



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



UENDERSON ARAUJO BARBOSA

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE
ESPÉCIES INORGÂNICAS EM MEDICAMENTOS UTILIZADOS
NO TRATAMENTO DE ANEMIA FERROPRIVA**

Salvador
2015

UENDERSON ARAUJO BARBOSA

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO
DE ESPÉCIES INORGÂNICAS EM MEDICAMENTOS
UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE ANEMIA
FERROPRIVA**

Tese apresentada ao colegiado dos Cursos de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do grau de doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof. Dr^a Ana Maria Pinto dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Luis Costa Ferreira

Salvador

2015

A Deus, por me abençoar sempre e, particularmente, na realização deste trabalho.

Hoje dedico maior parte desta trajetória a meus pais. Essenciais, guerreiros e, sobretudo, amorosos... Obrigado Tatá e Ana (*pinho* e *mainha*),
isso aqui é pra vocês.

Com amor, aos meus irmãos Altanir e Samira pelo apoio incondicional.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a. Ana Maria Pinto dos Santos, por ter depositado confiança em mim desde o mestrado e por saber que terei uma amiga de carreira científica. Ao escrever esta tese, tive uma retrospectiva da trajetória que percorri para chegar ao mestrado e, conseqüentemente, o doutorado. Devo parte disso a ti, Aninha! De todo o meu coração, muitíssimo obrigado.

Ao Professor Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira, pela co-orientação neste trabalho que foi indispensável, pelos momentos de descontração, pela compreensão, confiança, amizade, por todas as oportunidades que ele me proporcionou e, além de uma referência científica, poder dizer que é meu amigo. Lembro-me de uma vez que você me disse que existem pessoas que sentimos que tínhamos a obrigação de conhecer para nos mudar como pessoa e, tenho absoluta certeza, que você foi uma dessas. Com você dei excelentes risadas, tomei excelentes broncas, ouvi e tomei para mim excelentes conselhos, além de também ouvir muitas palavras de ânimo e encorajamento. Obrigado, Serginho.

À Tamires de Lima (miga) por ser sempre presente em minha vida, desde a graduação e me garantindo sempre uma amizade mais do que verdadeira. Sou muito grato de ter você presente em minha vida, me encorajando e me colocando pra cima. Obrigado!

À minha amiga Ivanice, por toda uma trajetória desde o mestrado que perdurou no doutorado. Por saber que é uma amiga para todos os momentos, desde lavar vidrarias, tomar chuva andando em Santiago de Compostela, até gastar em inúmeras compras passeando pela Passeig de Gracia, em Barcelona.

Aos meus doutores preferidos, Débora Correia, Maurício Muñoz e Adriana Caires pela amizade, momentos de descontração e por me ouvirem sempre que precisei. Sem esquecer-me de Laiana Bastos, que sempre me socorreu quando a busquei, sempre demonstrou estar preocupada comigo e pela ajuda indispensável em parte desse trabalho.

Um agradecimento a Augusto Cezar (a pessoa mais inteligente que já conheci) por representar pra mim uma amizade verdadeira, repleta de sentimentos, sensações, jargões, aventuras, vontades e sonhos. Muito obrigado amigo por todos os momentos de descontração, de encorajamento, pelas interpretações farmacológicas, pelas viagens e por ser pra mim a prova de que independente do tempo, uma amizade pode ser fiel e verdadeira. É a amizade, viu querido?

Aos meus amigos irmãos de vida, Laira, Daniel, Luciana Mota, Francine, Mariane e Sibeli, muito obrigado por todo apoio e por suportarem minhas crises de saturação de estudos, vocês tornaram uma experiência que seria difícil em muito fácil, não me deixaram sentir longe nem por um momento. Amo-vos.

A uma pessoa que representa muito para mim, Sissy Ribeiro, por saber que poderei contar pra sempre e ser minha amiga para todos os momentos, do choro ao riso.

A André Araujo, um segundo pai que aprendi a amar muito por partilhar dos meus anseios e, sem questionar, ajudar-me sempre que precisei e me encontrava desesperado. Sempre solucionando e me apoiando. Palavras não seriam suficientes para descrever aqui minha gratidão.

À Douglas Gonçalves, pela pessoa maravilhosa que é! Pelo carinho e todos os momentos excelentes que vi e vivi com esta amizade. Para mim, uma grande referência de ser humano.

A todos os companheiros do laboratório GRPQQ, de maneira singular à Fernanda, Liz, Emmanuelle, Arlene, Luana, Lorena, Luise, Ariana, Daniel Levi, Flávia, Gabriela Marinho, Gabriele, Dominique, Leonardo, Gabriela, Jucelino, Shirlei, Cheilane, Queila, Michael, Vitinho,

Anderson, Walter e Geysa pelo companheirismo e por proporcionarem prazerosos momentos, regados às excelentes conversas. Não posso esquecer-me de Geraldo Matos e Daniel Lima que sempre estiveram dispostos a ajudar. Um obrigado em especial a Nuno, pela amizade, por me suportar no laboratório e trabalhar comigo.

Um muito obrigado a Geovani Brandão (Jhow) pela maravilhosa pessoa que é; de enorme coração e sempre prestativo.

Um agradecimento para quatro bofes do GRPQQ por terem conquistado a minha amizade, por preservá-la com respeito e, sobretudo, com sinceridade. Buga, Mário, Danilo e Caio, muito obrigado.

Aos companheiros do laboratório GETEE, na Universidad de Santiago de Compostela - Espanha, em especial à Roi por todas as conversas, passeios, momentos e companheirismo, que fez minha estadia ficar muito melhor. E mais agradecimentos à Mercedes, Juan, Begoña, Allah, Javier, Sara, Carolina, Paloma, Raquel e Manolo. Ao professor Antonio Moreda por todos os cafés recheados às boas risadas. Às professoras Elena e Maria Carmen por toda orientação e ajuda e, sobretudo, à Professora Pilar Bermejo, pela oportunidade, por ser humana e sensível às questões alheias. Foi um prazer enorme integrar esta equipe, Muchas Gracias.

Aos meus “abigos” de nova jornada, Felipe, Alexandre, Sergio, Joilton, Mayara, Marcelo, Vicente, Rodrigo, Erika, Dayana, Bia, Gabi e Lucas por serem sempre compreensíveis com as minhas questões, pela ajuda sem questionar e sempre estarem dispostos.

Obrigado Thiago Sisan por todo apoio e por ser uma pessoa muito importante pra mim. Valeu por ouvir-me muitas vezes!

Obrigado à Luciana Mota, Juninho e Vinícius Oliveira por sempre estarem próximos. Sem esquecer-me de Grênivel Costa que independente de distância está sempre perto. Amo tanto! Obrigado a Andressa e Fabrizio por serem tão legais comigo, aprendi a amar vocês.

Um grupo de pessoas que foram fundamentais para o meu estágio na Espanha. Meus queridos amigos, Rui César, Nilda, Gal e Andrea. Em especial à Luciana Hamburgo por representar um misto de sensações em uma amizade maravilhosa e à Natalie Itaparica pela pessoa ímpar que é! Vocês foram partes fundamentais dessa trajetória.

Aos amigos Paulo e John pela amizade, apoio e por partilhar momentos maravilhosos. Sei que independente de distância, poderei sempre contar com vocês.

Às colegas dos laboratórios vizinhos, Gabriel, Jack, Luana Araújo, Chirlene, Isa e Roberta. Um agradecimento também a France, por toda paciência e prestatividade

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia.

À CAPES e o CNPq pelas bolsas concedidas. À FAPESB pelos auxílios para participação nos congressos.

Sem querer esquecer-me de ninguém, a todos, o meu muitíssimo obrigado!

*"a minha história não termina aqui,
Deus me conhece e sabe o melhor pra mim..."*

ABSTRACT

In this thesis work analytical strategies have been proposed for toxicological assessment of metals and metalloids in medicines used to treat iron deficiency anemia, using chromatographic and non-chromatographic techniques. In the first part of this thesis, lead was determined in drugs using electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). Sample preparation was performed using acid digestion in digester block with reflux system "cold finger" using 3 mL of HNO₃ (69% v / v) and 1 mL of H₂O₂ (30% v / v). Pyrolysis and atomization temperatures were optimized using a mixture of palladium and magnesium as conventional chemical modifier, yielding 1100 °C and 2000 °C for pyrolysis and atomization, respectively. With a characteristic mass of 21.3 pg and 0.25 and 0.82 µg g⁻¹, for limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), respectively. The accuracy, expressed as relative standard deviation was 5.92% for a sample with lead concentration of 2.98 µg g⁻¹. The accuracy was evaluated by comparing the results obtained by ETAAS and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Lead concentrations found in samples ranged between 0.096 and 7.068 µg g⁻¹. In the second part of this work, the determination of mercury using slurry sampling and high resolution continuous source cold vapor atomic absorption spectroscopy (HR-CS CVAAS) was performed. The optimum conditions for preparation of slurries (1.5 mol L⁻¹ HCl, 1.25% (w / v) thiourea and 15 minutes sonication) were optimized using a two level full factorial design. The limits of detection and quantification were 0.63 ng g⁻¹ and 2.11 ng g⁻¹, respectively. The relative standard deviation for accuracy evaluation was calculated using two samples with concentrations 4.82 and 9.61 ng g⁻¹ from which was obtained as results 10.89 and 6.84%, respectively. The possible loss of mercury was evaluated for the proposed procedure and the accuracy was studied by addition/recovery test, with recoveries ranging from 85.0 to 106.0%. Mercury concentrations ranged between 3.17 and 34.86 ng g⁻¹. The third part of this work describes the determination of macro and micro elements and the *in vitro* study of iron bioaccessibility in medicines used to treat iron deficiency anemia. It was used inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) measured as an analytical technique. Acid digestion treatment was conducted to the samples and the method was fully validated by demonstrating good sensitivity with quantification limits (mg L⁻¹) 0.52 for Ca, 0.14 for K, 0.03 for Mg, 0.07 for Mn, 0.40 for Na, 0.36 for P and 0.24 for Zn. The precision of the method was evaluated by intraday and interday repetitive experiments with results below 20%. During accuracy evaluation, addition/recovery tests were performed at different concentrations with results between 81.85 and 114.97%. The robustness of plasma was evaluated by a ratio between magnesium atomic and ionic lines, Mg(II)/Mg(I). The results were evaluated by multivariate analysis tools, principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). The study of *in vitro* bioaccessibility of Fe showed that some drugs are better bioaccessible, being therefore more recommended for anemia treatment, confirming data of pharmacological literature. The fourth part of this work describes the simultaneous determination of arsenic and chromium speciation using high-performance liquid chromatography coupled to ICP-MS (HPLC-ICP-MS). The total arsenic and chromium determination was carried out using an acid digestion in microwave oven, using a mixture of 4 mL HNO₃ (69% v / v)

and 1 mL of H₂O₂ (30% v / v) and analyzed by ICP-MS. For speciation, a study was performed with three possible procedures for extraction of species, being employed a procedure with water at 80 °C for 30 minutes in microwave energy. Using a mobile phase containing 1.0 mM tetrabutylammonium hydroxide (TBAH), 0.7 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 5% methanol (v / v) under pH 7.2 was possible the separation of the species present with retention time of 5 minutes with separation of As(III) As(V), Cr(III) and Cr(VI), with a LOD of 0.002, 0.003, 0.140 and 0.042 µg g⁻¹, respectively. The accuracy was assessed using addition/recovery tests, ranging between 80.64 and 109.36%. The method was applied in samples from Brazil and Spain.

Keywords: anemia, iron supplements, lead, ETAAS, mercury, slurry sampling, HR-CS CVAAS, thiourea, ICP OES, macro- and microelements, PCA, HCA, in vitro bioaccessibility, toxicology, arsenic, chromium, simultaneous speciation , ICP-MS, HPLC-ICP-MS Pharmacopoeia.

RESUMO

Neste trabalho foram propostas estratégias analíticas visando à avaliação toxicológica de metais e metaloides em medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva, empregando técnicas cromatográficas e não cromatográficas. Na primeira parte desta tese determinou-se chumbo nos medicamentos aplicando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). O preparo da amostra foi realizado fazendo uso de digestão ácida em bloco digestor com sistema de refluxo “dedo frio” usando 3 mL de HNO₃ (69% v/v) e 1 mL de H₂O₂ (30% v/v). Foram otimizadas as temperaturas de pirólise e atomização usando uma mistura de paládio e magnésio como modificador químico convencional, obtendo-se 1100°C e 2000°C para pirólise e atomização, respectivamente. Com uma massa característica de 21,3 pg e 0,25 e 0,82 µg L⁻¹, para os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), respectivamente. A precisão, expressa pelo desvio padrão relativo de 5,92% para uma amostra com concentração de chumbo igual a 2,98 µg g⁻¹. A exatidão foi estimada por comparação entre os resultados obtidos por ETAAS e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). As concentrações de chumbo nas amostras variaram entre 0,096 e 7,068 µg g⁻¹. Na segunda parte deste trabalho, foi efetuada a determinação de mercúrio através de amostragem em suspensão e espectrometria de absorção atômica com alta resolução e fonte contínua com geração de vapor frio (HR-CS CVAAS). As condições ótimas de preparo das suspensões (1,5 mol L⁻¹ de HCl, 1,25% (m/v) de tiourea e 15 minutos de sonicação) foram otimizadas por planejamento fatorial completo. Os limites de detecção e quantificação foram 0,63 ng g⁻¹ e 2,11 ng g⁻¹, respectivamente. O desvio padrão relativo para avaliação da precisão foi calculado usando duas amostras com concentrações 4,82 e 9,61 ng g⁻¹ com resultados 10,89 e 6,84%, respectivamente. Foi estimada a possível perda de mercúrio durante o procedimento proposto e a exatidão, mediante testes de adição e recuperação, variando entre 85,0 e 106,0%. As concentrações de mercúrio ficaram entre 3,17 e 34,86 ng g⁻¹. A terceira parte deste trabalho descreve a determinação de macro e microelementos e o estudo *in vitro* da bioacessibilidade de ferro em medicamentos usados no tratamento da anemia ferropriva. Foi escolhida a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) como técnica analítica de medida. Foi efetuada digestão ácida para tratamento das amostras e o método foi validado, demonstrando boa sensibilidade, com limites de quantificação (mg L⁻¹) 0,52 para Ca, 0,14 para K, 0,03 para Mg, 0,07 para Mn, 0,40 para Na, 0,36 para P e 0,24 para Zn. A precisão do método foi reconhecida mediante experimentos repetitivos intradia e interdía com resultados abaixo de 20%. Durante estudo da exatidão, testes de adição e recuperação foram executados em diferentes concentrações com resultados entre 81,85 e 114,97%. A robustez do plasma foi calculada mediante uma razão entre as linhas iônica e atômica de magnésio, Mg(II)/Mg(I) e os resultados, mediante análise componentes principais (PCA) e análise por agrupamentos hierárquicos (HCA). O estudo de bioacessibilidade *in vitro* de Fe demonstrou que alguns medicamentos são melhores bioacessíveis, sendo portanto, mais recomendados para o tratamento da anemia, comprovando dados da literatura farmacológica. Na quarta parte deste trabalho descreve-se o estudo da determinação e especiação simultânea de arsênio e cromo por

cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ICP-MS (HPLC-ICP-MS). A determinação total de arsênio e cromo foi realizada usando uma digestão ácida em forno de micro-ondas, uma mistura de 4 mL HNO₃ (69% v/v) e 1 mL de H₂O₂ (30% v/v) e análise por ICP-MS. Para o estudo de especiação foi elaborado um estudo com três possíveis procedimentos para extração das espécies, sendo selecionado um procedimento com água a 80°C por 30 minutos em energia de micro-ondas. Usando uma fase móvel contendo 1,0 mM de hidróxido de tetrabutilamônio (TBAH), 0,7 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 5% de metanol (v/v) em pH 7,2 foi possível separar as espécies presentes com tempo de retenção de 5 minutos com separação de As(III), As(V), Cr(III) e Cr(VI), com limites de detecção de 0,002, 0,003, 0,140 e 0,042 µg g⁻¹, respectivamente. A exatidão do método foi avaliada conforme testes de adição e recuperação, entre 80,64 e 109,36%. O método foi aplicado em amostras do Brasil e Espanha, com concentrações entre 0,1-1,3 e 0,18-62,27 µg g⁻¹ para As e Cr, respectivamente.

Palavras-chave: anemia, suplementos de ferro, chumbo, ETAAS, mercúrio, amostragem em suspensão, HR-CS CVAAS, tioureia, ICP OES, macro e microelementos, PCA, HCA, bioacessibilidade *in vitro*, toxicologia, arsênio, cromo, especiação simultânea, ICP-MS, HPLC-ICP-MS, farmacopeia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Procedimentos de preparo de amostra para o método de espectrometria atômica. (Reproduzido de: Farmacopeia Brasileira, 5ed. Pg 173)	29
Figura 1.2 - Diagrama esquemático de um instrumento de absorção atômica	32
Figura 1.3 - Ilustração do enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro.	46
Figura 2.1 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para uma solução de Pb ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) em padrão aquoso de Fe (1 g L^{-1}).	60
Figura 2.2 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para uma solução de Pb ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) em amostra de suplemento de ferro (FeSO_4).	60
Figura 2.3 - Avaliação do efeito de matriz: curva aquosa x curva com adição de padrão construída em medicamento de sulfato ferroso (FeSO_4).	62
Figura 3.1 Desenho esquemático do sistema de geração de vapor frio de mercúrio utilizando módulo HS50 adaptado, acoplado ao HR-CS AAS.	81
Figura 3.2 – Pico de absorvância de mercúrio para (a): experimento com adição de tioureia e sonicação da amostra a 60°C ; (b): experimento de adição de $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio na amostra de sulfato ferroso.	85
Figura 3.3 - Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo (2^3)	87
Figura 3.4 - Superfícies de resposta (a) = (Abs x T de Sonicação x C Tioureia) ; (b) = (Abs x Conc de HCl x C Tioureia) e (c) = (Abs x T de Sonicação x Conc de HCl).	88
Figura 3.5 – Curva univariada de otimização para a concentração de tioureia visando o preparo da suspensão para a determinação de mercúrio em amostras de medicamentos de sulfato ferroso.	90
Figura 3.6 - Avaliação do efeito de matriz: curva aquosa x curva na solução artificial x curva na amostra.	94

Figura 4.1 Gráfico biplot para PC1 e PC2 para as amostras e variáveis (Suplemento de ferro - comprimidos sais orgânicos(●), comprimidos sais inorgânicos (○), líquidos sais orgânicos (■), líquidos sais inorgânicos (□).	129
Figura 4.2 Dendrograma para as amostras de suplementos de ferro mostrando o método de Ward com distância euclidiana	131
Figura 4.3 Gráfico de matriz para o comportamento das amostras para todos os analitos determinados	132
Figura 5.1 - Curvas de calibração com padrão aquoso (em azul) e curva de calibração com adição de analito (em vermelho) para arsênio.	154
Figura 5.2 - Curvas de calibração com padrão aquoso (em azul) e curva de calibração com adição de analito (em vermelho) para cromo.	154
Figura 5.3 Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo (2^3) para arsênio	162
Figura 5.4 - Gráfico de médias marginais (TempoxHCl) do planejamento fatorial completo (2^3) para arsênio	163
Figura 5.5 - Gráfico de médias marginais (TempoxHCl) do planejamento fatorial completo (2^3) para arsênio	164
Figura 5.6 Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo (2^3) para cromo	166
Figura 5.7 - Cromatograma obtido para uma solução padrão de arsênio ($100 \mu\text{g L}^{-1}$)	169
Figura 5.8 - Cromatograma obtido para a amostra utilizada no planejamento fatorial completo (experimento 1) com concentração de ácido clorídrico $0,2 \text{ mol/L}$.	170
Figura 5.9 - Cromatograma obtido para a amostra utilizada no planejamento fatorial completo (experimento 8) na ausência de ácido clorídrico.	170
Figura 5.10 - Cromatograma obtido para a amostra utilizada no planejamento fatorial completo (experimento 9) com concentração de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol/L}$.	171

- Figura 5.11 - Cromatograma obtido para uma solução padrão de arsênio ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) 172
- Figura 5.12 - Cromatograma obtido para a amostra utilizada no planejamento fatorial completo (experimento 1) com concentração de ácido clorídrico $0,2 \text{ mol/L}$. 173
- Figura 5.13 - Cromatogramas obtidos para as soluções padrão (100 ppb) em diferentes concentrações de HCl. Partes a) As(III) em HCl $0,1 \text{ mol/L}$ b) As(V) em HCl $0,1 \text{ mol/L}$ c) As(III) em HCl $0,2 \text{ mol/L}$ d) As(V) em HCl $0,2 \text{ mol/L}$. 175
- Figura 5.14. Curvas de extração para arsênio (em preto) e cromo (em azul) durante a variação do tempo e utilização de banho ultrasson. 178
- Figura 5.15 - Cromatogramas para soluções padrão de As(III) e As(V), em preto e para soluções padrão de Cr(III) e Cr(VI), em azul, lidas após duas horas do preparo. 181
- Figura 5.16 - Cromatogramas para soluções padrão de As(III) e As(V), em preto e para soluções padrão de Cr(III) e Cr(VI), em azul, lidas após vinte e quatro horas do preparo. 181

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Métodos propostos de preparo de amostras para determinação de impurezas metálicas em produtos farmacêuticos empregando técnicas espectroanalíticas.	31
Tabela 1.2 - Populações atendidas pelo programa nacional de suplementação de ferro e as principais condutas de intervenção.	44
Tabela 2.1 - Condições experimentais utilizadas no GFAAS.	54
Tabela 2.2 - Parâmetros instrumentais utilizados para determinação dos elementos no ICP-MS	55
Tabela 2.3 - Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de Pb usando GFAAS; uma taxa de fluxo interno de gás de 2,0 L min ⁻¹ foi utilizada, exceto durante a atomização, quando o fluxo de gás foi desligado.	59
Tabela 2.4 - Inclinações das curvas analíticas obtidas para cada uma das curvas propostas construídas empregando GFAAS com fonte de linhas.	62
Tabela 2.5 - Figuras de mérito para o método proposto visando a determinação de chumbo em suplementos de ferro por GFAAS.	65
Tabela 2.6 - Resultados encontrados na determinação de chumbo empregando GFAAS e ICP-MS	66
Tabela 3.1 - Exemplo de matriz de planejamento fatorial completo (2 ³)	77
Tabela 3.2 Matriz de planejamento 2 ³ , considerando as interações entre os fatores.	78
Tabela 3.3 Resumo das condições ótimas para determinação de mercúrio empregando HR-CS CVAAS.	82
Tabela 3.4 Resultados dos testes para volume de amostra nas condições ótimas para determinação de mercúrio empregando HR-CS CVAAS.	83

Tabela 3.5 - Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com valores reais e codificados e as respostas analíticas em absorvância.	86
Tabela 3.6- Resumo das condições ótimas para determinação de mercúrio empregando em medicamentos para anemia empregando HR-CS CVAAS.	91
Tabela 3.7 - Avaliação da perda de mercúrio durante a execução do método analítico proposto para determinação empregando amostragem em suspensão e HR-CS CVAAS.	92
Tabela 3.8 – Equações das curvas analíticas obtidas para cada uma das curvas propostas construídas empregando HR-CS CVAAS para determinação de mercúrio empregando amostragem em suspensão.	93
Tabela 3.9 – Ensaios de adição e recuperação (Teste Spike)	96
Tabela 3.10 - Determinação de mercúrio em amostras de medicamentos de sulfato ferroso	98
Tabela 4.1 Matriz de dados demonstrando exemplo para um conjunto de dados obtidos para n casos e m variáveis.	106
Table 4.2. Parâmetros instrumentais usados no ICP OES	115
Tabela 4.3 Figuras de mérito do método analítico proposto para avaliação da linearidade e sensibilidade da determinação de macro e microelementos em suplementos de ferro.	119
Tabela 4.4 Resultados dos testes de adição e recuperação (Spike) para avaliação da exatidão do método.	120
Tabela 4.5 Resultados dos estudos de precisão para os analitos determinados nos experimentos de precisão intermédia e precisão intradia.	121
Tabela 4.6 Resultados dos experimentos para avaliação da robustez do método empregando as linhas de emissão iônica e atômica do Mg.	122
Tabela 4.7 Determinação de Ca, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em amostras de	124

suplementos de ferro por tipo de amostra (mg Kg^{-1}).

Tabela 4.8 Pesos das variáveis para as duas primeiras componentes principais.	128
Tabela 4.9 Resultados do teor de macro e microelementos em medicamentos de suplementos de ferro (mg Kg^{-1}).	134
Tabela 4.10 Concentrações bioacessíveis de ferro obtidas pelo método da digestão gastrointestinal (teste de bioacessibilidade <i>in vitro</i>) dos medicamentos estudados.	137
Tabela 5.1 Condições instrumentais para determinação de As e Cr empregando ICP-MS.	150
Tabela 5.2 Condições instrumentais para separação cromatográfica.	151
Tabela 5.3 Programa de digestão para as amostras de suplementos de ferro empregando micro-ondas.	152
Tabela 5.4 Inclinações das curvas analíticas obtidas para As e Cr ($\text{L } \mu\text{g}^{-1} \pm \text{s}$)	155
Tabela 5.5 Resultados obtidos para os testes de adição/recuperação para a determinação total de As por ICP-MS.	157
Tabela 5.6 Resultados obtidos para os testes de adição/recuperação para a determinação total de Cr por ICP-MS.	157
Tabela 5.7 Condições ótimas para a separação cromatográfica das espécies de As e Cr.	159
Tabela 5.8 Condições estudadas no domínio experimental para extração de As e Cr.	160
Tabela 5.9 Matriz e resultados do planejamento fatorial completo (2^3) para avaliação da extração de As e Cr empregando ultrasson e HCl.	161
Tabela 5.10 - Valores dos efeitos calculados para os fatores estudados.	165
Tabela 5.11- Valores dos efeitos calculados para os fatores estudados.	167

Tabela 5.12 - Resultados de extração para As e Cr empregando banho ultrassônico. 177

Tabela 5.13 - Áreas obtidas para soluções padrão de As(III), As(V), Cr(III) e Cr(VI), em diferentes tempos de leitura após o preparo e suas razões para avaliação de ocorrências de reações de oxidorredução. 180

Tabela 5.14 - Resultados de limites de detecção e quantificação calculados para o método proposto. 183

Tabela 5.15. Resultados obtidos para os testes de adição/recuperação para a especificação de As e Cr por HPLC-ICP-MS. 184

Tabela 5.16 Resultados obtidos para a determinação total de As e Cr em suplementos de ferro, empregando ICP-MS. 186

Tabela 5.17 Resultados obtidos para a especificação de As e Cr em suplementos de ferro, empregando HPLC-ICP-MS. 187

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Intermediário Farmacêutico Ativo (do inglês, Active Pharmaceutical Intermediate)
CRM	Material de referência certificado (do inglês, certified reference material)
CVAAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (do inglês, cold vapour atomic absorption spectrometry)
DMT-1	Transportador de metal divalente 1 (do inglês, divalent metal transporter 1)
DNA	Acido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)
DSS-ETAAS	Amostragem sólida direta acoplada à espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (do inglês, direct solid sampling coupled electrothermal atomic absorption spectrometry)
EC	Eletroforese capilar
EDL	Lâmpada de descarga sem eletrodos. (do inglês, electrodeless discharge lamp)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, Ethylenediamine tetraacetic acid)
ETAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (do inglês, electrothermal atomic absorption spectrometry)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês, Flame Atomic Absorption Spectrometry)
FPT	Ferroportina (do inglês, Ferroportin)
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês, Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)
HCA	Análise de agrupamentos hierárquicos (do inglês, Hierarchical Cluster Analysis)
HCL	Lâmpada de Cátodo Oco (do inglês, hollow-cathode lamp)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-ICP-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, High

	Performance Liquide Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
HR-CS	Alta resolução e fonte contínua (do inglês, High Resolution Continuous Source)
ICP OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (do inglês, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês, inductively coupled plasma mass spectrometry)
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada (do inglês, International United Pure Applied Chemistry)
KED	Discriminação de energia cinética (do inglês, Kinetic Energy Discrimination)
LD	Limite de detecção
LIBS	Espectrometria de emissão em plasma induzido por laser (do inglês, Laser-induced breakdown spectroscopy)
LQ	Limite de quantificação
MS	Ministério da Saúde
NIR	Espectrometria de infravermelho próximo (do inglês, Near-infrared spectroscopy)
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês, National Institute of Standards and Technology)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBET	Extração baseado fisiologicamente (do inglês, Physiologically Based Extraction Test)
PC	Componente principal (do inglês, Principal component)
PCA	Análise de componentes principais (do inglês, Principal component analysis)
pH	Potencial hidrogeniônico
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês, relative standard deviation)
SBET	Extração simples de bioacessibilidade (do inglês, Simple Bioaccessibility Extraction)
SUS	Sistema único de saúde

TBAH	Hidróxido de Tetrabutílamônio (do inglês, Tetrabutylammonium hydroxide)
THGA	Tubo atomizador de aquecimento transversal
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance (do inglês, Ultra Performance Liquid Chromatography)
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos (do inglês, United States Pharmacopoeia)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A importância da análise de medicamentos	25
1.2 Tratamento de amostras de medicamentos para fins analíticos	26
1.3 Técnicas espectroanalíticas usadas na determinação de metais em medicamentos	32
1.4 Noções básicas de toxicologia	35
1.5 Determinação de metais e metalóides em produtos farmacêuticos empregando técnicas espectroanalíticas	36
1.6 Anemia ferropriva	42
1.7 Sulfato ferroso e seus processos de obtenção	46

CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM SUPLEMENTOS DE FERRO EMPREGANDO ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA

2.1 Introdução	51
2.2 O chumbo e a importância da sua determinação	52
2.3 Objetivos	53
2.3.1 Objetivo geral	53
2.3.2 Objetivos específicos	53
2.4 Parte experimental	54
2.4.1 Análise por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS)	54
2.4.2 Análise por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	55
2.4.3 Reagentes e limpeza dos materiais	55
2.4.4 Amostras	56
2.4.4.1 Preparo das amostras de suplementos de ferro	57
2.5 Resultados e discussões	58
2.5.1 Estudo do comportamento eletrotérmico: construção das curvas de temperatura de pirólise e atomização	58
2.5.2 Avaliação do efeito de matriz e escolha da técnica de calibração	61
2.5.3 Precisão	63
2.5.4 Massa característica	63
2.5.5 Limites de detecção e quantificação	64
2.5.6 Resumo das figuras de mérito para determinação em GFAAS	65
2.5.7 Aplicação do método	65
2.6 Considerações parciais	68

CAPÍTULO III - DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM SUPLEMENTOS DE FERRO EMPREGANDO AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO E HR-CS CVAAS

3.1 Introdução	70
3.2 Fundamentação teórica	72
3.2.1 O mercúrio	72
3.2.2 Determinação de mercúrio por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio	72
3.2.3 Amostragem em suspensão	73
3.2.4 Otimização multivariada	75
3.2.4.1 Planejamento fatorial completo de dois níveis	75
3.3 Objetivos	80
3.3.1 Objetivo geral	80

3.3.2	Objetivos específicos	80
3.4	Parte experimental	81
3.4.1	Equipamentos e acessórios	81
3.5	Resultados e discussões	82
3.5.1	Estudos preliminares	82
3.5.2	Otimização das condições experimentais para preparo das suspensões	85
3.5.3	Otimização univariada da concentração de tioureia	89
3.5.4	Avaliação da perda de mercúrio durante o procedimento proposto	91
3.5.5	Validação do método	92
3.5.6	Aplicação do método proposto	96
3.5.7	Considerações parciais	101
CAPÍTULO IV - DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICRO ELEMENTOS E ESTUDO DE BIOACESSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE FERRO EM MEDICAMENTOS USADOS PARA TRATAMENTO DA ANEMIA FERROPRIVA		
4.1	Introdução	103
4.2	Análise exploratória dos dados	105
4.3	Aplicações da análise multivariada em estudos farmacêuticos	109
4.4	Estudo de bioacessibilidade	112
4.5	Objetivos	114
4.5.1	Objetivo geral	114
4.5.2	Objetivos específicos	114
4.6	Parte experimental	115
4.6.1	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)	115
4.6.2	Materiais e reagentes	115
4.6.3	Amostras	116
4.6.4	Preparo das amostras utilizando bloco digestor e dedo frio	116
4.6.5	Procedimento para estudo da bioacessibilidade de ferro das amostras	117
4.7	Resultados e discussão	118
4.7.1	Estudo de validação	118
4.7.2	Determinação de macro e microelementos em suplementos de ferro	122
4.7.3	Análise de componentes principais	127
4.7.4	Análise por agrupamentos hierárquicos	130
4.7.5	Gráfico de matriz	131
4.7.6	Avaliação do teor de macro e microelementos em suplementos de ferro	133
4.7.7	Avaliação da bioacessibilidade de ferro em suplementos de ferro	135
4.8	Considerações parciais	139
CAPÍTULO V - DETERMINAÇÃO E ESPECIAÇÃO SIMULTÂNEA DE ARSÊNIO E CROMO EM SUPLEMENTOS DE FERRO EMPREGANDO HPLC-ICP-MS		
5.1	Introdução	141
5.2	Arsênio e cromo em produtos farmacêuticos	143
5.3	Especiação de arsênio e cromo	144
5.4	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ICP-MS	146
5.5	Objetivos	148
5.5.1	Objetivo geral	148
5.5.2	Objetivos específicos	148
5.6	Parte experimental	149
5.6.1	Instrumentação, materiais e reagentes	149
5.6.2	Determinação total de arsênio e cromo por ICP-MS	150
5.6.3	Separação de arsênio e cromo por HPLC	151

5.7 Resultados e discussão	152
5.7.1 Determinação do teor total de arsênio e cromo	152
5.7.1.1 Estudo do efeito de matriz	153
5.7.1.2 Validação analítica	156
5.7.2 Especificação de arsênio e cromo	158
5.7.2.1 Condições otimizadas de separação por HPLC	159
5.7.3 Otimização das condições de extração das espécies de arsênio e cromo	159
5.7.3.1 Estudo de extração empregando ultrassom focalizado e meio ácido	159
5.7.3.2 Interpretação dos resultados para extração de arsênio	161
5.7.3.3 Interpretação dos resultados para extração de cromo	165
5.7.3.4 Análise do planejamento fatorial completo empregando HPLC-ICP-MS	168
5.7.4 Estudo da extração empregando banho ultrassônico	176
5.7.5 Estudo da extração empregando energia de micro-ondas	178
5.7.6 Estudo da estabilidade das espécies de cromo e arsênio	179
5.7.7 Validação analítica	182
5.7.8 Aplicação da determinação de arsênio e cromo em suplementos de ferro	185
5.8. Considerações parciais	188
CAPÍTULO VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS	189
REFERÊNCIAS	192

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS

A segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos compõem um arsenal de questões fundamentais da importância da terapêutica medicamentosa. A segurança de um medicamento a ser usado em uma terapêutica é determinada pelo seu perfil farmacológico-toxicológico, bem como, os efeitos adversos causados pelas impurezas presentes, relacionadas com a sua dosagem [1].

As impurezas em medicamentos muitas vezes possuem efeitos farmacológicos e toxicológicos indesejados, sem quaisquer benefícios em sua administração [1]. Dessa forma, é fácil entender que, os produtos destinados ao consumo humano precisam, obrigatoriamente, serem classificados como seguros em sua totalidade. O monitoramento e o controle dessas impurezas, em geral, nos dão uma garantia da qualidade e segurança de um medicamento [2, 3].

Muitos elementos químicos possuem suas toxicidades conhecidas e têm sido documentadas há muitos anos. Existem relatos antigos de que era evidente a exposição por chumbo e seu poder prejudicial. Atualmente, sua neurotoxicidade é descrita com clareza e conhecida como um potente fator prejudicial à fisiologia humana, interferindo na inteligência, memória, atenção, velocidade de processamento de informações, linguagem, habilidades visuais, motoras e até mesmo, afetando o humor [4, 5]. Toxicólogos permanecem estudando os efeitos dos elementos químicos sobre os seres humanos e estabelecendo, a partir disto, limites máximos e revendo limites já estabelecidos, com o intuito de promover a segurança. Criou-se uma necessidade de testar produtos farmacêuticos para investigar diversos elementos que podem estar contaminando e promovendo impurezas.

As impurezas inorgânicas, de um modo geral, são originadas de diversas fontes em suas diferentes fases, ou seja, matérias-primas, reagentes, solventes, eletrodos, catalisadores, recipientes de reações entre outros equipamentos utilizados durante a síntese de produtos farmacêuticos. Todas estas fontes citadas são características das vias de um processo de síntese de

produtos farmacêuticos [6]. O paládio e seus compostos, impurezas frequentes de vários medicamentos são monitorados rotineiramente, há décadas, evitando possíveis contaminações nos produtos finais [7].

O monitoramento de metais pesados em intermediários dos processos de produção, incluindo avaliação final do medicamento, são atividades essenciais na indústria farmacêutica. Deve-se considerar essa importância, não somente por causa da presença do metal, mas também pelos níveis a serem considerados, uma vez que é sabido que toxicidade está diretamente relacionada com a concentração da substância considerada tóxica ali presente [1].

Este controle de qualidade de produtos farmacêuticos é uma etapa de grande valor na produção de medicamentos e compreende a amostragem, verificação das especificações, ensaios de controle de qualidade, procedimentos de organização e geração de documentação para liberação do medicamento, atestando dessa forma, a segurança do medicamento que passou pelas etapas de controle. Visando esse controle, a Farmacopeia Brasileira enfatiza os ensaios que, obrigatoriamente, devem ser realizados para a garantia da qualidade dos produtos farmacêuticos produzidos. Dentre estes ensaios, destacam-se: identificação, doseamento e pureza. Entre os contaminantes inorgânicos mais comuns podemos destacar os metais pesados, o cloreto e o sulfato [8]. Além da Farmacopeia Brasileira, a USP (Farmacopeia dos Estados Unidos) também propõe alguns ensaios para a garantia da qualidade de medicamentos e tem sido considerada referência mundial [9].

1.2 TRATAMENTO DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS PARA FINS ANALÍTICOS

A Química Analítica oferece subsídios para a avaliação da segurança dos medicamentos, visando a determinação de metais e substâncias consideradas tóxicas ao organismo humano. Hoje em dia, os metais e metalóides, com destaque para os metais pesados, têm recebido atenção especial em estudos que envolvem a avaliação do perfil fármaco-toxicológico

devido ao uso crescente de técnicas analíticas que permitem o desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis, rápidos e precisos, para atender às demandas de quantificação requeridas nessa área do conhecimento [10].

A determinação de elementos químicos em amostras de produtos farmacêuticos pode ser realizada por diferentes métodos analíticos, desenvolvidos empregando variados procedimentos para o tratamento da amostra. A Farmacopeia Brasileira descreve procedimentos para determinações de metais, metalóides e outras substâncias em medicamentos, a partir de diversos ensaios de purezas [8].

A determinação destes elementos químicos empregando os diversos métodos analíticos existentes requer um tratamento prévio da amostra, principalmente quando se trata de amostras complexas, como de medicamentos. O principal objetivo, desse tratamento visa eliminar parcial ou totalmente a fração orgânica que compõe sua matriz.

Não existe um padrão ou um método universal para tratamento das amostras farmacêuticas que atenda à determinação dos mais variados analitos. Considerando isso, há uma constante necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos que apresentem limites de quantificações cada vez menores para a determinação de elementos com potencial de toxicidade em formulações farmacêuticas [11].

A escolha do procedimento de preparo da amostra ocorre em função das características do método analítico a ser empregado, da matriz que a amostra apresenta, dos analitos de interesse e também da disponibilidade de materiais no laboratório sendo que, a maior parte das técnicas analíticas requer que as amostras estejam na forma de solução.

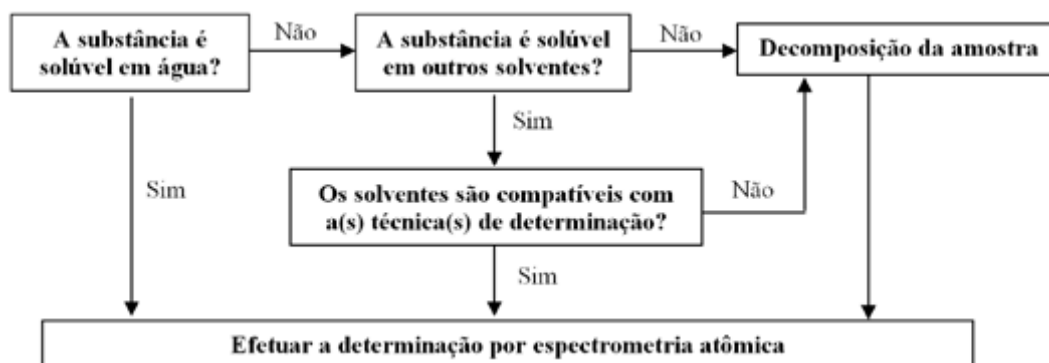
Após esse tratamento, precisam ser analisadas, o mais rápido possível para evitar perdas ou contaminações decorrentes do armazenamento das amostras. Porém, tomando como base otimizações e custos de análises, é muito comum que se estabeleça um número mínimo de amostras a serem analisadas para que se utilize um equipamento. Dessa forma, existe um tempo de armazenamento entre as etapas de tratamento e posteriores análises. De

um modo geral as amostras tratadas, agora chamadas de soluções das amostras, são armazenadas sob refrigeração e, no caso das amostras desidratadas, são armazenadas em ambientes que minimizem a reabsorção de umidade, como por exemplo, dessecadores. Não podemos esquecer que o armazenamento não deve ocorrer por períodos muito longos, uma vez que, deseja-se evitar a contaminação das soluções e perdas dos analitos por volatilização [12, 13].

Os procedimentos de tratamento de amostra variam de acordo com alguns parâmetros, tais como temperatura, pressão, formas de aquecimento (fonte de energia), tipos de analitos, dentre outros. Em geral, se aplicam dissolução, extração, derivatização e decomposição. A decomposição, a mais largamente utilizada, pode ocorrer por duas vias, uma seca e outra úmida. A via seca é também conhecida como calcinação ou incineração e a segunda, é conhecida largamente como digestão, que acontece utilizando misturas de ácidos concentrados e reagentes oxidantes às amostras e, após isso, são aquecidas durante um intervalo de tempo. A temperatura e o tempo necessários para a decomposição dependem da matriz da amostra, tempos estes que podem ser bastante longos, chegando a dois ou três dias, a depender do procedimento [14].

Para o tratamento de amostras de medicamentos, diferentes procedimentos de preparo da amostra podem ser aplicados, como demonstrado no esquema da Figura 1.1.

Figura 1.1 - Procedimentos de preparo de amostra para o método de espectrometria atômica. (Reproduzido de: Farmacopeia Brasileira, 5ed. Pg 173)



Quando as substâncias forem solúveis em água, não há necessidade da decomposição prévia da amostra e esta pode ser analisada após dissolução do medicamento. Caso não seja solúvel em água, mas o medicamento apresentar uma determinada solubilidade em outro solvente, a substância pode ser analisada após dissolução se não houver qualquer restrição entre o solvente e a técnica de espectrometria atômica a ser utilizada. Quando nenhuma das condições anteriores for atendida, recomenda-se a realização de um dos tipos de decomposição já citados [8]. A decomposição por via úmida se destaca pela alta eficiência e empregabilidade. Quando comparada com a calcinação, apresenta vantagens por ser mais rápida, eficiente, com menores temperaturas e, conseqüentemente, menores perdas por volatilização visto que, a decomposição por via úmida ocorre na maioria das vezes em sistemas fechados.

Ainda podemos apresentar mais comparações, como por exemplo, o fato de sistemas abertos possuírem um aquecimento que ocorre por condução e uma temperatura da decomposição limitada à temperatura de ebulição dos agentes oxidantes empregados [15]. Em sistemas fechados, existe uma associação entre temperatura e pressão para degradar os constituintes da matriz da amostra. A combinação de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio é amplamente aplicada devido ao seu considerável poder oxidante [12].

Ainda existe a se considerar, durante a decomposição, a ocorrência de erros de diferentes ordens como, por exemplo, impureza dos reagentes utilizados que conduz a altos valores dos brancos analíticos, por manipulação do analista e perdas por volatilização dos analitos. Entretanto, estes erros podem ser atenuados usando reagentes com alto grau de pureza, restringindo ao máximo a manipulação do analista e aparatos que reduzam a perda de analitos voláteis, como o sistema de digestão em refluxo com dedo frio. A Tabela 1.1 exhibe um breve resumo de trabalhos publicados empregando diferentes tipos de tratamentos de amostras farmacêuticas para análise.

Tabela 1.1 - Métodos propostos de preparo de amostras para determinação de impurezas metálicas em produtos farmacêuticos empregando técnicas espectroanalíticas.

Produto e/ou aplicação	Analito(s)	Técnica de análise	Preparação da amostra	Referência
Compostos farmacêuticos	14 analitos	ICP-MS	Diluição direta em solução aquosa 25% de 2-butoxietanol	[11]
Fosinopril	Pd	ICP-MS	Diluição direta em solução aquosa 25% de 2-butoxietanol	[16]
Antibióticos	21 analitos	ICP OES	Suspensões: 0.5 M ácido nítrico + Triton 0.5% (v/v)	[17]
4 medicamentos	Mg	FAAS	Extração com 0.1M de ácido nítrico	[18]
Formas farmacêuticas (Sólidas)	Fe, Zn, Ca, Mg, Na, K	FAAS para Fe, Zn, Ca, Mg; ICP OES para Na, K	Sete métodos diferentes de digestão	[19]
Maleato de enalapril	Pd	GFAAS	Amostragem sólida	[20]

Os procedimentos de digestão empregados na análise de medicamentos, visando ensaios de impureza, não obedecem aos listados na Farmacopeia. Como dito anteriormente, para cada técnica de análise é preciso buscar um método de digestão propriamente dito, não havendo um padrão a ser seguido. Como pode ser visto na Tabela 1.1, alguns trabalhos publicados buscaram desenvolver métodos com processos de tratamentos de amostras característicos que se aplicassem às mais variadas amostras, muitos deles evitam a digestão assistida por micro-ondas com a justificativa de limitação em

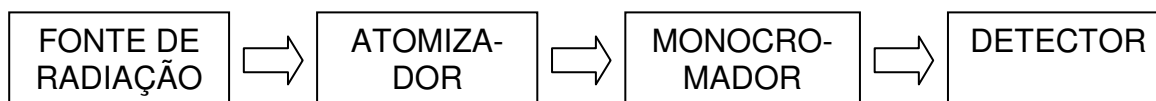
relação à quantidade de amostra, bem como, aumento da sequência analítica. Como já discutido, não existe um padrão, devendo o método de tratamento a ser empregado ser aplicável à técnica de análise que será utilizada.

1.3 TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS USADAS NA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM MEDICAMENTOS

Várias das diversas técnicas que envolvem o campo da espectrometria atômica como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) têm sido bastante usadas durante muitos anos para a análise de impurezas, em uma variedade de tipos de amostras, incluindo compostos farmacêuticos [21, 22, 23].

Destas técnicas de espectrometria atômica, as mais utilizadas na determinação de metais e metalóides são FAAS e ETAAS, que possuem como base de funcionamento a Lei de Beer-Lambert, em que há uma relação entre a concentração da substância e o sinal de absorção [24]. FAAS é considerada uma técnica menos sensível quando comparada a ETAAS. Com FAAS, os métodos analíticos desenvolvidos expressam sensibilidades em termos de partes por milhão (ppm) com o uso de mililitros de amostras, já a ETAAS é capaz de apresentar sensibilidades em termos de partes por bilhão (ppb), com quantidades de microlitros de amostra. FAAS é geralmente a mais barata das duas técnicas e também exige menos habilidades do analista do que ETAAS. Além disso, as análises realizadas com FAAS podem ser muito mais rápidas do que a ETAAS. Ambas as técnicas utilizam uma lâmpada de cátodo oco (HCL) ou lâmpada de descarga sem eletrodos (EDL) como fonte de radiação eletromagnética para cada analito em questão. Um diagrama esquemático de um instrumento está ilustrado na Figura 1.2.

Figura 1.2 - Diagrama esquemático de um instrumento de absorção atômica



ICP OES e ICP-MS, também têm sido usadas para uma variedade de tipos de amostras [25, 26] e suas aplicações na análise de produtos farmacêuticos têm crescido nos últimos anos [27]. Ambas as técnicas são capazes de promover uma análise rápida e multielementar, porém a ICP-MS oferece uma sensibilidade muito maior em relação à ICP OES. As habilidades requeridas dos analistas, para ambos os espectrômetros são maiores do que para as demais espectrometrias, como as já citadas FAAS e ETAAS. Dentre as quatro técnicas até aqui mencionadas, a ICP-MS é a que exige o maior nível de habilidade além de ser considerada a técnica com custo de análise mais cara.

Em FAAS, uma alíquota de amostra líquida é aspirada para dentro de uma chama por meio de um nebulizador. No nebulizador, a amostra é convertida em um aerossol, e as gotículas deste aerossol são levadas para uma célula de quartzo onde são facilmente queimadas pela chama. A chama atua de modo a dissolver e assim, atomizar a amostra. A chama mais utilizada é uma mistura de ar/acetileno, que queima dentro de uma faixa de temperatura de 2100-2400 °C, enquanto a chama de óxido nítrico, que pode ajudar a destruir os possíveis óxidos que poderiam ser formados, queima em um intervalo de temperatura de 2600-2800 °C [24].

Em GFAAS, uma amostra (normalmente um líquido) é inserido por meio de uma pequena abertura para dentro de um tubo de grafite recoberto com grafite pirolítico. No interior do tubo, o qual serve como a célula de amostra, os átomos ou moléculas neutras são excitadas a partir do seu estado fundamental quando o tubo é aquecido, aquecendo assim a amostra. As amostras podem ser depositadas diretamente sobre a parede do tubo de grafite ou numa pequena plataforma de grafite, conhecida como uma plataforma L'vov, que fica no interior do tubo de grafite. O aquecimento do tubo de grafite é organizado em uma série de etapas, que vão desde a secagem do tubo, passando pela atomização e terminando na limpeza. No passo de atomização, o forno é

aquecido rapidamente a uma temperatura alta, muitos analitos possuem temperatura de atomização entre 2300-2700 °C [24].

A ICP OES utiliza um plasma de gás argônio, com temperaturas que podem chegar à 10000K, para excitar e ionizar os analitos de uma dada amostra que são aspiradas para o plasma por meio de um nebulizador. Dessolvatação, vaporização, atomização e ionização da amostra ocorrem nas altas temperaturas do plasma e as colisões de íons do plasma de argônio, ionizam e excitam os átomos dos analitos. Os átomos excitados emitem diferentes frequências de luz que é característico da transição de energia para um determinado analito. A intensidade da luz é diretamente proporcional à concentração do analito. Como existem milhares de potenciais linhas de emissão, a escolha do comprimento de onda do analito é uma etapa crítica para a análise [24]. A ICP OES é uma técnica muito usada para determinação de elementos que estão em concentrações maiores (ppm), sendo as determinações da composição mineral de alimentos estão entre as principais aplicações.

De modo semelhante à ICP OES, a ICP-MS utiliza um plasma de gás argônio para excitar e ionizar espécies elementares dentro de uma determinada amostra e o sistema de introdução da amostra também é o mesmo, via nebulizador. Entretanto, ICP-MS emprega uma detecção de espectros de massa, em vez de detecção com base em emissão ou absorção em comprimentos de onda. ICP-MS tem demonstrado um aumento de utilização em variadas aplicações ao longo dos anos [25]. À medida que os íons são gerados no plasma ao passar pelo espectrômetro de massa, estes são separados no quadrupolo de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). ICP-MS, oferece uma vantagem sobre o ICP OES, esta possui menos interferências espectrais. A natureza das interferências no ICP-MS é geralmente devido à formação de íons de carga dupla e algumas espécies poliatômicas formados no plasma [24]. A ICP-MS é uma técnica mais sensível e mais delicada, exigindo maiores habilidades do analista e uma preparação maior para sua operação. Determinações de elementos traço com limites de detecção em níveis que podem chegar a partes por trilhão (ppt) são as

principais aplicações, sendo uma boa técnica para análises de elementos tóxicos em variadas amostras.

1.4 NOÇÕES BÁSICAS DE TOXICOLOGIA

A Toxicologia é definida como a ciência de estudo da interação entre agentes químicos e os sistemas biológicos, visando determinar qualitativa e quantitativamente o risco em que estes agentes químicos podem trazer aos sistemas, resultando em efeitos adversos [1][28].

Estes agentes químicos necessitam de um contato o mais íntimo possível com os tecidos e/ou órgãos para que sejam considerados potenciais danos e, conseqüentemente, este dano deve ter a capacidade de alterar a estrutura ou funções do local afetado. Na maioria das vezes, a toxicidade observada está diretamente relacionada com o grau de exposição ao agente tóxico. A relação entre a dose e a resposta é de fundamental importância na confirmação de uma possível relação de um agente químico e seu efeito tóxico, permitindo assim, a inferência de um suposto risco, sendo a dose letal mediana definida como a massa por peso corporal de um determinado agente tóxico capaz de matar 50% da população testada. [1][28].

Em toxicologia, os estudos envolvendo toxicidade visam avaliar o dano produzido pelo agente químico, a relação entre a dose e a resposta, os mecanismos envolvidos na toxicidade, ou seja, quais são as interações químicas e biológicas e aberrações resultantes que são responsáveis pela manutenção da resposta tóxica, além dos fatores que influenciam na resposta tóxica [1][28].

O foco de estudo da toxicologia é o agente tóxico que pode ser definido como qualquer espécie química ou física que é capaz de resultar em dano a sistema biológico alterando uma função ou levando-o à morte em determinadas condições de exposição [1][28].

O termo toxicidade é usado em toxicologia para descrever o risco de aparecer efeito tóxico num sistema biológico como consequência da exposição a um determinado agente tóxico. Considerando isto, a toxicidade depende, diretamente, das condições em que o sistema biológico foi exposto, por

exemplo, a dose administrada ou absorvida, o tempo e frequência de exposição, a via de administração e natureza do organismo afetado [1][28].

Em toxicologia, pode-se classificar agente tóxico como sendo metálico e não metálico. A investigação de espécies metálicas é importante por causa de alguns riscos a tecidos biológicos relacionados com estas espécies. Estes riscos estão vinculados com a não metabolização dos metais que acumulam-se nos tecidos podendo combinar-se com ligantes indispensáveis para as funções fisiológicas normais, como as principais biomoléculas [1][28].

1.5 DETERMINAÇÃO DE METAIS E METALÓIDES EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROANALÍTICAS

Considerando a larga aplicabilidade das técnicas espectroanalíticas já elucidadas nas seções anteriores, além dos riscos que os contaminantes inorgânicos podem trazer à fisiologia humana, diversos trabalhos começaram a ser publicados com objetivos de desenvolver métodos analíticos que visem avaliar os perfis de metais e metalóides em diversas matrizes de produtos farmacêuticos.

Os antibióticos são medicamentos aplicados no tratamento de infecções bacterianas, sejam de larga escala ou até mesmo para infecções oriundas de bactérias mais simples que infectam, por exemplo, o trato respiratório superior [29]. De Paula *et al.*, propuseram um método para a extração ultrassom de Cr e Mn em antibióticos e outros medicamentos e sua posterior determinação por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica. No método proposto, foram otimizadas variáveis como a potência do ultrassom, o tempo de extração, a concentração de HCl na solução durante a extração e a massa de amostra utilizada no processo. Esta otimização foi realizada com uma amostra de referência, construídas curvas de pirólise e atomização para ambos os analitos, a fim de avaliar o efeito da matriz sobre a determinação de Cr e Mn. A extração de Cr e Mn foi realizada com as variáveis otimizadas, sendo 50 mg da amostra submetidas ao ultrassom durante 30 minutos a 50% da potência, com 5 mL de uma solução de HCl 1 mol L⁻¹. O método proposto foi aplicado na determinação destes

elementos em amostras de medicamentos que continham diversos princípios ativos, sendo três antibióticos, ciprofloxacino, cefalexina, azitromicina, um antihipertensivo, a anlodipina e um medicamento para proteção do fígado, a metionina. Para avaliar a exatidão do método, realizou-se uma determinação após a digestão ácida usando uma mistura oxidante HCl:HNO₃ 1:3. Não houve diferença estatística significativa em nível de confiança de 95% e teste t-pareado entre os resultados obtidos pelo método proposto e os resultados obtidos após a digestão total das amostras [30].

Alguns fungos são utilizados como antibiótico, bem como, na alimentação com o objetivo de obter seus benefícios. Zhang *et al.*, propuseram um estudo para avaliar 21 elementos (Li, Na, K, Ga, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, V, Cr, Ni, Co, Mo, Se, Ba, Sn, As, Pb, Cd, Hg) em amostras fungos da espécie *Cordyceps kyushuensis*, naturais e cultivadas que foram determinados empregando espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado. As amostras (naturais e cultivadas em laboratório) foram digeridas usando digestão assistida com micro-ondas antes da análise. O método proposto foi validado através da análise de um material de referência certificado (CRM) GBW10015 (folha de espinafre). Os resultados foram avaliados empregando análise de variância (ANOVA) que revelou que as concentrações de elementos nos três tipos de amostras foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Com exceção de Mg, Zn e Cu, os valores de outros conteúdos elementares foram os mais altos nas cultivadas em laboratório do que na amostra natural. Os autores concluem que a diferença notável de teores dos elementos entre cultivadas e natural pode ser causada por meio de cultivo diferente. É importante avaliar os perfis de elementos que podem ser prejudiciais à saúde, como no caso deste fungo que é usado como tratamento alternativo. O método proposto empregando ICP-MS mostra a sua extensa aplicabilidade multielementar [31]. Neste trabalho os autores poderiam ter proposto uma investigação mais aprofundada acerca dos teores encontrados e promovido uma extensão ao solo utilizado no cultivo, para que com isso fossem inferidas as conclusões encontradas. De qualquer maneira, a aplicação do ICP-MS traz a larga possibilidade de análise multielementar.

Além dos produtos finais, os excipientes também têm sido investigados e são apoiados pela Farmacopeia, como é o caso do estearato de magnésio usado para diminuir a fricção entre as partículas que formam os comprimidos. Alexandru *et al.*, propuseram o desenvolvimento de um método simples, rápido e de alto rendimento para a determinação de rotina de níquel em estearato de magnésio empregando GFAAS, após simples dissolução da amostra em etanol acidificado, sem mineralização, diminuindo o custo e a sequência analítica. O método desenvolvido foi totalmente validado considerando as figuras de mérito, linearidade, limites de detecção e quantificação, massa característica, sensibilidade (efeito matriz), precisão, exatidão e robustez. O método possuía linearidade da resposta para concentrações que variavam entre 0 e 12 ng mL⁻¹ de níquel na solução padrão em etanol acidificado apresentando bons coeficiente de correlação (<0,999). O limite de detecção do método proposto foi 0,84 ng mL⁻¹ (correspondente a 0,42 ug g⁻¹ de níquel na amostra real), e o limite de quantificação foi de 2,54 ng mL⁻¹ (correspondente a 1,27 ug g⁻¹ de níquel na amostra real). A massa característica encontrada no método foi 13,62 pg de níquel. Repetibilidade foi a principal maneira selecionada para avaliar a precisão do método, foram calculados desvios padrão relativos variando entre 2,7-9,3%. Ensaio de recuperação também foram empregados, fornecendo valores que variaram entre 98,6% e 100,5%. A robustez foi testada através da variação das temperaturas utilizadas para a programação das etapas forno de grafite e os resultados experimentais foram comparados estatisticamente através do teste F e teste t de Student. O método permitiu uma sobrevida do tubo, alcançando 350 queimas e, além disso, foi aplicado em oito amostras, todas dentro dos padrões permitidos pela Farmacopeia [32].

Krejčová *et al.*, propuseram o uso de ICP-MS e ICP OES para determinação de macro e microelementos em multivitamínicos e suplementos dietéticos e, com base nos resultados, a caracterização empregando ferramentas de análise multivariada. O método foi otimizado e avaliado com o uso de materiais de referência certificados, GBW 08503 farinha de trigo, GBW 07603 ramos e folhas e NIST1568 leite em pó. Os métodos foram desenvolvidos para a determinação de Na, K, Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn, Zn, Se, Cr, As, Cd, Pb, Ni, V, Ti, Au, Pt, Pd e, apresentaram bons limites de detecção,

bem como outros parâmetros de processo, demonstrando ser adequado para a finalidade da análise elementar. ICP OES foi empregada para quantificar Na, K, Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn, Ni, V, Zn e seus limites de detecção foram 11, 81, 11, 13, 57, 0,68, 0,65, 0,51, 1,1, 1,2 e 0,42 mg Kg⁻¹, respectivamente. ICP-MS foi usada para determinar Cu, Mn, Se, Cr, As, Cd, Pb, Ni, V, Ti, Au, Pt, Pd com limites de detecção 1,5, 0,98, 1,4, 0,85, 2,6, 2,3, 1,8, 2,7, 2,3, 2,3, 14, 11 e 6,1 µg Kg⁻¹, respectivamente. Levando em consideração os resultados, os autores concluem algo que é essencial quando se realizam trabalhos empregando análise de medicamentos, as doses diárias e o período de uso, diferente de quando se analisa um alimento que é ingerido ocasionalmente. Se comparado com doses diárias recomendadas algumas amostras apresentam um possível risco para a saúde por terem valores superiores aos recomendados pela Farmacopeia e o máximo que pode ser metabolizado por um organismo saudável. Alguns dos demais elementos analisados forneceram apenas valores de referência para os multivitamínicos [33].

Antes *et al.*, propuseram o desenvolvimento de um método através ICP-MS para a determinação de impurezas de elementos em componentes utilizados para soluções de nutrição parenteral. As soluções de aminoácidos a 10% (m/v), glicose (50% m/v) e lipídeos (20% m/v) foram analisados. Para avaliar os índices de impurezas foram determinados As, Cd, Cu, Pb e Mo por ICP-MS operado em modo *standard* e, para introdução da amostra, um nebulizador pneumático foi escolhido. Além destes elementos, foi determinado mercúrio utilizando geração de vapor frio acoplado ao ICP-MS. Para Cr, Mn, Ni e V foram determinadas por meio de células de reação dinâmica acopladas a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e o gás amônia foi usado como gás de reação. As condições operacionais de cada técnica foram otimizadas, a fim de conseguir uma melhor sensibilidade, precisão e exatidão. Foi avaliada a influência da matriz da amostra, durante a quantificação do analito, avaliando a interferência essencialmente do carbono (abundante em todas as soluções), com todos os elementos analisados. O uso da célula de reação dinâmica foi eficaz para reduzir interferências sobre a determinação de Cr, Mn, Ni e V. Os outros elementos investigados (As, Cd, Cu, Pb, Mo e Hg) foram determinados diretamente nas amostras, que foram

diluídas em ácido nítrico a 5%. Os resultados obtidos estão em boa concordância (entre 96 e 103%), com os valores dos materiais de referência certificados NIST1640 metais traço em água natural e NIST1641d mercúrio em água natural. Para a precisão, o desvio padrão relativo foi inferior a 5%. O método demonstrou rapidez, uma vez que permitiu a análise de cerca de 30 amostras por hora. Deste modo, os autores recomendavam o método proposto para análises de rotina [34].

Zoran *et al.*, propuseram um método empregando ETAAS para a determinação de níquel em substâncias ativas. Foi realizada inicialmente uma tentativa de recuperação de níquel por uma simples dissolução das amostras em ácido nítrico diluído, porém, foram encontrados erros na determinação, bem como baixas recuperações. Considerando isto, foram realizados diferentes estudos para tratamento da amostra. Verificou-se que a digestão assistida em micro-ondas era o modo mais apropriado para a preparação da amostra, pois o procedimento prioriza uma mineralização em sistema fechado, reduzindo os riscos de contaminações. Várias combinações de soluções para digestão e diferentes condições de operação no programa do micro-ondas foram testados. Como há muito é proposto na literatura, a combinação de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio demonstrou ser a mais adequada. A exatidão do método foi avaliada por estudos de recuperação após adição do analito e por comparação dos resultados obtidos pela determinação empregando ICP-MS. Os valores de recuperação variaram entre 87,5-104,0% e não houve diferenças significativas entre as determinações empregando as técnicas diferentes. Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,6 e 2,1 mg g⁻¹, respectivamente. A precisão do método foi confirmada pela determinação de Ni em amostras dopadas com RSD menor que 4%. O método foi aplicado para quantificar níquel em amostras de substâncias ativas e intermediários farmacêuticos e demonstrou ser eficaz [35].

Durante a geração de produtos farmacêuticos, o paládio pode ser considerado como o metal mais amplamente utilizado como catalisador. A desvantagem desta catalisação por metal é que os resíduos de metais pesados e/ou tóxicos são, às vezes, frequentes nos produtos finais, como é o caso do paládio. Dessa forma, existem regulamentações na Farmacopeia que

listam valores máximos para paládio que um candidato à droga pode conter. Margui *et al.*, propuseram um método simples e rápido para a determinação de Pd em amostras de substâncias ativas empregando espectrometria de fluorescência de raios-X, sendo desenvolvido e totalmente validado de acordo com os limites de especificação da legislação vigente (10 mg kg^{-1} Pd). Com o uso das melhores condições de medidas, foram encontrados limites de detecção e de quantificação $0,11$ e $0,37 \text{ mg kg}^{-1}$ de Pd, respectivamente. A precisão do método (avaliada a partir da repetibilidade) foi menor que 2% para as medições e, a partir da reprodutibilidade foi de cerca de 7%. A exatidão foi avaliada por análise de amostras de API com adição de níquel e os valores de recuperação ficaram na faixa dos 95%. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de três lotes do API estudado e foram avaliadas quanto ao seu teor de Pd. Os resultados foram comparáveis aos obtidos pelo método de rotina diária (digestão ácida e espectrometria atômica) utilizados na maioria dos laboratórios farmacêuticos e não demonstraram diferenças significativas, indicando a larga aplicabilidade do método [36].

Hong *et al.*, propuseram a avaliação de La, Sr, Zn e Se em ervas utilizadas para tratamento medicinal empregando ICP-MS e espectrometria de absorção atômica. Vinte e duas amostras de ervas foram selecionadas. Os resultados fizeram os autores concluírem que deve existir uma atenção em relação às ervas que continham valores maiores de La e são tradicionalmente usados para regular algumas doenças cardiovasculares. O conhecimento dos efeitos e das concentrações de elementos nessas ervas pode orientar a seleção de ervas chinesa na prática clínica em conjunto com as teorias tradicionais da medicina popular [37].

Bolzan *et al.*, propuseram um procedimento para determinação de cromo em sulfato de bário (medicamento usado como contraste em exames radiológicos) por amostragem sólida direta acoplada à espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (DSS-ETAAS) com efeito Zeeman de correção de fundo. Foram estudadas as condições operacionais para o procedimento proposto e a utilização de ácido cítrico, fosfato de amônio, nitrato de paládio e magnésio como possíveis modificadores químicos. As temperaturas de pirólise e de atomização foram fixados em 1500 e $2400 \text{ }^\circ\text{C}$,

respectivamente, e o uso de modificadores de químicos não demonstraram melhorar estas condições térmicas para a determinação. O tubo de grafite demonstrou uma degradação rápida da plataforma de L'vov, entretanto, mínimas alterações foram observados no perfil de sensibilidade ou de sinal. As amostras (0,3-1 mg) foram pesados e introduzidas no forno utilizando um sistema de amostragem de sólidos manual. A curva de calibração apresentou linearidade entre 100-1800 pg com bom coeficiente de correlação ($<0,999$). A massa característica foi de 7,7 pg e o limite de detecção foi de 2,4 pg. A concentração de cromo em amostras comerciais variou entre 0,45-1,06 mg g⁻¹ e estes resultados foram confirmados pelo método de adição de padrão. A precisão foi expressa pelo desvio padrão relativo e o valor médio foi de 12% (para 20 medidas em um período de 3 dias). Os resultados obtidos foram comparados com a análise por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e, em ICP OES, demonstraram valores 20% menores do que os obtidos pelo procedimento proposto. Esses resultados mais baixos, podem ser associados a uma extração incompleta, uma vez que, para a análise no ICP OES, foi realizada uma extração em ácido nítrico. Dessa forma, o procedimento proposto por DSS-ETAAS apresenta algumas vantagens relacionadas à metodologia recomendada pela Farmacopeia, como menores riscos de contaminação e perdas de analitos, maior especificidade, precisão e sensibilidade, e não há necessidade de uso de reagentes tóxicos ou que possam contaminar as amostras [38].

Os diferentes trabalhos descritos aqui, mostram a variedade de aplicações das técnicas espectroanalíticas para a determinação de elementos metálicos em amostras de medicamentos.

1.6 ANEMIA FERROPRIVA

As anemias nutricionais estão entre os maiores problemas da atualidade, acredita-se que cerca de 40% da população mundial, apresentam carência de ferro ou níveis de hemoglobina abaixo dos valores considerados normais [39]. Algumas pesquisas geraram um consenso de que a deficiência de ferro é o principal fator responsável pelas anemias nutricionais [40].

A deficiência de ferro é a causa mais comum de anemia nutricional nos seres humanos, bastante comum em crianças e mulheres grávidas. Quando é grave, provoca anemia microcítica característica e hipocrômica, secundária à redução na síntese de hemoglobina [41]. O ferro é um componente da hemoglobina e sua deficiência pode afetar o metabolismo dos músculos, a atividade das enzimas mitocondriais, as trocas gasosas e tem mostrado associação com problemas comportamentais e de aprendizado em crianças [42].

É importante conhecer a causa da anemia, para o adequado tratamento. As necessidades de ferro são determinadas pelas perdas fisiológicas e também impostas pelo crescimento [43]. Um homem adulto requer cerca de 1 mg de ferro/dia, já uma mulher grávida requer cerca de 6 mg de ferro/dia [1]. É importante frisar que o intestino delgado regula a absorção de ferro e a entrada na corrente sanguínea. O tratamento eficaz é seguido de uma taxa aumentada de produção de hemácias e esse aumento é proporcional à gravidade da anemia e à quantidade de ferro disponível para a medula [43]. A deficiência de ferro decorre, na maioria das vezes, das quantidades insuficientes de ferro na dieta para satisfazer às necessidades nutricionais individuais. Como resultado da deficiência prolongada ocorre a anemia, um dos fatores mais importantes diretamente relacionados com nascimentos abaixo do peso ideal, à mortalidade materna e como já citado, ao déficit cognitivo em crianças [39].

Como é sabido, a anemia ferropriva é uma doença de alta taxa de incidência e prevalência principalmente em populações com nível socioeconômico menos favorecido. O Ministério da Saúde (MS), por meio de parcerias, propôs o desenvolvimento do “*Programa Nacional de Suplementação de Ferro*”, que juntamente com a fortificação obrigatória das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico e a orientação nutricional, constituem atualmente as principais estratégias voltadas para o controle e redução da anemia por deficiência de ferro no País [39]. Este programa prevê que os suplementos de ferro sejam distribuídos, gratuitamente, às unidades de saúde da rede do SUS em todos os municípios brasileiros, de acordo com o número de crianças e mulheres que atendam ao perfil de sujeitos da ação do programa. Além do foco preventivo (independente do diagnóstico há a

distribuição e recomendação para o uso de suplemento visando reduzir as taxas de incidência de anemia), o tratamento da anemia ferropriva é feito por distribuição gratuita de suplementos de ferro em farmácias das unidades de saúde, sendo encontrados a baixíssimo custo nas farmácias populares.

O sulfato ferroso administrado por via oral, a mais barata das preparações de ferro, é o tratamento de escolha para a anemia ferropriva. Os sais ferrosos (Fe^{2+}) são absorvidos três vezes mais que os sais férricos (Fe^{3+}). O sulfato ferroso está disponível como droga única ou em associações em diferentes formas farmacêuticas produzidas para administração oral e parenteral. Os xaropes, soluções orais e os comprimidos constituem as principais formas de apresentação. Além do sulfato ferroso, outras preparações, apesar de apresentarem menores teores de ferro, são bem administradas, tais como, o glicinato férrico e a ferripolimaltose. A dose terapêutica usualmente prescrita é cerca de 200 mg por dia (2 a 3 mg/kg) em três doses iguais de 65 mg, com base no conteúdo de ferro da preparação. A duração do tratamento é controlada pela recuperação da hemoglobina e pelo objetivo de criar estoques de ferro. Com a taxa diária de recuperação de 0,2 g de hemoglobina por decilitro de sangue, a massa de hemácias é reconstituída dentro de um a dois meses [1]. A Tabela 2 foi reproduzida do manual de suplementação de ferro e descreve as principais populações atendidas na suplementação de ferro e as principais condutas de intervenção a serem tomadas.

Tabela 1.2 - Populações atendidas pelo programa nacional de suplementação de ferro e as principais condutas de intervenção.

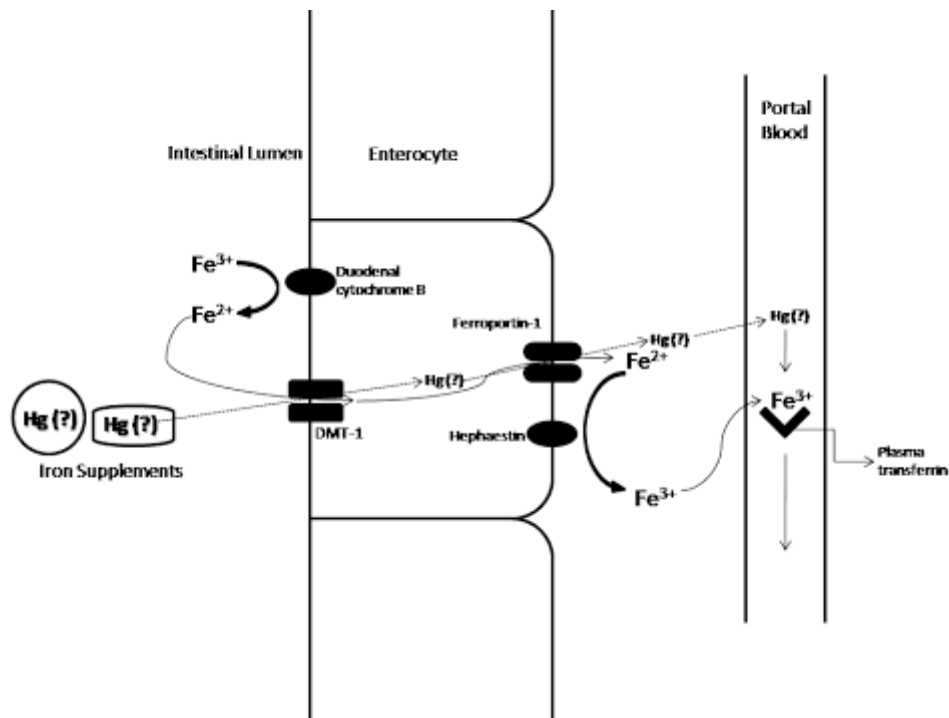
População a ser atendida	Dosagem	Periodicidade	Tempo de permanência	Produto
Crianças de 6 a 18 meses	25 mg de ferro elementar	1 vez por semana	Até completar 18 meses	Sulfato ferroso
Gestantes a partir da 20ª semana	60 mg de ferro elementar 5 mg de ácido	Todos os dias	Até completar a gestação	Sulfato ferroso e ácido fólico

População a ser atendida	Dosagem	Periodicidade	Tempo de permanência	Produto
	fólico			
Mulheres no pós-parto e pós-aborto	60 mg de ferro elementar	Todos os dias	Até o 3º mês pós-parto ou pós-aborto	Sulfato ferroso

A principal via de absorção de ferro é pelo epitélio duodenal, onde uma faixa de 1 a 2 mg são absorvidos por dia. Essa absorção é consequência das microvilosidades presentes nos vilos intestinais, responsáveis por aumentar a superfície de absorção e é mediada por uma série de proteínas presentes nos enterócitos [44] [45].

A Figura 3 ilustra um enterócito e a localização das proteínas envolvidas no processo de absorção. O mais essencial a ser destacado, é a existência de proteínas responsáveis pela absorção que se dá em forma inorgânica ou na forma heme e que independe da quantidade ingerida. Há uma limitação da absorção, uma vez que, íons em excesso dentro da célula podem carrear outros íons e desregular a homeostase celular, causando distúrbios hidroeletrólíticos. Além deste destaque, é importante frisar que o ferro é absorvido sob forma de íon bivalente, o que explica a maior absorção dos sais ferrosos e sua maior aplicabilidade. Os íons trivalentes são convertidos por um citocromo b duodenal em íons bivalentes antes de serem absorvidos. A anemia ferropriva faz com que a célula absorptiva crie um mecanismo para aumentar a absorção e suprir esta necessidade de ferro [44] [45].

Figura 1.3 - Ilustração do enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro.



Há um aumento da expressão de proteínas (DMT-1 e FPT) ampliando o aporte de absorção da célula para suprir as necessidades requeridas pela eritropoiese. Assim, em situações em que há falta ou aumento da necessidade de ferro como, gravidez, puberdade ou hemólise, por exemplo, há uma maior absorção. É importante destacar que alguns fatores também favorecem a absorção intestinal, como a acidez e a presença de agentes solubilizantes, como açúcares, isto explica a grande presença de xaropes como medicamentos para tratamento da anemia ferropriva. A quantidade de ferro absorvida é regulada pela necessidade do organismo [44] [45].

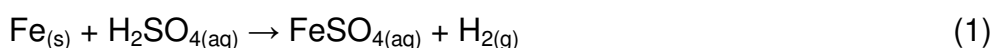
1.7 SULFATO FERROSO E SEUS PROCESSOS DE OBTENÇÃO

O sulfato ferroso é um sal inorgânico encontrado na natureza sempre nas formas hidratadas. Seu grau de hidratação pode ser de 1; 4; 5 ou 7 moléculas de água. O sulfato ferroso é mais comumente encontrado no seu estado heptahidratado e este se apresenta como um pó cristalino, verde claro

ou cristais verde azulado, inodoros, de sabor adstringente, eflorescentes ao ar seco, solúvel em água e insolúvel em etanol. O sulfato ferroso heptahidratado oxida-se rapidamente em contato com ar úmido, formando sulfato férrico básico amarelo-amarronzado [46].

Alguns trabalhos na literatura mostram algumas reações que têm como produtos o sulfato ferroso. Abaixo estão relacionadas as principais reações listadas na literatura para obtenção do sulfato ferroso que posteriormente é purificado para utilização em variadas aplicações, como na indústria farmacêutica.

- *Sulfato ferroso a partir do ferro puro*



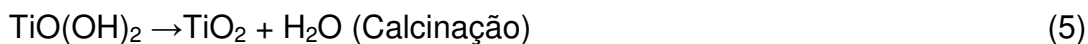
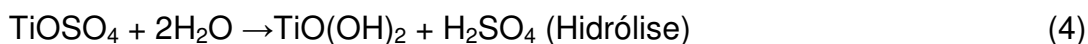
Facilmente obtido a partir da reação de ferro e solução de ácido sulfúrico. A solução é aquecida em banho maria até o fim da reação. Para obtenção do sulfato ferroso sólido adiciona-se etanol para que ocorra a precipitação, graças ao caráter insolúvel do sulfato ferroso em álcool [47].

- *Sulfato ferroso a partir do óxido de ferro (FeO)*

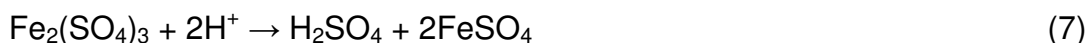


Similar à reação do item anterior, o sulfato ferroso pode ser obtido por meio da utilização de uma solução de ácido sulfúrico, nesse caso, emprega-se óxido ferroso, presente em abundância como hematita (Fe_2O_3) [47].

- *Sulfato ferroso a partir do ataque com ácido sulfúrico do mineral ilmenita*



Há uma importante obtenção de sulfato ferroso a partir do processo de produção de dióxido de titânio, largamente utilizado como pigmento na indústria. As três equações acima representam as etapas empregadas na produção do pigmento. A rocha ilmenita (FeOTiO_2) produz um licor rico em sulfato ferroso que, após o resfriamento da solução, precipita sob a forma de sulfato ferroso heptahidratado quando esta é atacada com ácido sulfúrico. Após isso, ocorre a hidrólise do sulfato de titanila, onde se obtém um óxido hidratado que, quando calcinado à uma temperatura de $900\text{ }^\circ\text{C}$, produz o dióxido de titânio [47]. O licor produzido apresenta, uma alta concentração de ferro na forma de Fe^{3+} , que pode precipitar junto com o dióxido de titânio, o que é prejudicial ao processo, uma vez que formam-se pigmentos fora dos padrões. Para contornar este problema, o íon de ferro trivalente é convertido por uma reação de redução à ferro bivalente e, com isso, retirado no processo de cristalização [48].



Observa-se pelas reações representadas pelas equações 6 e 7 que ocorre a liberação de H^+ , que entra em contato com o sulfato férrico, reduzindo-o e produzindo sulfato ferroso [48].

É produzido sulfato ferroso heptahidratado e, a partir dele, pode ser produzido o sulfato ferroso monohidratado e o sulfato anidro, que podem ser utilizados para produção de medicamentos, por exemplo.

CAPÍTULO II

*DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM
SUPLEMENTOS DE FERRO
EMPREGANDO ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA COM
ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA*

2.1 INTRODUÇÃO

Chumbo é um metal que possui sua toxicidade bem estabelecida, sendo esse elemento, prejudicial à fisiologia humana. A determinação de chumbo é sempre uma tarefa de extrema importância nas mais variadas matrizes e isto nem sempre é uma tarefa fácil.

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica possui grandes vantagens, sendo a sua principal os baixos limites obtidos, o que garante sua considerável sensibilidade. A necessidade de poucas quantidades de amostra diminui os gastos com reagentes e até facilita a análise de matrizes limitadas.

Em espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, algumas interferências passaram a ser reduzidas por causa do uso de diferentes modificadores químicos e de espectrômetros com alta resolução e fonte contínua.

Neste trabalho determinou-se chumbo total em amostras de suplementos de ferro usados para tratamento da anemia ferropriva empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). O atomizador utilizado foi um forno de grafite (GFAAS).

Foi seguida uma estratégia de digestão das amostras empregando digestão ácida com refluxo em dedo frio e, além da determinação por GFAAS, o método foi comparado com a determinação empregando ICP-MS.

O método teve como parâmetros de validação: limite de detecção e quantificação, linearidade das curvas analíticas, precisão mediante determinação do desvio padrão relativo e exatidão empregando outra técnica analítica.

2.2 O CHUMBO E A IMPORTÂNCIA DA SUA DETERMINAÇÃO

O chumbo é um dos metais de maior importância desde a antiguidade, sendo conhecido como um poluente ambiental de ameaça em escala global. Considerado um grande e potencial tóxico aos organismos biológicos, é um metal quase que onipresente, graças a sua abundância natural e uso em indústrias. A exposição do organismo humano ao chumbo deve-se, principalmente, aos alimentos. Entretanto, muitas ligas utilizadas na fabricação de peças e materiais metálicos para manuseio dos processos de produção de medicamentos possuem chumbo em sua composição, contaminando-os. Além disso, processos de mineração, chapeamento de metais, aditivos em pigmentos e gasolina são fontes conhecidas de chumbo [49].

Quantidades de metais que podem ser prejudiciais têm a possibilidade de contaminar etapas durante a produção do sulfato ferroso, matérias-primas de baixa qualidade e, se não devidamente tratadas há o risco de originar fontes potencialmente perigosas destes metais, como foi descrito por Portugal *et al.*, onde um método preciso, sensível, robusto e de fácil aplicabilidade foi desenvolvido para determinar chumbo em medicamentos antiácidos de magnésio e alumínio. Este método desenvolvido permitiu revelar quantidades elevadas de chumbo nestes medicamentos [50].

A absorção de valores de chumbo em medicamentos que são usados por um longo período de tempo, como é o caso da anemia ferropriva pode desencadear problemas de saúde. É sabido que a absorção do chumbo no trato gastrointestinal varia de 2% a 16% se ingerido com refeição, podendo chegar a 60-80%, quando administrado em jejum. A absorção de chumbo pelo trato gastrointestinal depende principalmente de fatores nutricionais tais como ingestão de cálcio, ferro, fósforo e proteínas. Estudos mostram que baixos teores destes, aumentam a absorção do chumbo. A absorção do chumbo pela mucosa intestinal possivelmente envolve os mesmos mecanismos de absorção dos demais nutrientes essenciais [51].

Diante do exposto, o presente trabalho visou a otimização de uma estratégia analítica para a determinação de chumbo em medicamentos utilizados no tratamento de anemia ferropriva.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma estratégia analítica para determinação de chumbo em medicamentos utilizados no tratamento de anemia ferropriva empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar e validar os parâmetros envolvidos no método proposto para a determinação de chumbo empregando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica;
- Avaliar preliminarmente os teores de Pb em suplementos de ferro;
- Comparar com os valores máximos estabelecidos para a ingestão máxima permitida.

2.4 PARTE EXPERIMENTAL

2.4.1 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE (GFAAS)

As análises por GFAAS foram realizadas em um equipamento Modelo AAS ZEE nit 600 (Analytik Jena AG, Jena Germany), equipado com um tubo atomizador de grafite com aquecimento transversal (THGA) com plataforma de grafite integrada (IGP) e efeito Zeeman de correção de fundo. As amostras foram introduzidas no tubo de grafite utilizando um autoamostrador Modelo MPE60 (Analytik Jena AG, Jena Germany), o espectrômetro compacto é controlado por um micro-computador.

As medidas no equipamento foram executadas utilizando uma lâmpada de cátodo oco (HCL) de chumbo (Varian, Austrália), usada como fonte de radiação. Absorvância integrada (absorvância intergrada/s), baseada de modo restritivo em área de pico foi usada exclusivamente para a evolução e quantificação do sinal analítico. As condições experimentais estão descritas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Condições experimentais utilizadas no GFAAS.

Parâmetro	Valor / especificação
Intensidade de corrente	3 mA
Comprimento de onda	283,305 nm
Largura da fenda espectral	1,2 nm
Gás de purga	Argônio (pureza 99,997%)
Fluxo de gás	2 L min ⁻¹

2.4.2 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-MS)

Um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado ICP-MS XseriesII (Thermo Scientific, Germany) foi usado para a determinação de chumbo, onde as amostras foram introduzidas utilizando um nebulizador concêntrico. O instrumento foi operado em modo *standard* sem célula de colisão. Gás argônio (99.997%, White Martins, Salvador, Brasil) foi usado como gás carreador e os parâmetros instrumentais estão listados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Parâmetros instrumentais utilizados para determinação dos elementos no ICP-MS

Potência do Plasma	1,3 kW
Fluxo de argônio do plasma	13 L min ⁻¹
Fluxo de argônio auxiliar	0,7 L min ⁻¹
Fluxo de argônio do nebulizador	0,87 L min ⁻¹
Isótopo monitorado	²⁰⁸ Pb
Número de leituras por replicata	3

2.4.3 REAGENTES E LIMPEZA DOS MATERIAIS

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), com resistividade específica de 18 MΩ cm⁻¹. Ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) e peróxido de

hidrogênio (*Suprapur Merck*) foram utilizados na digestão das amostras de medicamentos de suplementos de ferro.

As soluções padrão de chumbo foram preparadas a partir de diluições adequadas de uma solução padrão estoque de chumbo 1000 mg L^{-1} (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) em HNO_3 0,5% (v/v). A faixa de concentração da curva de calibração aquosa variou entre 0,0 e $10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e foram preparadas diretamente pelo amostrador automático, através de diluições apropriadas de uma solução estoque. Para isso, utilizou-se solução contendo $25,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de uma solução de chumbo. Foi construída uma curva analítica por adição padrão nas amostras de suplementos de ferro, uma curva em uma solução artificial de chumbo em solução padrão de ferro e o mesmo procedimento para a calibração aquosa.

Os *vayos* do amostrador automático, frascos e vidrarias para decomposição ou armazenamento das amostras e preparo das soluções de calibração foram previamente lavados com solução diluída de Extran (*Merck*). Posteriormente enxaguados com água deionizada e mantidos em solução de HNO_3 10% (v/v) por no mínimo 24 horas. Após este período, enxaguados três vezes com água ultrapura e secos ao ar em ambiente livre de poeira.

2.4.4 AMOSTRAS

Os estudos visando a determinação de chumbo foram realizados em doze amostras de medicamentos para suplementação de ferro, adquiridas em farmácias de cidades brasileiras.

As amostras permaneceram armazenadas em seus respectivos recipientes e, quando abertas para a realização dos experimentos foram transferidas individualmente para frascos de polipropileno previamente descontaminados com solução de ácido nítrico 10% (v/v), por 24 horas, e lavados com água ultra pura para eliminação de metais interferentes. Em seguida, as amostras foram guardadas em prateleira no laboratório protegidas da luz e umidade.

2.4.4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS DE FERRO

Inicialmente foram realizados testes para análise direta, entretanto, a presença de sacarose de algumas amostras formava fuligens dentro do tubo de grafite, comprometendo a análise. Considerando isso, pesou-se, aproximadamente, 0,6 g de amostra de suplemento de ferro para os medicamentos líquidos (500 microlitros de amostra), e 0,1 g de medicamentos pulverizados no caso dos comprimidos, diretamente em tubos de digestão. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de HNO₃ concentrado e 1,0 mL de H₂O₂ 30% (v/v) para digestão completa das amostras.

Os tubos foram colocados em um bloco digestor modelo TECNAL TE 040/25 e, em seguida, fechados com “dedo frio” a fim de evitar evaporação excessiva do ácido durante aquecimento e prevenir a contaminação das amostras. As misturas aquecidas a 140 °C durante três horas sob refluxo constante. A digestão de cada amostra foi realizada em triplicata, assim como ocorreu com o branco. Após a digestão, as amostras foram transferidas quantitativamente para recipientes de polietileno e diluídas para 25 mL utilizando água ultra pura.

A exatidão do método analítico, foi avaliada mediante determinação empregando espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, uma vez que não existe material de referência certificado de medicamentos de suplemento de ferro, bem como matriz similar.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.5.1 ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROTÉRMICO: CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE TEMPERATURA DE PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO

O programa de temperatura para aquecimento do forno de grafite é constituído por duas etapas de secagem, uma etapa de pirólise, uma de atomização e uma última etapa de limpeza.

A otimização de curvas de pirólise e atomização é uma das etapas mais empregadas pelos usuários da espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica durante a obtenção dos programas de aquecimento dos fornos de grafite.

Para obtenção dessas temperaturas, após a otimização, as curvas são representadas graficamente e é observada a variação da absorvância integrada com o aumento da temperatura durante as etapas de pirólise e atomização. Esses resultados permitem verificar a temperatura máxima que pode ser usada na etapa de pirólise para a qual não ocorrem perdas de analito e a temperatura na qual o sinal analítico é mais intenso, sendo também possível, verificar a absorção de fundo durante estas etapas e adotar as condições nas quais se atinja um máximo de sensibilidade, com o mínimo de interferência.

Foram otimizadas as temperaturas de pirólise e atomização na solução artificial de chumbo em padrão de ferro e na solução da amostra com adição de chumbo. As curvas de pirólise foram obtidas a partir das medidas de absorvância após injeção de 20 µL da amostra de suplemento de ferro em HNO₃ 0,5 % (v/v).

Para a otimização da temperatura de pirólise foi fixado 1800°C para a temperatura de atomização que é recomendada pelo fabricante do equipamento e variou-se a temperatura de pirólise com incrementos de 100 °C a partir de 400 °C até observar a diminuição do sinal. A Tabela 2.3 apresenta o

programa de temperatura. As Figuras 2.1 e 2.2 mostram as curvas de temperaturas para a solução artificial e para a amostra de suplemento de ferro.

Tabela 2.3 - Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de Pb usando GFAAS; uma taxa de fluxo interno de gás de 2,0 L min⁻¹ foi utilizada, exceto durante a atomização, quando o fluxo de gás foi desligado.

	Temperatura/°C	Rampa °C/s	Tempo de permanência /s
Secagem 1	120	3	20
Secagem 2	150	5	20
Pirólise	1100	100	30
Adaptação do Gás	2000	0	5
Atomização	2000	FP*	5
Limpeza	2450	FP*	6

**FP=Full Power*

Figura 2.1 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para uma solução de Pb ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) em padrão aquoso de Fe (1 g L^{-1}).

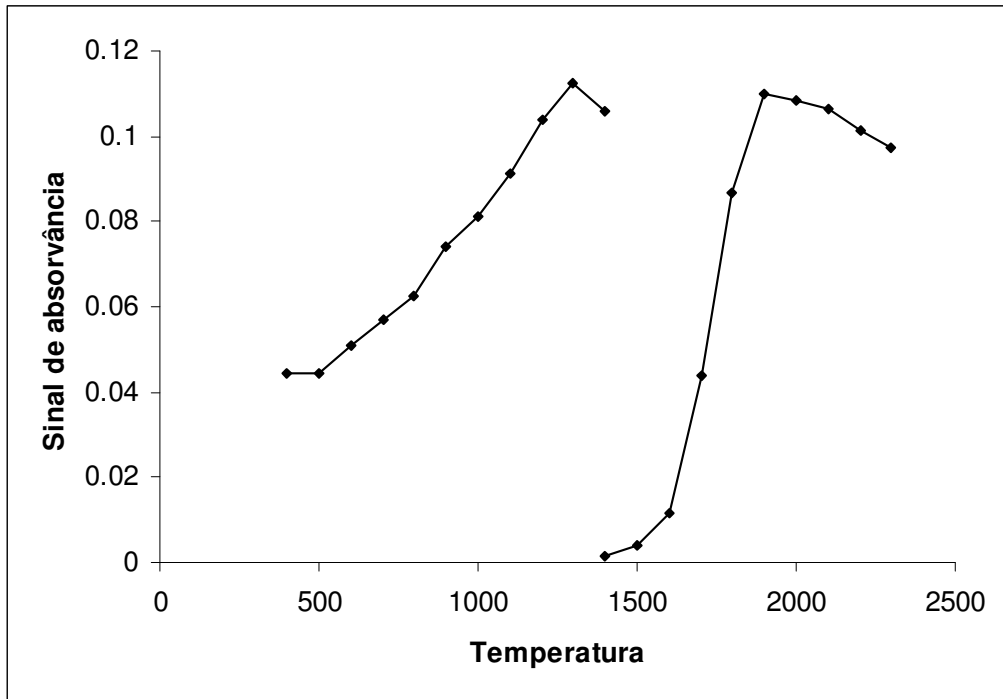
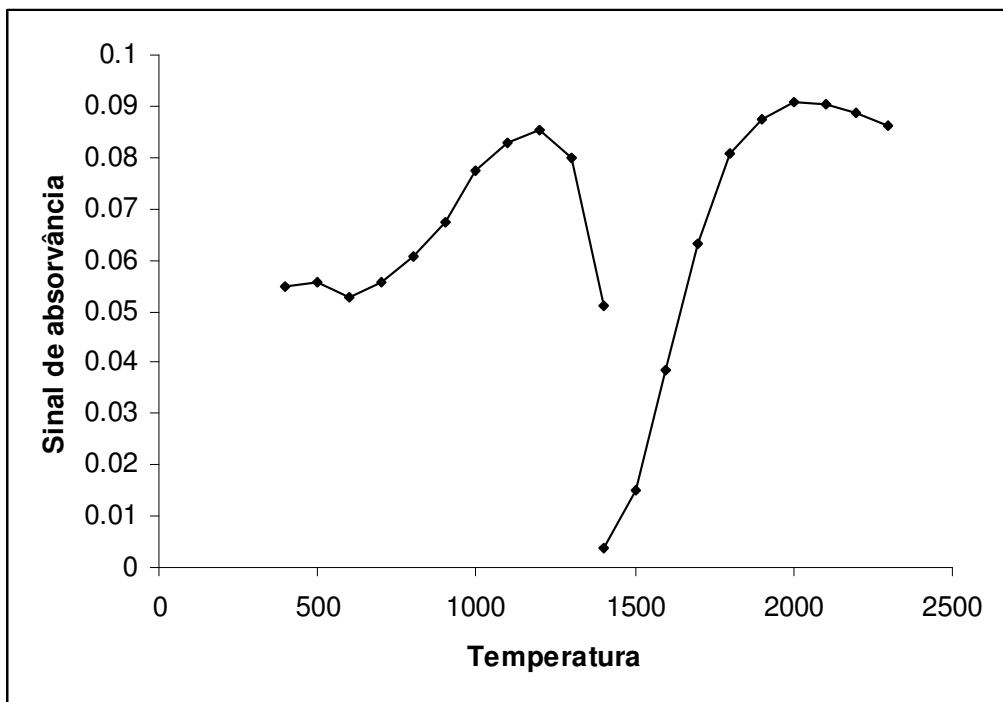


Figura 2.2 – Curvas de temperatura de pirólise e atomização para uma solução de Pb ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) em amostra de suplemento de ferro (FeSO_4).



A comparação das curvas permitem inferir que, os comportamentos são semelhantes na solução artificial e nas amostras, logo, não existe interferência, bem como contribuição das elevadas concentrações de ferro para a atomização de chumbo. Considerando isso, para os experimentos posteriores foram adotadas temperaturas que serão fixadas nos próximos passos do trabalho em 1100 °C e 2000 °C para a temperatura de pirólise e atomização, respectivamente.

2.5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ E ESCOLHA DA TÉCNICA DE CALIBRAÇÃO

Para avaliar o efeito de matriz e escolher a técnica de calibração para o procedimento, um experimento empregando o procedimento geral envolvendo a técnica de adição de analito foi realizado utilizando uma amostra de sulfato ferroso com baixo teor de chumbo. Quantidades de chumbo foram adicionadas nas amostras de sulfato ferroso antes do preparo da amostra de forma que fossem obtidas amostras de sulfato ferroso para medida com concentração equivalente aos seguintes pontos da curva analítica 0; 1,25; 2,5; 3,75; 5,0; 7,5 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A partir disso foram construídas duas curvas de calibração para as condições:

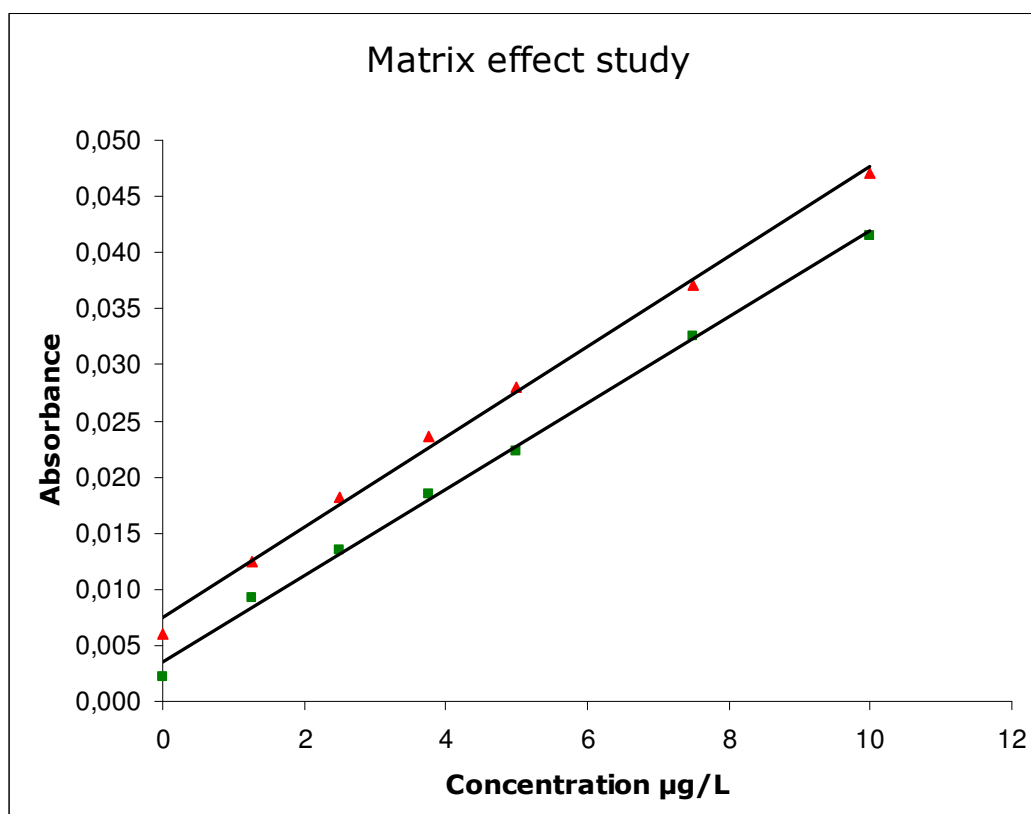
- Curva de calibração em padrão aquoso de chumbo.
- Curva de calibração com adição de analito.

Para os experimentos realizados, foram encontradas as inclinações listadas na Tabela 2.4 e suas respectivas curvas analíticas são mostradas na Figura 2.3.

Tabela 2.4 - Inclinações das curvas analíticas obtidas para cada uma das curvas propostas construídas empregando GFAAS.

Curva analítica	Inclinação da curva analítica
Padrão aquoso de Pb	$Abs_{integrada} = (0.003843 \pm 0.000254)C_{Pb}$
Adição de analito	$Abs_{integrada} = (0.004016 \pm 0.000277)C_{Pb}$

Figura 2.3 - Avaliação do efeito de matriz: curva aquosa x curva com adição de padrão construída em medicamento de sulfato ferroso ($FeSO_4$).



Na Figura 2.3, em vermelho, estão dispostos os pontos que formam a curva analítica com adição de analito (curva na amostra). Em verde, os pontos da curva analítica em padrão aquoso de chumbo. As inclinações das curvas analíticas obtidas (Tabela 2.3), expressas como intervalo de confiança ao nível de 95%, demonstraram que a determinação de chumbo através do método proposto neste trabalho pode ser realizada com a técnica de calibração

externa usando padrões aquosos, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre as inclinações das curvas analíticas obtidas mediante comparação por *teste t Student*.

2.5.3 PRECISÃO

Precisão é um termo generalizado para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições conhecidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão relativo. Como é dependente do analito, a precisão deve ser determinada para diferentes concentrações do analito.

Neste trabalho, a precisão foi expressa como percentagem do desvio padrão relativo, a partir de 10 determinações repetitivas, calculada usando solução padrão de chumbo e em uma amostra de suplemento de ferro. Foram encontrados, **4.65%** para a solução padrão de chumbo com concentração $25 \mu\text{g L}^{-1}$ e **5.92%** para uma amostra com concentração de chumbo igual a $12.56 \mu\text{g L}^{-1}$. Os valores obtidos demonstram boas precisões ($\text{RSD} < 20\%$) e, considerando isto, apresentam capacidade de reproduzirem os resultados encontrados.

2.5.4 MASSA CARACTERÍSTICA

Na atomização eletrotérmica, um volume definido da amostra é dispensado dentro do atomizador e a temperatura vai sendo aumentada para remover o solvente e a maioria dos concomitantes antes da atomização. A alíquota introduzida dentro do tubo de grafite é atomizada em um tempo muito curto (geralmente 1s) e um sinal transiente é estabelecido, cuja área (absorvância integrada) é proporcional à massa do analito na solução medida. Tendo em vista que o sinal observado em ETAAS depende da massa do

analito, o termo “massa característica” é usado como uma medida da sensibilidade do forno para um dado analito. A massa característica de um analito é definida como a massa do analito necessária para produzir um sinal, absorvância *versus* tempo, com área integrada de 0,0044 s, ou seja, 1 % de absorção. A massa característica é calculada de acordo com a seguinte equação:

$$m_o = \frac{\text{Volume de padrão injetado (L)} \times \text{Concentração do analito } (\mu\text{g L}^{-1}) \times 0,0044}{\text{Absorvância medida}}$$

onde, m_o , é a massa característica, e Abs medida é o sinal de absorvância integrada medido para o padrão empregado. O valor da massa característica encontrada foi de **21,3 pg**.

2.5.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Limite de detecção é o fator mais crítico na seleção de um método para análise de traços. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, valendo-se de um determinado procedimento experimental, ou seja, o menor valor que pode distinguir ruído de sinal analítico. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância analisada que pode ser medida, utilizando um procedimento experimental com certo nível de confiança. O limite de detecção (LD) foi calculado pela relação $(3 \times \delta/s)$ e o limite de quantificação (LQ) pela relação $(10 \times \delta/s)$, sendo δ o desvio padrão da leitura de 10 brancos e s o coeficiente angular da curva de calibração. Os limites de detecção e de quantificação foram, **0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$** e **0,82 $\mu\text{g L}^{-1}$** , respectivamente. Os limites de detecção e quantificação, considerando uma massa de 0,5 g de amostra, são **0,012 $\mu\text{g g}^{-1}$** e **0,041 $\mu\text{g g}^{-1}$** , respectivamente.

2.5.6 RESUMO DAS FIGURAS DE MÉRITO PARA DETERMINAÇÃO EM GFAAS

A Tabela 2.5 resume as figuras de mérito encontradas no desenvolvimento deste trabalho. Pode-se concluir que o método desenvolvido é rápido e bastante sensível para determinação de chumbo em suplementos de ferro.

Tabela 2.5 - Figuras de mérito para o método proposto visando a determinação de chumbo em suplementos de ferro por GFAAS.

Figuras de mérito	
Inclinação da curva analítica ($L \mu g^{-1} \pm s$)	0,003843 \pm 0,000254
Limite de Detecção	0,012 $\mu g g^{-1}$
Limite de Quantificação	0,041 $\mu g g^{-1}$
Precisão	5,92%
Massa característica	21,3 pg

2.5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método proposto foi aplicado em 12 amostras de medicamentos de suplementos de ferro e os valores encontrados estão listados na Tabela 2.6. A Tabela 2.6 mostra os valores encontrados empregando a determinação por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.

Tabela 2.6 - Resultados encontrados na determinação de chumbo empregando GFAAS e ICP-MS

Amostra	Resultados empregando GFAAS ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Resultados empregando ICP-MS ($\mu\text{g g}^{-1}$)
BRA-LOM	<0,041	<0,016
BRA-ANS	<0,041	<0,016
BRA-FOL	0,153 \pm 0,019	0,168 \pm 0,006
BRA-ANS	0,096 \pm 0,005	0,099 \pm 0,003
BRA-SULX	0,161 \pm 0,021	0,170 \pm 0,013
BRA-COM	0,534 \pm 0,066	0,580 \pm 0,055
BRA-ANX	<0,041	0,018 \pm 0,002
BRA-FER	<0,041	<0,016
BRA-NEU	2,980 \pm 0,279	2,830 \pm 0,575
BRA-SULJ	0,787 \pm 0,078	0,737 \pm 0,032
BRA-FOR	5,940 \pm 0,0276	6,290 \pm 0,041
BRA-VIT	7,068 \pm 0,199	6,953 \pm 0,081

O objetivo da determinação por ICP-MS foi avaliar a exatidão do método analítico, buscando valores que não exibissem diferenças estatisticamente significativas. O método de regressão linear foi usado para comparar os resultados obtidos entre as duas técnicas empregadas e a equação expressa com intervalos de confiança foi:

$$[\text{ICP-MS}] = 1,01 \pm 0,05 [\text{ETAAS}] - 0,01 \pm 0,15, r = 0,9975$$

Estes resultados demonstram que a inclinação e o intercepto calculado não diferem significativamente a partir do “ideal” valores de 1 e 0 respectivamente, evidenciando que não há uma diferença sistemática entre os valores obtidos pela determinação de chumbo empregando ETAAS e ICP-MS.

Os valores obtidos permitem inferir que se for avaliada a duração do tratamento para anemia, os mesmos precisam ser considerados. A Farmacopeia dos Estados Unidos estabelece que valores de Pb superiores a $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ em medicamentos são valores elevados e podem ser prejudiciais. Quatro das doze amostras analisadas possuem valores acima do máximo estabelecido e podem trazer toxicidade.

2.6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica demonstrou ser eficaz para determinação de chumbo nos medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva. O método proposto apresentou boa precisão, exatidão (a partir da análise por ICP-MS) e sensibilidade.

Os medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva precisam de análises mais aprofundadas considerando as diversas possibilidades de obtenção - baratas, cabe ressaltar - e por serem vendidos em larga escala, sem esquecer a distribuição gratuita, para crianças.

Não estabelecer limites máximos permitidos para metais e metalóides em produtos farmacêuticos funciona como uma porta para a não preocupação dos laboratórios enquanto produtores de medicamentos. Visando o lucro, inicialmente e, obedecendo aos critérios mínimos da ANVISA, contaminantes podem chegar aos medicamentos sem um conhecimento prévio destes.

Das amostras analisadas, quatro apresentam valores de chumbo superiores ao máximo estabelecido pela Farmacopeia norte americana. Isso permite inferir que os medicamentos possuem contaminações de chumbo que, em uma amostra chega a ser até 10 vezes maior que o estabelecido pela Farmacopeia consultada.

A Farmacopeia brasileira precisa incluir valores máximos em produtos e não somente valores máximos permitidos para a ingestão, pois deve-se considerar que a posologia medicamentosa leva em consideração o tempo de tratamento, bem como o alvo terapêutico.

CAPÍTULO III

*DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM
SUPLEMENTOS DE FERRO
EMPREGANDO AMOSTRAGEM EM
SUSPENSÃO E HR-CS CVAAS*

3.1 INTRODUÇÃO

A busca incessante por novos métodos analíticos com o objetivo de minimizar o tratamento de amostras, garantindo uma determinação cada vez mais direta e voltada para a redução da sequência analítica e da possibilidade de contaminações do procedimento causadas por excessivas manipulações tem sido um dos principais objetivos em análise de metais. Aliado a isso, a química analítica dispõe de técnicas capazes de oferecerem métodos com boas sensibilidades, permitindo análise de variadas amostras em níveis traço e ultra-traço.

A utilização da amostragem em suspensão tem sido proposta em química analítica como alternativa para os métodos principais que decompõem a amostra, por promoverem menores possibilidades de perdas do analito e, principalmente, diminuição da possibilidade de contaminação.

A combinação de técnicas analíticas à geração de vapor frio tem sido muito aplicada para a determinação de mercúrio e cádmio garantindo técnicas bem consolidadas [52, 53]. Como vantagens, essa técnica traz o aumento da eficiência de transporte do analito permitindo limites de detecção em níveis muito baixos, uma total separação entre a matriz e o analito, uma menor possibilidade de formação de interferências com a quantificação total do analito presente.

Graças a essas vantagens, a geração de vapor frio tem sido aplicada em variadas amostras para determinação de mercúrio. Aplicações que vão desde a determinação em amostras alimentícias até amostras ambientais [54, 55].

Nesse trabalho desenvolveu-se uma estratégia analítica para determinação de mercúrio total em medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva usando amostragem em suspensão como procedimento de preparo de amostra e espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio. Empregou-se, após resultados preliminares, um planejamento fatorial completo para avaliar as variáveis que afetavam o preparo da suspensão.

Os parâmetros de validação foram: limites de detecção e quantificação, linearidade das curvas analíticas, precisão mediante determinação do desvio padrão relativo e exatidão a partir do ensaio de adição/recuperação. O método foi aplicado em medicamentos adquiridos em farmácias de diferentes cidades brasileiras [56].

3.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.2.1 O MERCÚRIO

O mercúrio e suas espécies orgânicas e inorgânicas são extremamente tóxicos para o sistema nervoso central e periférico. Entretanto, como já é bem descrito, a toxicidade de um composto depende da sua concentração e da forma química presente, sendo as orgânicas mais tóxicas que as inorgânicas. As principais formas químicas de mercúrio são: o mercúrio elementar (Hg^0), mercúrio inorgânico bivalente (Hg^{2+}), metilmercúrio (CH_3Hg^+) e di-metilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) [57]. A monitoração biológica da exposição ao mercúrio depende da investigação da forma química presente. Por exemplo, a identificação de mercúrio elementar no sangue e na urina é usada para avaliação da exposição em caso de contaminação por mercúrio elementar, principalmente associada às contaminações ocupacionais. Para a exposição em metilmercúrio, os principais bioindicadores utilizados são amostras de sangue e de cabelo [58].

Espécies de mercúrio são altamente voláteis e isso é preocupante, pois facilita a exposição por via aérea, alcançando a corrente sanguínea e produzindo, mais rápido, efeitos nocivos sobre o sistema nervoso, digestivo, imunológico, além dos pulmões e rins (principais fontes de entrada e saída). Crianças e bebês são os mais afetados pela toxicidade do mercúrio [59].

3.2.2 DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM GERAÇÃO DE VAPOR FRIO

A determinação de mercúrio empregando espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) possui um fundamento de operação bastante simples. Nessa técnica, o mercúrio é reduzido ao seu estado atômico livre sem a necessidade de qualquer unidade de atomização, podendo então ser medido por absorção atômica sem precisar aquecer. A redução deste elemento presente na amostra a átomos livres no estado gasoso

ocorre por meio de reação com fortes agentes redutores em sistemas fechados, onde, após isso, o vapor de mercúrio elementar é carregado ao caminho ótico (tubo T de quartzo) por um gás inerte (nitrogênio ou argônio). À medida que os átomos vão chegando à célula de absorção, a medida da absorvância aumenta, até que este cai quando o mercúrio estiver esgotado.

As principais dificuldades encontradas em geração de vapor frio estão diretamente ligadas à natureza da amostra em estudo, estando associado aos seguintes aspectos:

a) Composição química da matriz que irá determinar a forma química do mercúrio. Assim, a presença de agentes quelantes e/ou compostos orgânicos podem afetar o passo de geração de vapor frio, o que complica a análise química.

b) A natureza da matriz definirá as condições experimentais que devem ser postas em prática na preparação de amostras para análise, provando a necessidade de cuidados nesta etapa, considerando o caráter volátil do mercúrio.

Os problemas supracitados revelam as principais fontes de erros nos métodos desenvolvidos para a determinação de mercúrio. Garcia et al. conseguiram realizar a determinação de mercúrio em óxido de ferro (III) e óxido de titânio empregando amostragem em suspensão e CV AAS. As suspensões foram preparadas de usando hexametáfosfato de sódio e ácido clorídrico. O vapor de mercúrio foi gerado utilizando como agente redutor, tetrahidroborato de sódio e quantificação empregando técnica de calibração externa com um limite de detecção de 5 ng g^{-1} [60].

3.2.3 AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO

Em química, o termo suspensão é usado para descrever um fluido contendo partículas sólidas, dispersas e com diâmetro maior que 1 micrômetro [61]. A suspensão é definida em duas fases, interna e externa. A fase interna (sólida) é dispersa na fase externa (líquida) por agitação e, geralmente, ocorre

sedimentação das partículas quando o meio está em repouso. Para evitar a sedimentação, é preciso valer-se de agentes estabilizantes.

A amostragem em suspensão tem sido proposta em química analítica como uma alternativa aos métodos de preparo de amostras por decomposição, uma vez que oferecem benefícios, tais como a diminuição do tempo de preparo das amostras, redução do consumo de ácidos e das perdas do analito por formação de resíduos insolúveis ou por volatilização, menor possibilidade de contaminação e facilidade de operação do procedimento [62].

Um dos principais problemas encontrados na análise por amostragem em suspensões está no tamanho das partículas, uma vez que esta influencia diretamente na estabilidade da suspensão, além de ser fator determinante da eficiência do transporte da amostra em análise. Capilares utilizados em atomização eletrotérmica ou em técnicas com plasmas acoplados podem ser obstruídos, caso suas partículas sejam muito grandes, e com isso, reduzir a eficiência de análise podendo gerar erros analíticos. Tamanhos diminutos de partículas são conseguidos com técnicas de moagem, porém a depender do tipo de amostra, podem se estender por muito tempo, aumentando a sequência analítica e os riscos de contaminação [63].

As vantagens supracitadas de aplicação da amostragem em suspensão explicam o porquê de serem empregadas para a determinação de mercúrio. Silva et al. determinaram mercúrio em arroz, onde a preparação das suspensões é realizada com um leve aquecimento da amostra em um sistema fechado. Após isso, a suspensão obtida é sonicada em presença de uma solução de ácido clorídrico e tiourea. Por fim, uma alíquota acidificada da suspensão é levada para a determinação por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor [64]. Durante a análise de fertilizantes, De Jesus et al. prepararam suspensões utilizando a amostra, uma solução de cloreto de lantânio, solução de ácido clorídrico, solução de tiourea e uma etapa de sonicação. Os fosfatos dos fertilizantes interferiam na extração de mercúrio, devido à complexação com os íons de mercúrio (II). Essa interferência foi eliminada fazendo uso da solução de cloreto de lantânio como reagente de liberação [52]. Outros trabalhos na literatura reportam o uso da amostragem

em suspensão como procedimento alternativo para preparo da amostra visando a determinação de metais [65] [66] [67] [68].

3.2.4 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA

A otimização multivariada pode ser entendida como um procedimento que visa levar em consideração todos os possíveis fatores importantes no desenvolvimento de um método, estudando-os concomitantemente.

Diferente da otimização univariada, a multivariada pode destacar-se por considerar as interações entre as variáveis durante os experimentos, cuja quantidade é, na maioria das vezes, menor que a univariada e a identificação da significância dos fatores nos processos estudados [69].

Segundo Ferreira 2015, para realizar uma otimização multivariada deve-se selecionar os fatores envolvidos no processo, aqueles que em potencial podem afetar o estudo e devem ser avaliados. Uma definição dos domínios experimentais deve ser criteriosamente realizada, pois a interpretação dos resultados obtidos na otimização é dependente do domínio experimental examinado. Após avaliação preliminar dos fatores, caso necessário, deve-se aplicar uma metodologia de superfície de resposta, onde os fatores considerados estatisticamente significativos para o processo devem ser reestudados mediante uso de planejamentos que estabelecem modelos quadráticos, encontrando assim, valores críticos [69].

3.2.4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO DE DOIS NÍVEIS

O planejamento fatorial completo de dois níveis é um ferramenta que pode ser empregada na otimização de procedimentos, com a vantagem de não necessitar obrigatoriamente de programas estatísticos para avaliar os resultados obtidos.

A quantidade de experimentos para o desenvolvimento deste tipo de planejamento é determinado pela expressão $n=2^k$, onde n é o número de experimentos e k é o número de fatores. A expressão permite todas as possíveis combinações com todos os fatores estudados em dois níveis distintos (superior e inferior). Entretanto, para que sejam avaliados os possíveis erros dos experimentos, é necessário realizá-los em variadas réplicas, o que se torna desvantajoso por aumentar o número de experimentos (principal vantagem em relação à otimização univariada). Para contornar isso, é proposto a realização de experimentos em variadas réplicas (25-30% do número de n) de um ponto central entre o nível superior e inferior [69].

Os resultados dos experimentos do planejamento fatorial completo são geralmente avaliados pelo cálculo e interpretação dos efeitos, os gráficos de Pareto e gráficos de médias marginais.

Na Tabela 3.1 é mostrada uma matriz exemplo para um planejamento fatorial completo 2^3 , apresentando 3 fatores em estudo (A, B e C) e cada um desses fatores, variando em dois níveis (-1 e +1). Considerando 3 pontos centrais (PC), esse planejamento possui 11 experimentos, sendo 8 obrigatórios ($2^3=8$).

Tabela 3.1 - Exemplo de matriz de planejamento fatorial completo (2^3)

Experimento	A	B	C
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	+
8	-	-	-
9 (PC)	0	0	0
10 (PC)	0	0	0
11 (PC)	0	0	0

Os experimentos devem ser realizados em ordem aleatória, a fim de garantir que possíveis resultados influenciados pelo sistema sejam evitados, proporcionando confiabilidade e qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos que serão calculados [69] [70] [71].

Uma vez obtidos os resultados dos experimentos, a avaliação da significância dos principais fatores em estudos e das suas interações pode ser feita por uma análise da variância (ANOVA) e da interpretação dos resultados do gráfico de Pareto. A ANOVA faz o uso de p (probabilidade estatística) e com isso é estimada a significância dos efeitos e das suas interações, sendo considerado um efeito significativo quando o valor de p for menor que 0,05, o que corresponde a um nível de confiança de 95%. A avaliação realizada

utilizando gráfico de Pareto, considerado um recurso de mais fácil interpretação, é feita pela visualização das barras horizontais, sendo o efeito de um determinado fator, significativo, quando essa barra ultrapassa a linha vertical que também corresponde a um nível de confiança de 95% ($p=0,05$) [69].

O efeito para um determinado fator em estudo é calculado pela diferença da média dos resultados atingidos para o nível superior e o inferior. Esse efeito pode ser negativo ou positivo e isso indica que a resposta analítica diminui ou aumenta no sentido do nível inferior para o superior, respectivamente [69].

Para fins de exemplificação dos conceitos supracitados, a Tabela 3.2 exibe modelo de matriz para um planejamento fatorial completo (2^3), construído com os fatores A, B e C, com suas respectivas interações e suas respostas representadas como Y_n , sendo n igual ao número de experimentos do planejamento, 8. Os sinais das interações entre os fatores são obtidos a partir do produto dos sinais dos fatores que dão origem às interações [69].

Tabela 3.2 Matriz de planejamento 2^3 considerando as interações entre os fatores.

Experimento	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	Respostas
1	+	+	+	+	+	+	+	Y1
2	+	+	-	+	-	-	-	Y2
3	+	-	+	-	+	-	-	Y3
4	+	-	-	-	-	+	+	Y4
5	-	+	+	-	-	+	-	Y5
6	-	+	-	-	+	-	+	Y6
7	-	-	+	+	-	-	+	Y7
8	-	-	-	+	+	+	-	Y8

Os cálculos dos efeitos para os fatores e suas interações são realizados pela diferença entre o somatório das respostas para o nível superior e o das respostas para o inferior, dividida pela metade do número de experimentos. Por exemplo, para calcular o efeito do fator A, deve-se somar as respostas para o nível superior (Y1, Y2, Y3 e Y4), subtrair do somatório das respostas para o nível inferior (Y5, Y6, Y7 e Y8) e em seguida dividir por 4, que corresponde à metade do número de experimentos realizados. O mesmo procedimento deve ser realizado para calcular os efeitos das interações, tendo como nível superior e inferior os sinais obtidos do produto dos sinais dos fatores que dão origem às interações sendo positivo e negativo, respectivamente [69].

Os efeitos calculados devem ser interpretados tanto pela magnitude do valor em módulo, bem como pelo sinal. Isso quer dizer que quanto maior for o número, maior é a significância do efeito calculado para o fator. Levando em consideração o sinal do efeito calculado, valores negativos indicam que a resposta aumenta quando o fator diminui do nível superior para o nível inferior e os valores positivos indicam que a resposta aumenta quando o fator aumenta do nível inferior para o nível superior [69].

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma estratégia analítica para a determinação de mercúrio em medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva empregando amostragem em suspensão e espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

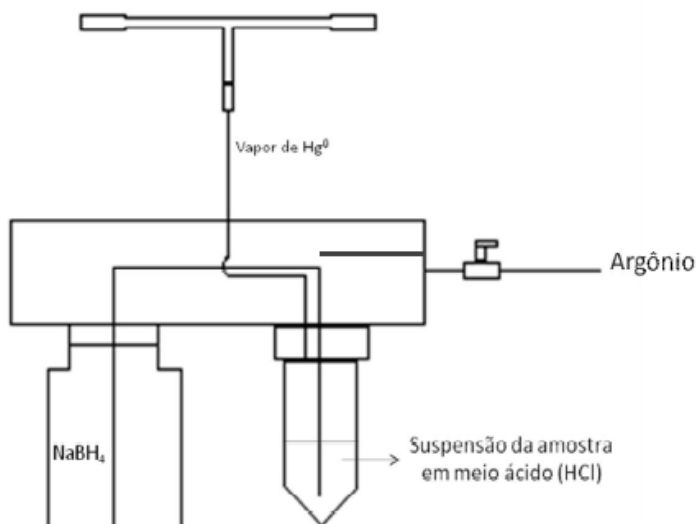
- Investigar os principais fatores envolvidos no preparo da suspensão para a determinação de mercúrio;
- Otimizar, empregando técnicas de planejamento fatorial completo, as condições experimentais para preparo da suspensão;
- Validar a estratégia analítica considerando os critérios estabelecidos pela IUPAC;
- Aplicar os métodos desenvolvidos em suplementos de ferro usados para tratamento da anemia ferropriva;
- Avaliar os resultados encontrados à luz da legislação vigente.

3.4 PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Foi usado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua modelo CONTRAA 700 Analytik Jena (GLE, Berlin, Alemanha), equipado com um módulo de Geração de Hidreto HS50 Analytik Jena (GLE, Berlin, Alemanha), esquematizado na figura 3.1. Para as suspensões, um banho ultrassônico modelo USC -1850 UNIQUE (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). A água utilizada foi obtida a partir de um sistema para purificação de água Milli-Q Plus (Belford, MA, USA).

Figura 3.1 Desenho esquemático do sistema de geração de vapor frio de mercúrio utilizando módulo HS50 adaptado, acoplado ao HR-CS AAS. (Reproduzido com autorização de Silva, 2012 [72])



3.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.5.1 ESTUDOS PRELIMINARES

Inicialmente foram realizados testes para avaliar quais condições seriam escolhidas na determinação de mercúrio empregando HR-CS CVAAS, segundo os critérios estudados visando a determinação direta de mercúrio nas amostras de medicamentos.

Os testes preliminares foram efetuados com a determinação direta de mercúrio na amostra somente com ácido clorídrico, com adição de tiourea (0,5% m/v) e ácido clorídrico e por fim, com adição de tiourea (0,5% m/v), ácido clorídrico e sonicação.

As condições para a geração de vapor de mercúrio foram selecionadas a partir de um método já desenvolvido em trabalhos anteriores, otimizados para condições ótimas, listadas na Tabela 3.3 [64].

Tabela 3.3 Resumo das condições ótimas para determinação de mercúrio empregando HR-CS CVAAS.

Parâmetro	Condições ótimas
Concentração HCl (mol L⁻¹)	1,5
Concentração de NaBH₄ (% m/v)	1,0
Volume de NaBH₄ (mL)	4,0

Anterior à realização dos testes foram realizadas determinações de soluções branco e padrões aquosos, a fim de, realizar uma limpeza do sistema bem como avaliar os sinais de absorvância e aspecto do pico formado no espectro.

A solução branco resultou em um sinal (**0,00714**) e a solução de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ em um sinal (**0,25065**) que são concordantes com os valores obtidos na curva de calibração anteriormente desenvolvida.

Os testes foram realizados em dois diferentes volumes da amostra (2 mL e 4 mL) e em todos, o volume final levado para a geração do vapor de Hg foi de 10 mL, avolumadas com água ultrapura alcançando concentração final de HCl ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$) e concentração de tioureia 0,5%. Os resultados dos seguintes experimentos são descritos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Resultados dos testes para volume de amostra nas condições ótimas para determinação de mercúrio empregando HR-CS CVAAS.

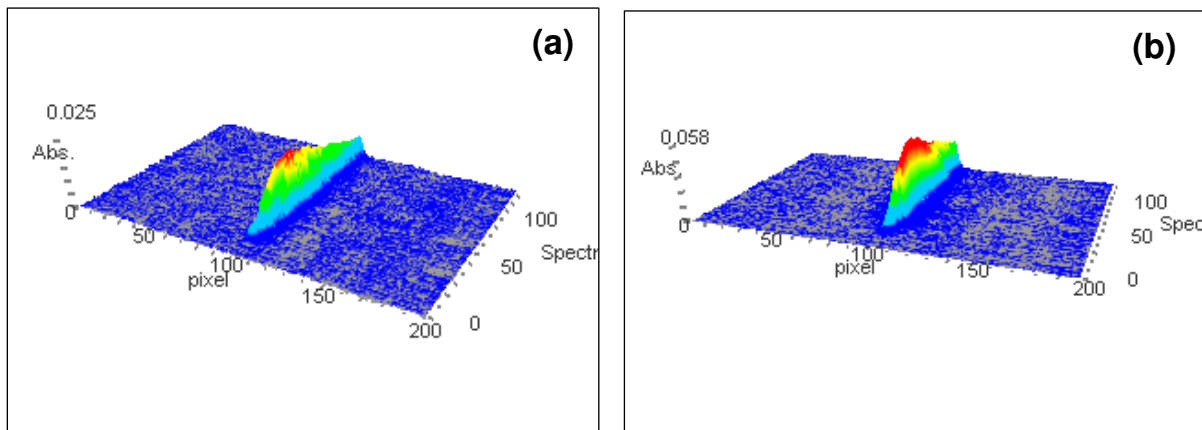
Teste	Volume de Amostra (mL)	Volume de HCl (6 mol L^{-1})	Volume de Tioureia (2%)	Tempo e Temperatura de Sonicação	Sinal de Absorvância
1	2	2,5 mL	--	--	0,00538
	4	2,5 mL	--	--	0,00636
2	2	2,5 mL	2,5 mL	--	0,04043
	4	2,5 mL	2,5 mL	--	0,03594
3	2	2,5 mL	2,5 mL	20 min/60 °C	0,26537
	4	2,5 mL	2,5 mL	20 min/60 °C	0,24005

Os valores obtidos permitem inferir que a utilização de tioureia admite uma maior extração de mercúrio que poderia estar retido na amostra e que, quando aliada à sonicação, toleram ainda maiores extrações, levando a deduzir que a tioureia é necessária para a extração no preparo da suspensão, visto que nos experimentos realizados em sua ausência, o valor de absorvância é aproximadamente igual ao sinal do branco. Os valores ainda tornam possível concluir que, a solução de tioureia é limitante em relação à quantidade de

mercúrio extraída da amostra, porquanto nos experimentos com maiores volumes (4 mL) esperava-se um maior sinal de absorvância, fato que não foi observado, levando a entender que a concentração de tioureia seja limitante do valor máximo que esta consegue extrair de mercúrio e que em concentrações maiores mais mercúrio possivelmente seja extraído. Espera-se que o mercúrio encontrado nestes sinais de absorvância esteja complexado a algum composto presente na matriz orgânica do medicamento que funciona como um quelante, tendo sua ligação rompida pelo ultrassom durante a sonicação, permitindo a liberação do mercúrio para a geração do vapor.

Ainda foi realizado um experimento para avaliar a recuperação de mercúrio no qual (2 mL de amostra + 2,5 mL de tioureia + 2,5 de HCl) foi repetido adicionando-se 0,5 µg de mercúrio e levado para a geração do vapor. O sinal de absorvância (**0,08135**) desse experimento permitiu concluir que houve uma boa recuperação de mercúrio quando avaliado com o valor da curva analítica. Para afastar a hipótese de uma possível interferência ligada às elevadas concentrações de ferro presente na amostra (que giram em torno de 5g L⁻¹ segundo bula do medicamento), o ambiente espectral foi avaliado e na linha utilizada (253,651 nm) não foram exibidas interferências por linhas próximas resultantes de ferro, além de não existirem listados na literatura possíveis relatos deste fato. O espectro (200 pixels) mostra conforme Figura 3.2, um ambiente espectral onde só há a presença do pico de absorvância referente ao vapor de Hg gerado.

Figura 3.2 – Pico de absorvância de mercúrio para (a) experimento com adição de tioureia e sonicação da amostra a 60°C; (b) experimento de adição de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio na amostra de sulfato ferroso.



A partir desses valores encontrados, foram realizados estudos para avaliação e otimização das condições a serem empregadas para as determinações nas amostras de sulfato ferroso por amostragem em suspensão.

3.5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA PREPARO DAS SUSPENSÕES

O estudo em evidência foi realizado empregando um planejamento fatorial completo (2^3). Avaliados os fatores: concentração de tioureia, tempo de sonicação e a concentração de ácido clorídrico a ser utilizado durante o preparo da suspensão. As respostas quimiométricas avaliadas em termos de absorvância, obtidas através da altura de pico. A matriz de planejamento, juntamente com os valores reais e codificados está representada na Tabela 3.5.

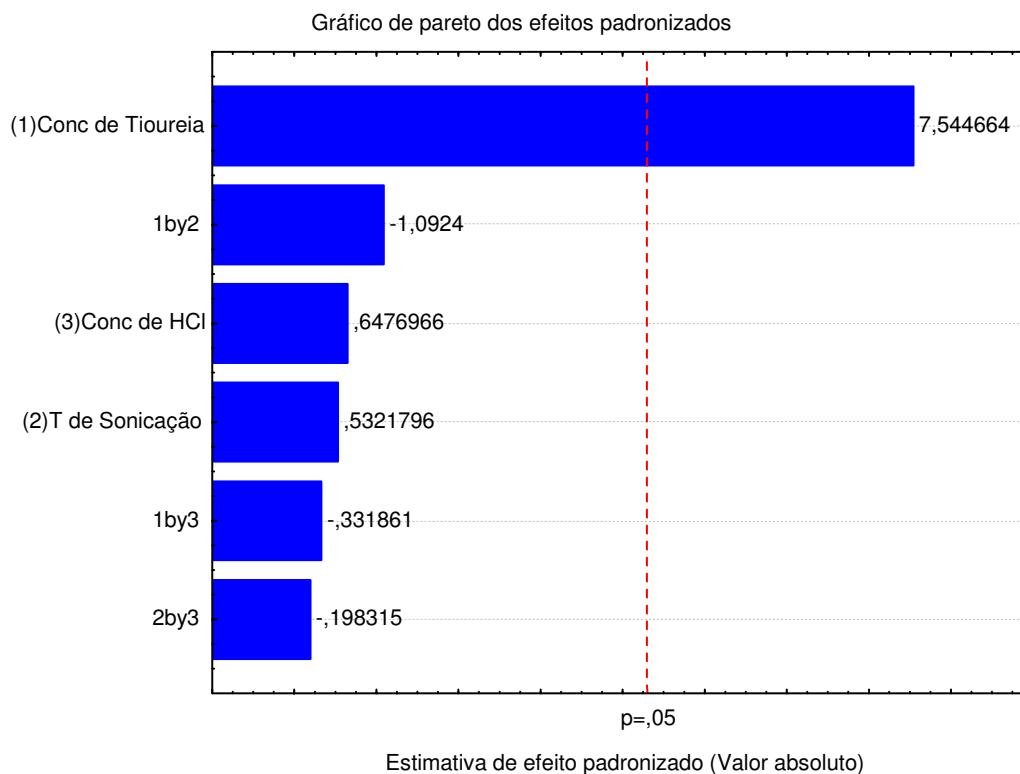
Tabela 3.5 - Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com valores reais e codificados e as respostas analíticas em absorvância.

Experimento	Concentração de HCl	Tempo de Sonicação	Concentração de Tiourea (% m/v)	Absorvância
1	+1 (1,5 mol L ⁻¹)	+1 (30 min)	+1 (1,0 %)	0,040410
2	+1 (1,5 mol L ⁻¹)	+1 (30 min)	-1 (0,0 %)	0,017365
3	+1 (1,5 mol L ⁻¹)	-1 (10 min)	+1 (1,0 %)	0,043120
4	+1 (1,5 mol L ⁻¹)	-1 (10 min)	-1 (0,0 %)	0,012155
5	-1 (0,3 mol L ⁻¹)	+1 (30 min)	+1 (1,0 %)	0,039840
6	-1 (0,3 mol L ⁻¹)	+1 (30 min)	-1 (0,0 %)	0,014570
7	-1 (0,3 mol L ⁻¹)	-1 (10 min)	+1 (1,0 %)	0,041325
8	-1 (0,3 mol L ⁻¹)	-1 (10 min)	-1 (0,0 %)	0,007615
9 (PC)*	0 (0,9 mol L ⁻¹)	0 (20 min)	0 (0,5 %)	0,025660
10 (PC)*	0 (0,9 mol L ⁻¹)	0 (20 min)	0 (0,5 %)	0,032685
11 (PC)*	0 (0,9 mol L ⁻¹)	0 (20min)	0 (0,5 %)	0,036035

*PC: Ponto Central

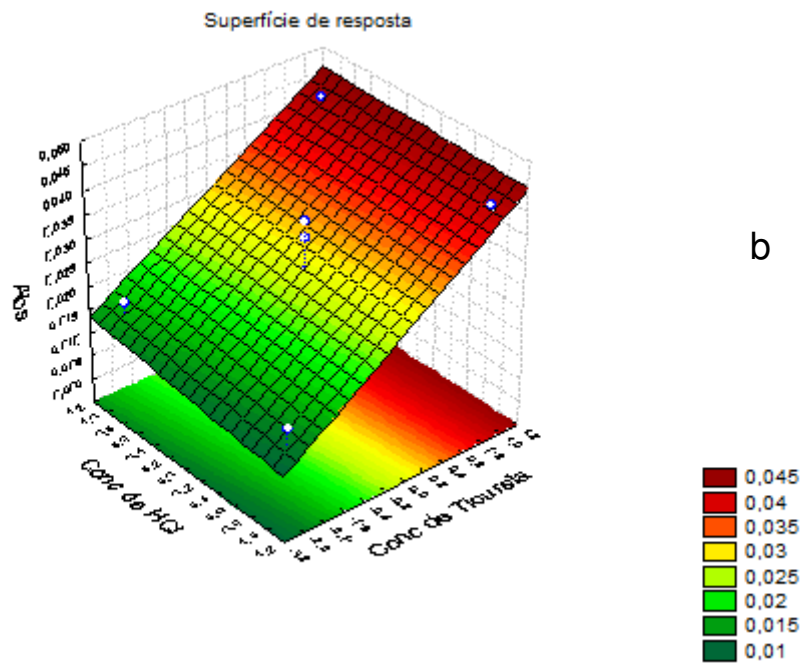
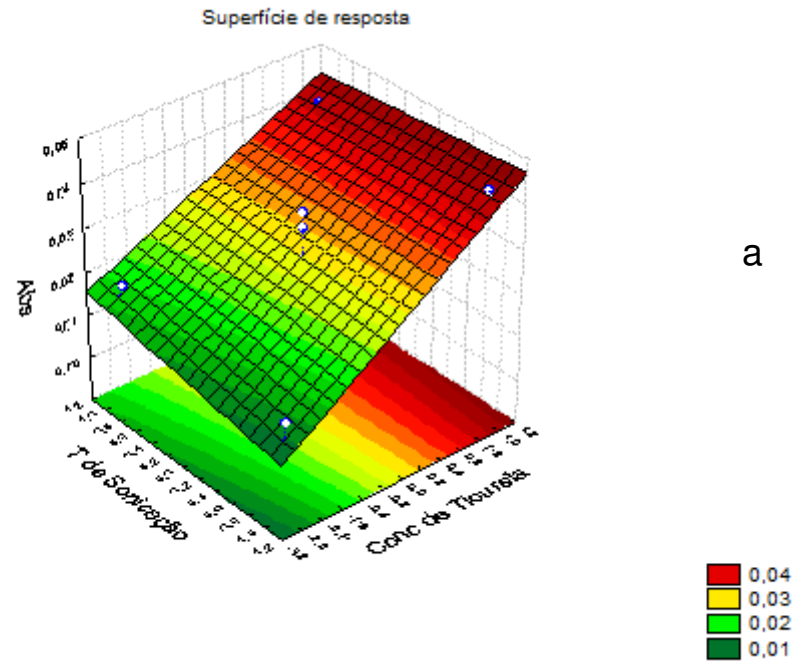
Com as respostas analíticas em absorvância foram gerados: gráfico de Pareto (Figura 3.3) e superfícies de respostas (Figura 3.4).

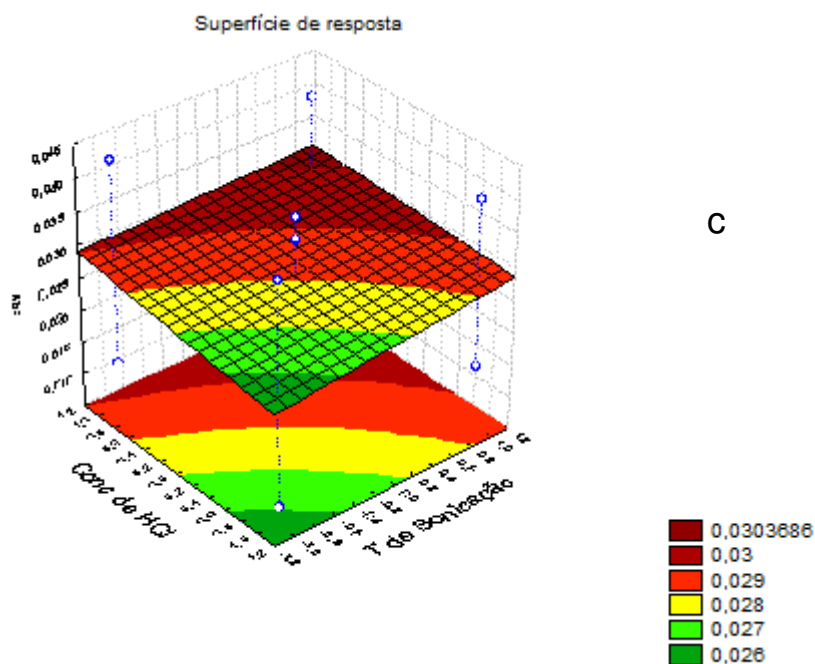
Figura 3.3 - Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo (2^3)



De acordo com o gráfico de Pareto obtido, o único fator significativo que influência no preparo da suspensão para a determinação de mercúrio nos medicamentos de sulfato ferroso é a concentração de tioureia. Pela estimativa do efeito exibida no gráfico, este fator apresenta um efeito positivo no processo, ou seja, na medida em que a concentração de tioureia aumenta a resposta analítica em termos de absorvância também aumenta. Os demais fatores estudados, não são considerados significativos. Nem o tempo de sonicação, nem a concentração de HCl mostram ter efeitos maiores no preparo da suspensão, assim como, suas interações.

Figura 3.4 - Superfícies de resposta (a) = (Abs x T de Sonicação x C Tiourea) ; (b) = (Abs x Conc de HCl x C Tiourea) e (c) = (Abs x T de Sonicação x Conc de HCl).





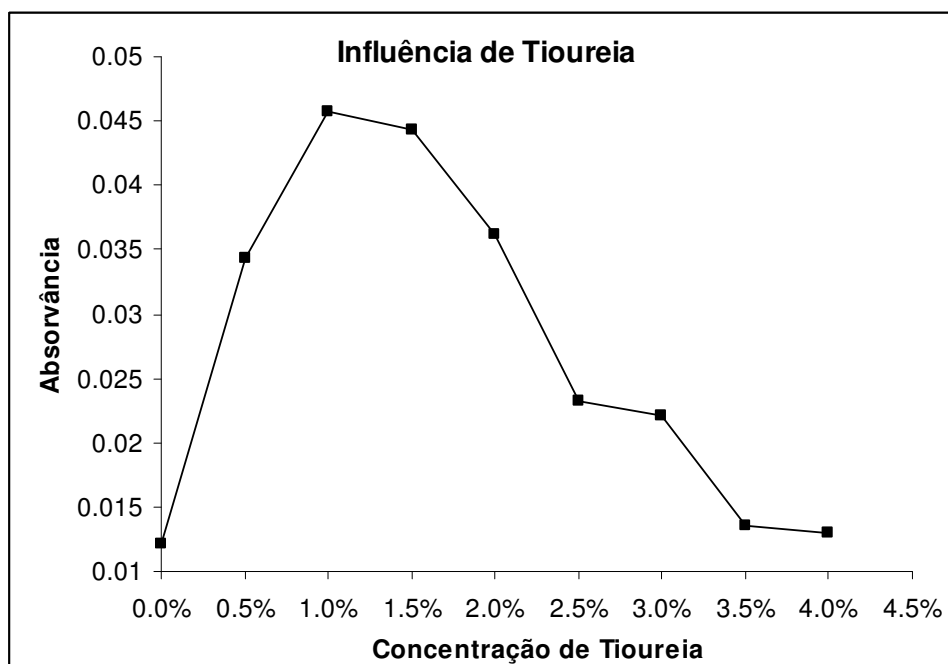
De acordo com as superfícies de respostas (Figura 3.4), é possível concluir que maiores respostas analíticas (absorvância) são obtidas quando se utiliza maiores concentrações de tioureia e não sofrem influências significativas quando a concentração de ácido clorídrico e tempos de sonicação variam.

A partir da interpretação do gráfico de Pareto e das superfícies de respostas, foi escolhido um estudo univariado para a concentração de tioureia, fator mais importante na determinação de mercúrio. Nos seguintes experimentos foram fixados, 15 minutos e 1,5 mol L⁻¹ para o tempo de sonicação e a concentração de HCl, respectivamente.

3.5.3 OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA DA CONCENTRAÇÃO DE TIOUREIA

A partir dos valores do planejamento fatorial completo (2³) e tendo em vista que a concentração de tioureia foi o único fator significativo, uma curva de variação da concentração de tioureia foi realizada e pode ser vista na Figura 3.5.

Figura 3.5 – Curva univariada de otimização para a concentração de tiourea visando o preparo da suspensão para a determinação de mercúrio em amostras de medicamentos de sulfato ferroso.



A partir da análise da Figura 3.5, pode-se inferir que a concentração de tiourea influencia diretamente no preparo da suspensão para a extração de mercúrio da amostra, confirmando assim, os resultados encontrados empregando planejamento fatorial completo. Compreendendo que não há uma variação significativa do sinal de absorvância entre as concentrações de tiourea 1,0 e 1,5%, o valor considerado para o preparo da suspensão foi 1,25%, pois garantia assim a utilização de um valor robusto. Na Tabela 3.6 estão apresentadas as condições ótimas encontradas e utilizadas para o método analítico proposto.

Tabela 3.6- Resumo das condições ótimas para determinação de mercúrio empregando em medicamentos para anemia empregando HR-CS CVAAS.

Parâmetro	Condições ótimas
Concentração de HCl	1,5 mol L ⁻¹
Tempo de Sonicação	15 min
Concentração de tiourea	1,25 %

3.5.4 AVALIAÇÃO DA PERDA DE MERCÚRIO DURANTE O PROCEDIMENTO PROPOSTO

Levando em consideração a volatilidade do mercúrio, foram realizados experimentos visando avaliar o comportamento desse elemento durante o preparo da suspensão. Duas amostras diferentes selecionadas com teores de mercúrio conhecidos e uma quantidade fixa de mercúrio (0,5 µg L⁻¹) foi adicionada em diferentes ordens de execução do experimento, conforme é apresentado na Tabela 3.7. Todas as condições experimentais mantidas e somente a ordem de adição de mercúrio foi variada.

Tabela 3.7 - Avaliação da perda de mercúrio durante a execução do método analítico proposto para determinação empregando amostragem em suspensão e HR-CS CVAAS.

Teste	Ordem de execução	Recuperação
1	Amostra 1 + adição de Hg + sonicação + medida	109,5%
2	Amostra 1 + sonicação + adição de Hg + medida	101,4%
3	Amostra 2 + adição de Hg + sonicação + medida	88,3%
4	Amostra 2 + sonicação + adição de Hg + medida	102,3%

Os resultados, como podem ser vistos na Tabela 3.7, demonstram que no processo de sonicação proposto para a metodologia analítica utilizada, não há perda significativa de mercúrio, com recuperação variando de 88.3% a 109.5%, permitindo deduzir que o preparo da suspensão é confiável no que tange às perdas por volatilidade.

3.5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para avaliar o efeito de matriz e escolher a técnica de calibração para o procedimento, um experimento envolvendo a técnica de adição de analito foi realizado utilizando duas amostras diferentes e quantidades de mercúrio adicionadas nas amostras de forma que fossem obtidas amostras com concentração equivalente aos seguintes pontos da curva analítica 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A partir disso e, para garantir uma maior semelhança possível à matriz da amostra, construídas cinco curvas de calibração com as condições listadas:

- Curva de calibração com padrão de mercúrio em solução aquosa.
- Curva de calibração com adição de analito na amostra 1, sendo adicionadas as concentrações de mercúrio após o processo de

preparo da suspensão e imediatamente antes da leitura (legendada na tabela como: “*Adição amostra 1 – Depois*”);

- Curva de calibração com adição de analito na amostra 2, sendo adicionadas as concentrações de mercúrio após o processo de preparo da suspensão e imediatamente antes da leitura (legendada na tabela como: “*Adição amostra 2 – Depois*”);
- Curva de calibração com adição de analito na amostra 1, sendo adicionadas as concentrações de mercúrio antes do processo de preparo da suspensão (legendada na tabela como: “*Adição amostra 1 – Antes*”);
- Curva de calibração com adição de analito na amostra 2, sendo adicionadas as concentrações de mercúrio antes e o processo de preparo da suspensão (legendada na tabela como: “*Adição amostra 2 – Antes*”).

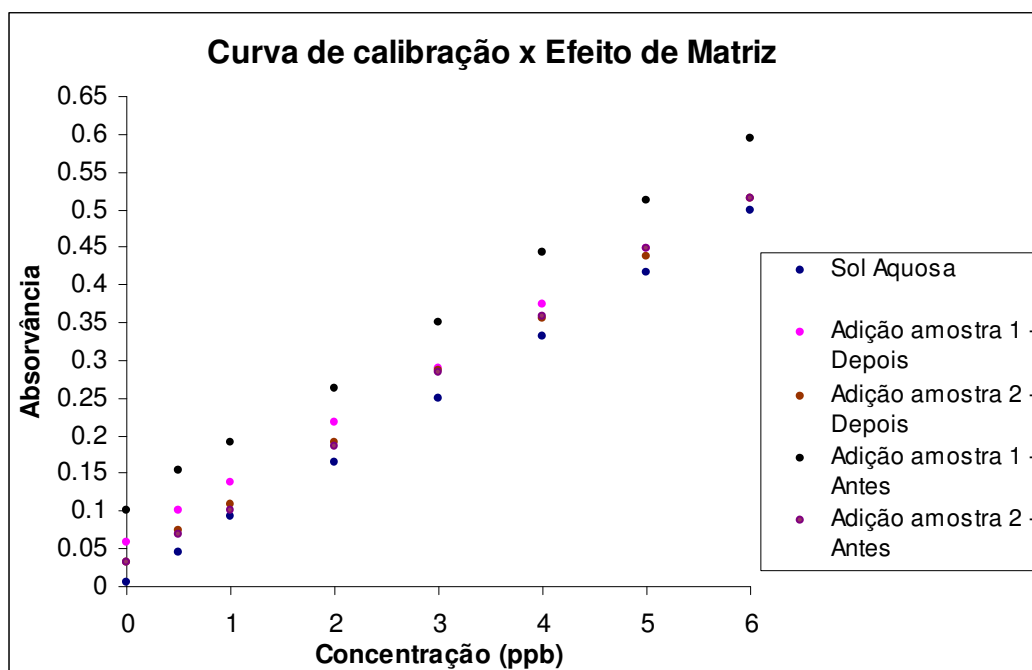
Para os experimentos realizados, foram encontradas as equações listadas na Tabela 3.8 e suas respectivas curvas analíticas são mostradas na Figura 3.6.

Tabela 3.8 – Equações das curvas analíticas obtidas para cada uma das curvas propostas construídas empregando HR-CS CVAAS para determinação de mercúrio aplicando amostragem em suspensão.

Curva analítica	Equação da curva analítica
Padrão aquoso de Hg	$Abs = (0,082054 \pm 0,001466)C_{Hg} + 0,005089$
Adição amostra 1 – Depois	$Abs = (0,077801 \pm 0,001315)C_{Hg} + 0,060053$
Adição amostra 2 – Depois	$Abs = (0,080853 \pm 0,002258)C_{Hg} + 0,033266$
Adição amostra 1 – Antes	$Abs = (0,081744 \pm 0,002769)C_{Hg} + 0,106415$

Curva analítica	Equação da curva analítica
Adição amostra 2 – Antes	$Abs = (0,082720 \pm 0,003448)C_{Hg} + 0,026974$

Figura 3.6 - Avaliação do efeito de matriz: curva aquosa x curva na solução artificial x curva na amostra.



A partir da análise da Figura 3.6 e dos dados referentes às equações das curvas analíticas listadas na Tabela 3.8, pode-se verificar que, a determinação de mercúrio através do método proposto nesse trabalho pode ser realizada usando a técnica de calibração externa com padrões aquosos, já que não há diferença significativa entre as inclinações das curvas analíticas obtidas.

O limite de detecção (LD) foi calculado pela relação $(3\bar{\delta}/s)$ e o limite de quantificação (LQ) calculado pela relação $(10\bar{\delta}/s)$, sendo $\bar{\delta}$ o desvio padrão do branco e s o coeficiente angular da curva de calibração. Nesta etapa do trabalho o limite de detecção encontrado foi de **0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$** , sendo que para a determinação empregando amostragem em suspensão e o valor médio de 1,2 g de amostra de medicamento de sulfato ferroso, este limite é equivalente a

0,635 ng g⁻¹. Neste cálculo foram realizadas a 10 leituras da solução branco, sendo que o desvio padrão e o coeficiente angular considerados foram de **0,000833** e **0,082054**, respectivamente.

O Limite de quantificação encontrado neste trabalho foi de **0,102 µg L⁻¹**, sendo que para a determinação usando amostragem em suspensão e o valor médio de 1,2 g de amostra de medicamento de sulfato ferroso, este limite é equivalente a **2,117 ng g⁻¹**.

A precisão expressa como percentagem do desvio padrão relativo (RSD %), calculado a partir de 7 medidas consecutivas de suspensões, sendo encontrados **10,89 %** e **6,84 %** para suspensões preparadas a partir de duas amostras de sulfato ferroso com as concentrações de mercúrio de **4,816** e **9,610 ng g⁻¹**, respectivamente.

Ademais, a exatidão foi avaliada usando ensaios de adição/recuperação, que consiste na recuperação do analito após análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas e os experimentos realizados com duas amostras diferentes, a fim de, garantir a maior representatividade da natureza do ferro presente nas amostras que seriam utilizadas. A Tabela 3.9 exhibe os resultados dos ensaios de recuperação em amostras de medicamentos para tratamento da anemia.

Tabela 3.9 – Ensaio de adição e recuperação.

Amostra	Natureza do ferro	Hg adicionado (ng g ⁻¹)	Hg encontrado (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)
3*	Ferro (II) Sulfato	0	2,11	--
		10,41	12,18	97
		20,82	19,85	85
12*	Ferro (III) Glicinato	0	3,20	--
		10,41	14,21	106
		20,82	24,09	101

3.5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

O método proposto para determinar mercúrio em medicamento para o tratamento da anemia ferropriva, empregando amostragem em suspensão e HR-CS CVAAS foi utilizado em 12 amostras compradas em farmácias nas cidades de Salvador, Ilhéus, Belo Horizonte, Goiânia, Rio de Janeiro e São Paulo, no Brasil. Dessas 12 amostras, 4 apresentaram um teor de mercúrio inferior ao limite de quantificação (2,117 ng g⁻¹). As demais continham teores de mercúrio que variaram entre 3,17 e 34,86 ng g⁻¹. Esses resultados são visualizados na Tabela 3.10. A farmacopeia brasileira estabelece um limite máximo permitido para um conjunto de metais, incluindo o mercúrio. De acordo com o proposto, o teor máximo para todos os metais pesados e metalóides, não pode ultrapassar a concentração de 50 ppm. Isto é de se considerar desatualizado, uma vez que é preciso estabelecer limites para cada elemento em sua legislação, em especial tratando-se de metais potencialmente

perigosos, como é o caso do mercúrio. A farmacopeia americana estabelece como limite máximo de mercúrio permitido nos medicamentos, $0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ e considerando isto, todas as amostras analisadas estão abaixo dos limites máximos autorizados.

Tabela 3.10 - Determinação de mercúrio em amostras de medicamentos de sulfato ferroso

Amostra	Composição	Natureza do ferro	Teor de ferro	Teor de mercúrio (ng g⁻¹)
1*	Sacarose, sorbitol, cloreto de sódio, metabissulfito de sódio, cloridrato de cisteína, ácido sórbico e água	Ferro (III) ferripolimaltose	10 mg mL ⁻¹	34,86 ± 4,53
2*	Ácido cítrico, glicerina, sacarina de sódio, metilparabeno, propilparabeno, propileno glicol e água	Ferro (II) sulfato	125 mg mL ⁻¹	8,25 ± 2,11
3*	Ácido cítrico, metilparabeno, propilparabeno, sorbitol, propilenoglicol, sacarose e água	Ferro (II) sulfato	125 mg mL ⁻¹	<LQ
4	Celulose microcristalina, lactose, amido glicolato de sódio, estearato de magnésio, dióxido de titânio, polietilenoglicol, água e hipromelose	Ferro (II) sulfato	145 mg g ⁻¹	<LQ
5	Dióxido de titânio, estearato de magnésio, povidona, lactose, celulose microcristalina, crospovidona, acetona, macrogol, álcool etílico e água	Ferro (II) sulfato	160 mg g ⁻¹	<LQ

Amostra	Composição	Natureza do ferro	Teor de ferro	Teor de mercúrio (ng g⁻¹)
6	Croscarmelose de sódio, celulose microcristalina, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio e óxido de ferro vermelho	Ferro (II) sulfato	330 mg g ⁻¹	9,61 ± 0,88
7	Manitol, sucralose, macrogol, povidona, celulose microcristalina e dióxido de silício	Ferro (III) ferripolimaltose	140 mg g ⁻¹	<LQ
8	Celulose microcristalina, lactose, amido glicolato de sódio, estearato de magnésio, dióxido de titânio, polietileno-glicol, água e hipromelose	Ferro (II) sulfato	145 mg g ⁻¹	3,17 ± 0,79
9	Manitol, maltodextrina, polivinilpirrolidona, dióxido de silício, estearato de magnésio, carbonato de cálcio, sacarose, polietilenoglicol, dióxido de titânio e álcool	Ferro (II) sulfato	447 mg g ⁻¹	4,82 ± 0,52
10	Sorbitol, metilparabeno, propilparabeno, carmelose de sódio, celulose microcristalina, propilenoglicol e água	Ferro (III) glicinato	280 mg g ⁻¹	<LQ
11*	Ácido cítrico, metilparabeno, propilparabeno, sacarose,	Ferro (II) sulfato	50 mg mL ⁻¹	<LQ

Amostra	Composição	Natureza do ferro	Teor de ferro	Teor de mercúrio (ng g ⁻¹)
	propilenglycol, sorbitol e água			
12*	Cianocobalamina, dexpantenol, nicotinamida, nitrato de tiamina, riboflavina, ácido cítrico mono-hidratado, sacarose, carmelose de sódio, celulose microcristalina, ciclamato de sódio, citrato de sódio di-hidratado, glicerol, metilparabeno, propilenglicol, propilparabeno, sacarina di hidratada de sódio, sorbitol, vanilina e água,	Ferro (III) glicinato	28 mg mL ⁻¹	3,20 ± 0,63

$LQ = 2.117 \text{ ng g}^{-1}$

* Amostras Líquidas

3.5.7 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

A amostragem em suspensão demonstrou ser uma boa alternativa para o preparo de amostra para a quantificação de mercúrio e suplementos de ferro, considerando o caráter volátil de mercúrio e o alto teor de ferro presente.

O planejamento fatorial completo de dois níveis realizado para a otimização do preparo da suspensão, demonstrou a grande importância da tioureia para o procedimento. Este reagente permite a extração de mercúrio da fase sólida para a fase líquida da suspensão.

A alta toxicidade do mercúrio é uma preocupação global bastante conhecida e o método é oportuno considerando os riscos para a saúde que o consumo deste elemento pode causar.

O teor de mercúrio encontrado nos medicamentos analisados foram relativamente baixos e menores que os limites máximos permitidos pelas farmacopeias consultadas. Entretanto, a inquietação é presente considerando que o tratamento de anemia requer um uso contínuo dos medicamentos durante um largo período e altas doses.

CAPÍTULO IV

*DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICRO
ELEMENTOS E ESTUDO DE
BIOACESSIBILIDADE IN VITRO DE FERRO
EM MEDICAMENTOS USADOS PARA
TRATAMENTO DA ANEMIA FERROPRIVA*

4.1 INTRODUÇÃO

A determinação de macro e microelementos tem sido uma importante ferramenta na avaliação nutricional de alimentos. Entretanto, mesmo sabendo que a toxicidade de um elemento está associada à forma química presente e a concentração, poucos trabalhos são reportados investigando os seus teores em amostras com intuito toxicológico.

Isso é de extrema importância, pois nos oferece uma verdadeira noção dos processos de produção de um determinado material e dos seus possíveis efeitos se ingeridos em grandes quantidades, permitindo assim, reconhecer problemas nos processos de produção.

A determinação de macro e microelementos pode ser realizada lançando mão de variadas técnicas espectroanalíticas. Todavia, a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) tem mostrado ser uma boa técnica por quantificar os elementos de maneira multielementar e, com isso, apresentar-se como uma excelente estratégia que reduz custos de análise e o tempo da sequência analítica.

A avaliação dos resultados de um estudo envolvendo a determinação multielementar em variadas amostras é uma tarefa, muitas das vezes, difícil de ser realizada se considerarmos que uma grande quantidade de dados é obtida.

Para auxiliar na interpretação dos resultados, a representação gráfica tornou-se uma alternativa importante e tende a facilitar a explicação por reduzir a dimensionalidade dos resultados, concatenando informações sem perdê-las. Duas técnicas têm sido largamente empregadas e bem difundidas: análise de componentes principais (PCA) e análise por agrupamentos hierárquicos (HCA).

O estudo de bioacessibilidade pode ser realizado *in vivo* ou *in vitro* e os resultados permitem ter uma noção da realidade de uma substância quanto à sua digestão gástrica e inferir sobre o real poder nutritivo e também tóxico de uma determinada substância.

O presente trabalho determinou macro e microelementos em suplementos de ferro usados no tratamento da anemia ferropriva por ICP OES

e avaliou a bioacessibilidade *in vitro* de ferro nestes medicamentos. Os resultados foram estimados empregando ferramentas de análise exploratória de dados, PCA e HCA. Essas análises permitiram avaliar, com sucesso, os teores existentes e discriminar os medicamentos pela origem do ferro presente.

4.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS

A análise exploratória pode ser entendida como um conjunto de métodos estatísticos que tem como objetivo principal a obtenção do máximo possível de informações de um conjunto de dados com relação às suas diferenças e semelhanças, ou seja, para reconhecimento de padrões. Os métodos quimiométricos utilizados para este tipo de análise de dados estão divididos em dois grupos: os métodos supervisionados e os não supervisionados de reconhecimento de padrões [73].

A principal diferença entre os métodos supracitados é que nos métodos supervisionados, cada amostra analisada já possui uma classe preestabelecida, e esta informação é levada em consideração quando estão sendo analisados os resultados e criados os modelos de classificação. Em contrapartida, nos métodos não supervisionados, as amostras não possuem uma classe fixada previamente e assim, não necessitam de nenhum conhecimento prévio acerca da classificação das amostras, sendo criados modelos de classificação a partir dos resultados dos dados obtidos [73].

Para iniciar uma análise exploratória os dados devem ser organizados em uma matriz Z ($n \times m$), onde as linhas da matriz reproduzem os casos (conjunto amostral em estudo), sendo cada amostra descrita por um vetor-linha e as colunas representam as variáveis medidas, como por exemplo, os resultados analíticos, concentrações, intensidades ou semelhantes, sendo cada uma das variáveis representada por um vetor-coluna [74].

Essa matriz Z , que contém m resultados das medidas das variáveis, obtidas para os n casos analisados, pode ser exposta graficamente por n pontos num espaço m -dimensional, ou seja, poderá ser exibida espacialmente, em que cada variável medida corresponderá a um valor dimensional no espaço e cada resultado para cada amostra, corresponderá a um ponto nesse espaço [74]. A Tabela 4.1 mostra um exemplo de uma matriz de dados que é modelada para o uso empregando as ferramentas de análise exploratória.

Tabela 4.1 Matriz de dados demonstrando exemplo para um conjunto de dados obtidos para n casos e m variáveis.

	m_1	m_2	m_3	m_4	$m_{...m}$
n_1	n_1m_1	n_1m_2	n_1m_3	n_1m_4	$n_1m_{...m}$
n_2	n_2m_1	n_2m_2	n_2m_3	n_2m_4	$n_2m_{...m}$
n_3	n_3m_1	n_3m_2	n_3m_3	n_3m_4	$n_3m_{...m}$
n_4	n_4m_1	n_4m_2	n_4m_3	n_4m_4	$n_4m_{...m}$
$n_{...n}$	$n_{...n}m_1$	$n_{...n}m_2$	$n_{...n}m_3$	$n_{...n}m_4$	$n_{...n}m_{...m}$

Quando o conjunto de dados obtidos é muito grande, torna-se difícil a interpretação visual dos resultados, principalmente por conta das altas dimensões dos resultados. Algumas alternativas como a representação gráfica dos dados na forma de histogramas ou por meio de gráficos das variáveis em suas combinações podem ser utilizadas, entretanto, não são eficientes.

O mais apropriado é a utilização de métodos matemáticos que sejam capazes de extrair as informações contidas neste grupo de dados de uma forma mais facilmente visível [73]. Portanto, podem ser aplicadas as ferramentas de análise exploratória, análise de componentes principais (PCA) e análise por agrupamentos hierárquicos (HCA).

A PCA é uma ferramenta, introduzida em 1901 [75] e baseia-se no princípio da manipulação matemática da matriz que contem os dados organizados, onde a redução da dimensionalidade dos resultados é alcançada a partir da correlação das variáveis, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas. A PCA permite descobrir, visualizar e interpretar as diferenças existentes entre as variáveis e examinar as relações que possivelmente existam entre as amostras. Além disso, a PCA permite encontrar amostras com comportamentos distintos (anômalos) àqueles do conjunto de dados [76].

Na análise de componentes principais, a matriz de dados Z recebe. Um pré-tratamento dos dados que é realizado escolhendo a melhor alternativa para tal. Na maioria das vezes, os dados oriundos de análises químicas são autoescalados por conta das diferentes ordens de grandeza. Nesta etapa, os dados são centralizados na média e posteriormente escalados pela variância, dando desta forma, pesos iguais a todas as variáveis medidas, independente das suas ordens de magnitude. O resultado do pré-tratamento gera uma nova matriz que denominaremos de X . Essa matriz é decomposta em duas matrizes, sendo uma de escores e uma ortonormal^A de pesos, sendo que os escores vão expressar as possíveis relações existentes entre as amostras e os pesos, as possíveis relações existentes entre as variáveis. Na nova matriz ortonormal cada coluna definirá uma componente principal [73].

Após a definição das componentes principais cada amostra é projetada no novo conjunto de base, sendo que estas informações estão presentes na matriz de escores. A matriz de escores pode ser entendida como o produto entre a matriz dos eixos originais e a de transformação dos eixos originais para as componentes principais. Após as etapas matemáticas e havendo correlação entre as variáveis originais, não é preciso analisar todas as componentes principais, pois as informações importantes foram concatenadas nas primeiras geradas, significa que houve uma redução da dimensionalidade dos resultados [73, 77].

A redução da dimensionalidade dos resultados ocorre porque as variações do sistema que estão apresentados nos dados são concentradas no menor número possível de novos eixos. Dessa forma, os erros experimentais que são as principais variações aleatórias estão representados nas últimas componentes principais [73]. Seleciona-se o número de componentes principais pela sua importância na avaliação dos resultados e, neste caso, também cabe o bom senso. Alguns autores têm usado a seleção de componentes principais pelo seu autovalor, sendo selecionadas as componentes principais com autovalor maior que um.

^A Uma matriz é dita ortonormal quando seu produto com sua matriz transposta é igual a uma matriz identidade.

Assim como a PCA, a análise de agrupamento por métodos hierárquicos (HCA) é útil para reduzir a dimensionalidade dos dados, permitindo que grandes quantidades de resultados sejam organizados em poucos grupos que representem comportamentos semelhantes e então, comportamentos anômalos sejam identificados. A finalidade principal é a de reunir os objetos (amostras ou os casos da PCA) de maneira que as pertencentes a um mesmo grupo sejam mais parecidas entre si, em relação às demais de outros grupos. Aumentando a homogeneidade intragrupos e a heterogeneidade intergrupos [78].

HCA é uma técnica aglomerativa, significa dizer que, inicialmente, cada objeto é um grupo unitário e a análise vai sendo processada por agrupamento, de acordo com as similaridades até que venham formar um único grande grupo.

A HCA examina as distâncias entre todas as amostras do conjunto de dados e representa essa informação em um gráfico chamado dendograma, onde podem-se visualizar os agrupamentos formados e dessa forma, as similaridades entre as amostras ou variáveis, caso sejam analisadas as variáveis ao invés das amostras. O dendograma é um gráfico que é apresentado em forma de árvore, onde um eixo exibe o nível de similaridade e o outro, os casos em análise, ordenados pelo agrupamento formado [73,78].

Como HCA é baseada no conceito de similaridade, devem existir maneiras de ser calculada a similaridade entre dois objetos. Matematicamente, a similaridade pode ser calculada pela distância entre estes. A maneira mais comum e intuitiva é pela distância Euclideana [78], onde, no plano cartesiano, dois pontos com coordenadas A ($x_1; y_1$) e B ($x_2; y_2$), sua distância euclideana pode ser calculada de acordo a equação 4.1

$$d_{AB} = \{(x_2-x_1)^2 + (y_2-y_1)^2\}^{1/2} \quad \text{Equação 4.1}$$

Além da distância Euclideana, a de Manhattan e a de Mahalanobis são também popularmente utilizadas. A literatura exibe outros métodos de fazer o agrupamento das amostras. Todos têm um comum da primeira iteração, onde são encontrados os dois objetos separados pela menor distância e colocados

no primeiro agrupamento. As etapas seguintes são definidas por critérios específicos para cada método. Pode ser por unir os objetos mais próximos ou os mais distantes ou pela distância média entre outros. Os principais existentes na literatura são: método do vizinho mais próximo, do vizinho mais distante, da média, centróide e de Ward [73].

4.3 APLICAÇÕES DA ANÁLISE MULTIVARIADA EM ESTUDOS FARMACÊUTICOS

A análise multivariada tem sido largamente aplicada em avaliação de dados químicos de diversas naturezas. Dentre estas, cabe citar a avaliação de alimentos [79], plantas [80], amostras ambientais [81] e estudos toxicológicos [82]. A larga aplicabilidade explica o porquê da sua importância enquanto uma ferramenta para explorar resultados.

Nas análises farmacêuticas, onde não deveriam ser diferentes, diversos trabalhos começaram a ser publicados. Zhu *et al.*, propuseram a aplicação da análise multivariada para avaliação de resultados oriundos da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), electroforese capilar (EC) e espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) a fim de gerar impressões digitais de diferentes partes do gengibre, muito conhecido por ser um potente bactericida. O interesse nessa análise está nas diferentes partes da planta que são utilizadas para produção dos fitoterápicos. PCA e HCA identificaram que as amostras foram melhor classificadas quando usados UPLC e HPLC baseados em impressões digitais, ao invés de EC e NIR. PCA, baseado nos resultados de UPLC e HPLC foi capaz de distinguir corretamente entre amostras provenientes de rizomas e da raiz principal. Como conclusão, os autores atribuem ao uso da quimiometria uma importante ferramenta, capaz de distinguir entre as diferentes partes de plantas. Pode ser um instrumento poderoso visando a análise farmacológica, uma vez que foi capaz de identificar e classificar, por qualidade, as matérias-primas vegetais e apoiar assim a segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos [83].

Durante a produção dos medicamentos, a utilização de diferentes insumos pode interferir nos medicamentos obtidos. Carneiro *et al.*, realizaram um estudo para avaliar a homogeneidade de um creme usado para tratamentos dermatológicos de carcinoma basocelular, estuocoqueratose, doença de Bowen, molusco contagioso e verrugas virais, empregando espectroscopia no infravermelho e ferramentas quimiométricas. O creme foi preparado, como uma emulsão utilizando o imiquimode como fármaco ativo e os excipientes: água, vaselina, um emulsionante e um ácido carboxílico, a fim de dissolver o imiquimode. Após o preparo, o creme foi exposto a 45 °C por 3 meses para realizar o teste de estabilidade sendo observada a presença de alguns cristais o que indica problemas de homogeneidade na formulação. PCA permitiu avaliar a composição dos cristais formados a partir dos espectros obtidos em infravermelho. Foi possível identificar a origem dos cristais formados, por causa da ausência de características da substância usada para emulsionar os excipientes e o ativo, como sendo de origem do ácido carboxílico por conta da presença de porção amina e CH nos cristais [84]. Como discutido anteriormente, quando se utiliza técnicas de reconhecimento de padrões não-supervisionados, é possível identificar problemas de produção em indústrias e isso mostra a larga aplicabilidade das ferramentas de análise exploratória.

Myakalwar *et al.*, também avaliaram os medicamentos produzidos quanto ao seu conteúdo visando a viabilidade do estudo em posteriores análises de rotina. Nesse estudo os autores propuseram a utilização de PCA para a classificação de comprimidos (ibuprofeno revestido e não revestido, glucosamina revestida e não revestida, paracetamol e vitamina C) a partir dos teores de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, ferro, manganês, sódio, vanádio, magnésio, titânio e cálcio medidos em seus respectivos comprimentos de onda por espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS). Foram explicadas pelas três primeiras componentes principais 96,29% da variância total dos resultados, permitindo a classificação dos medicamentos pelo teores dos elementos supracitados. A única exceção estava associada à glucosamina não revestida e os dois tipos de comprimidos de ibuprofeno, que em PC2, não exibiram classificações significativas. Os autores concluem sobre a boa aplicabilidade da LIBS, sendo que foram investigados os parâmetros de

validação do processo, com destaque para a precisão dos dados (sempre com RSD<4,03%), tendo um potencial para classificar e discriminar entre comprimidos farmacêuticos, servindo assim, como uma boa alternativa para avaliação eficácia do processo de produção [85].

Aleluia (2015) propôs a aplicação das ferramentas de análise exploratória para avaliação dos resultados obtidos a partir da determinação de macro e microelementos em medicamentos fitoterápicos. Neste estudo, o autor propõe um método de digestão ácida em sistema de refluxo em dedo frio e determinação de Na, K, Mg, P, Ca, Se e Zn, empregando ICP OES. O método, após completamente validado, foi aplicado em 30 amostras de fitoterápicos e o uso da PCA e HCA permitiu a classificação das amostras quanto à presença dos elementos determinados, sendo possível identificar amostras que fugiam do padrão das demais analisadas. Foram escolhidas as três primeiras componentes principais, que explicavam cerca de 78,56% da variância total dos dados, permitindo identificar K, Mg, Zn e Na como os analitos com maior importância na variabilidade dos resultados. Após isso, foram retiradas as amostras que apresentavam um perfil destoante das demais e novas componentes principais calculadas, explicando nas três primeiras componentes principais, 69,48% da variância total dos resultados. Além disso, o autor propôs em seu estudo a avaliação da ingestão dos elementos determinados, considerando a posologia existente nas bulas dos medicamentos e o estudo permitiu inferir que algumas amostras possuem ingestão de macro e microelementos, superiores às máximas permitidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [86].

As variadas aplicações nas mais distintas áreas da química analítica mostram a importância das ferramentas de análise exploratória. Como citado na seção anterior, essas ferramentas podem exibir características desconhecidas em amostras analisadas e identificar falhas nos processos de produção.

4.4 ESTUDO DE BIOACESSIBILIDADE

A concentração de um nutriente presente em um alimento não é parâmetro confiável para avaliar um alimento sob o ponto de vista nutricional, visto que nem toda quantidade do nutriente é liberada para ser absorvida pelo organismo durante a digestão. Diante disso, a comunidade científica propôs os termos bioacessibilidade e biodisponibilidade para um melhor entendimento do assunto e para uma avaliação nutricional mais efetiva de um alimento.

A bioacessibilidade de um nutriente refere-se à fração deste que é liberada da matriz de um dado alimento no trato gastrointestinal, tornando-se disponível para ser absorvido pelo intestino, ou seja, para entrar na corrente sanguínea [87].

A biodisponibilidade de um nutriente é definida como a sua fração em certo alimento que fica disponível para ser utilizado nas funções fisiológicas do organismo ou para ser estocado, quer dizer, apenas uma parcela de todos os nutrientes de um alimento será efetivamente usada pelo organismo [88]. Simplificando, o conteúdo nutricional de um alimento liberado no trato gastrointestinal é a fração bioacessível dos nutrientes (sua bioacessibilidade) para absorção intestinal. Desse total bioacessível, apenas uma parte será de fato absorvida pelo organismo, que refere-se à fração biodisponível do nutriente (sua biodisponibilidade).

Existem basicamente duas maneiras de se determinar a bioacessibilidade de um nutriente específico em um dado alimento: testes *in vivo* e testes *in vitro*.

Os testes *in vivo* fazem uso de cobaias (coelhos, ratos, porcos e macacos) ou humanos. A primeira estratégia do teste é o estudo de balanço de matéria, que determina a quantidade absorvida de um nutriente por medidas da diferença entre a quantidade de nutriente ingerida e a quantidade eliminada nas excretas. A segunda estratégia é o estudo de concentração tecidual, onde a fração bioacessível dos nutrientes é determinada pelas análises das unhas, pêlos e sangue do animal [88].

Já os testes *in vitro* simulam a fisiologia do trato gastrointestinal. Nesta técnica é aplicado sobre a amostra alimentar um sistema de digestão

gastrointestinal simulado empregando a pepsina durante a fase gástrica e uma mistura de pancreatina e os sais biliares durante a fase intestinal. Após essa simulação, a solução resultante é destinada à quantificação do nutriente de interesse, permitindo, assim, avaliar sua bioacessibilidade [89].

As técnicas para determinar a bioacessibilidade de um elemento são usadas não somente em alimentos, mas também em medicamentos, drogas e em materiais contaminados.

Jade *et al.*, propuseram o estudo da bioacessibilidade de elementos traços essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de leguminosas de diferentes espécies, optando por duas técnicas analíticas de extração *in vitro* a fim de compará-las: extração simples de bioacessibilidade (SBET, do inglês Simple Bioaccessibility Extraction) e teste de extração baseado fisiologicamente (PBET, do inglês Physiologically Based Extraction Test). Amostras de caupi, gandu e feijão mangalô foram analisadas. No método SBET, a solução que simula a digestão foi preparada com 100mL de fluido extrator, o qual contém 0,4 mol/L de glicina com pH 1,5 ajustado com HCl concentrado, a 1g de amostra. Depois de ter sido agitada a 30 rpm a uma temperatura constante de 37°C por uma 1 hora, a mistura foi filtrada através de um filtro de acetato celulose. Já no método PBET a amostra foi incubada a 37°C por 1 hora com pepsina em pH 2,5, simulando a digestão gástrica e, posteriormente, com extratos de bile e pancreatina em pH 7,0, simulando digestão intestinal. Foram utilizadas também enzimas, aminoácidos, sais orgânicos e inorgânicos e outros reagentes. Os dois métodos forneceram resultados significativamente diferentes em relação à concentração dos analitos, refletindo em respostas distantes de biodisponibilidade. Entretanto, constatou-se que o método PBET simula de forma mais efetiva o processo de digestão no trato gastrointestinal [90].

4.5 OBJETIVOS

4.5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar do perfil de macro e microelementos em amostras de medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva e estudar a bioacessibilidade de ferro nos medicamentos, usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado como técnica analítica de medida.

4.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico para determinar o teor de macro e microelementos de diferentes amostras de medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva, em função dos elementos Ca, Na, Zn, Mn, Mg, K e P empregando ICP OES;
- Avaliar os resultados obtidos por meio de técnicas multivariadas (PCA e HCA);
- Avaliar a regularidade dos medicamentos usados no tratamento da anemia ferropriva, de acordo com a Farmacopeia.
- Realizar um estudo para avaliar a bioacessibilidade do ferro presente nos medicamentos usados para tratar a anemia ferropriva.

4.6 PARTE EXPERIMENTAL

4.6.1 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP OES)

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Varian, modelo Vista PRO - Mulgrave, Austrália) com visão axial foi usado para a determinação multielementar. As condições instrumentais e as linhas analíticas para cada elemento estão mostradas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Parâmetros instrumentais usados no ICP OES

Parâmetros	Condições
RF gerador de frequência (MHz)	40
RF potência (kW)	1,3
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Pressão do Nebulizador (kPa)	200
Nebulizador	V-Groover com câmara de spray de PTFE <i>Sturman-Masters</i>
Linhas espectrais (nm)	Ca (II) 396,847 K (II) 769,897 Mg (II) 280,270 Mn (II) 257,610 Na (I) 589,592 P (I) 213,618 Zn (II) 213,857 Fe(II) 238,204

4.6.2 MATERIAIS E REAGENTES

Todos os materiais utilizados foram limpos antes de sua utilização, deixados em banho de HNO₃ 30 % (v/v) por pelo menos 24 h e, em seguida, enxaguados com água ultrapura obtido a partir do sistema Milli-Q (Milipore, MA,

EUA), apresentando condutividade inferior a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura.

Visando a avaliação da concentração dos analitos, foram preparadas soluções multielementares na concentração de 500 mg L^{-1} para Ca, P, Mg, K e Na a partir da diluição das soluções padrão de 4000 mg L^{-1} de cada elemento (Merck, Alemanha) e para Mn e Zn, soluções multielementares na concentração de 50 mg L^{-1} , a partir da diluição das soluções padrão de 1000 mg L^{-1} de cada elemento (Merck, Alemanha).

As soluções foram utilizadas para produzir as curvas de calibração e ensaios de adição/recuperação. Para os procedimentos de mineralização das amostras, usou-se o ácido nítrico concentrado (após destilação) e peróxido de hidrogênio 30 % (v/v) Merck (Darmstadt, Germany). No estudo de bioacessibilidade o ácido clorídrico 37 % (Merck), cloreto de sódio 99% (Merck) e pepsina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

4.6.3 AMOSTRAS

Dezessete amostras comerciais de medicamentos de suplementos de ferro, usados no tratamento da anemia ferropriva, foram adquiridas em farmácias de diferentes cidades do Brasil, tais como, Salvador, Ilhéus, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro entre os meses de agosto de 2013 e junho de 2014. As amostras obtidas, de diferentes laboratórios, mantidas em suas embalagens originais e abertas somente no momento dos experimentos.

4.6.4 PREPARO DAS AMOSTRAS UTILIZANDO BLOCO DIGESTOR E DEDO FRIO

Para digestão, pesou-se 0,1 g de amostra de medicamento sólido (comprimido previamente pulverizado) ou 500 microlitros (0,5 g) de medicamento líquido (solução oral, suspensão e xaropes), diretamente em tubos de digestão. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de ácido nítrico

concentrado e 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). Os tubos foram colocados em um bloco digestor modelo TECNAL TE 040/25 e, em seguida, tampados com um aparato de vidro denominado “*dedo frio*”. A digestão de cada amostra foi realizada em triplicata, assim como ocorreu com o branco.

Após a digestão, transferiu-se as amostras quantitativamente para recipientes de polietileno e foram diluídas para 25 mL em água ultra pura.

4.6.5 PROCEDIMENTO PARA ESTUDO DA BIOACESSIBILIDADE DE FERRO DAS AMOSTRAS

Uma etapa de extração simulando a digestão ocorrida no suco gástrico foi realizada a uma temperatura de 37°C em um banho ultrassônico com um suporte para agitação [8]. Os extratantes usados foram água ultrapura e uma solução de composição similar ao suco gástrico, contendo cloreto de sódio, ácido clorídrico e pepsina (0,32 g de pepsina, 0,06 g de NaCl e 0,7 mL de HCl 37%, avolumado para 100 mL com água ultrapura).

Cinquenta mililitros da solução extratante foi adicionada em um Erlenmeyer e, em seguida, uma dose da posologia recomendada na bula de cada medicamento. Após isso, o Erlenmeyer foi agitado por 30 minutos à uma rotação de 110 rpm.

Na etapa final, o extrato foi transferido para um tubo de centrífuga, centrifugado por 15 minutos à uma rotação de 3200 rpm e o sobrenadante levado para análise por ICP OES.

4.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.7.1 ESTUDO DE VALIDAÇÃO

Na etapa de validação, algumas características analíticas do método usado para a quantificação dos elementos foram avaliadas. A linearidade de qualquer metodologia analítica utilizada para quantificar impurezas, deve ser avaliada a partir do limite de quantificação do método até o ponto máximo da curva de calibração onde não é perdida a linearidade. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados com base nas recomendações da ICH [91] e IUPAC, calculados como $3\delta/s$ e $10\delta/s$, respectivamente, onde δ é o desvio padrão de um conjunto de medidas da solução branco e s é a inclinação da curva analítica. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.3 e informam que o método apresenta boa linearidade, com uma ampla faixa dinâmica e boa sensibilidade, exibindo limites de detecção e quantificação em baixos valores.

Tabela 4.3 Figuras de mérito do método analítico proposto para avaliação da linearidade e sensibilidade da determinação de macro e microelementos em suplementos de ferro.

Analito	Linearidade e faixa dinâmica (mg L⁻¹)	Coefficiente de regressão	LD (mg g⁻¹)	LQ (mg g⁻¹)
Ca	0,52 - 10	0,9990	0,04	0,13
K	0,14 - 100	0,9996	0,01	0,04
Mg	0,03 - 100	0,9997	0,01	0,02
Mn	0,07 - 10	0,9999	0,01	0,02
Na	0,40 - 10	0,9996	0,03	0,10
P	0,36 - 100	0,9999	0,03	0,09
Zn	0,24 - 10	0,9998	0,02	0,06

Devido à inexistência de material de referência certificado, ou material similar às amostras de medicamentos usadas e, com o objetivo de avaliar a exatidão do método, foram realizados dois ensaios distintos de adição/recuperação (Spike), os detalhes e resultados dos ensaios são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Resultados dos testes de adição/recuperação para avaliação da exatidão do método.

Analito	Teste 1			Teste 2	
	[Adicionado] = 1 mg L ⁻¹			[Adicionado] = 2 mg L ⁻¹	
	[Amostra] mg L ⁻¹	[Encontrado] mg L ⁻¹	Recuperação %	[Encontrado] mg L ⁻¹	Recuperação %
Ca	0,82	1,77	94,71	2,67	92,46
K	0,72	1,64	92,66	2,40	84,32
Mg	0,31	1,31	99,65	2,34	101,39
Mn	1,12	1,94	81,85	2,92	89,81
Na	0,89	1,65	85,82	2,68	94,75
P	0,15	1,23	107,73	2,38	114,97
Zn	0,74	1,58	84,40	2,58	91,81

A precisão (expressa como o desvio padrão relativo, RSD) foi avaliada em experimentos realizados no mesmo dia (intradia) e a precisão intermédia (experimentos realizados em dias diferentes) com experimentos utilizando as mesmas amostras de suplementos de ferro usadas nos estudos de recuperação. Os resultados dos estudos de precisão estão exibidos na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 Resultados dos estudos de precisão para os analitos determinados nos experimentos de precisão intermédia e precisão intradia.

Analito	Precisão intermédia	Precisão intradia
	RSD (%) N=6	RSD (%) N=7
Ca	4,11	1,35
K	4,24	1,63
Mg	3,70	1,07
Mn	3,10	0,90
Na	2,50	1,34
P	1,51	12,99
Zn	3,01	1,11

A robustez em ICP OES diz respeito à capacidade que o sistema possui, que o faz capaz de acomodar-se às pequenas alterações nas concentrações dos elementos, ácidos e outros componentes, sem que haja variação significativa nas intensidades das linhas dos analitos [92]. Este estudo foi avaliado por uma razão das intensidades de emissão das linhas iônica (Mg(II) 280 nm) e atômica (Mg(I) 285 nm). Essa razão tem sido empregada para avaliar a robustez em ICP OES considerando-se um plasma robusto, aquele que possui razões calculadas iguais ou superiores a 8 (plasma com visão axial) ou iguais ou superiores a 10 (plasma com visão radial) [93]. Alguns resultados são exibidos na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 Resultados dos experimentos para avaliação da robustez do método empregando as linhas de emissão iônica e atômica do Mg.

Experimento	Mg(II)/Mg(I)
Sol. Padrão 1	8,50
Sol. Padrão 2	8,30
Sol. Padrão 3	8,31
LOM-MG	10,58
ANS-SSA	9,25
FOL-SP	9,64

Neste estudo, as razões entre as intensidades calculadas (soluções padrão e amostras) foi sempre superior a 8. Considerando todos os resultados durante a etapa de validação do método, pode-se deduzir que é robusto, sensível, possui boa exatidão e precisão para os macros e microelementos a serem determinados.

4.7.2 DETERMINAÇÃO DE MACRO E MICROELEMENTOS EM SUPLEMENTOS DE FERRO

Dezessete amostras de diversas farmácias brasileiras foram preparadas e analisadas. ICP OES foi usado para determinar cálcio, potássio, magnésio, sódio, fósforo e zinco. Os resultados desta determinação estão exibidos na Tabela 4.7 com suas concentrações expressas em mg do analito por kg de amostra. A tabela exhibe as concentrações para todas as réplicas. Os resultados na tabela estão organizados por um código para as amostras, sendo os medicamentos sólidos em círculos e os líquidos representados por um quadrado. Quanto à natureza do sal do medicamento, os sais de ferro

orgânicos são representados pelos símbolos cheios e os sais de ferro inorgânicos representados pelos símbolos vazios.

Tabela 4.7 Determinação de Ca, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em amostras de suplementos de ferro por tipo de amostra (mg Kg⁻¹).

Código da Amostra*	Cálcio	Potássio	Magnésio	Manganês	Sódio	Fósforo	Zinco
□	5,04	1,13	2,39	134,52	131,76	<LQ	90,57
□	8,49	3,55	2,64	133,58	131,27	<LQ	90,21
□	8,87	4,11	2,65	135,34	130,96	<LQ	90,95
□	28,95	17,96	16,05	109,54	37,13	1,78	74,70
□	28,05	18,35	16,14	109,67	37,09	0,45	74,76
□	28,00	18,25	16,10	109,92	37,46	0,34	74,98
■	4,99	<LQ	0,57	<LQ	380,53	3,08	2,16
■	3,36	<LQ	0,42	<LQ	376,88	2,36	2,05
■	3,14	<LQ	0,36	<LQ	379,10	3,00	1,95
□	25,20	16,67	14,95	104,07	34,55	2,55	72,35
□	24,18	16,88	14,88	104,51	34,43	2,67	72,02
□	24,68	17,03	14,80	104,91	34,20	0,92	72,34
□	22,68	16,76	8,18	26,62	241,80	3,84	19,15
□	22,14	16,86	8,08	26,53	245,41	4,44	19,15
□	22,12	17,38	7,86	26,54	245,26	5,02	19,17
■	43,88	26,57	8,16	7,64	893,24	17,29	2,88
■	43,03	27,57	8,48	7,94	923,04	21,29	2,91
■	43,56	27,88	8,40	7,97	915,55	20,44	2,95

Código da Amostra*	Cálcio	Potássio	Magnésio	Manganês	Sódio	Fósforo	Zinco
■	3,00	<LQ	<LQ	18,73	1006,74	2,36	2,01
■	1,07	<LQ	<LQ	18,45	1001,69	2,39	1,90
■	1,12	<LQ	<LQ	18,66	1002,98	2,91	1,92
□	31,86	43,71	12,25	43,93	35,18	5,54	28,88
□	32,73	44,58	12,51	44,70	35,34	6,72	29,53
□	32,31	43,87	12,43	44,16	34,55	5,30	29,23
○	50,60	<LQ	883,97	323,69	80,83	15,22	48,07
○	52,26	<LQ	895,25	330,65	80,00	19,98	48,16
○	46,63	<LQ	902,33	329,77	78,58	20,37	47,60
●	134,40	22,63	926,93	<LQ	1356,35	20,44	14,96
●	83,22	21,58	911,58	<LQ	1365,26	21,79	13,36
●	82,50	24,88	861,60	<LQ	1370,54	12,07	13,35
○	75,76	<LQ	248,76	444,13	506,06	19,47	25,90
○	67,67	<LQ	249,55	446,02	506,51	20,29	25,72
○	71,13	<LQ	248,24	442,16	497,61	21,71	25,63
●	35,62	<LQ	511,69	<LQ	1087,08	14,66	24,55
●	16,70	<LQ	528,77	<LQ	1072,20	15,74	25,00
●	16,79	<LQ	515,46	<LQ	1081,32	14,97	25,29
○	<LQ	11,62	<LQ	298,63	96,28	39,68	22,87
○	<LQ	10,11	<LQ	301,35	99,21	49,31	24,45

Código da Amostra*	Cálcio	Potássio	Magnésio	Manganês	Sódio	Fósforo	Zinco
○	<LQ	12,11	<LQ	301,73	97,65	46,42	24,04
●	1005,73	1138,05	777,66	862,63	5746,77	296,95	38,46
●	993,69	1132,78	759,50	861,48	5631,13	292,00	38,04
●	989,64	1134,35	742,86	859,42	5736,87	299,24	37,85
○	93,50	<LQ	243,78	263,68	494,17	15,78	20,11
○	79,28	<LQ	234,26	259,75	475,54	12,55	19,87
○	77,85	<LQ	235,19	259,86	486,35	21,89	20,13
●	62,41	0,68	723,16	3,35	1748,96	36,79	10,74
●	57,38	3,35	719,22	2,70	1743,09	26,32	11,34
●	64,46	2,17	722,81	2,23	1747,34	50,37	11,65
○	83,29	<LQ	604,05	249,00	1318,90	8,38	21,12
○	80,68	<LQ	613,60	252,33	1324,42	15,63	20,70
○	77,99	<LQ	608,06	252,87	1285,03	9,21	20,57

*Suplemento de ferro - comprimidos sais orgânicos(●), comprimidos sais inorgânicos (○), líquidos sais orgânicos (■), líquidos sais inorgânicos (□).

4.7.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Os resultados da determinação dos elementos nas dezessete amostras de suplementos de ferro analisadas foram avaliados em suas respectivas triplicatas, por análise de componentes principais. Em uma breve visualização dos resultados constantes na matriz de dados, é possível perceber que os elementos possuem diferentes ordens de magnitude. Portanto é imprescindível realizar uma etapa de pré-processamento dos dados, sendo a escolhida por autoescalamento dos dados com o objetivo de dar igual importância às variáveis, independente de seus valores de concentrações obtidos.

Considerando que todas as variáveis sempre têm alta correlação com a primeira componente principal, a análise de componentes principais foi realizada com rotação Varimax para facilitar a interpretação dos resultados. Esse é um método ortogonal que pretende maximizar o peso das variáveis em cada componente principal e minimizar (o máximo possível) todas as outras.

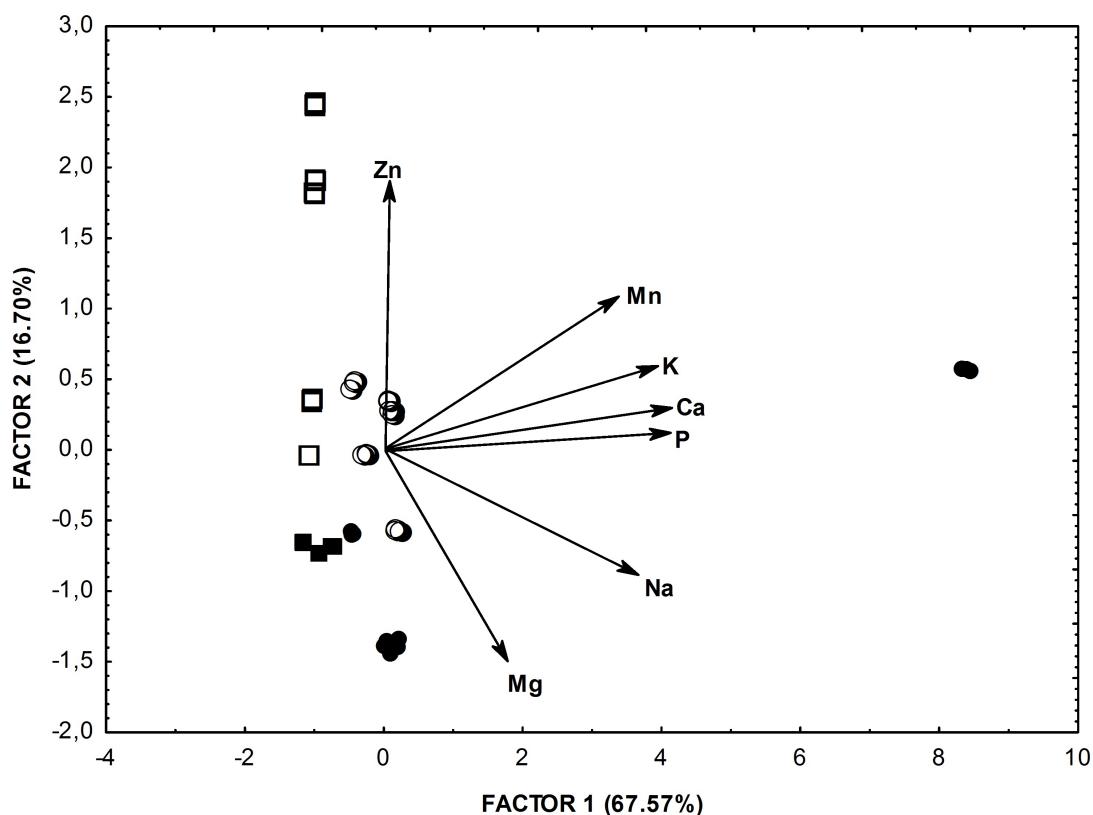
Os resultados exibidos na Tabela 4.8 demonstram que 84,27% da variância total dos dados foi explicada pelas duas primeiras componentes principais (PC's), sendo escolhidas por serem as componentes principais que apresentam autovalores maiores que 1 (4,7297 e 1,1687 para PC1 e PC2, respectivamente).

Tabela 4.8 Pesos das variáveis para as duas primeiras componentes principais.

Variável	PC1	PC2
Ca	0,45454	0,04717
K	0,44560	0,10049
Mg	0,23512	-0,39804
Mn	0,38411	0,24991
Na	0,43309	-0,20202
P	0,45209	0,02620
Zn	0,00825	0,85164
Autovalor	4,7297	1,1687
Variância total (%)	67,57	16,70
Variância acumulada (%)	67,57	84,27

A partir dos pesos das variáveis das duas primeiras PC's listados na Tabela 4.8, pode-se perceber que os elementos que possuem maiores pesos em PC1 são Ca, K, Na e P, sendo assim as variáveis que mais contribuem para a variância dos dados nessa componentes principal. Em PC1, 67,57% da variância dos dados são explicadas. O gráfico biplot das duas primeiras componentes principais é mostrado na Figura 4.1.

Figura 4.1 Gráfico biplot para PC1 e PC2 para as amostras e variáveis (Suplemento de ferro - comprimidos sais orgânicos(●), comprimidos sais inorgânicos (○), líquidos sais orgânicos (■), líquidos sais inorgânicos (□).



De acordo com os resultados que podem ser vistos na Figura 4.1, pode-se observar que as triplicatas de uma amostra (comprimido de um sal orgânico) possui altas concentrações para os elementos dominantes em PC1 e as demais amostras têm baixas concentrações para os elementos também considerando PC1. A segunda PC tem os mais altos pesos para Zn e Mg, de acordo com a Tabela 4.8.

A segunda componente principal explica 16,70% da variância total dos dados e é capaz de caracterizar as amostras pela sua composição química, de acordo com a presença de magnésio ou zinco. Pelos grupos formados, é possível observar que há uma tendência maior para os medicamentos líquidos (símbolos quadrados) estarem deslocados mais para os pesos positivos em PC2, levando a reconhecer que possuem maiores concentrações para Zn. Assim como pode ser observado que os medicamentos sólidos (símbolos circulares) estão mais deslocados para os pesos negativos em PC2, indicando

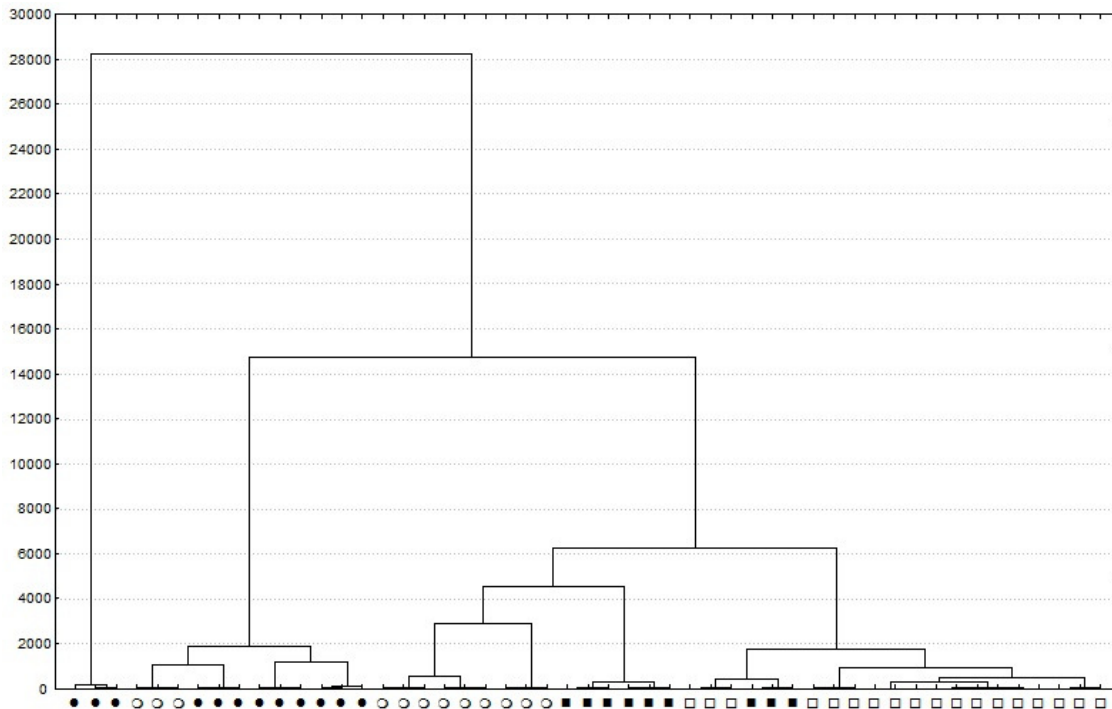
maiores concentrações de Mg neses medicamentos. Estes resultados estão de acordo com a farmacotécnica do medicamento, uma vez que o estearato de magnésio é um excipiente utilizado durante a produção dos medicamentos sólidos, com o objetivo de reduzir a fricção entre as partículas sólidas e, com isso, facilitar a produção do comprimido [94].

4.7.4 ANÁLISE POR AGRUPAMENTOS HIERÁRQUICOS

HCA foi aplicada aos dados escalonados utilizando o método de Ward com distâncias euclidianas para calcular as distâncias entre amostras, onde todos os dados são rodadas para eixos ortogonais, sem alterações, garantindo assim que todas as informações presentes na matriz de dados originais serão preservadas.

O dendograma obtido é apresentado na Figura 4.2 e mostra que não é possível obter uma separação completa dos grupos. Uma amostra de comprimido de sal orgânico, com altas concentrações de todos os elementos, é separada de todas as outras amostras a uma distância de, aproximadamente, 28000. As outras amostras são separadas em três grupos, a uma distância de cerca de 6000, as amostras de comprimidos, amostras de medicamentos líquidos e um conjunto de amostras de medicamentos líquidos de sais orgânicos que se assemelham às amostras de comprimidos de sais inorgânicos. Este último aglomerado é separado à uma distância de aproximadamente 4.000, mostrando que existe uma pequena diferença nas composições das amostras entre elas.

Figura 4.2 Dendograma para as amostras de suplementos de ferro mostrando o método de Ward com distância euclidiana

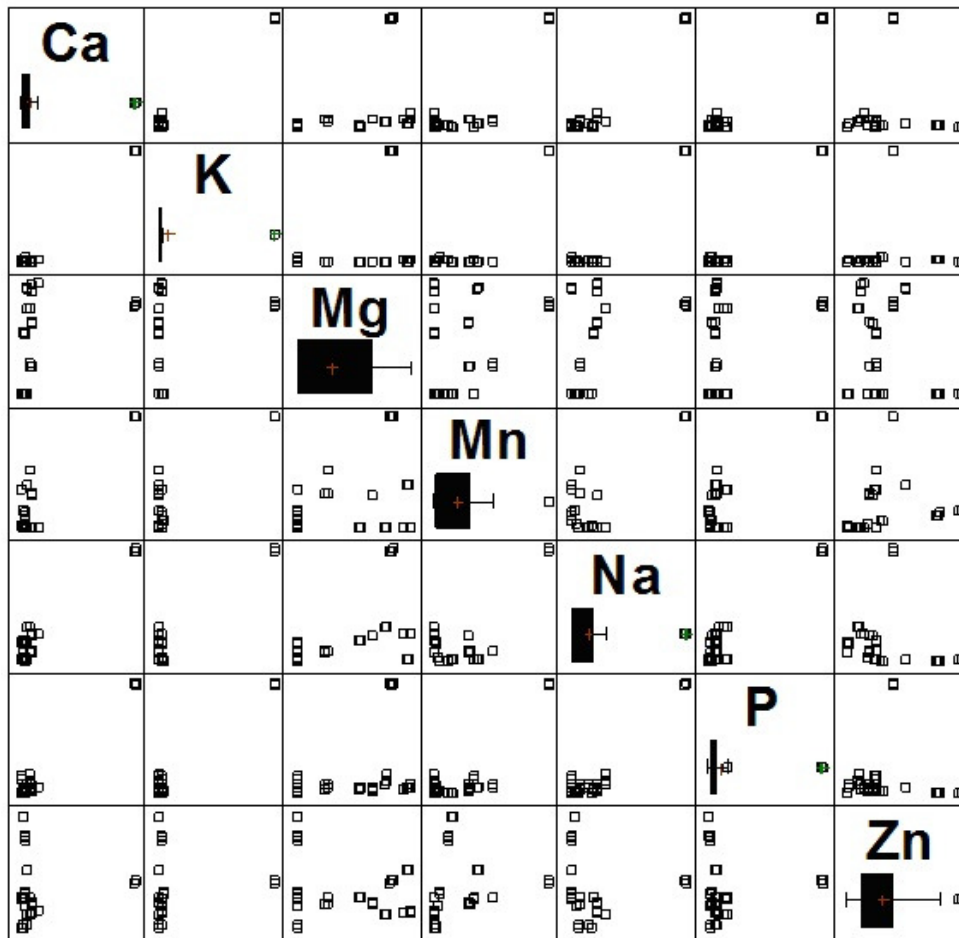


4.7.5 GRÁFICO DE MATRIZ

O gráfico de matriz foi utilizado para avaliar o comportamento de amostras com relação a todos os analitos determinados. Um gráfico de matriz é um conjunto de gráficos de dispersão individuais, que pode ser utilizado para avaliar a relação entre vários pares de variáveis ao mesmo tempo. Esse gráfico é útil quando existem muitas variáveis em grandes ordens de magnitude e há a necessidade de examinar as relações que existem entre todos os pares de variáveis, permitindo assim, encontrar possíveis associações.

Cada parcela de uma variável em Y contra cada uma em X exibe uma combinação $Y-X$ possível. No caso em estudo, o gráfico 7×7 tem 21 combinações diferentes para todos os analitos. O gráfico de matriz obtido pode ser visto na Figura 4.3.

Figura 4.3 Gráfico de matriz para o comportamento das amostras para todos os analitos determinados



Nesse gráfico, combinações entre Mg, Mn, Na e Zn mostram que as concentrações desses analitos tendem a aumentar juntas, mostrando que existem relações entre os elementos. As demais combinações mostram uma possível relação positiva mais fraca entre as variáveis. Os resultados permitem inferir que os quatro analitos são os principais responsáveis pelas variações das composições das amostras, interpretações similares às obtidas pela PCA.

4.7.6 AVALIAÇÃO DO TEOR DE MACRO E MICROELEMENTOS EM SUPLEMENTOS DE FERRO

Os teores dos macro e microelementos nos suplementos de ferro foram determinados pela análise das amostras coletadas. A média e os intervalos de concentração (expressos em mg de analito por kg de amostra) para o cálcio, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo e zinco são mostrados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 Resultados do teor de macro e microelementos em medicamentos de suplementos de ferro (mg Kg^{-1}).

Análitos	Comprimidos de sais orgânicos		Comprimidos de sais inorgânicos		Líquidos de sais orgânicos		Líquidos de sais inorgânicos	
	Média	Faixa de concentração	Média	Faixa de concentração	Média	Faixa de concentração	Média	Faixa de concentração
Ca	295,21	16,70 - 1005,73	71,39	46,63 - 93,50	16,35	1,07 - 43,88	23,02	5,04 - 32,73
K	386,72	0,68 - 1138,05	11,28	10,11 - 12,11	27,34	26,57 - 27,88	19,81	1,13 - 44,58
Mg	725,10	511,69 - 926,93	497,25	234,26 - 902,33	4,40	0,36 - 8,48	10,79	2,39 - 16,14
Mn	431,97	2,23 - 862,63	317,04	249,00 - 446-02	13,23	7,64 - 18,73	83,90	26,53 - 135,34
Na	2473,91	1072,2 - 5746,77	495,14	74,58 - 1324,42	764,42	376,88 - 1006,74	96,43	34,2 - 245,41
P	91,78	12,07 - 299,24	22,39	8,38 - 49,31	8,35	2,36 - 21,29	3,30	0,34 - 6,72
Zn	22,05	10,74 - 38,46	27,66	19,87 - 48,16	2,30	1,90 - 2,95	57,20	19,15 - 90,95

As Farmacopeias (brasileira, americana e europeia) não estabelecem limites máximos permitidos para estes elementos em medicamentos, entretanto, fixam valores máximos para a ingestão diária de massa de elemento por dia. A justificativa para não definirem limites máximos é por não considerarem esses elementos como potencialmente perigosos, o que é controverso, uma vez que a toxicidade de um elemento está diretamente relacionada à concentração de um agente químico presente [28].

Além disso, como pode ser visto na Tabela 4.9, os medicamentos orgânicos devem ser administrados com precaução em doentes com hipertensão arterial (com o risco cardiovascular associado) e insuficiência renal [95], pois exibem valores de sódio e de potássio bem significativos quando comparados com os demais medicamentos analisados.

As altas ingestões destes elementos podem gerar um hipercalemia (aumento da concentração de potássio plasmático) e consequente acidose metabólica [96, 97]. Além disso, pode-se perceber que os medicamentos em comprimidos apresentam valores significativos para magnésio que por uma intoxicação pode causar insuficiência renal aguda [98].

4.7.7 AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE FERRO EM SUPLEMENTOS DE FERRO

A quantidade total de ferro existente nas amostras foi levada em consideração à descrita na bula dos medicamentos. As bulas exibiam os valores do teor de ferro para cada dose/comprimido utilizado e esse valor calculado levado em consideração.

As quantidades bioacessíveis de ferro foram determinadas usando o teste de bioacessibilidade *in vitro* descrito na seção 4.6.5. A Tabela 4.10 mostra os resultados obtidos. As colunas estão ordenadas: valor de ferro em mg

presente na dose utilizada, o teor de ferro calculado após o ensaio *in vitro* para a bioacessibilidade e a fração bioacessível, calculada pela expressão:

$$F_{\text{Bioac}} = \frac{[\text{FeE}]}{[\text{Fe}]} \times 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde [FeE] é a concentração de ferro obtida pelo teste de bioacessibilidade *in vitro*, e [Fe] é a concentração total de ferro no medicamento existente na dose utilizada.

Tabela 4.10 Concentrações bioacessíveis de ferro obtidas pelo método da digestão gastrointestinal (teste de bioacessibilidade *in vitro*) dos medicamentos estudados.

Nome da Amostra	[Fe]	[FeE]	F_{Bioac}
Endofer (Ferro III - Ferripolimaltose)	100	9,25	9,3%
Lomfer (Ferro II - Sulfato)	60	4,68	7,8%
Neutrofer (Ferro III - Glicinato)	60	41,54	69,2%
Vitafer (Ferro II - Sulfato)	40	32,27	80,7%
Ferronil (Ferro II - Sulfato)	40	31,71	79,3%
Sulferbel JQ (Ferro II -Sulfato)	40	40,62	101,6%
Foliron (Ferro II - Bisglicinato ferroso)	30	22,43	74,8%
Lomfer SO (Ferro II -Sulfato)	25	24,88	99,5%
Folifer SO (Ferro II -Bisglicinato ferroso)	6	5,51	91,8%
Combiron (Ferro III - Ferrocbonila)	26,2	18,67	71,2%
Anemifer SO1 (Ferro II - Sulfato)	25	19,90	79,6%
Anemifer SO2 (Ferro II - Sulfato)	25	23,13	92,5%

[Fe] = a concentração total de ferro no medicamento existente na dose utilizada.

[FeE] = a concentração de ferro obtida pelo teste de bioacessibilidade *in vitro*.

Observando-se os resultados da tabela pode-se perceber que a bioacessibilidade varia entre 7,8 e 101,6%, mostrando que a bioacessibilidade tem uma grande faixa de variação nas diferentes amostras analisadas.

Os resultados permitem inferir que os medicamentos de sais de ferro inorgânicos (Sulfato Ferroso) são mais bioacessíveis se comparados aos medicamentos de sais de ferro orgânicos (bisglicinato ferroso, glicinato férrico, ferripolimaltose e ferrocarbonila), mostrando que sais inorgânicos são mais eficazes para o tratamento, pois uma maior fração destes é disponibilizada à digestão intestinal.

Além destas inferências, pode-se também visualizar que os medicamentos apresentados na forma de solução oral são mais bioacessíveis do que os medicamentos em comprimido, xaropes e suspensões. Isso pode estar relacionado à presença de uma maior fração de ferro em uma menor quantidade de medicamento, pois, em uma solução oral, o princípio ativo é dissolvido em uma pequena quantidade de solvente. O que as difere das suspensões (onde o princípio ativo não é completamente dissolvido) e dos xaropes (onde o princípio ativo é dissolvido em uma solução aquosa com uma concentração maior de açúcar) [1, 29].

4.8 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Os resultados da determinação de macro e microelementos confirmam que os comprimidos de suplementos de ferro têm concentrações consideráveis de zinco e magnésio que, segundo as discussões realizadas, devem estar relacionadas ao processo de produção.

Algumas amostras demonstraram altas concentrações para todos os analitos e os suplementos de ferro de sais orgânicos, apresentam maiores concentrações de sódio, se comparadas às demais amostras. Devendo assim, ser considerada sua ingestão com cautela, principalmente em pacientes hipertensos e/ou doentes renais.

As Farmacopeias existentes devem incluir valores máximos para cada um desses analitos em suas regulamentações.

O estudo de bioacessibilidade confirma que apenas uma fração de ferro presente nos medicamentos estudados é bioacessível, ou seja, é liberada no trato gastrointestinal, tornando-se disponível para absorção pelo intestino.

Percebe-se que as soluções orais apresentam maior bioacessibilidade, o que deve estar relacionado com a concentração de ferro na solução. O procedimento de extração simulou de forma efetiva a digestão gástrica, reproduzindo resultados similares aos que ocorrem na bioacessibilidade no organismo humano.

CAPÍTULO V

*DETERMINAÇÃO E ESPECIAÇÃO
SIMULTÂNEA DE ARSÊNIO E CROMO
EM SUPLEMENTOS DE FERRO
EMPREGANDO HPLC-ICP-MS*

5.1 INTRODUÇÃO

É sabido que o potencial de toxicidade de um determinado elemento químico está relacionado não somente com a concentração presente, mas sim com as espécies existentes.

Há uma necessidade constante de desenvolvimento de métodos analíticos visando a especiação de elementos químicos empregando técnicas que possuam sensibilidades para determinação em níveis traço e até mesmo ultra traço.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica bastante sensível e permite, com o uso adequado de colunas, a separação das diferentes espécies que demonstra larga aplicabilidade em variados tipos de amostras, desde estudos ambientais até mesmo estudos forenses [99]. Quando acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), permite separar espécies de elementos traço.

O interesse da determinação e especiação de arsênio e cromo está na toxicidade destes elementos serem associadas tanto com limites baixos permitidos para concentrações dentro de uma faixa de segurança e de possuírem espécies com toxicidades elevadas e bem descritas, como é o caso das espécies de As(III) e Cr(VI).

O cromo e o arsênio podem acumular-se em medicamentos por alcançarem desde as substâncias incorporadas na produção, do mesmo modo que em materiais utilizados. Desta forma suas investigações são de grande valor.

Por não apresentarem importância biológica associada a algumas espécies de cromo e arsênio, assim como suas potenciais toxicidades, estes elementos foram escolhidos para estudo de especiação. É proposta a determinação e especiação simultânea de arsênio e cromo em medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva, por HPLC e ICP-MS como

técnica analítica de detecção. O estudo foi realizado com amostras adquiridas em farmácias do Brasil e da Espanha.

5.2 ARSÊNIO E CROMO EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS

A determinação de arsênio e cromo em produtos farmacêuticos tem imensa influência no controle de qualidade, devido aos possíveis efeitos tóxicos que possuem, e igualmente a capacidade de reduzir a estabilidade dos princípios ativos utilizados, mesmo quando em concentrações pequenas.

Entre os principais efeitos tóxicos relatados para arsênio, estão as doenças de pele, do sistema cardiovascular, nervoso, hepático, endócrino e principalmente, renal [100, 101]. Classificado como risco carcinogênico I para humanos pela organização mundial da saúde (OMS), o As está associado ao desenvolvimento de variados tipos de cânceres e, tendo em vista essa importância, foi incluído como elemento prioritário para análises de rotina nas Farmacopeias brasileira, americana e europeia.

O arsênio tem sido investigado em variadas amostras, como por exemplo, água [102], alimentos [103], fertilizantes [104] e cosméticos [105]. Em análises farmacêuticas, as aplicações mais comuns são em fitoterápicos [106], plantas medicinais [107] e drogas como o antimoniato de metilglucamina [108].

Diferente do arsênio, o cromo pode ser essencial ao organismo humano (quando na forma de Cr(III)), indispensável para o funcionamento de organismos vivos, com importância em funções metabólicas e até mesmo endócrinas.

Apesar dessa essencialidade, o cromo quando na forma de Cr(VI) não é indispensável e apresenta riscos biológicos estando associado à má formação genéticas, aberrações cromossômicas, mutações, carcinogenicidade e algumas outras variações de DNA. O cromo também está classificado como risco carcinogênico I pela OMS e pela sua presença em medicamentos poder representar riscos à saúde, trabalhos na literatura reportam a determinação de cromo em fitoterápicos [109], medicamentos em cápsulas [110] e multivitamínicos [111].

Analiticamente, a determinação de arsênio e cromo pode ser realizada com facilidade por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica ou espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, uma vez que essas técnicas demonstram excelentes sensibilidades para detecção de elementos em níveis traço, além de ser considerado com um método de excelência para a determinação dessas impurezas em medicamentos, pela regulamentação da farmacopeia brasileira.

5.3 ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO E CROMO

A especiação de arsênio e cromo é um interesse global, tendo em vista que os riscos de um elemento químico estão associados primariamente à forma química presente. O Cr(VI) e As(III) possuem sua toxicidade bem descrita e seus riscos são conhecidos, diferente das espécies de Cr(III) e As(V) [112].

O As não consegue se ligar às proteínas do plasma e é removido do sangue e distribuído entre os tecidos com uma maior rapidez. Acredita-se que cerca de 50 - 70% do arsênio pentavalente que é absorvido, é reduzido à arsênio trivalente através de uma reação não enzimática que ocorre no sangue na presença da glutathione. Como o As(III) é mais tóxico que o As(V), diz-se que essa etapa é de bioativação. O arsênio é metilado pela metiltransferase e após isso, o excesso é eliminado pela urina [113].

Diferente do arsênio, o cromo participa diretamente do metabolismo de carboidratos, em especial coatuando com a insulina fazendo com que haja um aumento da tolerância à glicose. Como em uma via de mão dupla, por aumentar a sensibilidade à insulina, acaba aumentando a síntese protéica aumentando a captação de aminoácidos [114].

O cromo trivalente, mesmo sendo essencial, torna-se extremamente tóxico quando é ingerido em grandes quantidades. Em contrapartida, a

exposição ao cromo hexavalente já é tóxica independente da quantidade ingerida, pois o Cr(VI) pode causar ulceração do septo nasal, inflamação da mucosa nasal, bronquite crônica e enfisema pulmonar [114].

A especiação de arsênio e cromo pode ser efetuada através de variadas técnicas espectroanalíticas. Dentre as principais, métodos que realizam a geração de hidretos com especiação baseada na diferença das espécies presentes, têm sido largamente aplicados para a especiação inorgânica de arsênio [115]. O cromo também possui uma variedade de formas a serem inseridas na análise de especiação. Um dos trabalhos mais citados reportado na literatura, refere à especiação considerando o caráter volátil da espécie de Cr(III) quando complexado com 1,1,1-trifluoro-2,4-pentanodiona. O complexo volátil é vaporizado na etapa de pirólise do forno de grafite [116]. Além das técnicas de absorção atômica, o acoplamento entre técnicas também possui grande aplicação, como é o caso do HPLC-ICP-MS.

Considerando a importância e as variadas técnicas para especiação, trabalhos na literatura reportam que o estudo começou a ser elaborado. Ali *et al.*, propuseram a especiação de arsênio e cromo usando HPLC e espectrometria de absorção atômica que demonstrou uma excelente precisão, sensibilidade e boas recuperações [117]. Um método empregando microfluorescência de raio-X e espectroscopia de absorção de raio-X microfocalizada foi proposto por Landrot *et al.*, para a especiação de arsênio e cromo em solos contaminados por uma indústria americana [118]. Além disso, um estudo para especiação de arsênio empregando cromatografia líquida acoplada à ICP-MS foi feito em amostras de vinho branco. O estudo da exatidão foi avaliado por testes de adição e recuperação, com resultados entre 95-106%. O arsênio total foi determinado após digestão ácida e por ICP-MS. O método permitiu a determinação de espécies orgânicas e inorgânicas de arsênio em amostras de vinhos argentinos [119]. Apresentou excelente sensibilidade e demonstrou ser uma excelente estratégia para a especiação de arsênio, demonstrando a superior aplicabilidade da cromatografia.

5.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ICP-MS

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o sistema cromatográfico mais amplamente utilizado pela sua alta aplicabilidade e seletividade. O funcionamento da técnica baseia-se na separação das espécies em duas fases: uma estacionária (fixa) e uma móvel. A cromatografia líquida de alta eficiência é definida pelo tipo de separação ou da fase estacionária. Essa classificação permite incluir: cromatografia líquido-líquido, líquido-sólido, de troca iônica, por exclusão, por afinidade e cromatografia quiral.

Um equipamento de HPLC é constituído por: um conjunto de reservatórios para armazenamento dos solventes, sistema de bombeamento, sistema de injeção da amostra, coluna e um detector. O conjunto de reservatórios compreende em recipientes capazes de armazenar os solventes que serão possivelmente utilizados durante a análise, podendo ser fase móvel ou solventes para limpeza do sistema. Para evitar a formação de bolhas de gases que possam alcançar a coluna e alargar o sistema, interferindo nos detectores, o sistema é degaseificado usando na maioria das vezes, bombas de vácuo [24].

O sistema de bombeamento em HPLC deve ser capaz de gerar pressões de até 6000 psi, ter vazão ente 0,1 e 10 mL min⁻¹, boa reprodutibilidade da vazão e resistir à corrosão pelos solventes com a possibilidade de uso. A bomba recíproca é mais largamente empregado e consiste em um cilindro que é preenchido e esvaziado por um pistão, com o objetivo de forçar a passagem da fase móvel através da fase estacionária [24].

O sistema de injeção de amostra preferido é baseado em um sistema de alça com amostragem. Alças intercambiáveis estão presentes permitindo que seja possível escolher o volume de amostra que será analisada.

A fase estacionária, a coluna cromatográfica, é geralmente construída de aço inoxidável, com comprimentos entre 10 e 30 cm, diâmetro entre 2 e 5 mm e em HPLC, possuem estrutura interna capaz de reduzir o gasto com solventes, sendo bastante vantajoso devido ao custo do material de análise. Além da estrutura básica da coluna, é inserido um termostato, a fim de controlar a temperatura (que oferece melhores cromatogramas quando operam à temperatura ambiente) e também são usadas muitas vezes colunas de sacrifício para conservar uma coluna mais sensível [24].

Os detectores mais adequados são os de radiação UV-Vis, podendo o HPLC estar acoplado a outras técnicas de absorção, emissão ou fluorescência atômica.

O acoplamento ao ICP-MS ocorre diretamente por ligação do capilar que sai da coluna à entrada do nebulizador da espectrometria de massas. Após nebulizado, o eluído da coluna é elevado à temperatura do plasma (cerca de 10000K) e conduzido ao quadrupolo, onde será contabilizado pela sua razão massa/carga. Como a coluna separa as espécies a partir de diferentes fundamentos, a detecção no ICP é feita de maneira contínua em um intervalo escolhido previamente. As separações ocorrem em formas de retenções e os picos obtidos são representados graficamente em cromatogramas, que servem para obter a quantificação para cada espécie de interesse. Este acoplamento é chamado de HPLC-ICP-MS [24].

O HPLC-ICP-MS é uma técnica bastante viável para análises de traço. Na literatura, revela-se mais aplicável à especiação, como por exemplo, Krachler e Emons especiaram antimônio em amostra de urina [120]. Outro método por Narukawa *et al.*, propõe a especiação de arsênio em arroz, testando diferentes procedimentos de extração para serem empregados usando HPLC-ICP-MS [121]. Também para a especiação inorgânica e orgânica de arsênio em solos foi comprovada a eficiência do HPLC-ICP-MS por Bissen e Frimmel [122].

5.5 OBJETIVOS

5.5.1 OBJETIVO GERAL

Determinar e especiar simultaneamente arsênio e cromo em medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado como detector e cromatografia líquida de alta eficiência como técnica de separação.

5.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar um método de digestão de amostra fazendo uso do micro-ondas;
- Determinar arsênio e cromo através da espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado;
- Estudar um método para extração das espécies de arsênio e cromo em medicamentos com técnicas de ultrasson focalizado, banho ultrassônico e energia de micro-ondas;
- Especiar simultaneamente arsênio e cromo empregando HPLC-ICP-MS;
- Validar os métodos analíticos propostos;
- Aplicar os métodos propostos em medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva.

5.6 PARTE EXPERIMENTAL

5.6.1 INSTRUMENTAÇÃO, MATERIAIS E REAGENTES

Foi utilizado um sistema HPLC (Perkin Elmer Flexar) composto de um autoamostrador, uma bomba e um desgaseificador. Além disso, um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado NEXION 300X (Perkin Elmer).

Balança analítica com precisão de 0,001g (Sartorius Basic Plus, BP 121 S.). Um pHmetro modelo Basic 20 Crison.

Todos os reagentes foram de grau analítico e todas as dissoluções preparadas com água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q com resistividade específica de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (Millipore, Massachusetts, EEUU). O ácido nítrico, HNO_3 , hiperpur-plus 69% (Panreac, Barcelona, Espanha) foi utilizado durante todos os procedimentos. Além disso, também o metanol, CH_3OH , com grau gradiente HPLC (Panreac, Barcelona, Espanha), sal disódico de ácido etilenodiaminotetracético bihidratado, $\text{Na}_2\text{-EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, Barcelona, Espanha) e hidróxido de tetrabutilamônio, TBAH, em dissolução (40%) para cromatografia iônica (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) durante o preparo da fase móvel.

As soluções padrão preparadas a partir de dissoluções adequadas de padrões de As(III) de 1000 mg L^{-1} (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e Cr(III) de 1000 mg L^{-1} (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Para o preparo da solução padrão de As(V) de 1000 mg L^{-1} foi utilizado 0,1040 gramas de disódio hidrogenioarseniato, Na_2HAsO_4 , dissolvido em 25 mililitros e para a solução padrão de Cr(VI) de 1000 mg L^{-1} utilizado 0,1225 gramas de dicromato de potássio, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, dissolvido em 50 mililitros.

Para limpeza do material, todos foram lavados com água e sabão e enxaguados três vezes com água deionizada. Após isso, mantidos por 48

horas em um banho de ácido nítrico 10% (v/v) e novamente enxaguados por três vezes com água Milli-Q e secados em estufa (com exceção dos materiais com precisão volumétrica) e armazenados para posterior uso.

5.6.2 DETERMINAÇÃO TOTAL DE ARSÊNIO E CROMO POR ICP-MS

Na determinação do teor total de arsênio e cromo por ICP-MS, utilizadas as condições instrumentais mostradas na Tabela 5.1. Para resolução de possíveis interferentes foi utilizado gás hélio como gás de colisão e o equipamento operado com modo KED (discriminação de energia cinética).

Tabela 5.1 Condições instrumentais para determinação de As e Cr empregando ICP-MS.

Parâmetro	Condição
Nebulizador	Vidro concêntrico
Câmara de spray	Câmara ciclônica
Material do Cone Triplo da interface	Níquel/Alumínio
Fluxo do gás de plasma	18,0 L min ⁻¹
Fluxo do gás auxiliar	1,2 L min ⁻¹
Fluxo do gás do nebulizador	0,83 L min ⁻¹
Fluxo do gás de colisão (He)	40,0 mL min ⁻¹
Potência de RF	1600 W
Tempo de integração	250 ms

Parâmetro	Condição
Modo de operação	KED
Isótopos monitorados	^{75}As , ^{52}Cr , ^{53}Cr

5.6.3 SEPARAÇÃO DE ARSÊNIO E CROMO POR HPLC

A separação das espécies de arsênio e cromo foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica *Kinetex C18* 100x4,6 mm com tamanho de partícula de 2,6 micrometros e as condições de medida estão exibidas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Condições instrumentais para separação cromatográfica.

Sistema HPLC	Perkin Elmer Flexar
Coluna cromatográfica	<i>Phenomenex Kinetex C18</i> 100x4,6 mm, 2,6 μm
Fase móvel	TBAH 1mM, 0,7mM EDTA (sal disódico), 5% metanol
pH	7,2
Ajuste de pH	NH_3OH e HCl
Volume de injeção	50 μL
Fluxo de fase móvel	0,7 mL min $^{-1}$

5.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.7.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR TOTAL DE ARSÊNIO E CROMO

Para a determinação do teor total de arsênio e cromo em suplementos de ferro, as amostras foram submetidas a uma digestão ácida em micro-ondas. Para isso, cerca de 0,2 gramas (para as amostras de comprimidos) e 500 microlitros (aproximadamente 0,55 gramas para as amostras líquidas) pesadas em recipientes de teflon de alta pressão, próprios para a digestão em micro-ondas. Após isso, 4 mL de ácido nítrico concentrado hiperpuro e 1 ml de peróxido de hidrogênio 33% (v/v) adicionados em cada recipiente. Os recipientes de teflon introduzidos no forno de micro-ondas e foram submetidos ao programa de digestão descrito na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 Programa de digestão para as amostras de suplementos de ferro empregando micro-ondas.

Etapa	Temperatura	Potência	Duração
1	24 °C	1000 W	2 min
2	90 °C	1000 W	2 min
3	140 °C	1000 W	5 min
4	200 °C	1000 W	5 min
5	200 °C	1000 W	11 mn
6		Ventilação	1h 30 min

Após completo o programa de digestão e total resfriamento dos recipientes, o digerido foi avolumado até 25 ml com água ultrapura. Todas as amostras digeridas em triplicada e um branco de digestão preparado para cada rodada de irradiação de micro-ondas.

5.7.1.1 ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ

Os teores totais de arsênio e cromo em suplementos de ferro foram analisados empregando espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado. Construídas curvas de calibração, a fim de, avaliar possíveis efeitos de matriz e a melhor técnica a ser empregada para quantificação dos analitos.

Para construção da curva de calibração com padrão aquoso realizadas respectivas diluições de soluções padrão de arsênio e cromo para seis pontos na curva de calibração. O mesmo realizado para a curva de calibração com adição de analito, entretanto, devido à variedade de amostras com teores de ferro similares e por estarem digeridas em meio ácido, foi construído um “*pool sample*” que consiste em uma solução com alíquotas aleatórias de variadas amostras. O objetivo disto é obter uma solução com o máximo possível de contribuição das matrizes das diferentes amostras e avaliá-las de uma só vez. Os seis pontos para ambas as curvas de calibração foram (0; 1,25; 2,50; 5,00; 7,50; 15,00; 25,00) todos expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Nas figuras 5.1 e 5.2 estão representadas as curvas de calibração obtidas em azul para a calibração aquosa e, em vermelho, para a adição de analito.

Figura 5.1 - Curvas de calibração com padrão aquoso (em azul) e curva de calibração com adição de analito (em vermelho) para arsênio.

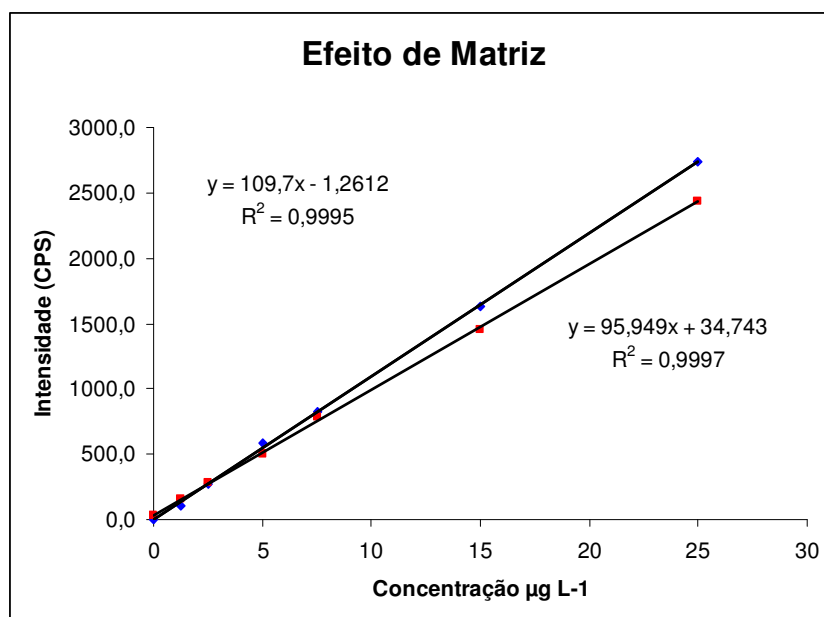
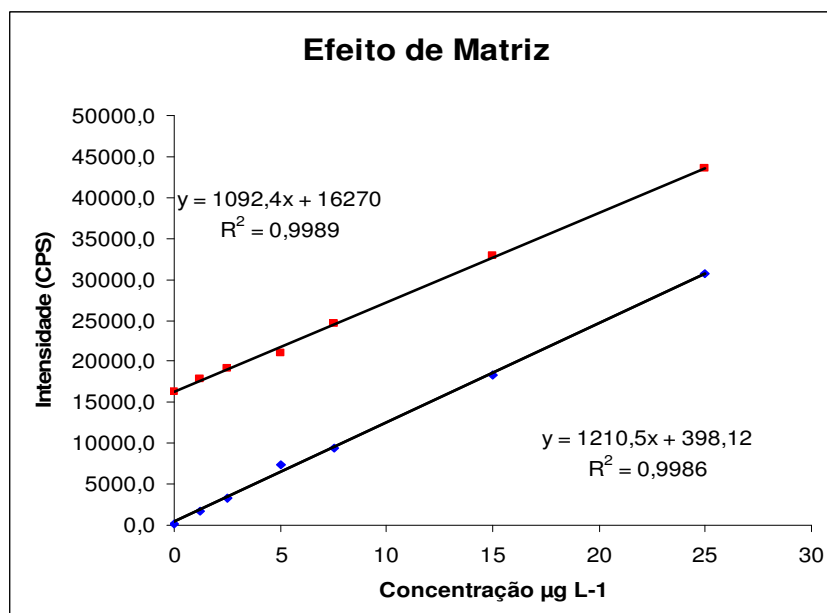


Figura 5.2 - Curvas de calibração com padrão aquoso (em azul) e curva de calibração com adição de analito (em vermelho) para cromo.



Além das curvas obtidas de forma gráfica, as análises estatísticas por regressão linear possibilitaram encontrar as equações para cada curva com seus respectivos intervalos de confiança (95%), com a possibilidade de avaliar as possíveis diferenças estatísticas significativas para as inclinações, que estão dispostas na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Inclinações das curvas analíticas obtidas para As e Cr ($L \mu g^{-1} \pm s$)

Analito	Inclinação	Técnica Analítica
Arsênio	109,7 \pm 2,9	Padrão aquoso
	95,9 \pm 1,9	Adição de analito
Cromo	1210,4 \pm 55,2	Padrão aquoso
	1092,4 \pm 41,8	Adição de analito

A partir da análise das curvas de calibração e suas inclinações obtidas por análise de regressão linear e teste *t student*, pode-se concluir que existem diferenças estatisticamente significativas entre as inclinações obtidas pelas técnicas de calibração externa com padrões aquosos e de adição de analito. Isso permite inferir que existem efeitos de matriz na quantificação de ambos os analitos nas amostras de suplementos de ferro. Considerando o exposto, as curvas de calibração com adição de analito foram empregadas para quantificação de arsênio e cromo.

5.7.1.2 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A etapa de validação de um procedimento analítico em desenvolvimento visa garantir a credibilidade da metodologia para ser aplicada rotineiramente no laboratório. Com a validação analítica há uma garantia documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado a fazer com resultados confiáveis.

Durante a etapa de validação do método proposto, avaliou-se os limites de detecção, quantificação, linearidade analítica, exatidão e precisão.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as normas consideradas pela IUPAC, sendo o limite de detecção calculado pela expressão $(3\delta/s)$, onde “ δ ” representa o desvio padrão da solução do branco e “s” a inclinação da curva analítica. Os limites de detecção calculados foram **0,009** e **0,027 $\mu\text{g g}^{-1}$** para arsênio e cromo, respectivamente. Os limites de quantificação calculados pela expressão $(10\delta/s)$, também levando em consideração os parâmetros da curva analítica e medidas do branco foram **0,029** e **0,089 $\mu\text{g g}^{-1}$** para arsênio e cromo, respectivamente.

A exatidão do método foi avaliada mediante ensaios de adição e recuperação, uma vez que não existiam materiais de referência certificados para a amostra e materiais similares. Foram realizadas adições de: 1,25; 2,5; 5,0; e 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para As e 5,0; 7,5; 15,0 e 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cr. Os resultados obtidos para os ensaios de recuperação são exibidos nas Tabelas 5.5 e 5.6.

Tabela 5.5 Resultados obtidos para os testes de adição/recuperação para a determinação total de As por ICP-MS.

[As] Adicionada $\mu\text{g L}^{-1}$	[As] Encontrada $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação
0,0	0,29	--
1,25	1,57	102,22%
2,5	2,91	104,76%
5,0	5,25	99,01%
15,0	15,11	98,78%

Tabela 5.6 Resultados obtidos para os testes de adição/recuperação para a determinação total de Cr por ICP-MS.

[Cr] Adicionada $\mu\text{g L}^{-1}$	[Cr] Encontrada $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação
0,0	17,61	--
5,0	23,37	114,99%
7,5	24,23	88,16%
15,0	33,67	107,00%
25,0	41,56	95,82%

Os valores alcançados para arsênio variam entre 98,78 e 104,76% e, considerando isso, boas recuperações são obtidas demonstrando assim a exatidão do método. Para os experimentos de cromo as recuperações estão entre 88,16 e 114,99% portanto confirmando que o método também é exato.

A precisão do método foi avaliada a partir da repetitividade de 9 leituras consecutivas de uma mesma alíquota com concentração 1,51 e 6,93 $\mu\text{g g}^{-1}$ para arsênio e cromo, respectivamente. Para arsênio, a precisão calculada foi 4,99% e para cromo de 4,32%, evidenciando que o método é preciso para as leituras realizadas.

5.7.2 ESPECIAÇÃO DE ARSÊNIO E CROMO

5.7.2.1 CONDIÇÕES OTIMIZADAS DE SEPARAÇÃO POR HPLC

As condições para a separação das espécies a serem estudadas mediante HPLC foram otimizadas em trabalhos prévios para especificação em amostras de água de mar. Inicialmente foram realizados estudos para seleção da melhor coluna a ser utilizada, obtendo como respostas ótimas em termos de eluição, sensibilidade e, considerando a especificação simultânea, a coluna *Kinetex C18* (100x4,6 mm com tamanho de partícula de 2,6 μm) que permite a eluição das espécies na ordem: As(III), As(V), Cr(III) e Cr(VI).

Os estudos seguintes envolveram: pH da fase móvel, concentração de TBAH, concentração de EDTA e porcentagem de metanol. As condições ótimas foram aplicadas para análise dos suplementos de ferro, entretanto, no início observava-se um aumento súbito de pressão na coluna cromatográfica que ultrapassava os 4000 psi que prejudicaria a análise assim como a coluna. Atentando para o fato foi diminuído o fluxo da fase móvel e mantida em fluxo constante por 24 horas antes do início das medidas com o objetivo de reduzir a pressão a valores operáveis para a coluna (2000 psi). Ponderando sobre os resultados obtidos nos estudos e as variáveis que afetam a separação das espécies de arsênio e cromo, as condições ótimas podem ser vistas na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 Condições ótimas para a separação cromatográfica das espécies de As e Cr.

Coluna	<i>Phenomenex Kinetex C18</i> 100x4,6 mm, 2,6µm
Composição da fase móvel	pH 7,2; 1,0 mM TBAH; 0,7mM EDTA; 5% metanol
Tempo de medida	5 minutos
Fluxo de fase móvel	0,7 mL min ⁻¹

5.7.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO E CROMO

5.7.3.1 ESTUDO DE EXTRAÇÃO EMPREGANDO ULTRASSON FOCALIZADO E MEIO ÁCIDO

A partir dos resultados atingidos na digestão para determinação total por ICP-MS foram avaliados as melhores condições de extração das espécies de arsênio e cromo das amostras sem destruí-las ou modificá-las. Após análise de alguns dados da literatura, foram escolhidos dois possíveis extratores e condições diferentes de extração.

Para extração das espécies da fase sólida para a líquida foi realizado um estudo com ultrasson focalizado em condições similares para a extração dos dois analitos, visto que é proposta a especiação simultânea usando HPLC-ICP-MS.

Atendendo a essa observação, criou-se um planejamento fatorial completo com dois níveis e três variáveis (2^3) em que foram estudadas as

seguintes variáveis: concentração de ácido clorídrico, amplitude do ultrassom e tempo de extração. As condições analisadas no domínio experimental estão descritas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 Condições estudadas no domínio experimental para extração de As e Cr.

Variável	Valor mínimo (-1)	Valor máximo (+1)	Ponto Central
Concentração de ácido clorídrico [HCl] (mol/L)	0,0	0,2	0,1
Amplitude do ultrassom (%)	40	80	60
Tempo de ultrassom (minutos)	2	10	6

As respostas quimiométricas avaliadas em termos de razão de extração para cada analito, calculadas pela equação 5.1.

$$\text{Extração} = \frac{\text{concentração obtida na extração das espécies}}{\text{concentração obtida na digestão ácida}} \quad \text{Equação 5.1.}$$

Visando a especificação simultânea o planejamento buscou as melhores condições de extração para ambos os analitos. A matriz de planejamento juntamente com os valores reais e codificados estão representados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 . Matriz e resultados do planejamento fatorial completo (2^3) para avaliação da extração de As e Cr empregando ultrasson e HCl.

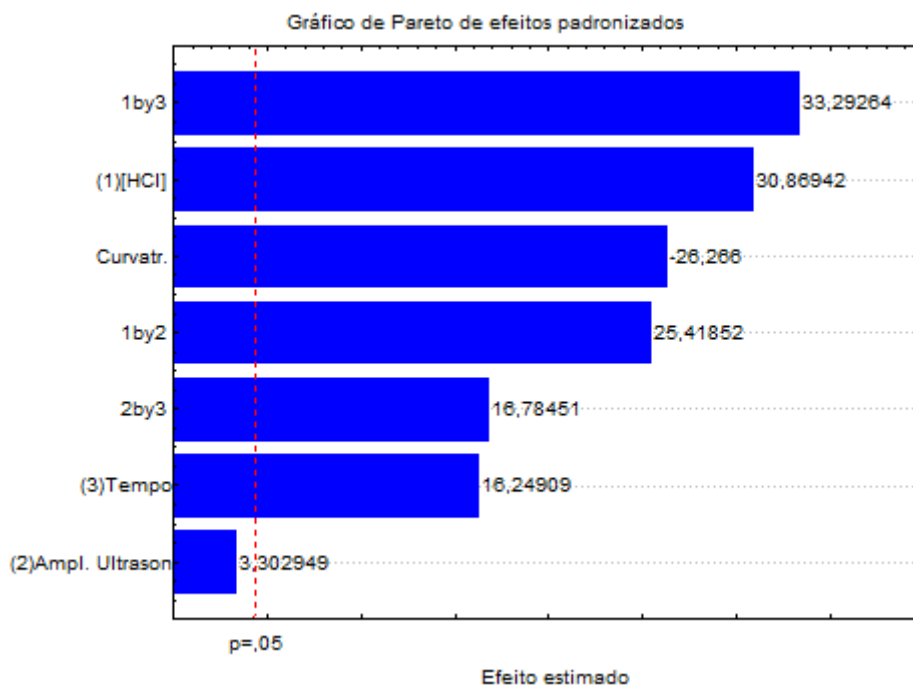
	[HCl]	Ampl. Ultrasson	Tempo	Extração Arsênio	Extração Cromo
1	1 (0,2M)	1 (80%)	1 (10 min)	78,76%	56,61%
2	1 (0,2M)	1 (80%)	-1 (2 min)	21,00%	56,79%
3	1 (0,2M)	-1 (40%)	1 (10 min)	35,32%	60,14%
4	1 (0,2M)	-1 (40%)	-1 (2 min)	24,94%	62,73%
5	-1 (0,0M)	1 (80%)	1 (10 min)	5,01%	12,94%
6	-1 (0,0M)	1 (80%)	-1 (2 min)	17,34%	19,27%
7	-1 (0,0M)	-1 (40%)	1 (10 min)	20,83%	20,16%
8	-1 (0,0M)	-1 (40%)	-1 (2 min)	31,94%	16,73%
9*	0 (0,1M)	0 (60%)	0 (6 min)	12,69%	69,49%
10*	0 (0,1M)	0 (60%)	0 (6 min)	10,98%	64,74%
11*	0 (0,1M)	0 (60%)	0 (6 min)	12,63%	66,67%

*Ponto Central

5.7.3.2 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS PARA EXTRAÇÃO DE ARSÊNIO

Com as respostas analíticas obtidas para a extração de arsênio, foi gerado o gráfico de Pareto (Figura 5.3).

Figura 5.3 Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo (2³) para arsênio



De acordo com o gráfico de Pareto e os valores para os efeitos calculados indicados na Tabela 5.10, o fator mais significativo, isto é, aquele que mais influencia a extração de arsênio é a concentração de ácido clorídrico e também a sua interação com o tempo de extração. Essa interação expressa um efeito positivo no processo, a saber, na medida em que é aumentada a concentração de ácido clorídrico e do tempo de extração, a resposta analítica também aumenta mostrando que a extração é mais eficaz quando se utiliza maiores concentrações de ácido clorídrico em tempos maiores. O observado está de acordo com a química de extração do processo, uma vez que maiores tempos de ultrasson permitem que a amostra seja mais aquecida em suas respectivas amplitudes, auxiliando o processo de extração. Os gráficos de médias marginais para os dois fatores revelam sua interação (Figura 5.4 e 5.5). Pode ser notado que, para maiores tempos e maiores concentrações de ácido

clorídrico as respostas em termos de extração também aumentam e que em menores concentrações de ácido clorídrico, mesmo que sejam utilizados maiores tempos, a resposta analítica não é eficaz. Então, pode-se deduzir que os fatores tempo de ultrasson e concentração de ácido clorídrico estão diretamente relacionados e, para que existam maiores respostas de extração, é necessário que ambas estejam relacionadas. Já em menores tempos, não se percebe uma variação significativa em termos de extração para maiores e menores concentrações de ácido clorídrico, confirmando a resposta do gráfico de Pareto em que mais significância tem a concentração de ácido clorídrico. Pode-se também verificar que maiores ou menores concentrações de ácido clorídrico não influenciam na resposta quando este é aplicado a menores tempos, comprovando a interação entre o tempo de ultrasson e a concentração de ácido clorídrico.

Figura 5.4 - Gráfico de médias marginais (Tempo x HCl) do planejamento fatorial completo (2^3) para arsênio

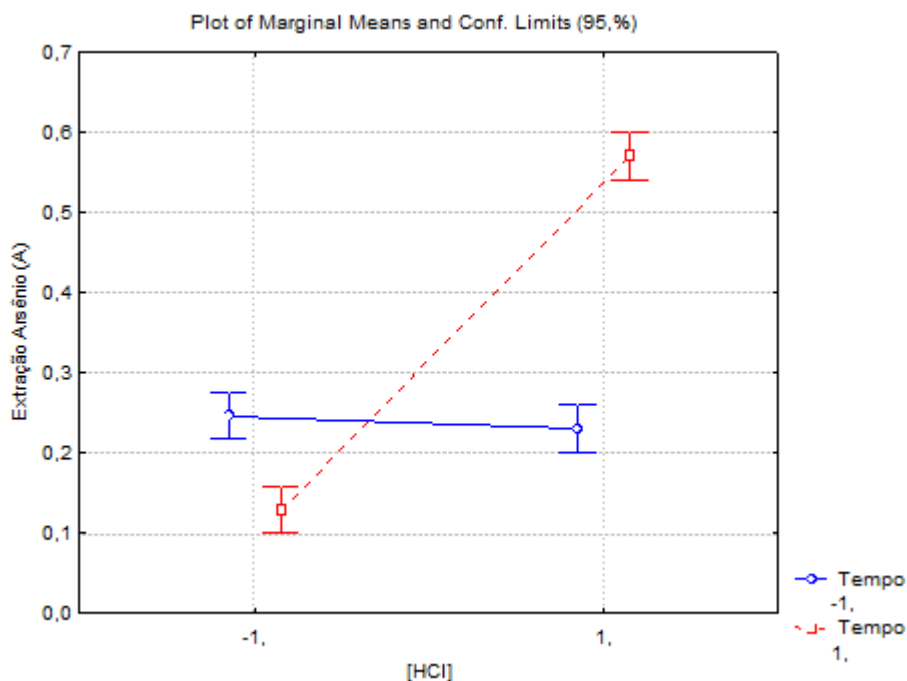
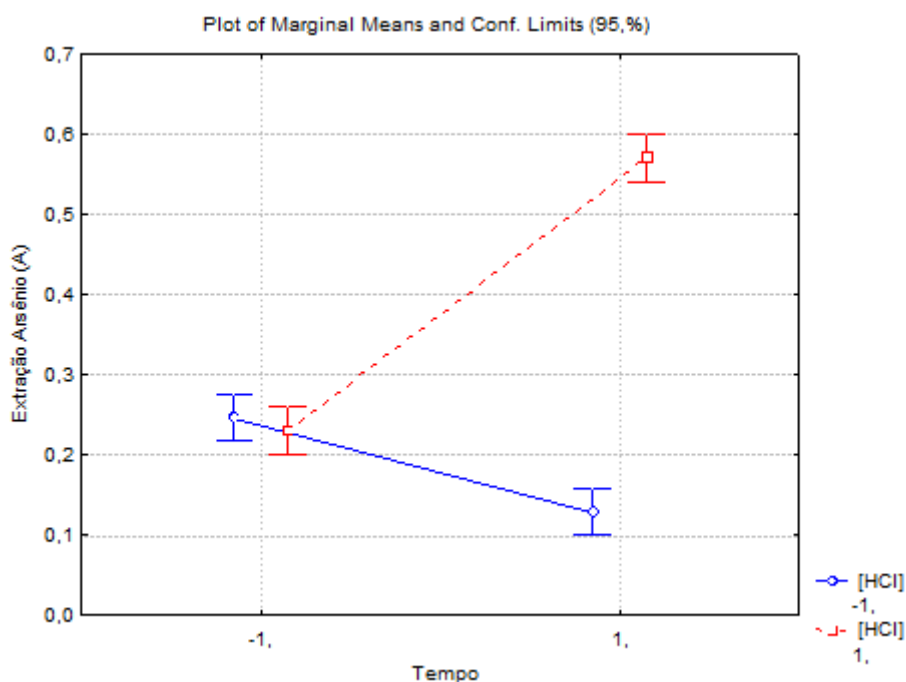


Figura 5.5 - Gráfico de médias marginais (Tempo x HCl) do planejamento fatorial completo (2^3) para arsênio



Os demais fatores estudados e suas interações igualmente são significativos no processo. Tempo e amplitude de ultrassom evidenciam efeitos positivos, o que significa que à medida que o tempo de ultrassom aumenta a resposta analítica em termos de extração também aumenta, outrossim à medida que a amplitude de ultrassom aumenta, a resposta analítica em termos de extração aumenta. Tudo está de acordo com a química do sistema, pois à medida que mais tempo é empregado, o ultrassom focalizado permite que a extração vá acontecendo em temperaturas cada vez maiores e mais espécies consigam ser extraídas. Além do tempo, à medida que mais amplitude é administrada na amostra o ultrassom tem mais eficiência para atingir todo o recipiente utilizado, agitando mais a amostra e expondo sua superfície à extração pelo ácido clorídrico.

Tabela 5.10 - Valores dos efeitos calculados para os fatores estudados.

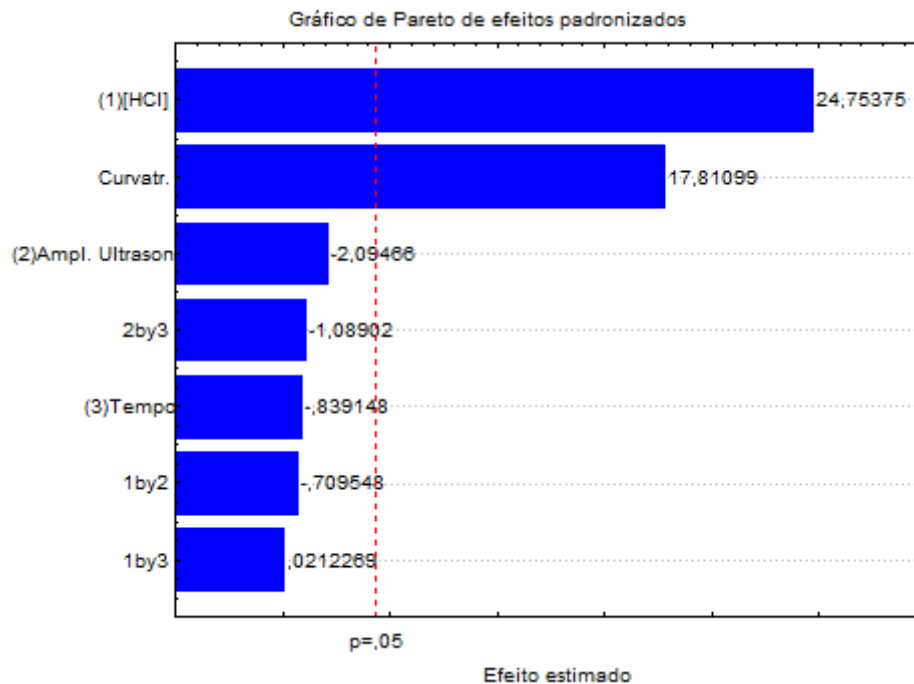
Efeito	Valor
Concentração de HCl	0,2122 ± 0,0068
Amplitude do ultrassom	0,0227 ± 0,0068
Tempo de extração	0,1117 ± 0,0068

Os efeitos calculados demonstraram que a concentração de ácido clorídrico e o tempo de extração são fatores estatisticamente significativos na extração de arsênio nas condições experimentais estabelecidas.

5.7.3.3 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS PARA EXTRAÇÃO DE CROMO

Com as respostas analíticas obtidas para a extração de cromo foi gerado o gráfico de Pareto (Figura 5.6).

Figura 5.6 Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo (2³) para cromo



De acordo com o gráfico de Pareto e os valores para os efeitos calculados apresentados na Tabela 5.11, demonstram que a concentração de ácido clorídrico tem efeito positivo e que a amplitude e o tempo de ultrassom possuem efeito negativo. Nas respostas encontradas, o fator mais significativo e o único que influencia na extração de cromo é a concentração de ácido clorídrico, uma resposta parecida com a indicada para a extração de arsênio. No entanto, diferente do obtido para a extração de arsênio, os demais fatores estudados não se apresentaram significativos, mostrando que não possuem influência na extração de cromo.

Tabela 5.11- Valores dos efeitos calculados para os fatores estudados.

Efeito	Valor
Concentração de HCl	0,4179 ± 0,0168
Amplitude do ultrassom	-0,0353 ± 0,0168
Tempo de ultrassom	-0,0141 ± 0,0168

Como pode ser observada pelo gráfico de Pareto a significância da curvatura, foi feito também o teste de curvatura que avalia o comportamento do sistema na região do ponto central. Para isso, foi aplicado nos resultados obtidos e para o seu cálculo utilizada a equação 5.2.

Equação 5.2.
$$\text{Curvatura} = R_{FD} - R_{CP}$$

Onde, R_{FD} é a média das respostas obtidas a partir dos experimentos realizados para o planejamento fatorial e R_{CP} é a média das respostas obtidas para o ponto central.

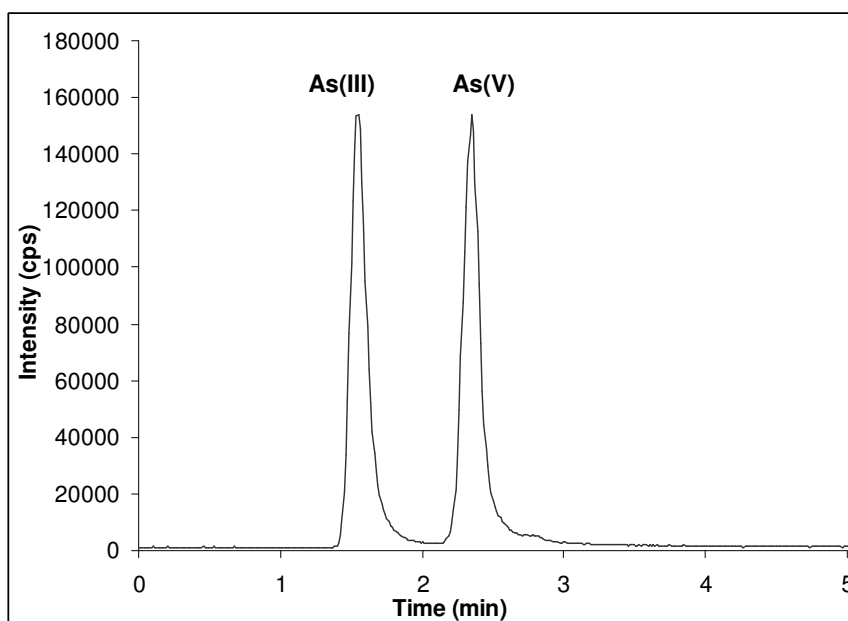
Pela análise dos resultados, $R_{FD} = 0,38$, $R_{CP} = 0,67$ sugeriu uma curvatura negativa. Isso revela a existência de uma região máxima de sinal analítico de extração (acima de 65%) próxima das condições experimentais do ponto central que corresponde em valores reais a: 0,1 mol L⁻¹ para a concentração de ácido clorídrico, a 60% de amplitude do ultrassom, e 6 minutos para o tempo de emprego do ultrassom.

5.7.3.4 ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO EMPREGANDO HPLC-ICP-MS

Considerando os resultados apontados pela análise das extrações aplicando ICP-MS, partiu-se para uma avaliação dos extratos obtidos por HPLC-ICP-MS que é o proposto pelo método.

O ideal para as respostas encontradas no planejamento seria partir para um segundo planejamento de superfície de resposta, a fim de dar a conhecer com exatidão, os melhores parâmetros para extração das espécies de arsênio e cromo. Entretanto, a análise por HPLC-ICP-MS demonstrou que as melhores condições obtidas, apesar de demonstrarem ser excelentes quando avaliados os resultados das concentrações totais dos analitos, não são bons extratores do ponto de vista instrumental, uma vez que os reais valores não revelam que as concentrações seriam fruto de uma interferência no equipamento causada pela formação de um poliatômico entre o gás utilizado no equipamento durante a nebulização, geração e manutenção do plasma, o argônio com o íon cloreto. O poliatômico de massa 75 ($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$) possui massa igual à do arsênio utilizado na leitura (^{75}As). Os cromatogramas obtidos no equipamento são mostrados nas figuras 5.7, 5.8 e 5.9, a seguir.

Figura 5.7 - Cromatograma obtido para uma solução padrão de arsênio ($100 \mu\text{g L}^{-1}$)



A Figura 5.7 exibe o cromatograma para uma solução padrão de arsênio e permite visualizarmos os dois picos de arsênio com linhas de base sem outros eventos com tempos de retenção em aproximadamente 1,5 min e 2,2 min para As(III) e As(V), respectivamente.

Na análise do experimento 1 em que se é utilizado 0,2 mol/L de HCl (Figura 5.8), o cromatograma mostra uma formação de um pico fracionado para o que seria As(V) e um segundo pico de maior altura com tempo de retenção de aproximadamente 3,5 min. O equipamento não é capaz de identificar este ponto, tal como, quando comparados os cromatogramas da solução padrão e do experimento em questão realizado na ausência de HCl não é visualizado, nos levando a inferir que o fato seja causado por ácido clorídrico e medido no equipamento como poliatômico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$.

Figura 5.8 - Cromatograma obtido para a amostra utilizada no planejamento fatorial completo (experimento 1) com concentração de ácido clorídrico 0,2 mol/L.

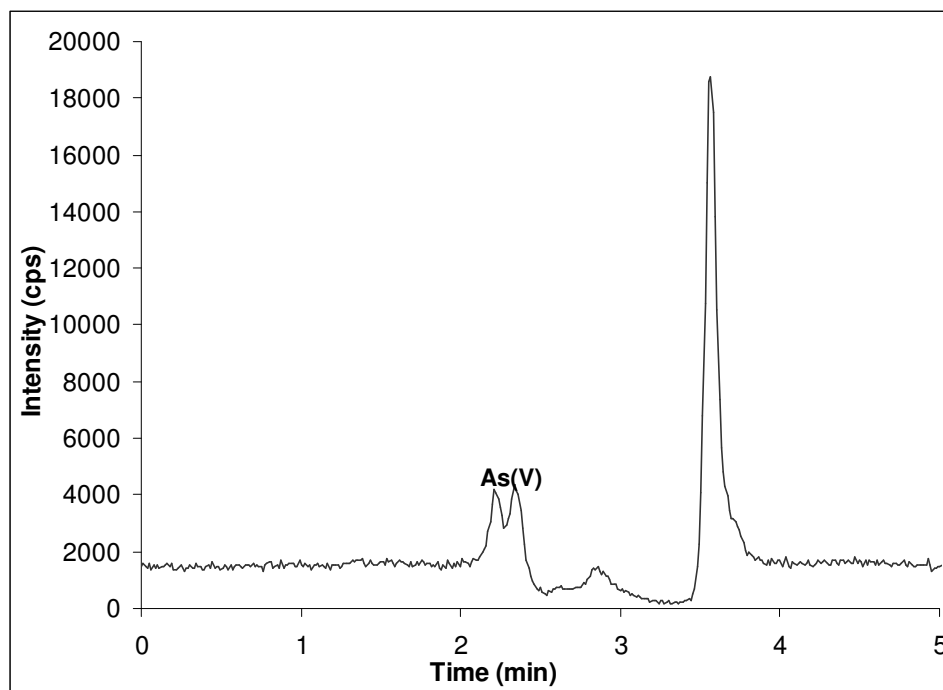
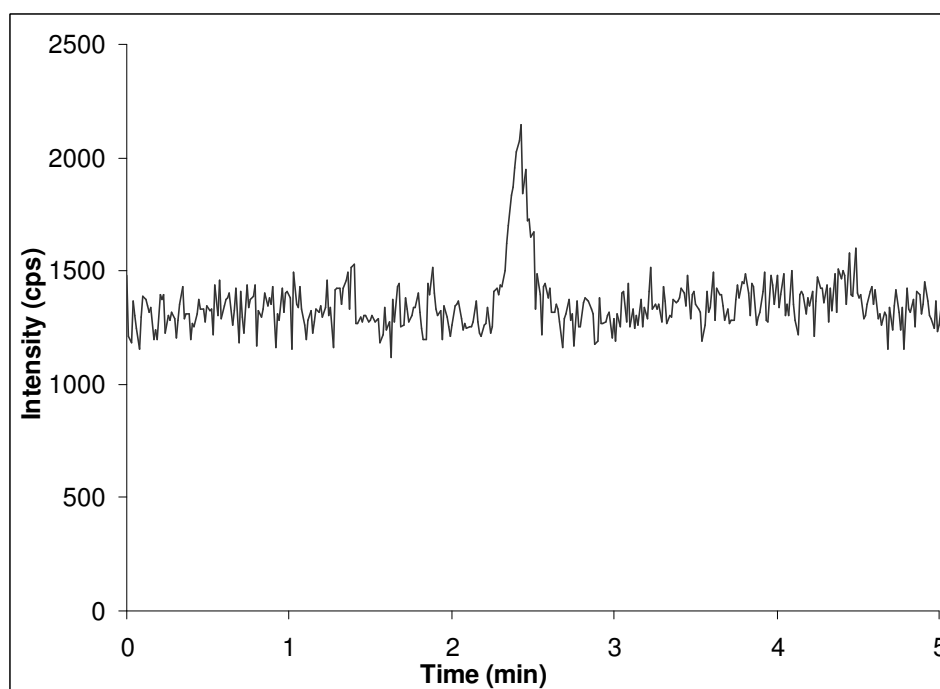
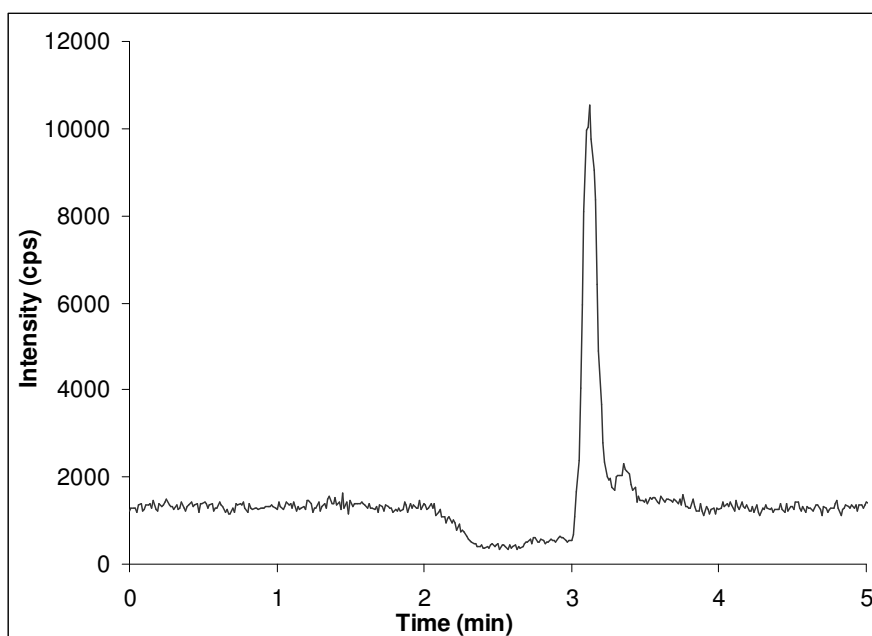


Figura 5.9 - Cromatograma obtido para a amostra utilizada no planejamento fatorial completo (experimento 8) na ausência de ácido clorídrico.



Quando analisado também o experimento do ponto central (Figura 5.9), onde é utilizado uma menor concentração de ácido clorídrico (Figura 5.10), pode-se perceber que há uma redução da altura do pico com tempo de retenção em aproximadamente 3,5 min comprovando a hipótese do interferente encontrado.

Figura 5.10 - Cromatograma obtido para a amostra utilizada no planejamento fatorial completo (experimento 9) com concentração de ácido clorídrico 0,1 mol/L.



Ainda em estudo com as concentrações de ácido clorídrico e suas possíveis interferências, quando analisamos os resultados para cromo, resultados similares também são encontrados. Entretanto, a análise cromatográfica para cromo é relativamente mais difícil por causa da presença de matriz orgânica que, associada ao gás argônio, formam poliatômicos tais como $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, que são medidos na mesma massa do isótopo ^{52}Cr . Para

resolução dessa interferência, o ideal seria optar por um gás de reação amônia, acoplado ao gás de colisão (hélio) que foi utilizado. Entretanto, o gás de reação não elimina por completo a presença da interferência e, além disso, promove a formação de outro poliatômico na presença de argônio e nitrogênio que também interfere na determinação de cromo pelo isótopo 52. Um segundo isótopo para cromo (^{53}Cr) foi utilizado, apesar de sua menor abundância, permitiu a análise dos experimentos e tirar conclusões acerca do estudo.

Para cromo, resultados similares aos do arsênio foram computados. A presença de ácido clorídrico permite a retenção de espécies não identificadas no mesmo tempo de retenção de Cr(VI) e, com isso, além de dificultar a integração dos picos de cromo hexavalente, são produtos de interferências instrumentais. O cromatograma da Figura 5.11 mostra o a solução padrão com espécies de cromo diluídas em fase móvel e a figura 13 mostra o cromatograma para uma solução padrão de Cr(III) em meio HCl 0,2 mol L⁻¹.

Figura 5.11 - Cromatograma obtido para uma solução padrão de arsênio (100 $\mu\text{g L}^{-1}$)

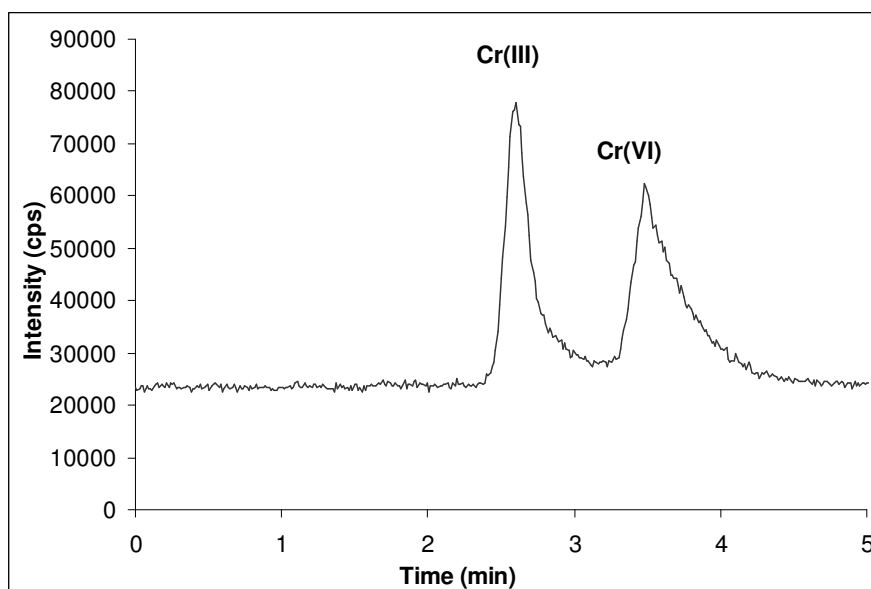
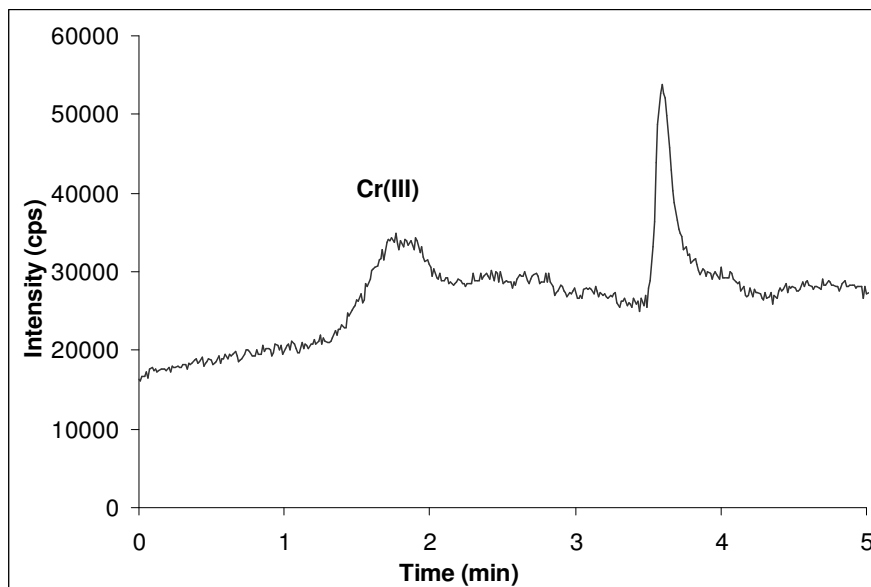


Figura 5.12 - Cromatograma obtido para a amostra utilizada no planejamento fatorial completo (experimento 1) com concentração de ácido clorídrico 0,2 mol/L.



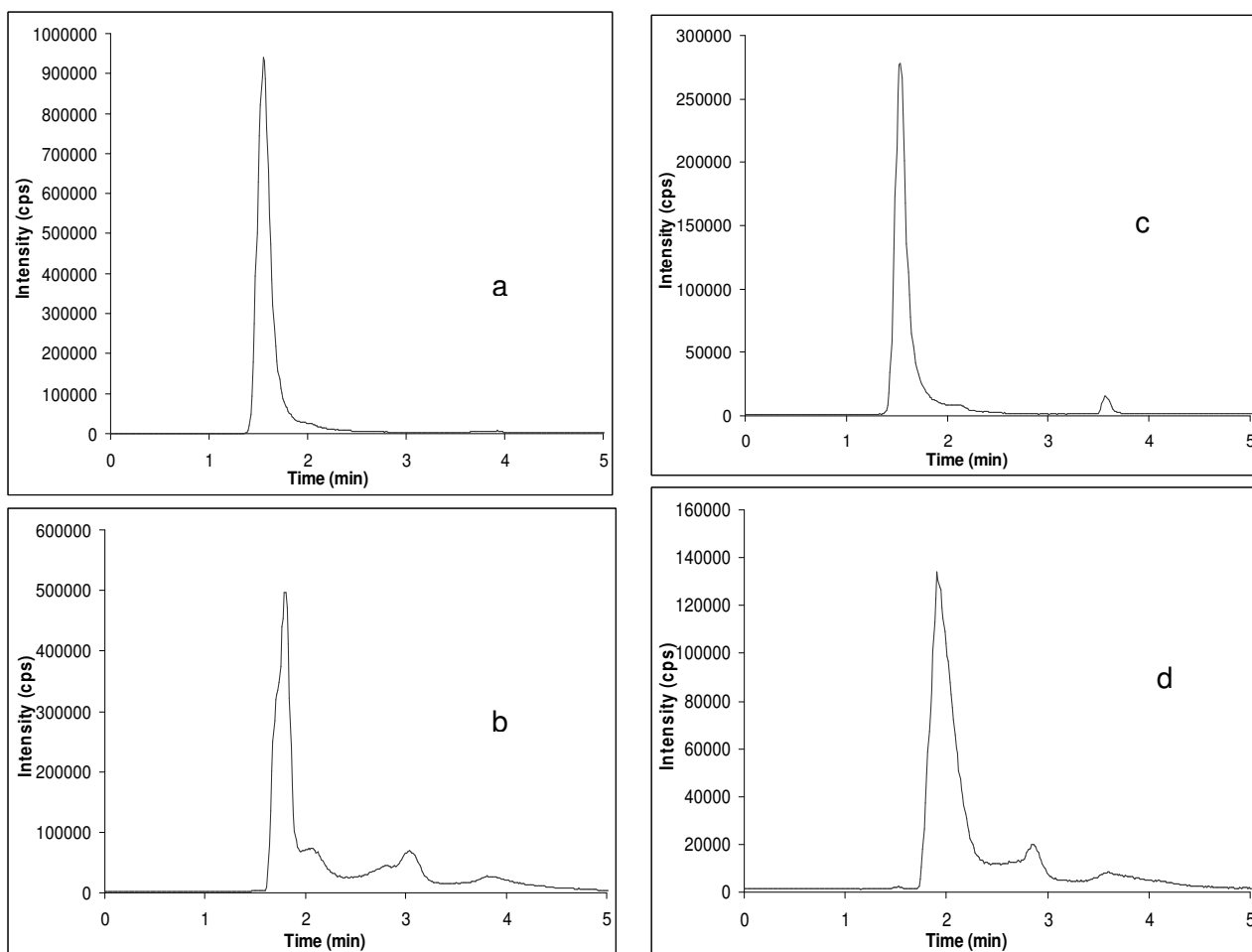
Na análise da Figura 5.12, pode ser visto que quando é utilizado 0,2 mol/L de HCl, o cromatograma mostra uma formação de um pico mais espalhado para o que seria Cr(III), com um tempo de retenção diferente do que é notado na solução padrão e um segundo pico de maior altura com tempo de retenção de aproximadamente 3,5 min, no mesmo tempo em que ocorre a retenção no isótopo 75. O equipamento também não foi capaz de identificar este ponto, da mesma forma quando comparamos com um experimento na ausência de HCl este pico igualmente não é observado, nos levando a inferir que também seja produto de interferente causado ácido clorídrico e medido no equipamento. Possíveis poliatômicos para o isótopo de ^{53}Cr são: $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$ e $^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}$.

Em prosseguimento às interpretações dos resultados para arsênio, foram feitos testes com adição de espécies isoladas de As(III) e As(V) em condições realizadas nos planejamentos. Solução padrão aquosa, em ácido clorídrico 0,1mol/L e, em ácido clorídrico 0,2mol/L. Os resultados são

comparados na Figura 5.13. O que pode ser observado é que adições de quantidades de ácido clorídrico modificam tanto o tempo de retenção, quanto facilitam a ocorrência de reações de oxidorredução.

Em experimentos onde foram adicionados somente As(III) com 0,1 mol/L de ácido clorídrico, mostrado na primeira parte da figura (parte a), nota-se uma retenção somente de As(III) como era esperado. Entretanto, no segundo experimento (parte b) onde foi acrescentado somente As(V), verifica-se a retenção de As(III) e uma pequena retenção do que seria As(V) fora do padrão em solução aquosa (aprox. 2,7 min). O mesmo é comprovado para os experimentos onde é adicionado à uma solução 0,2 mol/L de ácido clorídrico. Pode-se confirmar na parte c da figura que, a adição de As(III) não promove eventos dignos de nota, com exceção de uma formação de pequeno pico que possivelmente seria um interferente já mencionado, entre o argônio e o cloro. Quando adicionamos somente As(V) em uma solução 0,2 mol/L de ácido clorídrico (parte d), visualizamos um único pico, identificado como As(III) e um menor pico com um tempo de retenção também fora do padrão para a solução aquosa (aprox. 2,7 min). A partir destes experimentos, pode-se deduzir que, o ácido clorídrico está facilitando a redução de As(V) a As(III).

Figura 5.13 - Cromatogramas obtidos para as soluções padrão (100 ppb) em diferentes concentrações de HCl. Partes a) As(III) em HCl 0,1 mol/L b) As(V) em HCl 0,1 mol/L c) As(III) em HCl 0,2 mol/L d) As(V) em HCl 0,2 mol/L.



5.7.4 ESTUDO DA EXTRAÇÃO EMPREGANDO BANHO ULTRASSÔNICO

Interpretando os resultados encontrados no planejamento fatorial completo, em que o tempo de sonicação foi considerado um fator significativo e que de acordo com a química do processo, o aumento da sonicação permite que a extração ocorra em temperaturas maiores, foi realizado um estudo univariado com o objetivo de examinar a extração de arsênio e cromo com banho ultrasson e água como solvente extrator, uma vez que, adições de ácido interferem na estabilidade das espécies e facilitam a ocorrência de reações de oxidorredução.

Foi utilizado um procedimento através de extração assistida com banho ultrasson com água como solvente extrator à uma temperatura de 90°C em recipientes fechados, testados quatro tempos e as respostas obtidas em termos de extração.

O procedimento proposto foi a utilização de 0,1 gramas de amostra e 5 mililitros de água ultrapura. Os tempos escolhidos foram 15, 30, 60 e 90 minutos, reportados dentro dos trabalhos listados na literatura. Após o resfriamento, 5 mL de água ultrapura foi adicionado e levados à uma centrífuga por 15 minutos a 3000 rpm. Os resultados encontrados, analisados por HPLC-ICP-MS e estão descritos na Tabela 5.12.

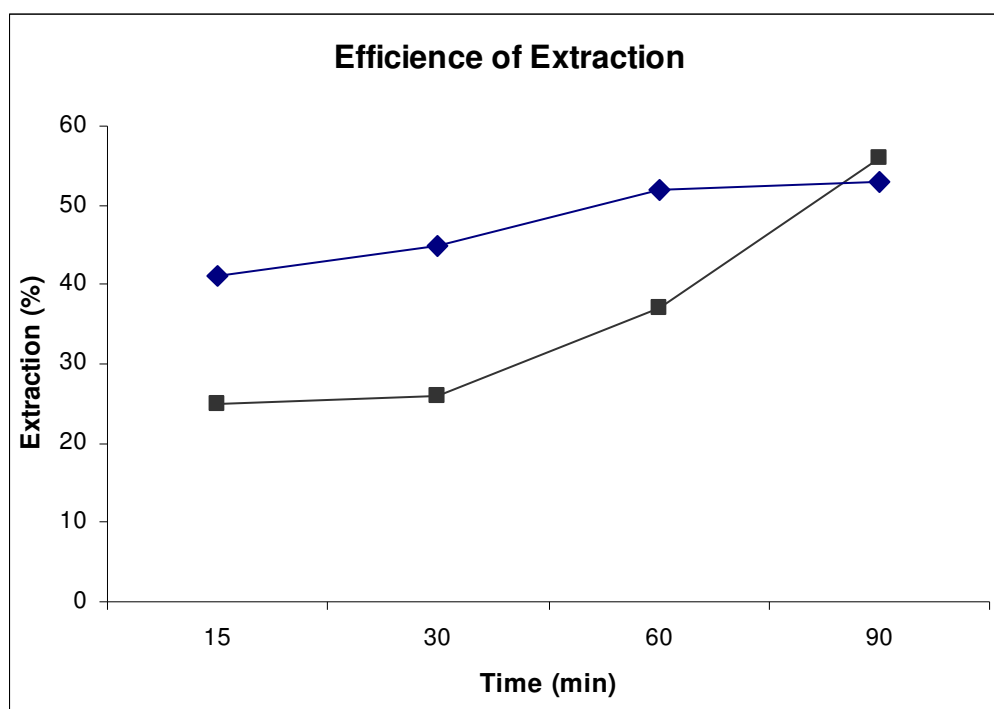
Tabela 5.12 - Resultados de extração para As e Cr empregando banho ultrassônico.

Extratos da Otimização						
Tempo (min)	As_{total} Extraído*	As_{total} Digestão*	- Extração	Cr_{total} Extraído*	Cr_{total} Digestão*	- Extração
15	0,35		26%	25,36		41%
30	0,34		26%	27,91		45%
60	0,49	1,321	37%	32,52	62,273	52%
90	0,78		59%	32,54		52%

* expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$

Os resultados exibidos na Tabela 5.12 e Figura 5.14, permitem entender parte do que já foi concluído pelo planejamento fatorial completo. No qual conseguimos respostas com baixa extração quando era utilizada água como solvente extrator, com extração em torno de 20% de eficiência. No estudo univariado utilizando um banho ultrasson, uma extração média de 55% foi atingida quando realizada por 90 minutos. Dessa forma, fica provado que à maiores temperaturas e maiores tempos de extração, mais eficiência de extração é obtida. Entretanto, utilizar tempos maiores que 90 minutos, aumenta o tempo da sequência analítica e torna-se uma tarefa mais complicada uma vez que parte da água sofre vaporização e, ao ter que repor a quantidade de água perdida, a temperatura não seria mantida em 90°C constantemente.

Figura 5.14. Curvas de extração para arsênio (em preto) e cromo (em azul) durante a variação do tempo e utilização de banho ultrassônico.



Outros trabalhos já reportados na literatura propõem a utilização de soluções diluídas de metanol como solvente extrator. Entretanto, neste trabalho não foi possível realizar os citados testes, uma vez que o uso de metanol alteraria a composição da fase móvel que é utilizada para eluir a amostra pela coluna cromatográfica e, com isso, alteriam respostas de experimentos já realizados para a otimização das condições ótimas para separação por HPLC.

5.7.5 ESTUDO DA EXTRAÇÃO EMPREGANDO ENERGIA DE MICRO-ONDAS

Considerando os resultados obtidos nos experimentos anteriores, foi realizada uma tentativa de extração de um trabalho reportado na literatura empregando uma extração assistida com energia de micro-ondas. Para isso,

uma alíquota de 1,0 grama de amostra foi pesada em recipientes de teflon de alta pressão, próprios para a digestão em micro-ondas. 10 mL de água ultrapura foram adicionados em cada recipiente, estes introduzidos no forno de micro-ondas e submetidos ao seguinte programa de aquecimento: a temperatura foi aumentada da temperatura ambiente até 80 °C por 5 minutos, mantida em 80 °C por 30 minutos e, após isso, resfriada até a temperatura ambiente através de um programa de ventilação. Temperaturas maiores que 80°C não são recomendadas uma vez que a constante evaporação de água diminui o volume de solvente extrator, mesmo tratando-se de um sistema fechado a necessidade de condensação do vapor de água diminui a eficiência de extração. Os experimentos foram realizados imediatamente antes da leitura e, para cada rodada, realizadas três réplicas e um branco para controle de possíveis contaminações. Durante essa etapa as respostas também foram analisadas em termos de eficiência de extração.

Os extratos foram analisados empregando HPLC-ICP-MS e os resultados para o estudo em questão mostrou que são extraídos 95% de arsênio e 97% de cromo das amostras, levando em consideração os teores totais encontrados no procedimento de digestão total. Os resultados são concordantes com os relatados em outros trabalhos da literatura e, por isso, o procedimento foi empregado na extração das espécies nas amostras de suplementos de ferro.

5.7.6 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS ESPÉCIES DE CROMO E ARSÊNIO

Constatando o elevado poder oxidante da espécie de Cr(VI) foram realizados estudos de estabilidade das espécies de cromo, uma vez que, em soluções multielementares poderiam ocorrer ocasionalmente oxidação de Cr(III) a Cr(VI) e As(III) a As(V) por obedecerem ao princípio de Le Chatelier.

Foram preparadas soluções padrão diluídas em fase móvel, com concentrações iguais para ambas as espécies do mesmo elemento e analisadas em dois tempos distintos: 2 e 24 horas depois, as soluções foram congeladas após a primeira leitura e retiradas antes da análise.

Tabela 5.13 - Áreas obtidas para soluções padrão de As(III), As(V), Cr(III) e Cr(VI), em diferentes tempos de leitura após o preparo e suas razões para avaliação de ocorrências de reações de oxidorredução.

Área (cps)	2 Horas	24 Horas	24/2 Horas
Cr(III)	477767	427681	0,8952
Cr(VI)	471729	386358	0,8190
Cr(VI)/Cr(III)	0,9874	0,9034	0,9149
As(III)	790315	411186	0,5203
As(V)	792117	902946	1,1399
As(V)/As(III)	1,0023	2,1960	2,1910

Figura 5.15 - Cromatogramas para soluções padrão de As(III) e As(V), em preto e para soluções padrão de Cr(III) e Cr(VI), em azul, lidas após duas horas do preparo.

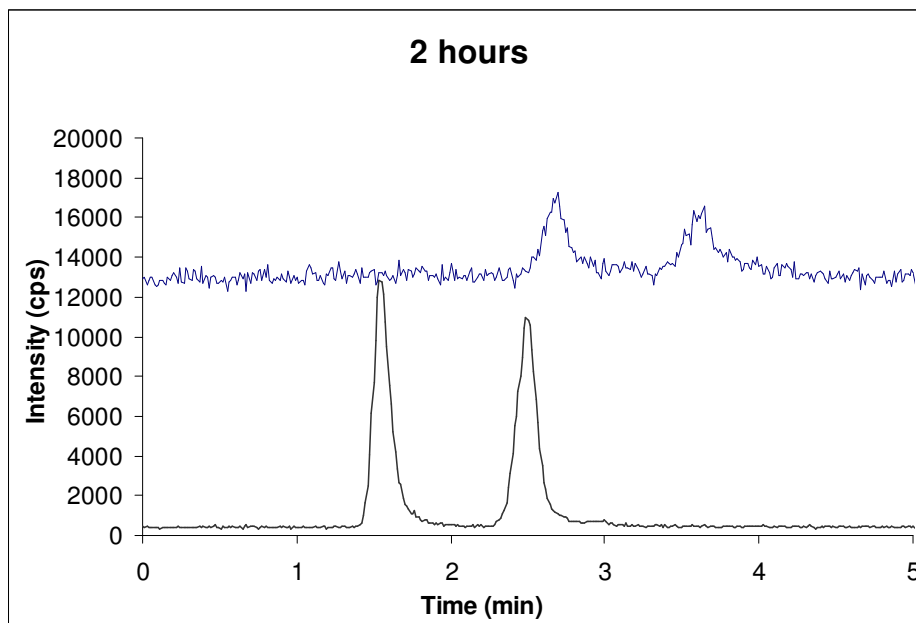
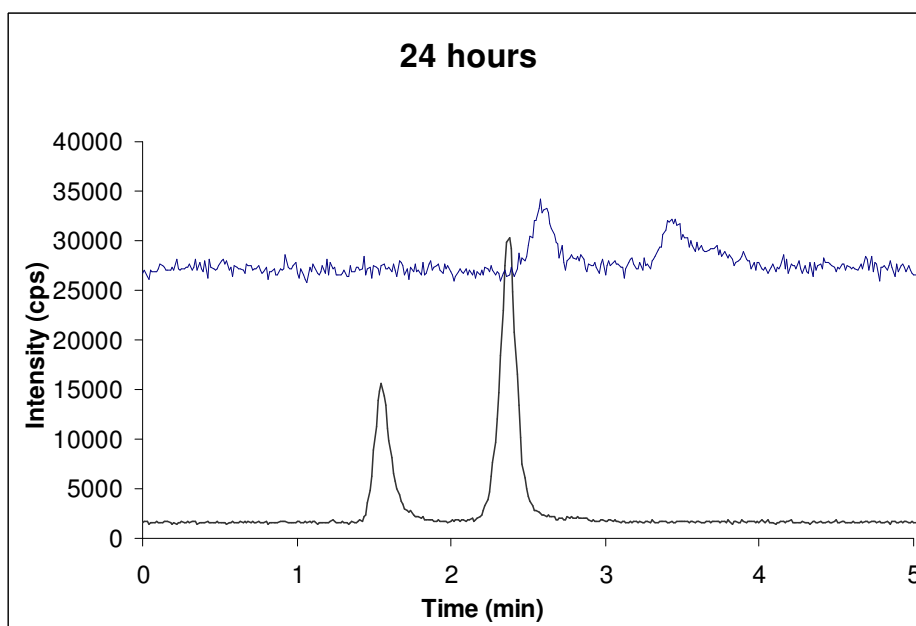


Figura 5.16 - Cromatogramas para soluções padrão de As(III) e As(V), em preto e para soluções padrão de Cr(III) e Cr(VI), em azul, lidas após vinte e quatro horas do preparo.



Os resultados exibidos na Tabela 5.13 e Figuras 5.15 e 5.16 mostraram que as soluções estoque não podem ser preparadas em caráter multielementar caso a análise não seja realizada imediatamente após seu preparo, uma vez que, a maior parte das espécies são de As(III) e Cr(III) são oxidadas a As(V) e Cr(VI), respectivamente, após um período de 24 horas.

5.7.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Durante a etapa de validação do método de especificação proposto, avaliaram-se o efeito de matriz, do método de quantificação, os parâmetros analíticos limites de detecção e quantificação, a linearidade analítica, a exatidão e a precisão.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados como descrito anteriormente e de acordo com o estabelecido pela IUPAC, sendo o limite de detecção e quantificação calculados pelas expressões $(3\delta/s)$ e $(10\delta/s)$, respectivamente, onde “ δ ” representa o desvio padrão da solução do branco e “s” a inclinação da curva analítica. Os valores calculados estão descritos na Tabela 5.14. Os limites de detecção demonstram boas sensibilidades para as espécies de arsênio e uma sensibilidade mais reduzida para as espécies de cromo, devido às interferências existentes que não são completamente corrigidas mesmo utilizando célula de colisão.

Tabela 5.14 - Resultados de limites de detecção e quantificação calculados para o método proposto.

Espécie	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
As(III)	0,002	0,008
As(V)	0,003	0,010
Cr(III)	0,140	0,468
Cr(VI)	0,042	0,140

A exatidão do método foi avaliada mediante ensaios de adição e recuperação, uma vez que não existiam materiais de referência certificados para a amostra, bem como CRM's similares. Foram realizadas adições de: 1,0; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as espécies de As(III) e As(V), 80,0 160,0, 320,0 e 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a espécie de Cr(III) e 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a espécie de Cr(VI). Os resultados obtidos para os ensaios de recuperação realizados são exibidos na Tabela 5.15.

Tabela 5.15. Resultados obtidos para os testes de adição/recuperação para a especiação de As e Cr por HPLC-ICP-MS.

Espécie	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
	0,178	0,0	--
As(III)	1,158	1,0	98,05
	2,912	2,5	109,36
	5,420	5,0	104,85
	10,647	10,0	104,69
	0,749	0,0	--
As(V)	1,806	1,0	105,65
	3,413	2,5	106,53
	5,618	5,0	97,38
	10,881	10,0	101,31
	97,387	0,0	--
Cr(III)	169,719	80,0	90,42
	231,186	160,0	83,62
	399,376	320,0	94,37
	482,018	400,0	96,16
	2,763	0,0	--
Cr(VI)	11,362	10,0	85,99
	18,891	20,0	80,64
	40,397	40,0	94,09
	80,340	80,0	96,67

Os valores encontrados para as espécies de arsênio variaram entre 97,38 e 109,36%, com uma recuperação média de $103,47 \pm 4,19\%$. Para as espécies de cromo, variaram entre 80,64 e 96,16%, com uma recuperação média de $89,33 \pm 5,99\%$. Compreendendo isso, podemos interpretar que boas recuperações são alcançadas e, deduzir que o método possui boa exatidão. Os valores são concordantes com outros trabalhos já desenvolvidos onde foi realizada a especiação simultânea de As e Cr em água do mar.

A precisão do método foi avaliada a partir da repetitividade de 7 leituras consecutivas de uma mesma alíquota de uma amostra, as precisões calculadas foram 14,0, 7,88 e 3,12% para As(III), As(V) e Cr(III), respectivamente, permitindo inferir que o método possui boa precisão com bons RSD's, garantindo resultados reproduzíveis. A precisão do procedimento geral foi avaliada pela reprodutibilidade dos resultados das réplicas de uma mesma amostra, também expressa como o RSD e os valores calculados foram 10,17, 5,14, 3,51 e 5,75% para As(III), As(V), Cr(III) e Cr(VI), respectivamente.

5.7.8 APLICAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO E CROMO EM SUPLEMENTOS DE FERRO

O método proposto foi aplicado em 15 amostras de suplementos de ferro, e os resultados estão listados na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 Resultados obtidos para a determinação total de As e Cr em suplementos de ferro, empregando ICP-MS.

Identificação da amostra	As ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$)
BRA-NET	< 0,029	0,335 \pm 0,057
ESP-TDF	0,058 \pm 0,012	13,654 \pm 0,453
BRA-END	1,510 \pm 0,051	6,927 \pm 0,321
BRA-LOM	0,083 \pm 0,022	33,921 \pm 0,862
ESP-GRD	< 0,029	62,273 \pm 0,432
BRA-SUL	0,042 \pm 0,016	33,403 \pm 2,121
BRA-NOR	< 0,029	0,425 \pm 0,125
BRA-FER	0,096 \pm 0,010	1,822 \pm 0,250
BRA-ANX	< 0,029	0,176 \pm 0,015
BRA-FOL	< 0,009	< 0,089
BRA-LOL	< 0,009	< 0,089
BRA-ANS	< 0,009	< 0,027
ESP-FER	0,112 \pm 0,012	0,864 \pm 0,012
ESP-CRF	<0,009	0,362 \pm 0,018
ESP-PRF	0,049 \pm 0,023	1,779 \pm 0,182

Nove, das quinze amostras aplicadas na determinação total foram aplicadas à análise de especiação, levando em conta as limitações de valores encontrados e sensibilidades do método. Estes resultados alcançados estão listados na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 Resultados obtidos para a especiação de As e Cr em suplementos de ferro, empregando HPLC-ICP-MS.

Identificação da amostra	As(III) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	As(V) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cr(III) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cr(VI) ($\mu\text{g g}^{-1}$)
ESP-TDF	0,057 \pm 0,010	N.D.	--	--
BRA-END	N.D	1,253 \pm 0,109	6,902 \pm 0,124	N.D.
BRA-LOM	0,042 \pm 0,001	0,034 \pm 0,001	--	--
ESP-GRD	--	--	61,169 \pm 1,241	N.D
BRA-SUL	<0,008	0,020 \pm 0,001	5,808 \pm 0,745	10,303 \pm 0,188
BRA-NOR	--	--	<0,468	N.D.
ESP-FER	0,010 \pm 0,003	0,072 \pm 0,002	--	--
ESP-CRF	N.D	0,046 \pm 0,009	<0,468	N.D.
ESP-PRF	--	--	0,697 \pm 0,057	0,392 \pm 0,120

Os resultados evidenciam que uma das quinze amostras analisadas possui valor elevado para arsênio e três, das quinze possuem valores de cromo elevados, maiores que o proposto pelas regulamentações que são 0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ para arsênio e 25,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para cromo.

5.8. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Foi proposto um método sensível empregando HPLC-ICP-MS para a determinação e especiação simultânea de arsênio e cromo em suplementos de ferro usados no tratamento da anemia ferropriva. Das quinze amostras adquiridas em cidades brasileiras e na Espanha, analisadas pelo método, nove foram utilizadas no estudo de especiação.

O método tem como vantagens fornecer informações reais de arsênio e cromo inorgânico em amostras de suplementos de ferro, apresentar alta sensibilidade e uma elevada seletividade com baixos tempos de retenção, mostrando que o método é rápido para o estudo proposto. A extração utilizada é eficiente e mostrou-se livre de interferências quando comparada com outros métodos de extração testados e fornece uma nova estratégia de análise para a avaliação toxicológica de produtos farmacêuticos.

Para Cr, a interferência não completamente eliminada dificultou a integração de alguns picos, em particular os que possuíam baixos teores das espécies de cromo na amostra. Entretanto, em outras amostras foi possível por conta dos elevados teores de cromo.

Os resultados demonstram que algumas amostras indicam valores elevados de cromo e uma amostra possui um valor de arsênio maior do que o estabelecido pela farmacopeia americana.

CAPÍTULO VI

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho possibilitou a determinação e especificação de espécies químicas em medicamentos utilizados no tratamento da anemia ferropriva empregando variadas técnicas espectroanalíticas.

A determinação de chumbo utilizando ETAAS mostrou-se como uma técnica bastante sensível, permitindo a quantificação deste elemento em forno de grafite sem a presença de interferentes de matriz oriundos das altas concentrações de ferro, usando calibração externa com padrões aquosos.

O método possibilitou a determinação de chumbo com temperatura de pirólise 1100°C e atomização de 2000 °C, usando uma mistura de paládio e magnésio como modificador químico. Com precisões calculadas abaixo de 10%, o método permitiu obtenção de valores com exatidão e foi comparado com a técnica de ICP-MS.

As concentrações de chumbo encontradas foram comparadas com a legislação vigente e cinco, das doze amostras analisadas possuíam valores acima do máximo fixado pela Farmacopeia, devendo assim serem consideradas como potenciais riscos.

Este trabalho mostrou ainda que, a utilização da amostragem em suspensão aliada à HR-CS CVAAS é uma boa estratégia para a determinação de mercúrio obtendo bons LD e LQ e precisão com RSD<20%.

Livre de interferências de matriz, a amostragem em suspensão demonstrou ser uma alternativa bastante eficaz ao tratamento da amostra, principalmente pelo fato do mercúrio tratar-se de um elemento muito volátil. Isso foi possível com poucos gastos de reagentes graças ao emprego do planejamento fatorial completo como ferramenta matemática para otimização do preparo da suspensão.

Com uma estratégia rápida e uma sequência analítica mais curta, o método possui menor custo em comparação a métodos que demandam o emprego da digestão ácida com fornos de micro-ondas, por exemplo. Além

disso, a redução dos riscos de contaminação, uma vez que poucas etapas de manipulação da amostra são requeridas.

As técnicas de PCA e HCA mostraram que os medicamentos usados no tratamento da anemia ferropriva são estatisticamente diferentes se comparadas as suas matrizes. As diferenças entre os sais orgânicos, sais inorgânicos e forma de apresentação dos medicamentos, são fatores que influenciam diretamente na composição.

A ICP OES é uma técnica muito sensível para determinação de macro e microelementos em amostras complexas, como é o caso da matriz com alto teor de ferro. O estudo *in vitro* demonstrou que os medicamentos apresentados em soluções orais são mais bioacessíveis para a digestão intestinal, o que seria mais facilmente aproveitado no tratamento da anemia.

A HPLC-ICP-MS provou ser uma técnica eficaz para a especificação de arsênio e cromo nos medicamentos com altos teores de ferro. O uso de uma matriz complexa poderia influenciar nos resultados, entretanto, o uso de hélio como gás de colisão revelou redução eficaz das interferências poliatômicas.

Mais uma vez, o planejamento fatorial completo confirmou ser uma ferramenta rápida e eficaz para otimização de condições do preparo da extração. Neste caso, também foram elucidados graças aos estudos de planejamento fatorial os possíveis interferentes encontrados, como no caso do ácido clorídrico.

Os medicamentos analisados evidenciaram teores de arsênio e cromo, na maioria dos casos, acima dos valores da legislação da Farmacopeia. Para arsênio, os casos de algumas amostras são mais críticos, pois superam esse valor máximo permitido. Porém, por tratar-se apenas de um estudo investigativo, seria necessário realizar estudos de disponibilidade biológica para avaliar riscos efetivos.

REFERÊNCIAS

[1] GOODMAN, Louis Sanford; GILMAN, Alfred Goodman; BRUNTON, Laurence L. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro, RJ: McGraw-Hill: AMGH Ed., 2006. xxiv, 1821 p.

[2] Husain, S., Rao, R.N, (1997) High performance liquid chromatographic monitoring of process impurities in drugs. *Process Control And Quality*. 10: 41-57.

[3] Rao, R.N., Nagaraju, V., (2003) An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*. 33 (3): 335-377.

[4] Pearce, J.M.S, (2007) Burton's line in lead poisoning. *European Neurology*., 57: 118–119.

[5] Mason, L. H., Harp, J. P., & Han, D. Y. (2014). Pb neurotoxicity: Neuropsychological effects of lead toxicity. *BioMed Research International*. <http://doi.org/10.1155/2014/840547>

[6] Marguí, E., Queralt, I., & Hidalgo, M. (2013). Determination of platinum group metal catalyst residues in active pharmaceutical ingredients by means of total reflection X-ray spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 86, 50–54.

[7] Wang, T., Walden, S., Egan, R. (1997) Development and validation of a general non-digestive method for the determination of palladium in bulk pharmaceutical chemicals and their synthetic intermediates by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 15 (5): 593-599.

[8] Farmacopeia Brasileira; 2010, 5^a ed., Parte I, p. 171.

[9] The United States Pharmacopeia ; NF 20 : the national formulary. Rockville, MD: USPC, 2001-2002. 2675p.

[10] Lewen, N. (2011). The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
<http://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.030>

[11] Lewen, N., Mathew, S., Schenkenberger, M., & Raglione, T. (2004). A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(4), 739–752.

[12] Ferreira, S. L. C., Silva, L. O. B., de Santana, F. A., Junior, M. M. S., Matos, G. D., & dos Santos, W. N. L. (2013). A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. *Microchemical Journal*, 106, 307–310.

[13] Mello, P. A., Pereira, J. S. F., Mesko, M. F., Barin, J. S., & Flores, E. M. M. (2012). Sample preparation methods for subsequent determination of metals

and non-metals in crude oil-A review. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2012.08.009

[14] Dolan, S. P., & Capar, S. G. (2002). Multi-element analysis of food by microwave digestion and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(5), 593–615.

[15] Hoenig, M., & De Kersabiec, A. M. (1996). Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: Present status. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. doi:10.1016/0584-8547(96)01507-8

[16] Lewen, N., Schenkenberger, M., Larkin, T., Conder, S., & Brittain, H. G. (1995). The determination of palladium in fosinopril sodium (monopril) by ICP-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13(7), 879–883.

[17] Zachariadis, G. A., & Michos, C. E. (2007). Development of a slurry introduction method for multi-element analysis of antibiotics by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using various types of spray chamber and nebulizer configurations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(3), 951–958.

[18] Sugisawa, K., Kaneko, T., Sago, T., & Sato, T. (2009). Rapid quantitative analysis of magnesium stearate in pharmaceutical powders and solid dosage forms by atomic absorption: Method development and application in product manufacturing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(3), 858–861.

[19] Zachariadis, G. A., Raidou, E. S., Themelis, D. G., & Stratis, J. A. (2002). Determination of mineral content of active dry yeast used in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(3-4), 463–473.

[20] Resano, M., Garcia-Ruiz, E., Crespo, C., Vanhaecke, F., Belarra, M.A. (2003) Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for palladium determination at trace and ultratrace levels. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 18: 1477–1484

[21] Karandashev, V. K., Zhernokleeva, K. V, Baranovskaya, V. B., & Karpov, Y. A. (2013). Analysis of High-Purity Materials by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Review). *Inorganic Materials*, 49(14), 1249–1263. doi:Doi 10.1134/S0020168513140057

[22] Pohl, P., Stecka, H., Sergiel, I., Jamroz, P. (2012) Different Aspects of the Elemental Analysis of Honey by Flame Atomic Absorption and Emission Spectrometry: A Review. *Food Analytical Methods*. 5 (4): 737-751.

[23] Støving, C., Jensen, H., Gammelgaard, B., & Stürup, S. (2013). Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84, 209–214. doi:10.1016/j.jpba.2013.06.007

[24] HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas Arvid; CROUCH, Stanley R. Princípios de análise instrumental. 6. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2009. vii, 1055 p.

[25] Huang, J., Hu, X., Zhang, J., Li, K., Yan, Y., & Xu, X. (2006). The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(2), 227–234. doi:10.1016/j.jpba.2005.11.014

[26] Oliveira, A. C., Dos Santos, V. S., Dos Santos, D. C., Carvalho, R. D. S., Souza, A. S., & Ferreira, S. L. C. (2014). Determination of the mineral composition of Caigua (*Cyclanthera pedata*) and evaluation using multivariate analysis. *Food Chemistry*, 152, 619–623. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.022

[27] Nageswara Rao, R., & Kumar Talluri, M. V. N. (2007). An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. doi:10.1016/j.jpba.2006.07.004

[28] OGA, Seizi (Ed.). *Fundamentos de toxicologia*. 2. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2003. 474 p.

[29] SILVA, Penildon. *Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2010. 1325 p

[30] De Paula, C.E.R., Caldas, L.F.S., Brum, D.M., Cassella, R.J. (2013) Development of a focused ultrasound-assisted extraction method for the determination of trace concentrations of Cr and Mn in pharmaceutical formulations by ETAAS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 74: 284-290.

[31] Zhang, G., Zhao, Y., Liu, F., Ling, J., Lin, J., & Zhang, C. (2013). Determination of essential and toxic elements in *Cordyceps kyushuensis* Kawam by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 172–176. doi:10.1016/j.jpba.2012.08.007

[32] Tanase, A., Miu, A. (2012) Assay of nickel in magnesium stearate by GF-AAS without sample mineralization. *Revue Roumaine de Chimie*. 57 (11): 971-985.

[33] Krejčová, A., Ludvíková, I., Černohorský, T., & Pouzar, M. (2012). Elemental analysis of nutritional preparations by inductively coupled plasma mass and optical emission spectrometry. *Food Chemistry*, 132(1), 588–596. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.076

[34] Antes, F. G., Mesko, M. F., Barin, J. S., Moreira, C. M., Flores, E. M. M., & Dressler, V. L. (2011). Development of multi-elemental method for quality control of parenteral component solutions using ICP-MS. *Microchemical Journal*, 98(1), 144–149. doi:10.1016/j.microc.2010.12.010

[35] Bubnic, Z., Urleb, U., Kreft, K., Veber, M. (2010) Determination of Nickel in Active Pharmaceutical Ingredients by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Acta Chimica Slovenica*. 57 (1): 37-44.

[36] Marguí, E., Van Meel, K., Van Grieken, R., Buendía, A., Fontàs, C., Hidalgo, M., & Queralt, I. (2009). Method for the determination of Pd-catalyst

residues in active pharmaceutical ingredients by means of high-energy polarized-beam energy dispersive X-ray fluorescence. *Analytical Chemistry*, 81(4), 1404–1410. doi:10.1021/ac8021373

[37] Xu, H., & Xu, H.-E. (2009). Analysis of trace elements in Chinese therapeutic foods and herbs. *The American Journal of Chinese Medicine*, 37(4), 625–638. doi:10.1142/S0192415X09007119

[38] Bolzan, R. C., Rodrigues, L. F., Mattos, J. C. P. de, Dressler, V. L., & Flores, É. M. de M. (2007). Chromium determination in pharmaceutical grade barium sulfate by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction. *Talanta*, 74(1), 119–124. doi:10.1016/j.talanta.2007.05.032

[39] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual operacional do Programa Nacional de Suplementação de Ferro. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 28p

[40] BATISTA FILHO, M; FERREIRA, L. O. C. Prevenção e tratamento da anemia nutricional ferropriva: novos enfoques e perspectivas. *Cad. Saúde Pública*; Rio de Janeiro, 12(3): 411-415 Jul.-Set, 1996.

[41] De Falco, L; Sanchez, M; Silvestri, L; Kannengiesser, C; Muckenthaler, MU; Iolascon, A; Gouya, L; Camaschella, C; Beaumont, C (2013). Iron refractory iron deficiency anemia *HAEMATOLOGICA* .98:845-853. DOI: 10.3324/haematol.2012.075515.

[42] Andro, M; Le Squere, P; Estivin, S; Gentric, A (2013) Anaemia and cognitive performances in the elderly: a systematic review. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY. 20:1234-1240 DOI: 10.1111/ene.12175

[43] Pietrangelo A (2003) Haemochromatosis. Gut. 52:23-30.

[44] Grotto, H. Z. W. (2008). Metabolismo do ferro : uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase Iron metabolism : an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 5, 390–397. doi:10.1590/S1516-84842008000500012

[45] LEVY, Matthew N.; BERNE, Robert M.; KOEPPEN, Bruce M; STANTON, Bruce A. Berne & Levy: fisiologia. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2009. xiv, 844 p.

[46] Cardoso, Kelly Araldi. Produção de sulfato ferroso a partir do resíduo proveniente da mineração de ferro Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2012.

[47] PETERSON, M. Produção de Sulfato Ferroso a Partir da Pirita: Desenvolvimento Sustentável. Tese de Doutorado, Florianópolis (SC), Universidade Federal de Santa Catarina. 127p, 2008.

[48] MARTINS, G.; ALMEIDA, A. F. Reuso e Reciclo de Águas em Indústria Química de Processamento Dióxido De Titânio. Monografia, Salvador (BA), Universidade Federal da Bahia, Escola politécnica. 69p, 1999.

[49] SHARMA, PALLAVI; DUBEY, RAMA SHANKER. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, Londrina, 17, 1, 2005 .Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04202005000100004&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 20 de Fevereiro de 2015.

[50] Portugal, L. A., Matos, G. D., Lima, D. C., Brito, G. B., Fernandes, A. P., & Ferreira, S. L. C. (2011). Determination of lead in aluminum and magnesium antacids using electrothermal atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, 98(1), 29–31. doi:10.1016/j.microc.2010.10.005

[51] MOREIRA, Fátima Ramos; MOREIRA, Josino Costa. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro , v. 9, n. 1, 2004 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232004000100017&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 30 Set. 2014.

[52] De Jesus, R. M., Silva, L. O. B., Castro, J. T., De Azevedo Neto, A. D., De Jesus, R. M., & Ferreira, S. L. C. (2013). Determination of mercury in phosphate fertilizers by cold vapor atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 106, 293–297.

[53] Manzoori, J. L., Abdolmohammad-Zadeh, H., & Amjadi, M. (2007). Ultratrace determination of cadmium by cold vapor atomic absorption

spectrometry after preconcentration with a simplified cloud point extraction methodology. *Talanta*, 71(2), 582–587.

[54] Shah, A. Q., Kazi, T. G., Baig, J. A., Afridi, H. I., Kandhro, G. A., Arain, M. B., ... Wadhwa, S. K. (2010). Total mercury determination in different tissues of broiler chicken by using cloud point extraction and cold vapor atomic absorption spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 65–69.

[55] Segade, S. R., & Tyson, J. F. (2007). Determination of methylmercury and inorganic mercury in water samples by slurry sampling cold vapor atomic absorption spectrometry in a flow injection system after preconcentration on silica C18 modified. *Talanta*, 71(4), 1696–1702.

[56] U.A. Barbosa, L.O.B. Silva, I. F. dos Santos, S.L.C. Ferreira, A.M.P. dos Santos, Determination of Mercury in Iron Supplement using Slurry Sampling and Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, *Curr. Anal. Chem.* 11 (2014) 44-49.

[57] R. Cornelis, J.A. Caruso, H. Crews, K.G. Heumann (Eds.), *Handbook of Elemental Speciation, Handbook of Elemental Speciation II: Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, John Wiley & Sons, Chichester, England (2005)

[58] Paruchuri, Y., Siuniak, A., Johnson, N., Levin, E., Mitchell, K., Goodrich, J. M., Basu, N. (2010). Occupational and environmental mercury exposure among small-scale gold miners in the Talensi-Nabdam District of Ghana's Upper East region. *Science of the Total Environment*, 408(24), 6079–6085.

[59] Counter, S. A., & Buchanan, L. H. (2004). Mercury exposure in children: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology*.

[60] I.L. Garcia, M.J.V. Martinez, M.H. Cordoba, Cold vapor atomic-absorption method for the determination of mercury in iron(iii) oxide and titanium-oxide pigments using slurry sample introduction, *J. Anal. At. Spectrom.*, 6 (1991) 627-630.

[61] Krug, Francisco José. Métodos de preparo de amostras, fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1 ed. 340 f. Piracicaba, São Paulo, 2008.

[62] Ferreira, S. L. C., Miró, M., da Silva, E. G. P., Matos, G. D., dos Reis, P. S., Brandao, G. C., ... Araujo, R. G. O. (2010). Slurry Sampling—An Analytical Strategy for the Determination of Metals and Metalloids by Spectroanalytical Techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*.

[63] Jun-Ye, Z., Zheng, W., Yi-Ping, D., De-Ren, Q., & Peng-Yuan, Y. (2011). Transportation and Evaporation Behavior of Suspension Particle for Slurry Nebulization Introduction in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. *CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY*, 39(5), 658–663.

[64] L.O.B. Silva, D.G. da Silva, D.J. Leao, G.D Matos, S.L.C. Ferreira, Slurry Sampling for the Determination of Mercury in Rice Using Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, *Food Anal. Method.*, 5 (2012) 1289-1295.

[65] Dobrowolski, R., Pawlowska-Kapusta, I., & Dobrzynska, J. (2012). Chromium determination in food by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry using classical and permanent modifiers. *Food Chemistry*, 132(1), 597–602.

[66] Tokman, N. (2007). The use of slurry sampling for the determination of manganese and copper in various samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1-2), 87–94.

[67] Lin, M.-L., & Jiang, S.-J. (2011). Determination of trace Cr, Mo, Pd, Cd, Pt and Pb in drug tablets by ultrasonic slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.

[68] RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A.; CURTIUS, A. J. Slurry sampling for Hg determination in sediments, sewage sludge and coal samples by cold vapor atomic absorption spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 6, p. 825 – 831, 2004.

[69] Ferreira, Sergio Luis Costa. *Introdução às técnicas de planejamento de experimentos*. 1 ed. 190 fl. Salvador: Vento Leste, 2015.

[70] LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 42, p. 3-40, 1998.

[71] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

[72] SILVA, Laiana Oliveira Bastos. Estratégias analíticas para minimização da etapa de preparo de amostra para determinação de mercúrio em amostras alimentícias e ambientais. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2012.

[73] FERREIRA, Márcia Miguel Castro, 1951 - Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações - Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.

[74] Barbosa, Uenderson Araújo. *Análise exploratória de dados originados da determinação de metais e metaloides por ICP -MS em amostras de águas coletadas no município de Cachoeira-Bahia*. 65 f.:il. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2013.

[75] Pearson, K. On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space', *Phil. Mag.* 2 (1901) 559-572.

[76] S. Wold, Principal Component Analysis, *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, 2, p.37-52, 1987.

[77] REIS, Marlon Martins dos and FERREIRA, Márcia M. C.. Separação de espectros simulados e de luminescência total através do método generalizado de anulação do posto (GRAM). *Quím. Nova* [online]. 1999, vol.22, n.1, pp. 11-17.

[78] N. Bratchell. Cluster Analysis, *Chemom. Intell. Lab. Sys*, 6, p.105-125, 1989.

[79] Oliveira, A. C., Dos Santos, V. S., Dos Santos, D. C., Carvalho, R. D. S., Souza, A. S., & Ferreira, S. L. C. (2014). Determination of the mineral composition of Caigua (*Cyclanthera pedata*) and evaluation using multivariate analysis. *Food Chemistry*, 152, 619–623.

[80] Barbosa, U. A., Dos Santos, I. F., Dos Santos, A. M. P., Dos Santos, D. C., & Da Costa, G. M. (2013). Determination and evaluation of the metals and metalloids in the chapeu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli). *Biological Trace Element Research*, 154(3), 412–417.

[81] Varol, M. (2011). Assessment of heavy metal contamination in sediments of the Tigris River (Turkey) using pollution indices and multivariate statistical techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 195, 355–364.

[82] Kuper, C.F., Vogels, J., Kemmerling, J., Fehlert, E., Ruhl-Fehlert, C., Vohr, H.W., Krul, C. (2015) Integrated analysis of toxicity data of two pharmaceutical immunosuppressants and two environmental pollutants with immunomodulating properties to improve the understanding of side effects-A toxicopathologist's view. *European Journal of Pharmacology*. 759: 343-355.

[83] Zhu, J., Fan, X., Cheng, Y., Agarwal, R., Moore, C. M. V, Chen, S. T., & Tong, W. (2014). Chemometric analysis for identification of botanical raw

materials for pharmaceutical use: A case study using *Panax notoginseng*. *PLoS ONE*, 9(1).

[84] Carneiro, R. L., & Poppi, R. J. (2014). Infrared imaging spectroscopy and chemometric tools for in situ analysis of an imiquimod pharmaceutical preparation presented as cream. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 215–220.

[85] Myakalwar, A. K., Sreedhar, S., Barman, I., Dingari, N. C., Venugopal Rao, S., Prem Kiran, P., ... Manoj Kumar, G. (2011). Laser-induced breakdown spectroscopy-based investigation and classification of pharmaceutical tablets using multivariate chemometric analysis. *Talanta*, 87(1), 53–59.

[86] ALELUIA, Augusto Cezar Magalhães. Determinação de macro e microelementos em medicamentos fitoterápicos. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2015.

[87] Benito, P., & Miller, D. (1998). Iron absorption and bioavailability: An updated review. *Nutrition Research*.

[88] Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*.

[89] Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Domínguez-González, R., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Bermejo-Barrera, P.

(2013). In vitro bioavailability of total selenium and selenium species from seafood. *Food Chemistry*, 139(1-4), 872–877.

[90] Jade S. A. Siqueira , Jéssica O. Fraga, Wagna P. C. dos Santos. Avaliação de métodos in vitro para a determinação da bioacessibilidade de elementos traços em leguminosas. Disponível em <<http://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/5281/3069>> Acessado: 18/07/2015.

[91] ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2006.

[92] V.S. Silva, L.C. Trevizan, C.S. Silva, A.R.A. Nogueira, J.A. Nóbrega, Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. *Spectrochimica Acta Part B*, 57 (2002) 1905-1913.

[93] J.M. Mermet, Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics, *Anal. Chim. Acta*, 250 (1991) 85–94.

[94] Sugisawa, K., Kaneko, T., Sago, T., & Sato, T. (2009). Rapid quantitative analysis of magnesium stearate in pharmaceutical powders and solid dosage forms by atomic absorption: Method development and application in product manufacturing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(3), 858–861. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.01.004>

[95] L. Wei, I.S. Mackenzie, T.M. MacDonald, J. George, Cardiovascular risk associated with sodium-containing medicines, *Expert Opin. Drug Saf.*, 13 (2014) 1515-1523.

[96] M. Tazoe, M. Narita, R. Sakuta, T. Nagai, N. Narita, Hyperkalemia and hyperdopaminemia induced by an obsessive eating of banana in an anorexia nervosa adolescent, *Brain Dev.-JPN*, 29 (2007) 369-372.

[97] D. Street, J.J. Nielsen, J. Bangsbo, C. Juel, Metabolic alkalosis reduces exercise-induced acidosis and potassium accumulation in human skeletal muscle interstitium, *J. Physiol.-LONDON*, 566 (2005) 481-489.

[98] W.H., Huang, J.L. Lin, Acute renal failure following ingestion of manganese-containing fertilizer, *J. Toxicol.-Clin. Toxic.*, 42 (2004) 305-307.

[99] OLIVEIRA, Marcelo Firmino de et al. Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis. *Eclet. Quím.* [online]. 2009, vol.34, n.3.

[100] Thomas, D. J., Styblo, M., & Lin, S. (2001). The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 176(2), 127–144.

[101] Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., ... Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, 31(2), 95–107.

[102] Altaş, L., Işık, M., & Kavurmaci, M. (2011). Determination of arsenic levels in the water resources of Aksaray Province, Turkey. *Journal of Environmental Management*, 92(9), 2182–2192.

[103] Ezoddin, M, Majidi, B, Abdi, K. (2015) Evaluation of ultrasound-assisted in situ sorbent formation solid-phase extraction method for determination of arsenic in water, food and biological samples. *Environmental Technology*. 36(11): 1381-1388.

[104] Rezende, HC, Coelho, NMM. (2014) Determination of Total Arsenic and Arsenic(III) in Phosphate Fertilizers by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry After Ultrasound-Assisted Extraction Based on a Control Acid Media. *Journal Of Aoac International*. 97(3):736-741.

[105] Capelli, C, Foppiano, D, Venturelli, G, Carlini, E, Magi, E, Ianni, C. (2014) Determination of Arsenic, Cadmium, Cobalt, Chromium, Nickel, and Lead in Cosmetic Face-Powders: Optimization of Extraction and Validation. *Analytical Letters*. 47(7): 1201-1209.

[106] Uddin, ABMH, Khalid, RS, Khan, UA, Abbas, SA. (2013) Determination of Arsenic Content of Available Traditional Medicines in Malaysia using Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research*.12(6):1053-1056.

[107] Turusova, E. V., Grigoryeva, L. A., Lyschikov, A. N.; Nasakin, O. E. (2014) Photochemical Determination of Arsenic Microimpurity in Raw Medicinal Plant Materials. *Farmatsiya (Moscow)*.3:12-15.

[108] Flores, E.M.M. da Silva, F. E. B., dos Santos, E.P., Paula, F. R., Barin, J. S., Zanella, R., Dressler, V. L., Bittencourt, C.F. (2012). Determination of total arsenic by batch hydride generation atomic absorption spectrometry in injectable drugs containing high levels of Sb(V) as N-methylglucamine antimonate. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 57B(12):2095-2102.

[109] Aghamohammadi, M., Faraji, M., Shahdousti, P., Kalhor, H., Saleh, A. (2015) Trace Determination of Lead, Chromium and Cadmium in Herbal Medicines Using Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction Combined with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 26(3): 209-214.

[110] Goncalves, D.A., Gu, J.Y., dos Santos, M.C., Jones, B.T., Donati, G.L. (2015) Direct determination of chromium in empty medicine capsules by tungsten coil atomic emission spectrometry. *Journal Of Analytical Atomic Spectrometry*. 30(6): 1395-1399.

[111] Soltyk, K., Lozak, A., Ostapczuk, P., Fijalek, Z. (2003). Determination of chromium and selected elements in multimineral and multivitamin preparations and in pharmaceutical raw material. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*. 32(3): 425-432.

[112] R. Cornelis Handbook of Elemental Speciation II, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England (2005)

[113] Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181-182:211-217.

[114] GOMES, Mariana Rezende; ROGERO, Marcelo Macedo and TIRAPEGUI, Julio. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. *Rev Bras Med Esporte* [online]. 2005, vol.11, n.5 [cited 2015-07-22], pp. 262-266 . Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-869220050005000003&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1806-9940.

[115] Macedo, S. M., dos Santos, D. C., de Jesus, R. M., da Rocha, G. O., Ferreira, S. L. C., & de Andrade, J. B. (2010). Development of an analytical approach for determination of total arsenic and arsenic (III) in airborne particulate matter by slurry sampling and HG-FAAS. *Microchemical Journal*, 96(1), 46–49.

[116] Bermejo-Barrera, P., Herbello-Hermelo, P., Barciela-Alonso, M.C., Bermejo-Barrera, A. (2003) Chromium speciation by ETAAS using 1,1,1-trifluoro-2,4-pentadione to form a volatile chelate with Cr(III). *Atomic Spectroscopy*. 24(1): 22-26.

[117] Ali, I., & Aboul-Enein, H. Y. (2002). Speciation of arsenic and chromium metal ions by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chemosphere*, 48(3), 275–278.

[118] Landrot, G., Tappero, R., Webb, S. M., & Sparks, D. L. (2012). Arsenic and chromium speciation in an urban contaminated soil. *Chemosphere*, *88*(10), 1196–1201.

[119] Moreira, C. M., Duarte, F. A., Lebherz, J., Pozebon, D., Flores, E. M. M., & Dressler, V. L. (2011). Arsenic speciation in white wine by LC-ICP-MS. *Food Chemistry*, *126*(3), 1406–1411.

[120] Krachler, M., & Emons, H. (2001). Urinary antimony speciation by HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. *16*(1):20-25.

[121] Narukawa, T., Inagaki, K., Kuroiwa, T., & Chiba, K. (2008). The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, *77*(1), 427–432.

[122] Bissen, M., & Frimmel, F. H. (2000). Speciation of As(III), As(V), MMA and DMA in contaminated soil extracts by HPLC-ICP/MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *367*(1), 51–55.