacos e que não dependem da qualidade da matéria-prima empregada, ou pela presença de impurezas de atividade tóxica na mesma. Como o tipo de impurezas num

determinado fármaco pode depender, por exemplo, da rota sintética, os efeitos colaterais causados por estas impurezas podem variar de acordo com a origem da matéria-prima. Portanto, através da determinação das impurezas presentes e do emprego de limites máximos de concentração é possível minimizar o risco dos efeitos colaterais causados por essas impurezas. Além disso, ao se obter informações sobre as impurezas, estas também fornecem informações sobre a possível origem da contaminação e a qualidade dos reagentes empregados na síntese do fármaco. (BARIN, 2007).

As impurezas em fármacos podem ser classificadas em três tipos: impurezas orgânicas, solventes residuais e impurezas inorgânicas, onde neste último tipo, estão incluídos os metais pesados.

3.2 Contaminação por cromo em medicamentos

O cromo é um elemento que ocorre naturalmente em rochas, animais, plantas, solo e poeira e gases vulcânicos. No meio ambiente, o elemento se encontra em três estados de oxidação: Cromo (0), Cromo (III) e Cromo (VI), sendo que, o cromo predominante é o estado de oxidação III, enquanto que cromo (0) e cromo (VI) são geralmente produzidos por processo químicos.

O cromo (III) atua no organismo humano ativamente no metabolismo da glicose, gorduras e proteínas, sendo um coadjuvante da insulina, melhorando a tolerância à glicose, conforme afirmam Gomes, Rogero e Tirapegui (2005).

O cromo se torna um elemento com características tóxicas quando há o acúmulo do mesmo no organismo, pois, assim como os demais metais pesados, ele se acumula na cadeia alimentar e permanece retido nos organismos vivos por sua natureza física (maior solubilidade nas gorduras ou absorção), ou por sua natureza química (fixação em certos componentes das células ou dos tecidos) ou, ainda, por lesar os órgãos excretores. Dessa maneira, há um aumento progressivo da concentração do elemento no organismo, até atingir o limite máximo tolerável e então, aparecerem os sintomas de intoxicação. (PASCALICCHIO, 2002)

O cromo (VI) é mais tóxico que o cromo (III). Quando há a inalação aguda (curto prazo) ou crônica (longo prazo) dessa forma de cromo, podem ocorrer sintomas como falta de ar, perfurações e ulcerações do septo, bronquite e diminuição da função pulmonar, atingindo principalmente o trato respiratório nos seres humanos. Já a ingestão de grandes quantidades de cromo (VI) provoca efeitos gastrointestinais, incluindo dores abdominais, vômitos e hemorragia.

A intoxicação por cromo pode levar, também, a aberrações cromossômicas, mutações, câncer e uma variedade de lesões no DNA. (O' BRIEN et al, 2003)(SNOW, 1992). A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classifica o cromo como elemento cancerígeno para humanos, tornando assim, a pesquisa de determinação de cromo importante, em relação aos medicamentos, visto que, estes, na maioria são administrados diariamente.

Devido alguns elementos apresentaram certa toxicidade ao ser humano, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em sua Resolução RD nº 269, de 22 de setembro de 2005, aprovou o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais, onde consta as quantidades de proteínas, vitaminas e minerais que devem ser consumidas diariamente para atender as necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia. Os limites de ingestão diária foram subdivididos em cinco grupos: adultos, lactentes, crianças, gestantes, e lactantes; os limites definidos pela ANVISA para o cromo estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 - Valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR) para o cromo, recomendados pela ANVISA, em 2005.

Grupos	Subgrupos	IDR (mg)
Adultos	-	35
Lactentes	0-6 meses	0,2
	7-11 meses	5,5
Crianças	1-3 anos	11
	4-6 anos	15
	7-10 anos	15
Gestantes	-	30
Lactantes	-	45

*Fonte: ANVISA, 2005

3.3 Métodos para o controle de metais pesados em produtos farmacêuticos segundo a Farmacopeia Brasileira

A Farmacopeia Brasileira menciona dois métodos para a determinação de metais pesados como forma de controle de qualidade em matérias-primas e produtos farmacêuticos prontos: o método do ensaio limite por formação de partículas sólidas de sulfetos e o método da espectrometria de absorção atômica.

3.3.1 Método do ensaio limite

O método do ensaio limite consiste na formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, em suspensão, e posterior comparação visual da intensidade da cor nas preparações amostra e padrão. A Farmacopeia Brasileira recomenda cinco tipos de ensaios limites de forma geral para os metais pesados, que utilizam uma solução padrão de chumbo e outra de tioacetamida, que produzem precipitados coloridos e cuja intensidade é comparada, visualmente, com uma solução de referência de chumbo de concentração conhecida.

Como se trata de um ensaio qualitativo, este não proporciona a detecção de um elemento específico, ou seja, o desenvolvimento da coloração se deve ao somatório da concentração dos precipitados metálicos dos elementos contaminantes na amostra. A probabilidade de erro na determinação é maior por esse método, devido a ser uma técnica que depende do operador, já que se trata de resultados visuais, além de ser uma técnica somente semi-quantitativa.

Outro fator importante que está relacionado a esse método, é que alguns elementos importantes do ponto de vista toxicológico, como o cromo, o elemento deste trabalho, não formam precipitados com soluções de tioacetamida, não podendo assim, serem detectados no teste. Portanto, os ensaios limites não podem ser usados como única forma de determinar a presença de certos metais pesados.

3.3.2 Espectrometria de absorção atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é utilizada para determinação de diversos elementos da tabela periódica, e pode ser aplicada a diferentes tipos de amostras, como sólidas, líquidas, ou em suspensão, mesmo quando estes estão em baixas concentrações.

Esta técnica se subdivide, basicamente, em quatro técnicas (como mencionado na Introdução): F AAS, HG AAS, CV AAS e GF AAS. As técnicas que utilizam a chama e o forno de grafite como atomizadores permitem a determinação de cerca de 70 elementos. Já a técnica de geração de hidretos permite a determinação de elementos que formam hidretos voláteis, como arsênio, chumbo e estanho, enquanto que a geração de vapor frio possibilita somente a determinação de mercúrio.

A AAS apresenta uma alta seletividade, excelente exatidão, precisão, e baixo custo, sendo por isso a mais indicada para determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos. Dentre as técnicas de AAS, as mais utilizadas nas determinações de metais são a F AAS e GF AAS, porém, a níveis de elementos traço, onde as concentrações são muito baixas, o emprego da GF AAS é mais indicado.

3.4 Técnicas de espectrometria de absorção atômica para determinação de metais pesados

Todas as técnicas citadas anteriormente, na seção 3.3.2, podem ser empregadas na determinação de metais pesados, o que irá determinar a escolha da técnica será o tipo de amostra, a faixa de concentração do analito que se deseja determinar, o número de elementos a serem determinados, se há necessidade de preparo da amostra e o tempo de análise.

Barin (2007) realizou uma ampla revisão de trabalhos desenvolvidos no período entre 1995 e 2007 sobre a determinação de elementos presentes como contaminantes em produtos farmacêuticos em que foram empregadas as técnicas de espectrometria atômica, e constatou que na maior parte dos trabalhos, as técnicas de F AAS e GF AAS foram empregadas.

Durante a pesquisa, Barin também constatou que para utilização da maior parte das técnicas de AAS, as amostras passaram por uma etapa de pré-tratamento, onde foram dissolvidas ou decompostas, para que somente depois fossem analisadas, sendo poucos os trabalhos com a proposta da introdução de amostras em suspensão ou sólidas. Esses pré-tratamentos das amostras acarretam desvantagens à técnica, como tempo de análise, que aumenta e a possível perda de analito ou contaminação da amostra, que pode ocorrer durante esse processo.

A partir de 2007, outros pesquisadores relataram o uso da técnica de GF AAS, como forma de determinar outros elementos além do cromo em produtos farmacêuticos, e em sua maioria, com a utilização de um pré-tratamento da amostra, ao invés do uso de SS-GF AAS.

Trabalhos realizados, empregando a técnica de AAS, como de Santos (2006), que determinou arsênio, antimônio e chumbo em antimoniato de meglumina, Lewen (2011), R. De Paula *et al.* (2012), que fez a determinação de cromo e níquel em formulações farmacêuticas e em matérias-primas, e Nema (2014), visavam à determinação de elementos traços em medicamentos, mas, também, dependiam de um pré-tratamento da amostra.

Em relação às técnicas de espectrometria de absorção atômica utilizadas para a determinação de metais pesados em produtos farmacêuticos, a F AAS tem sido empregada para determinação de elementos em concentrações mais elevadas e que, normalmente, não são considerados contaminantes. Já a técnica de GF AAS tem sido a técnica de espectrometria atômica mais empregada, principalmente, devido à maior sensibilidade e a possibilidade de introdução direta das amostras no atomizador, sem necessidade de pré-tratamento das mesmas. (BARIN, 2007)

O presente trabalho utilizará a técnica de GF AAS, esta será discutida em maiores detalhes no decorrer deste texto, porém primeiramente será abordado o conceito básico das técnicas de espectrometria de absorção atômica de um modo geral.

3.4.1 Espectrometria de absorção atômica: o conceito

A determinação de espécies atômicas por AAS é feita em meio gasoso, no qual os átomos individuais se encontram muito bem separados. A primeira etapa de todos os procedimentos de espectrometria de absorção atômica é a atomização, que pode ser realizada com atomizador de chama ou com atomizadores eletrotérmicos, onde a amostra é volatilizada e decomposta de forma que produza uma fase gasosa de átomos, preferencialmente, livre de interferentes. A eficiência e a reprodutibilidade dessa etapa são determinantes para a precisão e exatidão do método. (SKOOG *et al.*, 2008).

Após a atomização, para a determinação da concentração do analito, uma radiação de frequência específica, proveniente de uma fonte externa, incide sob o vapor atômico contendo os átomos livres desse elemento no estado fundamental. A atenuação que a radiação incidente sofre, devido à absorção do elemento, é utilizada para quantificar o analito presente na amostra. Esta atenuação da radiação é diretamente proporcional à quantidades de átomos presentes no atomizador.

Os primeiros espectrômetros de absorção atômica foram desenvolvidos na segunda metade do século XIX, e estes utilizavam uma fonte contínua como fonte de radiação, devido ser a única fonte disponível na época. Devido às limitações instrumentais da época, a maioria dos experimentos era realizada utilizando-se técnicas de emissão óptica. Porém, em 1952, Alan Walsh, chegou a conclusão que fontes de emissão de linha (LS) com linhas mais estreitas, quanto possível, seriam determinantes para as medidas em AAS, já que se uma fonte contínua fosse utilizada, um monocromador com uma resolução de aproximadamente 2 pm seria necessário. (WELZ *et al.*, 2003). Como essa resolução não poderia ser atingida, devido a precariedade dos instrumentos da época, os instrumentos de absorção atômica com fontes de linha foram, e são utilizados até hoje, com suas vantagens e limitações.

A espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (LS AAS) usa lâmpadas especialmente desenvolvidas para emitir apenas radiação com pequena largura, específica para cada elemento, chamadas lâmpadas de cátodo oco, como fonte de emissão de linhas, o que torna a técnica altamente seletiva e dispensa o uso de monocromadores de alta resolução. Essa técnica tem como vantagens o emprego de monocromadores de baixa resolução, a alta seletividade e especificidade devidas ao uso de uma fonte de radiação específica para

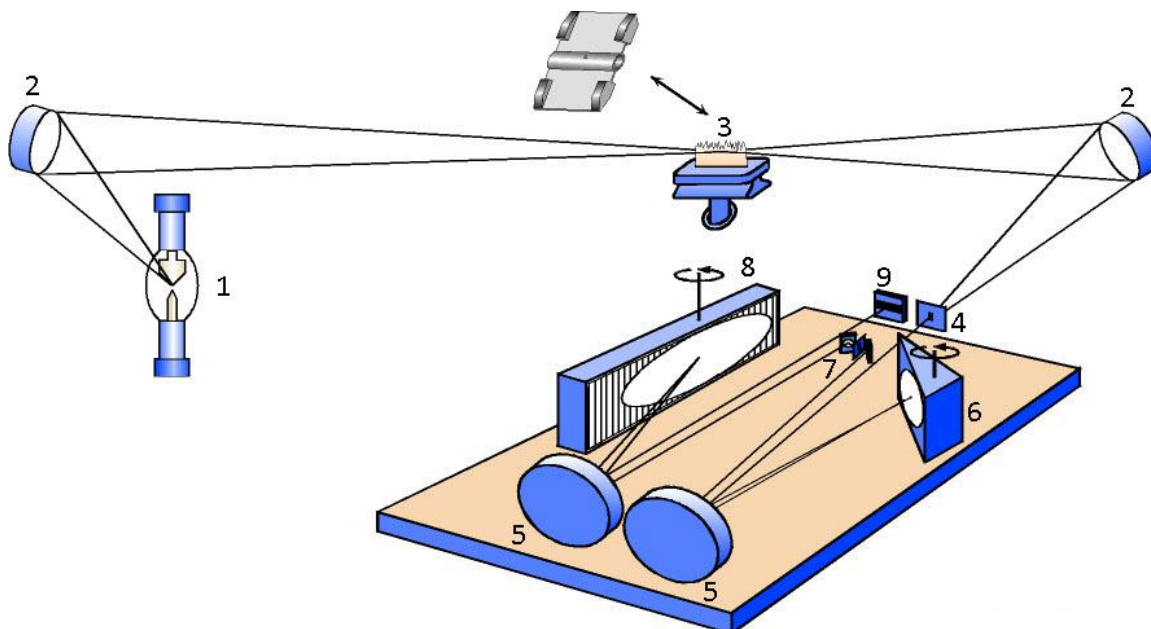
determinado elemento, e baixo risco de interferências espectrais, já que a sobreposição de linhas de outros elementos é rara. Por outro lado, a limitação mais relatada da técnica se deve ao fato de limitar a determinação de um elemento por vez, ou seja, ser monoelementar, sendo necessária a compra de lâmpadas para todos os elementos que se deseja determinar. (BORGES *et al.*, 2005).

No caso da LS AAS, a atenuação da radiação proveniente da lâmpada de cátodo oco, pode ser causada por moléculas (absorvem radiação) e por partículas (espalham a radiação) provenientes de constituintes da matriz, além de ser causada pelos átomos, dando origem ao chamado fundo, pois a técnica só permite a medida da absorção total, de maneira que o fundo deve ser determinado em uma segunda medida e subtraído da absorção total, para que assim, seja fornecida a absorção atômica absoluta. Com intuito de minimizar os erros, sistemas de correção de fundo foram desenvolvidos, como a correção de fundo com fonte contínua, o pulso de alta corrente da fonte de emissão, e a correção de fundo baseada no efeito Zeeman, sendo este último o mais eficiente dos três. Para minimizar os erros provocados por mudanças rápidas do sinal de fundo com o tempo, as duas medidas, absorvância total e de fundo, devem ser realizadas em sequência rápida, o que não é possível em equipamentos de fonte de linha. (BORGES *et al.*, 2005).

A ideia de utilizar um espectrômetro que operasse com uma fonte contínua nunca foi esquecida, e os resultados obtidos com esta técnica se tornaram cada vez mais promissores, sendo o primeiro instrumento de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) descrito pelo grupo de Becker-Ross, em 1996. (WELZ *et al.*, 2003)

A figura 1 apresenta um arranjo esquemático de um HR-CS AAS, com a configuração utilizada atualmente. O equipamento contém uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão, que opera no modo *hot spot*, com a formação de um plasma, cuja emissão compreende a faixa contínua entre 190 e 850 nm. A lâmpada é operada a uma potência de 300W e é constituída por dois eletrodos com uma distância de 1mm dentre eles, com isso, a intensidade de emissão ultrapassa a de uma lâmpada de cátodo oco, utilizada na LS AAS. Embora os arcos sejam instáveis, seu posicionamento é corrigido por um espelho, controlado por computador, que garante que o feixe de radiação esteja sempre incidindo no centro do atomizador. (WELZ *et al.*, 2014)

Figura 1- Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS). No esquema, estão representados: (1) lâmpada de arco curto de Xe; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabólicos; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede echelle e (9) detector CCD. (Adaptada de Borges *et al.*, 2005)



A radiação incidente, após passar pelo atomizador, é direcionada ao monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (*Double-Echelle Monochromator*), onde incidirá num prisma, e em uma rede de difração echelle, em arranjo Littrow. O prisma tem como papel ser o pré-dispersor, ou seja, o prisma seleciona a parte do espectro de interesse, enquanto que a rede *echelle* fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado, de aproximadamente 2 pm por *pixel* no ultravioleta. O comprimento de onda de interesse é, desta forma, selecionado pela rotação do prisma e da rede de difração para posições pré-ajustadas, através de motores de passos sobre os quais estes componentes estão fixados. (BORGES *et al.*, 2005).

Para a estabilização de comprimentos de onda, um sistema contendo uma lâmpada de neônio foi desenvolvido, onde esta lâmpada fica posicionada em frente à fenda intermediária, emitindo várias linhas relativamente estreitas. As linhas emitidas são resolvidas pela rede de *echelle*, e incidem sobre o detector, sendo atribuídas a um *pixel*, e o *software* do instrumento confere se a linha está posicionada no *pixel* esperado para o intervalo espectral selecionado.

A radiação emitida e transmitida, após todo o processo de separação, atinge o detector que é constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD), que opera com 512 *pixels*, como detectores independentes, sendo 200 utilizados para os propósitos

analíticos. Cada *pixel* é equipado com um amplificador individual, sendo lidos simultaneamente os 200 *pixels* de propósito analítico. Com isso, todo ambiente espectral, desde ± 200 pm ao redor da linha analítica na região do ultravioleta até ± 500 pm na região do visível do espectro torna-se “visível”, fornecendo uma série de informações que eram indisponíveis quando utilizados instrumentos convencionais. (BORGES *et al.*, 2005)

Com a introdução do detector de arranjo CCD, empregado na HR-CS AAS, é possível avaliar uma terceira dimensão do fenômeno que ocorre no atomizador. Então, quando utilizada a HR-CS AAS, podemos visualizar os dados de três formas distintas: o tradicional sinal da absorvância *versus* o tempo, o sinal de absorvância integrada *versus* comprimento de onda, e a imagem tridimensional, que mostra a absorvância como função do tempo e do comprimento de onda. (WELZ *et al.*, 2014)

O instrumento é controlado por um *software* que permite o processamento total dos dados após a leitura, o que é particularmente útil e interessante devido à grande quantidade de informações obtidas com HR-CS AAS. (BORGES *et al.*, 2005). Uma das características principais do *software* é a capacidade que o mesmo tem de corrigir automaticamente eventos que afetam de maneira similar todos os *pixels* do detector. Embora todos os *pixels* sejam iluminados pela mesma fonte de radiação e “lidos” simultaneamente, apenas alguns deles, normalmente o *pixel* central e os *pixels* laterais (+1 e -1), são utilizados para medir a absorvância atômica. Porém, podem ser selecionados outros *pixels* ou conjunto de *pixels* para corrigir efeitos como flutuações de intensidade da lâmpada, uma vez que qualquer efeito atinge, obviamente, todos os *pixels* da mesma maneira. Portanto, como todos os *pixels* são iluminados e “lidos” simultaneamente, mesmo se houverem mudanças rápidas na intensidade de emissão, estas podem ser corrigidas perfeitamente. O *software* usado também permite a correção de qualquer absorção molecular com estrutura fina rotacional, podendo ser realizada de quatro maneiras: automaticamente via *software* para eventos contínuos, separando temporalmente o sinal atômico do sinal de fundo, através do ajuste do intervalo de integração do sinal, separando espectralmente o sinal atômico do sinal de fundo, ou subtraindo o espectro do fundo do espectro de determinada amostra através de um algoritmo de mínimos quadrados, quando há sobreposição espectral e temporal do sinal do analito e do fundo.

3.4.2 GF AAS

A técnica de GF AAS foi desenvolvida por L'vov em 1959. Nesta técnica, um forno de grafite é utilizado como atomizador, o qual é aquecido, longitudinal ou transversalmente, por resistência à passagem de uma alta corrente elétrica a baixa voltagem através do forno. O

tipo de aquecimento, longitudinal ou transversal, influencia diretamente na análise. O aquecimento de forma transversal do forno permite uma temperatura uniforme, sendo assim, esse tipo de aquecimento evita a condensação de átomos nas extremidades mais frias do tubo, como ocorre quando utilizado aquecimento longitudinal, e possibilita condições apropriadas para formação de átomos livres ao longo de todo o atomizador, sendo o aquecimento mais recomendado. Os fornos também podem ser classificados em fornos com ou sem plataforma.

A introdução do uso da plataforma por Slavin (1981), com o conceito Forno-Plataforma de Temperatura Estabilizada, foi de grande importância, pois ela pode ser utilizada tanto para amostras líquidas, quanto para amostras sólidas, tornando a técnica mais versátil, sensível e confiável para a determinação de elementos traço e ultra traço, por proporcionar uma melhor reprodutibilidade para a técnica.

Para as medidas em forno de grafite, um volume/massa conhecido (a) de amostra é dispensado dentro do forno, podendo ser de 10 a 40 μL , quando se trata de amostras líquidas. No caso de amostras sólidas, a massa de amostra inserida no atomizador irá variar de acordo com a composição e densidade da amostra. As amostras líquidas podem ser introduzidas diretamente na parede do forno de grafite ou sobre uma plataforma. Já as amostras sólidas, são sempre introduzidas no forno, sobre a plataforma de grafite.

Após a amostra estar dentro do forno, o mesmo passa por um programa de temperatura, que inclui as etapas de secagem, pirólise, atomização e limpeza do forno, onde a temperatura é aumentada gradativamente para remover o solvente e os concomitantes da amostra e separá-los do analito, tanto quanto possível, antes da etapa de atomização ser iniciada. A etapa de secagem é a primeira etapa do processo, nela, a amostra passa por um aquecimento com intuito de remover o solvente da mesma. A etapa de pirólise é aquela onde a amostra passa pelo aquecimento com o objetivo de eliminar a matriz da amostra, antes que seja iniciada a etapa de atomização. Dependendo da natureza da amostra, elevadas temperaturas de pirólise são requeridas para eliminar efetivamente os concomitantes. Entretanto, deve-se ter cuidado com a escolha da temperatura, para que o analito não seja volatilizado durante esta etapa, sendo assim, faz-se necessário a otimização da temperatura máxima de pirólise, a qual é feita pela construção de curvas de pirólise. Após a etapa de pirólise, a temperatura do forno é aumentada e o analito é atomizado. A otimização da temperatura de atomização é feita fixando-se a temperatura de pirólise estipulada e modificando-se a temperatura de atomização, a fim de determinar a melhor temperatura em que todo analito é atomizado. Uma vez que toda amostra introduzida no forno é atomizada em

um curto intervalo de tempo, um sinal transiente, em função do tempo, é gerado. A área deste sinal, absorvância integrada, é proporcional a massa de analito inserida no forno.

Durante todo programa de aquecimento aplicado no forno de grafite, é utilizado argônio como gás de proteção e de purga, exceto na etapa de atomização, quando o gás de purga é interrompido. O argônio tem como função proteger o forno de grafite de entrar em combustão, e também tem a função de carregar para fora do forno os gases provenientes das etapas de secagem e pirólise, evitando que estes interfiram na leitura das medidas na etapa de atomização.

Os elementos químicos podem estar em diferentes formas dependendo de cada matriz da amostra, apresentando volatilidades diferentes, que acarretariam em erros na determinação. Para evitar esses possíveis erros, modificadores químicos são inseridos no forno de grafite juntamente com a amostra, tendo como função principal, estabilizar termicamente o analito ou atuar na amostra, a fim de tornar as propriedades químicas e físicas do analito nos padrões de calibração e nas amostras o mais próximo possível.

A técnica de GF AAS fornece limites de detecção melhores se comparada com a F AAS, pois o analito permanece por mais tempo no atomizador e a percentagem de atomização da amostra introduzida é 100%, enquanto que apenas 5% da solução aspirada chega à chama na F AAS.

3.5 Determinação de cromo em medicamentos por GF AAS

O cromo, dentre os elementos traços, é o que apresenta uma determinação mais complicada. Segundo Thomaidis e Piperaki (2000), isso se deve às perdas de sensibilidade ao analisar matrizes complexas, devido à ocorrência de efeitos de memória, a difícil correção do sinal de fundo usando como corretor de fundo a lâmpada de deutério e a necessidade de extremo cuidado para evitar contaminação durante a etapa de preparo da amostra. Por esses motivos, as determinações de cromo em amostras apresentam um erro percentual mais alto do que o relatado para outros elementos. Porém, apesar de se tratar de uma determinação mais complicada, a mesma pode ser obtida com sucesso, desde que as condições preliminares sejam bem estabelecidas, e todas as etapas do programa de aquecimento sejam otimizadas cuidadosamente. Neste trabalho, visando minimizar erros de correção de fundo, a técnica de HR-CS GF AAS será empregada.

Alguns trabalhos relatam a determinação de cromo em sulfato de bário empregado na preparação de suspensões a serem usadas como contraste radiológico (BOLZAN, 2007), em medicamentos anti-hipertensivos, como relatado por Silveira, em medicamentos à base de

cefalexina e ciprofloxacino (R. De Paula *et al.*, 2012), e em medicamentos fitoterápicos e suas matérias-primas, relatado por Souza Filho e Cassella (2012). Outros autores utilizam a técnica de GF AAS para determinação de outros elementos em fármacos, como o trabalho realizado por Santos (2006), que realizou a determinação de arsênio, antimônio e chumbo em antimoniato de meglumina. Porém, dentre os trabalhos citados anteriormente, somente a determinação feita por Bolzan (2007), em sulfato de bário, foi realizada empregando a análise direta de amostras sólidas por GF AAS.

O cromo, por ser um elemento não volátil, não requer o uso de modificadores durante sua determinação por GF AAS. A atomização do elemento acontece em duas etapas: primeiramente, o cromo forma carbetos estáveis até temperaturas de aproximadamente 1200 °C com o carbono proveniente do forno de grafite, durante as etapas de secagem e pirólise. Em um segundo momento, em temperaturas mais altas, como a utilizada para atomização, o carbeto de cromo é convertidos em cromo no estado gasoso e carbono. Assim, devido a formação de carbetos estáveis, geralmente não há necessidade do uso de modificadores químicos para a determinação de cromo por GF AAS. (THOMAIDIS E PIPERAKI, 2000)

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e reagentes

Os recipientes utilizados para armazenamento de amostras, soluções padrão, bem como a vidraria utilizada para a preparação das soluções, foram lavados e descontaminados pela imersão em um banho de 10% (v/v) de ácido nítrico em água ultra pura, por no mínimo 24 horas. Após, os recipientes foram enxaguados com água ultra pura em excesso e secos.

As soluções padrão aquosas usadas foram preparadas a partir de diluições adequadas de uma solução estoque de 1000 mg.L^{-1} de cromo Specsol (QuimLab, Brasil) em ácido nítrico $0,014 \text{ mol.L}^{-1}$.

4.2 Amostras e preparo de amostras

A escolha dos medicamentos à serem analisados foi realizada baseando-se nas vendas da Farmácia de Manipulação Sanar, que relacionou as amostras disponibilizadas como as mais consumidas pelos seus clientes, e disponibilizou medicamentos para diferentes sintomas, como forma de demonstrar que o consumo de fármacos é considerado grande, independente do tipo de problema de saúde que seus consumidores tenham. Os medicamentos analisados foram os seguintes: furosemida, que é indicado como diurético pelos médicos, a sinvastatina, que é utilizada no tratamento de colesterol, o atenolol, utilizado para o tratamento de pressão alta, e o paracetamol, muito usado no tratamento de dores de cabeça.

Neste trabalho foram empregados dois grupos de amostras de medicamentos: comprimidos industrializados e princípio ativo. As amostras de comprimidos industrializados foram adquiridas em diferentes farmácias, sendo todas provenientes de laboratórios farmacêuticos conhecidos. Já as amostras de princípio ativo, matérias-primas puras, empregadas na fabricação de comprimidos manipulados, foram adquiridas junto à farmácia de manipulação, citada anteriormente. As tabelas 2 e 3 apresentam as especificações dos medicamentos analisados.

No caso das amostras na forma de comprimidos, as mesmas foram trituradas em gral de ágata, sendo depois armazenadas em recipientes apropriados. As amostras de matérias-primas adquiridas na farmácia foram transferidas diretamente para os frascos descontaminados.

Tabela 2 - Lista de medicamentos, com seus respectivos excipientes, obtidos de indústrias farmacêuticas na forma de comprimidos.

Medicamento	Dose	Marca	Lote	Validade	Cor	Excipientes
Sinvastatina	20mg	LEGRAND	645984	06/2016	Vermelho	Lactose monoidratada, celulose microcristalina, amido pré-gelatinizado, croscarmelose sódica, butil-hidroxitolueno, ácido cítrico, ácido ascórbico, copovidona, dióxido de silício, ácido esteárico, hiprometose+macrogol, eticelulose, dióxido de titânio, óxido de ferro amarelo, óxido de ferro vermelho, álcool etílico.
Furosemida	40mg	TEUTO	7031177	09/2016	Branco	Amido, manitol, talco, estearato de magnésio, celulose microcristalina e água de osmose reversa.
Atenolol	50mg	BIOSINTÉTICA	1305390	05/2015	Branco	carbonato de magnésio, amido, gelatina, laurilsulfato de sódio, amidoglicolato de sódio e estearato de magnésio.
Paracetamol	750mg	PRATI-DONADUZZI	13H02D	07/2015	Branco	povidona, lactose monoidratada, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, copolímero de polivinil álcool-polietilenoglicol e macrogol.
Paracetamol	750mg	BIOSINTÉTICA	1309213	07/2015	Branco	povidona, amidoglicolato de sódio, amido, ácido esteárico, álcool polivinílico, macrogol, talco e dióxido de titânio.

Tabela 3 - Amostras de princípio ativo, e suas respectivas características, matérias-primas obtidas diretamente do fornecedor na farmácia de manipulação.

Matéria-prima pura	Lote	Fornecedor	Validade	cor
Furosemida	14083909J	Pharma Nostra	30/03/2019	Branco
Sinvastatina	SV135/09/2014	Gemini	31/07/2017	Branco
Atenolol	1141A2RII	PharmaNostra	01/02/2016	Branco
Paracetamol	13114624B	PharmaNostra	30/03/2019	Branco

4.3 Equipamentos

A determinação de cromo nas amostras foi realizada utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua, modelo ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Alemanha), equipado com dois tipos de atomizadores em diferentes compartimentos, chama e forno de grafite aquecido transversalmente, sendo utilizado somente o atomizador de forno de grafite para a realização do trabalho. O equipamento possui uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade operando no modo *hot-spot*, que serve como fonte de radiação contínua e cobre uma faixa espectral entre 190 e 900 nm.

As medidas dos sinais de absorvância foram realizadas no comprimento de onda de 357,868 nm, que corresponde à linha analítica com 100% de sensibilidade relativa para o cromo, monitorando-se 3 *pixels* (central e ± 1).

As análises foram realizadas utilizando fornos de grafite aquecidos transversalmente e plataforma de grafite para amostragem sólida. Argônio foi utilizado como gás de purga, com pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil), com uma vazão de 2 L.min⁻¹ em todas as etapas de aquecimento, sendo interrompida somente na etapa de atomização. O programa de aquecimento do forno de grafite utilizado na determinação de cromo é mostrado na tabela 4.

Tabela 4 - Programa de aquecimento do forno de grafite para determinação de cromo.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa de aquecimento (°C/s)	Tempo (s)
Secagem 1	90	30	20
Secagem 2	120	10	20
Pirólise	1200	500	30
Atomização	2600	3000	6
Limpeza	2650	1000	5

As amostras foram pesadas diretamente sobre as plataformas de SS, utilizando uma microbalança M2P (Sartorius, Göttingen, Alemanha). As soluções padrão foram inseridas na plataforma com auxílio de uma micropipeta, utilizando sempre um volume fixo de 10 µL. Em ambos os casos, a plataforma foi inserida no atomizador com o auxílio de uma pinça pré-

ajustada, que é parte do acessório de amostragem sólida manual modelo SSA 6 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha).

4.4 Validação do método

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação chamada validação. A validação de um método é um processo contínuo, que começa desde o planejamento da estratégia analítica a ser usada, até o desenvolvimento do mesmo.

O conceito de validação usado pela ANVISA (2003) diz que “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. Por isso, um processo de validação bem executado e documentado é determinante para que às agências reguladoras concluam que os métodos e os sistemas utilizados são adequados para o uso desejado.

Os parâmetros analíticos, conhecidos como parâmetros de mérito, normalmente analisados para validação de métodos são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez.

No desenvolvimento deste método, serão analisados: a linearidade e faixa de aplicação, expressa como uma equação de reta chamada curva de calibração; a exatidão, determinada pela análise de um material de referência certificado e pelo teste de recuperação; a precisão, através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) e os limites de detecção e quantificação do método proposto. (RIBANI *et al.*, 2004)

4.4.1 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação matemática entre o sinal analítico e a concentração ou massa da espécie deve ser determinada empiricamente, e muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada curva de calibração. (RIBANI *et al.*, 2004)

A área do pico dos sinais de absorvância atômica foi empregada para avaliação do sinal analítico. As condições otimizadas do programa de aquecimento foram empregadas para a construção da curva de calibração. Para a determinação de cromo nas amostras de medicamentos, foi construída a curva de calibração, na linha analítica de 357,8687 nm, utilizando-se um branco e seis soluções padrão aquosas. As soluções padrão empregadas correspondem à de massa de 25 a 400 pg de Cr, correspondendo ao intervalo de concentração de 2,5 a 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, tendo sido medidas em triplicata.

4.4.2 Limite de detecção, limite de quantificação e Massa característica

O limite de detecção, LOD, corresponde à quantidade de analito mínima detectável, com uma dada certeza analítica. É uma medida da concentração ou massa do analito que, quando excedida, permite o reconhecimento, com uma dada certeza estatística, que a quantidade de analito na amostra é maior que a do branco da mesma. (WELZ, 1999). O LOD, normalmente, é determinado pela equação 1:

$$LOD = \frac{3\sigma}{S} \quad (1)$$

onde σ é o desvio padrão de 10 medidas do branco da amostra e S é o coeficiente angular da curva de calibração, também conhecido como sensibilidade.

O limite de quantificação, LOQ, pode ser definido como a menor massa ou concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente, com um risco de erro menor que 5%. (WELZ, 1999). O limite de quantificação é calculado pela equação 2:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (2)$$

onde σ é o desvio padrão das medidas do branco e S , como mencionado anteriormente, é o coeficiente angular da curva de calibração.

As medidas do branco, usadas para os cálculos do LOD e LOQ, realizadas nesse trabalho foram realizadas de acordo com a técnica de “resposta de massa zero”, ou seja, a plataforma foi introduzida vazia no atomizador repetidamente, rodando o ciclo completo de atomização.

A massa característica, m_o , é definida como a massa de analito necessária para produzir um sinal de absorvância integrada de 0,0044 s. A m_o foi calculada por regra de três utilizando um dos padrões da curva de calibração.

4.4.3 Exatidão

A exatidão do método é definida como sendo a capacidade do método em produzir resultados que sejam concordantes com o valor considerado como verdadeiro. (HARRIS, 2012)

A exatidão do método foi verificada através de teste de recuperação e análise de material de referência certificado (CRM) de chá, Tea NCS ZC 73012, produzido pela China National Analysis Center for Iron and Steel (Beijing, China).

Para realização do teste de recuperação, foram escolhidas três amostras, atenolol e furosemida, do fornecedor Phama Nostra, e a sinvastatina, do fornecedor Gemini. O teste foi realizado fazendo-se, primeiramente, a leitura da absorvância de 5 µL da solução padrão de 10 µg/L, que corresponde à introdução de 50 pg de cromo no forno, e das amostras separadamente, e num segundo momento, fazendo-se a leitura do mesmo volume de solução padrão junto com cada amostra, utilizando o programada de aquecimento do forno de grafite mostrado na tabela 4. O resultado foi obtido comparando-se os valores obtidos separadamente com os valores obtidos quando a solução padrão e as amostras foram colocadas juntas no equipamento para análise.

Para validação do método utilizando-se o CRM de, cinco alíquotas do CRM foram analisadas, e foi realizada a comparação do valor médio de concentração de cromo obtido, com o valor de concentração certificado do CRM, utilizando o teste *student t*.

O teste *student t* é frequentemente usado para expressar intervalos de confiança e para a comparação de resultados de experimentos diferentes. O intervalo de confiança é calculado pela equação 3, onde t é o valor do teste *student t*, tabelado, para um intervalo de confiança desejado, no caso deste trabalho, de 95%. (HARRIS, 2012)

$$\text{Intervalo de confiança} = \bar{X} \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Onde \bar{X} é a média do valor obtido para as amostras, t é o t tabelado, s é o desvio padrão das amostras, e n é o número de medidas realizadas.

Quando calcula-se o intervalo de confiança para as amostras, e o valor considerado verdadeiro se encontra nesse intervalo, pode-se dizer que tem-se 95% de confiança de que os valores obtidos estão de acordo com o valor de referência do CRM (verdadeiro), sendo assim, pode-se dizer que o método é exato.

4.4.4 Precisão

A dispersão de resultados entre ensaios, independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas representa a precisão do método. Pode ser avaliada pelo desvio padrão absoluto, pelo intervalo de confiança ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Neste trabalho, a precisão será expressa através do RSD, calculado a partir de 5 replicatas da amostra.

O valor de RSD pode ser calculado pela equação 4:

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (4)$$

onde s é o desvio padrão calculado a partir de 5 replicatas e \bar{X} a média dos valores de concentração.

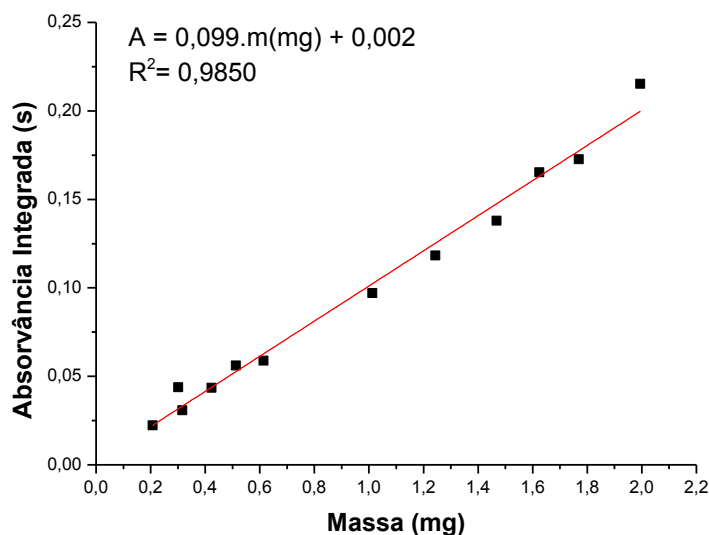
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos de massas

Para duas amostras, furosemida, do fornecedor Pharma Nostra, e sinvastatina, do laboratório Legrand, foram realizados estudos do efeito da massa de amostra pesada nos valores de absorvância medidos, para averiguar se a massa introduzida no atomizador influenciava os resultados das medidas. Para tanto, foi avaliado a linearidade de resposta através de um gráfico de absorvância integrada *versus* massa de amostra.

Para o estudo da influência da massa de amostra, no caso da furosemida, massas de amostras numa faixa de 0,20 a 2,20 mg foram inseridas no forno, e suas absorvâncias integradas medidas. Na figura 2, é apresentada a relação entre os valores de absorvância integrada medidas e a massa de amostra de furosemida inserida no forno. Como se pode notar, na figura 2, que há um aumento linear da absorvância com o aumento da massa de amostra, pelo menos quando massas de até 2 mg foram empregadas. Massas maiores de amostra não foram empregadas devido a capacidade da plataforma de grafite não suportar.

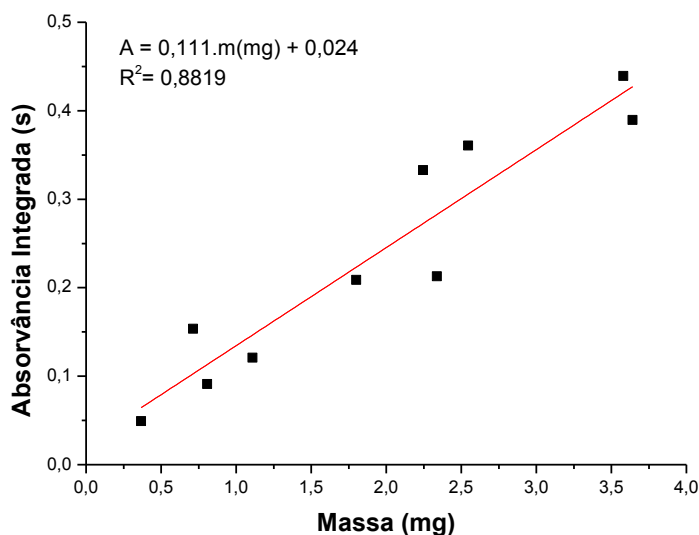
Figura 2 - Variação do valor de absorvância integrada do cromo com a quantidade de amostra de furosemida (Pharma Nostra). Tp 1200 °C, Ta 2600 °C.



O mesmo estudo também foi realizado para a sinvastatina. Neste caso, as massas pesadas de amostra de sinvastatina variaram entre 0,36 e 3,64 mg. A figura 3 representa a correlação dos valores medidos de absorvância integrada em relação às massas de sinvastatina pesadas. Como é possível observar, há um aumento proporcional da absorvância com o

aumento da massa de amostra, indicando que qualquer massa de amostra nesse intervalo pode ser empregada para as medidas.

Figura 3 - Variação do valor de absorvância integrada do cromo com a mudança de massa de amostra de sinvastatina (Legrand). T_p 1200 °C, T_a 2600 °C.



Portanto, como no caso das duas amostras estudadas houve linearidade de resposta nas curvas, quaisquer massas de amostras pesadas nos intervalos estudados não gerariam erros nas medidas de absorvância. Isto sugere que qualquer matriz inserida no forno não interfere na estabilidade do elemento. Portanto, a quantidade de amostra a ser pesada dependerá, principalmente, do teor de cromo nas amostras, isto é, para amostras com baixa concentração de analito, massas maiores de amostra podem ser empregadas e vice-versa.

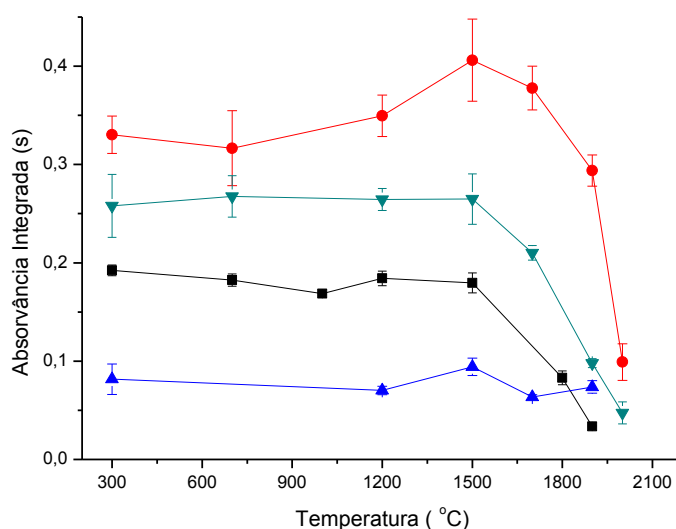
5.2 Otimização do programa de aquecimento do forno de grafite

Para realizar a otimização das temperaturas de pirólise e atomização, foram construídas curvas de pirólise e atomização empregando-se amostras e solução padrão aquosa de Cr. As curvas de pirólise foram realizadas empregando-se uma solução padrão aquosa ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) de Cr contendo 100 pg de analito, uma amostra de comprimidos comerciais (sinvastatina) e duas amostras de princípios ativos (sinvastatina e furosemida); a temperatura de atomização foi mantida fixa em 2600 °C. As curvas estão apresentadas na figura 4. Como se pode observar, nos quatro casos, solução padrão e amostras de medicamentos, o decréscimo do valor de absorvância só ocorre por volta de 1500 °C, ocorrendo um patamar entre 300 e 1500°C para a solução padrão e amostras sinvastatina Gemini e furosemida P. Nostra. A amostra de sinvastatina Legrand apresentou um pequeno aumento no valor de

absorvância entre 1200 e 1500 °C, mas considerando-se os desvios padrões das absorvâncias para o intervalo, este aumento não é significativo. Sendo assim, a temperatura de pirólise foi definida em 1200 °C, pois com essa temperatura é possível a completa eliminação da matriz, não apresentando sinal de fundo nas medidas, e como há formação de patamar na região que abrange de 300 a 1500 °C, não é preciso escolher uma temperatura de pirólise muito elevada, o que auxilia na prorrogação da vida útil do forno de grafite.

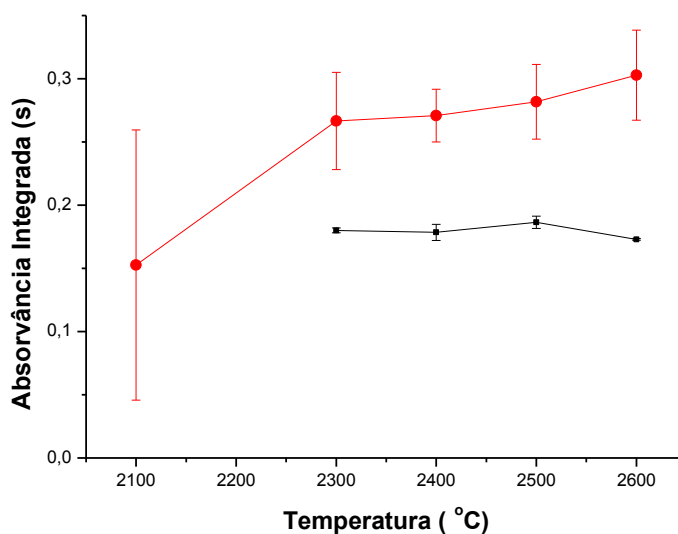
O fato do cromo apresentar o mesmo comportamento térmico na solução padrão e nas amostras, isto é serem estáveis de 300 à 1500 °C, demonstra que, como já era esperado, o cromo não é um elemento volátil e, portanto, não requer o uso de modificadores químicos.

Figura 4- Curvas de pirólise para cromo na (●) amostra de sinvastatina, Legrand, absorvância normalizada para 0,5 mg, (▼) amostra de sinvastatina, Gemini, absorvância normalizada para 0,5 mg, (▲) amostra de furosemida, P. Nostra, absorvância normalizada para 0,5 mg, e (■) 100 pg de Cr em 10 µL de solução padrão em 0,014 mol.L⁻¹ HNO₃. Ta=2600°C.



Após determinada a temperatura de pirólise, foram construídas as curvas de atomização. A partir desse momento, a temperatura de pirólise foi fixada em 1200 °C, e a temperatura de atomização foi variada para a solução padrão de cromo (10 µg.L⁻¹) e para a amostra de sinvastatina em comprimidos, do laboratório farmacêutico Legrand, obtendo-se as curvas de atomização mostradas na figura 5. Somente uma amostra foi investigada, pois na otimização da temperatura de pirólise, as três amostras estudadas apresentaram comportamentos semelhantes frente às temperaturas estudadas. Portanto, julgou-se desnecessário o estudo com mais de uma amostra de medicamento.

Figura 5- Curvas de atomização para (●) amostra de sinvastatina, Legrand, absorvância normalizada para 0,5 mg, (■) 100 pg de Cr em 10 μ L de solução padrão em 0,014 mol.L⁻¹ HNO₃. T_p= 1200°C.



Pode-se observar, na figura 5, que os valores de absorvância integrada da amostra, na temperatura de 2100 °C apresentaram um grande desvio padrão, que pode ser explicado pelo fato de que nem todo cromo está sendo liberado da superfície do grafite e atomizado. Portanto, visando a minimização do número de experimentos, esta temperatura de atomização não foi investigada para o padrão.

Como no intervalo de 2300 a 2600 °C, as duas curvas apresentaram um patamar, a escolha da temperatura ideal de atomização foi realizada analisando-se os perfis dos picos da absorvância em função do tempo, como mostrado nas figuras 6 e 7.

Figura 6 - Perfis de absorção atômica para o cromo na solução padrão de $10\mu\text{L.L}^{-1}$: (—) $A_{\text{int}}=0,17886$, $T_a=2400^\circ\text{C}$, (—) $A_{\text{int}}=0,18775$, $T_a=2500^\circ\text{C}$, (—) $A_{\text{int}}=0,17315$, $T_a=2600^\circ\text{C}$.

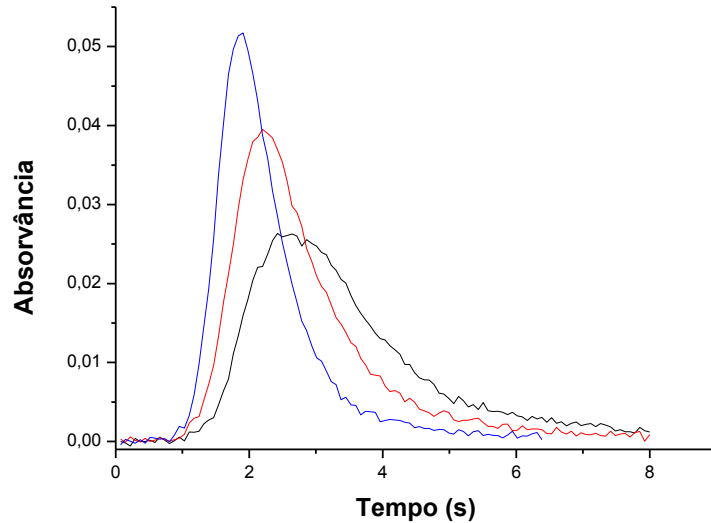
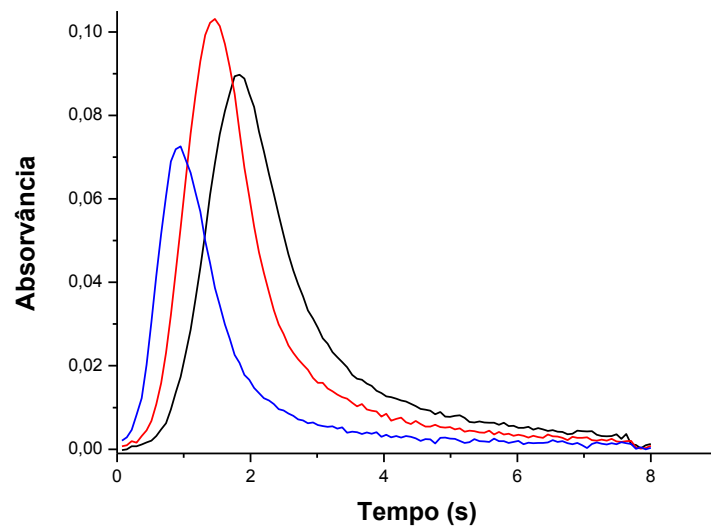


Figura 7 - Perfis de absorção atômica para o cromo em amostras de sinvastatina, Legrand: (—) 0,471 mg de sinvastatina, $A_{\text{int}}=0,17886$ s, $T_a=2400^\circ\text{C}$, (—) 0,418 mg de sinvastatina, $A_{\text{int}}=0,18775$ s, $T_a=2500^\circ\text{C}$, (—) 0,368 mg de sinvastatina, $A_{\text{int}}=0,17315$ s, $T_a=2600^\circ\text{C}$.



Como se pode observar nas figuras 6 e 7, o pico de absorvância referente à temperatura de 2600°C , nos dois casos, apresenta uma melhor resolução, visto que na figura 6 este pico apresenta um menor tempo de atomização, assim como na figura 7, e também os dois picos nessa temperatura apresentaram uma largura de base menor. Empregando-se a temperatura de 2600°C , um tempo de integração menor pode ser utilizado, o que irá,

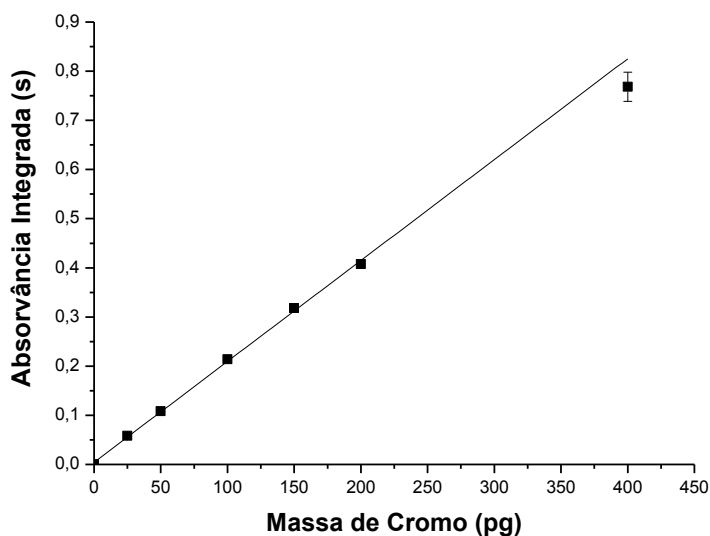
consequentemente, contribuir para a diminuição do ruído e melhora dos valores de LOD e LOQ. Por esses motivos, a temperatura de atomização ideal escolhida foi de 2600 °C.

5.3 Validação do método

5.3.1 Curva de calibração, LOD, LOQ e m_0

Após a otimização das condições experimentais, foram determinados os parâmetros de mérito do método desenvolvido. A curva de calibração, mostrada na figura 8, foi obtida utilizando-se 10 µL de diferentes soluções padrão aquosas, correspondentes à massas de 25 a 400 pg de cromo, submetidos ao programa de aquecimento otimizado, conforme descrito na seção 5.3. A curva apresentou boa linearidade para toda a faixa de massas empregada, num intervalo de absorvância de, aproximadamente, 0 a 0,8 s.

Figura 8 - Curva de calibração para os padrões aquosos de cromo. $T_p= 1200$ °C, $T_a= 2600$ °C.



A equação da reta obtida para a curva de calibração, bem como os valores de LOD, LOQ e m_0 foram calculados e estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de mérito para determinação de cromo em amostras de medicamentos.

Parâmetros		Cromo
Equação da Reta		$A = 0,00205.m(\text{pg})$ $+ 0,00442$
R		0,9980
LOD	Instrumental	2,9 pg
	Método*	$0,83 \text{ ng.g}^{-1}$
LOQ	Instrumental	9,7 pg
	Método*	$2,8 \text{ ng.g}^{-1}$
m_0		2,0 pg

*valores calculados para 3,5 mg de amostra.

Os valores obtidos de LOD e LOQ se encontram bem abaixo do valor limite de impurezas permitido pela Farmacopeia Brasileira em fórmulas farmacêuticas para o cromo, $25 \mu\text{g.g}^{-1}$. Portanto, o método desenvolvido pode ser aplicado para determinação de cromo em medicamentos, devido ao fato de que quantidades a níveis traço serão detectadas na análise.

Zmozinski *et al.* (2015) determinou cromo em taninos empregando a mesma técnica utilizada neste trabalho e obteve como resultados uma massa característica de 2,20 pg, e valores de 17 e $57 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para LOD e LOQ, respectivamente, para massa de 0,25 mg de amostra. A massa característica obtida está de acordo com o reportado por Zmozinski *et al.*, e os limites obtidos com o método proposto são ligeiramente melhores, se os recalcularmos para as mesmas massas pesadas por Zmozinski *et al.*(2015).

5.3.2 Exatidão

Foram realizados testes de recuperação com três amostras: atenolol e furosemida, ambos do fornecedor Pharma Nostra, e com a sinvastatina, do fornecedor Gemini, conforme descrito na seção 4.5.3. Os resultados obtidos estão na tabela 6, mostrada a seguir. Como se pode observar, para todas as amostras, os valores de recuperação foram superiores à 86%, sendo considerados bastante satisfatórios.

Tabela 6 - Resultados do teste de recuperação de cromo após adição de padrão de cromo junto à amostra.

Amostra	Recuperação (%)
Atenolol, Pharma Nostra	95
Furosemida, Pharma Nostra	95
Sinvastatina, Gemini	86

Para os ensaios de exatidão com a utilização do CRM, foi avaliada a exatidão das medidas utilizando o material de referência certificado de chá, Tea NCS ZC 73012, utilizando os padrões aquosos para a calibração. Foram realizadas cinco medidas do CRM, e posteriormente, foi calculada a concentração média de cromo no mesmo. O valor encontrado de Cr no CRM foi de $0,507 \pm 0,009 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

O CRM escolhido, possui uma concentração de cromo de $0,45 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Baseando-se no teste *Student t*, com nível de confiança de 95%, o valor de concentração obtida para o CRM é concordante com o valor certificado, para intervalo de confiança de 95%, concluindo-se que o método desenvolvido apresenta uma boa exatidão, podendo ser utilizado para as determinações de cromo de medicamentos.

5.3.3 Precisão

Em todas as medidas realizadas, foi calculado o valor de RSD, sendo sempre atingido um valor menor que 10%, exceto no caso do paracetamol, do laboratório Prati-donaduzzi, que foi obtido um RSD de 11,2%.

5.4 Determinação de cromo nas amostras

Após a realização da otimização e validação do método proposto, analisadas amostras de medicamentos foram analisadas, em triplicata, dentro das condições especificadas na seção 4.3, obtendo-se os resultados mostrados na tabela 7.

Tabela 7 - Resultados para as concentrações de cromo encontradas nas amostras utilizando análise direta de amostras sólidas com GF AAS.

Amostra	Classificação	Concentração de Cromo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD (%)
Atenolol, Pharma Nostra	Princípio ativo	$0,143 \pm 0,005$	3,7
Furosemida, Pharma Nostra	Princípio ativo	$0,072 \pm 0,006$	9,4
Furosemida, Teuto	Comprimido comercial	$0,133 \pm 0,015$	9,9
Paracetamol, Pharma Nostra	Princípio ativo	< LOD	-
Paracetamol, Biosintética	Comprimido comercial	$0,093 \pm 0,009$	8,9
Paracetamol, Prati- donaduzzi	Comprimido comercial	$0,329 \pm 0,004$	11,2
Sinvastatina, Gemini	Princípio ativo	$0,315 \pm 0,027$	8,7
Sinvastatina, Legrand	Comprimido comercial	$0,307 \pm 0,023$	7,6

Como se pode observar, pela tabela 6, no caso do paracetamol há grande diferença entre os resultados da matéria-prima e dos comprimidos dos dois laboratórios. Observa-se que o princípio ativo apresenta concentração de Cr inferior ao LOD. Já nos comprimidos, a amostra da Prati-donaduzzi apresentou concentração de Cr aproximadamente 3,5 vezes maior que a amostra da Biosintética, o que sugere que os laboratórios estão sujeitos a diferentes tipos ou graus de contaminação por cromo durante a fabricação do medicamento em comprimidos.

Se observarmos os resultados para furosemida, em que os comprimidos obtidos do laboratório Teuto apresentaram concentração de $0,133 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, enquanto que a matéria-prima pura, do fornecedor Pharma Nostra, tem concentração de $0,072 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, podemos concluir também que durante o processo de fabricação de comprimidos há uma contaminação por metais pesados, que pode ser proveniente do processo de manipulação do mesmo na indústria ou do uso de algum excipiente contaminado. Com os resultados, também podemos concluir que todos os medicamentos analisados estão de acordo com os limites informados pela

Farmacopeia Brasileira, o qual estabelece o limite máximo de cromo em medicamentos, de uso oral, de $25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

A amostra de atenolol em comprimido apresentou um fundo estruturado, que coincidiu no tempo e comprimento de onda com o sinal do cromo, como mostrado na figura 9. Comparando-se as figuras 9, 10 e 11, é possível observar o sinal de fundo bem nítido na amostra de atenolol do laboratório Biosintética (figura 9), enquanto que no caso da amostra de atenolol princípio ativo (figura 10) e do padrão de 10 μg de cromo (figura 11) observa-se somente o pico referente a absorção de cromo. Apesar das vantagens e eficiência de correção de fundo da técnica de HR-CS GF AAS, esse sinal de fundo, encontrado na amostra de atenolol em comprimidos, não foi identificado e o mesmo não pôde ser corrigido. Por isso, esta amostra não foi quantificada.

Figura 9 - Amostra de atenolol, Biosintética. $T_p= 1200 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_a= 2600 \text{ }^\circ\text{C}$.

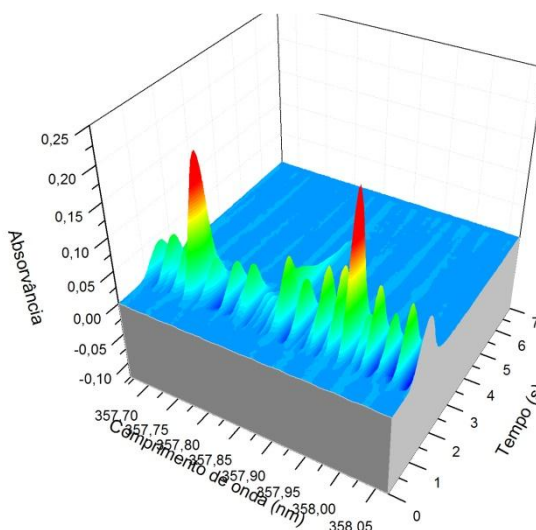


Figura 10 - Amostra de atenolol, Pharma Nostra. $T_p= 1200 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_a= 2600 \text{ }^\circ\text{C}$.

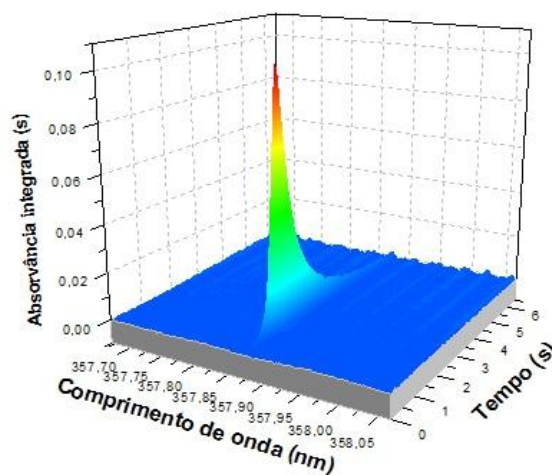
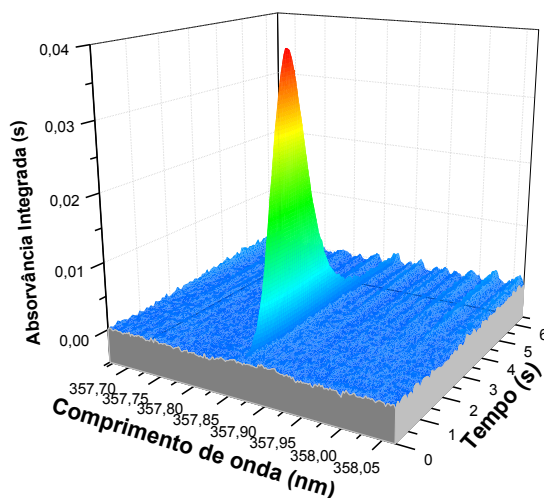


Figura 11 - Padrão de cromo, $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. $T_p= 1200 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_a= 2600 \text{ }^\circ\text{C}$.



Os comprimidos de furosemida e sinvastatina foram pesados, fazendo-se a média da massa de cinco comprimidos por fármaco, para que se pudesse quantificar a quantidade de cromo por comprimido. A média das massas e a quantidade de cromo calculada por comprimido encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da quantidade em massa de cromo por comprimido de amostra. Desvio padrão calculado para cinco comprimidos.

Amostra	Massa média do comprimido (g)	Quantidade de cromo em cada comprimido (μg)
Furosemida, Teuto	$0,203 \pm 0,001$	0,027
Sinvastatina, Legrand	$0,212 \pm 0,003$	0,065

Conforme visto na tabela 1, na seção 3.2, a quantidade estabelecida pela ANVISA para ingestão diária de cromo está muito acima daquelas que foram encontradas nos comprimidos. Isto sugere que a ingestão desses medicamentos não prejudicaria a saúde de um paciente, visto que a quantidade de cromo em cada comprimido está bem abaixo do limite de ingestão diária recomendado.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do método analítico simples, rápido de ser aplicado, preciso e exato para a determinação de cromo em medicamentos utilizando a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com forno de grafite e análise direta de amostras sólidas foi concluído com sucesso.

A técnica escolhida para o método gerou resultados satisfatórios – precisos e exatos – para a determinação do cromo em medicamentos, o que foi comprovado pela análise do CRM e testes de recuperação.

As concentrações de cromo encontradas nos medicamentos escolhidos variaram entre 0,07 a 0,33 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Porém, mesmo estando contaminados, as concentrações de cromo se encontram dentro dos padrões requeridos pela Farmacopeia Brasileira, e também, de acordo com os valores estipulados pela ANVISA.

Portanto, o método desenvolvido apresentou resultados satisfatórios, e pode ser empregado na determinação de cromo em medicamentos utilizando a técnica de HR-CS GF AAS com introdução da amostra sólida, utilizando somente a moagem como pré-tratamento da amostra.

7 REFERÊNCIAS

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). **Toxicological Profile for Chromium**. United States Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1998.

ANVISA: resolução RDC n° 269. 2005. Disponível em : <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1884970047457811857dd53fbc4c6735/RDC_269_2005.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 02 de Maio 2015.

BARIN, J. S. **Desenvolvimento de procedimentos alternativos de preparo e de determinação de metais pesados em fármacos tricíclicos**. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

BOLZAN, R. C. **Determinação de arsênio e cromo em insumos farmacêuticos contendo enxofre por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e análise direta de amostras sólidas**. 2007. 125 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

BORGES, D. L.G.; CURTIUS, A.J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista analytica Florianópolis**, n. 18, p. 58-67, 2005.

DUFFUS, J. H. Heavy metals – A meaningless term?. **Pure and Applied Chemistry**. v. 74, n. 5, p.793-807, 2002.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Fundação Oswaldo Cruz. 2010.

GOMES, M. R., ROGERO, M. M., TIRAPEGUI, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 5, 2005.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. Cap. 4, p. 77-80.

HAWKES, S. J. What is a heavy metal?. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 11, p. 1374, 1997.

LEWEN, N. The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 653-661, 2011.

NEMA, N. K. *et al.* Determination of trace and heavy metals in some commoly used medicinal herbs in Ayurveda. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 10, p. 964-968, 2014.

O'BRIEN, T. J., CERYAK, S., PATIERNO, S. R. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular responde, repair and recovery mechanisms. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 533, p. 3-36, 2003.

PASCALICCHIO, A. A. E. **Contaminação por metais pesados: saúde pública e medicina ortomolecular**, 1.ed. São Paulo: Annablume, 2002, p. 29.

R. DE PAULA, C. E. *et al.* Avaliação de métodos de extração para determinação de cromo e níquel em formulações farmacêuticas e em matérias-primas usadas na fabricação de medicamentos à base de cefalexina e ciprofloxacino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1858-1864, 2012.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SANTOS, E. P. **Determinação de espécies de arsênio, antimônio e chumbo em antimoniato de meglumina por espectrometria de absorção atômica após extração em fase sólida**. 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

SILVEIRA, J. N. ; LARA, P. C. P. ; Waldomiro borges ; SILVA, J. B. B. . **Determinação de Cromo em Medicamentos Anti-hipertensivos por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite**. In: 30 ENCONTRO ANUAL DA SBQ, 2007, ÁGUAS DE LINDÓIA. LIVRO DE RESUMOS DO 30 SBQ ANUAL, 2007. v. ACEITO.

SLAVIN, M., MANNING, D. C. CARNRICK, G. R. The stabilized temperature platform furnace. **At. Spectrosc.**, v. 2, p. 137-145, 1981.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8.ed., São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SNOW, E. T. Metal carcinogenesis: mechanistic implications. **Pharmac. Ther.**, v. 53, p. 31-65, 1992.

SOUZA FILHO, M. L., CASSELLA, R. J. Determinação de cobre e cromo em medicamentos fitoterápicos e suas matérias-primas empregando diferentes métodos de tratamento de amostras. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 61, p. 78-86, 2012.

THOMAIDIS, N. S., PIPERAKI, E. A. Effect of chemical modifiers on the kinetic parameters characterizing the electrothermal atomization of chromium. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 55, p. 611-627, 2000.

WELZ, B. SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**, 3rd.ed., Weinheim: WILEY-VCH, 1999, 941 p.

WELZ, B. BECKER-ROSS, H., FLOREK, S., HEITMANN, U., VALE, M. G. R. High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry – what can we expect?. **Journal the Brazilian Chemical Society**, v.14, No. 55, p. 220-229, 2003.

WELZ, B., VALE, M. G. R., PEREIRA, E. R., CASTILHO, I. N. B., DESSUY, M. B. Continuum source atomic absorption spectrometry: past, present and future aspects – a critical review. **Journal the Brazilian Chemical Society**, v.. 25, No. 5, 799-821, 2014.

ZMOZINSKI, A. V., PRETTO, T., BORGES, A. R., VALE, M. G. R. Determination of Cd and Cr in tannin samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample sequential analysis (HR-CS SS-GF AAS). **Analytical Methods**, v. 7, p.3735-3741, 2015.