

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE Cl^- e
 SO_4^{2-} EM MEDICAMENTOS CONTENDO CARBONATO DE CÁLCIO**

Diogo La Rosa Novo

PELOTAS, RS

2016

Diogo La Rosa Novo

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE Cl^- e SO_4^{2-} EM MEDICAMENTOS CONTENDO CARBONATO DE CÁLCIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química (Área: Química Analítica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko

PELOTAS, RS

2016

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “Desenvolvimento de Método para Determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em Medicamentos Contendo Carbonato de Cálcio”, de autoria de Diogo La Rosa Novo.

Banca examinadora:


.....
Prof.^a Dr.^a Márcia Foster Mesko (Orientadora) - UFPel


.....
Prof.^a Dr.^a Clarissa Marques Moreira dos Santos - UFPel


.....
Prof.^a Dr.^a Rochele Sogari Picoloto - UFSM

Dedico este trabalho aos meus pais,
Edison Luis e Vera, e minha irmã Pamela,
pelos ensinamentos, pela confiança,
amizade e por tudo que tenho e sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Pelotas, pela possibilidade da execução deste trabalho.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de mestrado.

À Prof^a. Dr^a. **Márcia Foster Mesko**, pela orientação e incentivo, pela amizade construída, pelo exemplo de profissionalismo e pelas oportunidades que permitiram o meu crescimento profissional e pessoal.

À Prof^a. Dr^a. **Clarissa Marques Moreira dos Santos** pelas valiosas sugestões e pela participação na banca examinadora.

À Prof^a. Dr^a. **Rochele Sogari Picoloto** pela participação na banca examinadora e pelas sugestões feitas para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, coordenador do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por todo apoio fornecido.

Aos integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais (UFPel), **Carla Hartwig, Filipe Rondan, Gilberto Coelho Junior, Janaína Brum, Julia de Mello, Marcelo Crizel, Natália Bielemann, Rodrigo Pereira, Tainá Teixeira e Vanize da Costa** pela amizade, colaboração e apoio prestados durante o desenvolvimento deste trabalho.

A **Djanira**, secretária do PPGQ, pelo sempre dedicado auxílio.

Agradeço ainda a minha família, em especial aos meus pais, **Edison Luis Leal Novo e Vera La Rosa Novo** por toda a compreensão, apoio, incentivo, carinho e por serem exemplo de seres humanos para minha formação pessoal e profissional. A minha irmã **Pamela La Rosa Novo** por todo o carinho, apoio e companhia, especialmente durante o período acadêmico. Agradeço também a minha namorada **Vitória Silveira da Costa** pela compreensão, carinho e paciência no período final desta jornada. Também agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Título: Desenvolvimento de Método para Determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em Medicamentos Contendo Carbonato de Cálcio.

Autor: Diogo La Rosa Novo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko

Nesse trabalho é proposto um novo método de preparo de amostras visando a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por cromatografia de íons (IC) em carbonato de cálcio matéria-prima e produto acabado. Nos ensaios recomendados pela Farmacopeia Brasileira, o CaCO_3 é dissolvido e a etapa de determinação realizada através de uma comparação visual com um reagente padrão. Apesar de apresentar simplicidade, esses ensaios são monoelementares, semiquantitativos e fatores como a acuidade visual do analista e a luminosidade do ambiente podem influenciar no resultado final. Para o método proposto, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foi avaliada visando promover a volatilização dos analitos da matriz através da energia fornecida pela queima de um auxiliar de combustão. Para as otimizações, alguns parâmetros foram avaliados como, por exemplo, massa de amostra, auxiliares de volatilização, solução absorvedora e etapa de refluxo. Adicionalmente, a matéria-prima (apenas o CaCO_3) e o produto acabado foram submetidos a extração assistida por radiação micro-ondas utilizando H_2O como solução extratora e a determinação foi realizada por IC. Além disso, a potenciometria com eletrodo íon seletivo e a espectrofotometria na região do ultravioleta e do visível foram avaliadas para determinação de Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente. Após serem otimizadas as condições do método utilizando a MIC (100 mg de CaCO_3 misturada com 300 mg de amido, utilizando HNO_3 100 mmol l^{-1} como solução absorvedora e 5 min de refluxo), os analitos foram determinados por IC. A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação utilizando solução de referência. Além disso, foi realizada a mistura de material de referência certificado (CRM) NIST 1515 (*Apple Leaves*) ao CaCO_3 . Em ambos os casos, as recuperações obtidas foram adequadas e variam de 95 a 104% para Cl^- e de 83 a 90% para SO_4^{2-} . Os resultados apresentaram boa precisão ($\text{RSD} \leq 9\%$) e limites de detecção (LODs) para Cl^- e SO_4^{2-} de 45 e 142 mg kg^{-1} , respectivamente. Após as otimizações, cinco matérias-primas de diferentes fabricantes foram analisadas utilizando o método proposto. Além disso, o método também foi aplicado para três produtos acabado (com marcas e/ou lotes diversos) recomendados para o tratamento de hiperacidez gástrica e suplementação de cálcio no organismo. A exatidão para o produto acabado foi avaliada através de ensaios de recuperação utilizando a mistura com CRM NIST 1547 (*Peach Leaves*) e NIST 8433 (*Corn Bran*) com a amostra para concentração de Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente. Recuperações satisfatórias foram obtidas para ambos analitos (103 e 91% para Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente). Com relação aos resultados para as matérias-primas e para os produtos acabados, as concentrações de Cl^- e SO_4^{2-} ficaram abaixo dos limites máximos estabelecidos pela FB.

Palavras-chave: Carbonato de cálcio matéria-prima e produto acabado. Cloreto e sulfato. Volatilização. Combustão iniciada por micro-ondas.

ABSTRACT

Title: Development of method for Cl^- and SO_4^{2-} determination in medicines containing calcium carbonate.

Author: Diogo La Rosa Novo

Supervisor: Dr^a. Márcia Foster Mesko

In this work, a new method for determination of Cl^- and SO_4^{2-} in calcium carbonate active pharmaceutical ingredient (API) and medicine by ion chromatography (IC) is proposed. In the limit tests recommended by Brazilian Pharmacopoeia (BP), the API is dissolved in acid medium and the determination is performed by visual comparison between the opalescence of the sample and a standard solution after the addition of precipitating reagents standard solution. Despite its relative simplicity, the tests are monoelementar, semi-quantitative and some factors such as the visual acuity analyst and the brightness of the workplace can influence the final result. For the proposed method, the microwave-induced combustion (MIC) was evaluated for the volatilization of the analytes from the matrix through the energy provided by volatilization aid. For optimization, several parameters such as sample mass, volatilization aids, absorption solution and reflux step were evaluated. Additionally, the CaCO_3 API and medicine were prepared by microwave assisted extraction using H_2O as extracting solution and the analytes determination were performed by IC. Moreover, the ion-selective electrode potentiometry and ultraviolet/visible spectroscopy were evaluated to determination of Cl^- and SO_4^{2-} , respectively. Thus, after selected the best conditions of the proposed method by MIC (100 mg of API mixed with 300 mg of starch as volatilization aids, using HNO_3 100 mmol l^{-1} as the absorbing solution, and 5 min reflux) the analytes were determined by IC. The accuracy of the results was evaluated by recoveries tests using a standard solution. Moreover, the API and a certificate reference material (CRM) NIST 1515 (Apple Leaves), were mixed as a recovery test. The recoveries obtained in both cases were adequate and ranged from 95 to 104% for Cl^- and ranged from 83 to 90% for SO_4^{2-} . The results showed good precision ($\text{RSD} \leq 9\%$) and LODs for Cl^- and SO_4^{2-} from 45 and 142 mg kg^{-1} , respectively. After the optimizations, five API from different manufacturers were analyzed using the proposed method. Furthermore, the method was also applied to three medicines (different brand and batches) recommended for the treatment of gastric hyperacidity and calcium supplementation on body. The accuracy for medicines was evaluated by recoveries tests. The medicine and a CRM NIST 1547 (Peach Leaves) and a NIST 8433 (Corn Bran) were mixed for evaluated the accuracy for Cl^- e SO_4^{2-} concentrations, respectively. Suitable recoveries was obtained in both cases (103 and 91% for Cl^- and SO_4^{2-} , respectively). In respect to the results, the concentration of Cl^- and SO_4^{2-} are in agreement with maximum limits recommended by BP.

Key words: Calcium Carbonate Active Pharmaceutical Ingredient and Medicine. Chloride and Sulfate. Volatilization. Microwave-Induced Combustion.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Perfil de frequência dos ensaios de impurezas	23
Figura 2 - Frasco de quartzo e suporte empregados na combustão iniciada por micro-ondas.....	33
Figura 3 - Equipamento utilizado para o preparo de amostras: A) Forno de micro-ondas Multiwave 3000® e B) rotor equipado com oito frascos.....	46
Figura 4 - Frascos utilizados nos procedimentos que empregam a radiação micro-ondas: A) frasco de quartzo utilizado na volatilização por MIC e B) frasco de PTFE utilizado na MW-AE.....	47
Figura 5 - Dispositivo de quartzo utilizado na MIC como suporte para as amostras.....	48
Figura 6 - A) Frasco de quartzo contendo a solução absorvedora e suporte de quartzo e B) suporte de quartzo contendo a amostra na forma de invólucro e o papel filtro umedecido com 50 µl de NH ₄ NO ₃	54
Figura 7 - Fracos de quartzo fechados, fixados no rotor e sendo pressurizados com 20 bar de oxigênio.....	54
Figura 8 - Visualização da combustão de 100 mg de CaCO ₃ com 300 mg de amido.....	56
Figura 9 - Auxiliares de volatilização a) amido, b) celulose microcristalina e c) grafite.....	57
Figura 10 - Etapas para a determinação de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ em CaCO ₃ através dos métodos avaliados e as etapas envolvidas nos métodos recomendados pela Farmacopeia Brasileira.....	64
Figura 11 - Aspecto da solução obtida após MW-AE utilizando água como solução extratora no A) produto acabado de	

	coloração verde, B) de coloração branca e C) apenas na matéria-prima.....	68
Figura 12 -	Concentração de Cl^- e SO_4^{2-} nos diferentes auxiliares de volatilização utilizados:  amido;  celulose microcristalina e  grafite.....	70
Figura 13 -	Pressão máxima atingida durante o procedimento de volatilização por MIC para o aumento da massa de matéria-prima utilizando 500 mg de amido (n=3).....	72
Figura 14 -	Recuperações obtidas para  Cl^- e  SO_4^{2-} com ensaio de recuperação em CaCO_3 após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras. Determinação por IC ($\bar{x} \pm \text{sd}$, mg kg^{-1} , n=3).....	73
Figura 15 -	Cromatograma obtido para a solução de referência quando adicionado 5 mg l^{-1} de clorato, 10 mg l^{-1} de sulfeto e sulfito em meio aquoso.....	75
Figura 16 -	Cromatograma obtido para cloreto, clorato, sulfeto, sulfito e sulfato após a volatilização por MIC.....	76
Figura 17 -	Recuperação de  Cl^- e  SO_4^{2-} na amostra de CaCO_3 após variação do tempo de refluxo no método de volatilização por MIC.....	77
Figura 18 -	Avaliação da massa de CaCO_3 na volatilização de  Cl^- e  SO_4^{2-} com uso de A) 300 mg e B) 500 mg de amido. Como solução absorvedora foi utilizado HNO_3 100 mmol L^{-1} (n = 3).	78
Figura 19 -	Aspecto da solução (A), e do resíduo no suporte (B) considerando o preparo de 100 mg de CaCO_3 + 300 mg de amido após a decomposição por MIC.....	80
Figura 20 -	Aspecto das soluções obtidas para: (A) matéria-prima e para os medicamentos (B) PA-1 (C) PA-2 (D) PA-3 e (E) solução de referência contendo 350 mg kg^{-1} de Cl^-	

segundo o método descrito pela Farmacopeia Brasileira
para o ensaio limite de Cl^- em CaCO_3 86

Figura 21 - Aspecto das soluções obtidas para: (A) matéria-prima e
para os medicamentos (B) PA-1 (C) PA-2 (D) PA-3 e (E)
solução de referência contendo 2500 mg kg^{-1} de SO_4^{2-}
segundo o método descrito pela Farmacopeia Brasileira
para o ensaio limite de SO_4^{2-} em CaCO_3 87

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Compostos inorgânicos utilizados no tratamento e diagnóstico de doenças.....	25
Tabela 2 - Programa de irradiação utilizado na extração assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.....	53
Tabela 3 - Programa de irradiação utilizado no processo de volatilização por combustão iniciada por micro-ondas....	55
Tabela 4 - Parâmetros utilizados na determinação de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ por IC.....	59
Tabela 5 - Parâmetros utilizados na determinação de Cl ⁻ por ISE e SO ₄ ²⁻ por UV-VIS.....	59
Tabela 6 - Teores de umidade, cinzas e CaCO ₃ médios obtidos para as matérias-primas e produtos acabados avaliados ($\bar{x} \pm sd, \%, n = 3$).....	66
Tabela 7 - Tempos de ignição e combustão observados após queima de 100 mg de CaCO ₃ misturadas com 300 mg de auxiliar de volatilização ($\bar{x} \pm sd, s, n=3$).....	69
Tabela 8 - Recuperações para Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ utilizando o CRM NIST 1515 ($\bar{x} \pm sd, n=3$).....	81
Tabela 9 - Concentrações de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ em CaCO ₃ após volatilização por MIC e determinação por IC ($\bar{x} \pm sd, mg kg^{-1}, n=3$).....	82
Tabela 10 - Recuperações para Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ em medicamento utilizando os CRMs NIST 1547 e NIST 8433 ($\bar{x} \pm sd, n=3$).....	84
Tabela 11 - Concentrações de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ em medicamentos constituídos de CaCO ₃ após volatilização por MIC e determinação por IC ($\bar{x} \pm sd, mg kg^{-1}, n=3$).....	84
Tabela 12 - Principais características do método proposto e dos ensaios limite recomendados pela Farmacopeia Brasileira (FB).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – espectrometria de absorção atômica, do inglês, *atomic absorption spectrometry*

CRC – Cella de reação e colisão, do inglês, *Collision and Reaction Cell*

CRM – material de referência certificado, do inglês, *certified reference material*

CVG-ICP-MS – espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor químico, do inglês, *chemical vapor generation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry*

ET AAS – espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês, *electrothermal atomic absorption spectrometry*

HR-CS-MAS – espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua, do inglês, *high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry*

IC – cromatografia de íons, do inglês, *ion chromatography*

ICP-OES – espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP-MS – espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

ISA – solução de ajuste da força iônica, do inglês, *Ionic Strength Adjusting*

ISE – eletrodo de íon seletivo, do inglês, *ion-selective electrode*

LOD – limite de detecção, do inglês, *limit of detection*

MIC – combustão iniciada por micro-ondas, do inglês, *microwave-induced combustion*

MAS – espectrometria de absorção molecular, do inglês, *molecular absorption spectrometry*

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

MW-AE – extração assistida por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted extraction*

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

PTFE – politetrafluoretileno, do inglês, *polytetrafluoroethylene*

RSD – desvio padrão relativo, do inglês, *relative standard deviation*

SOAB II – Solução antioxidante de sulfeto, do inglês, *sulfide anti-oxidant buffer*

UV-VIS – espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e do visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Impurezas em Produtos Farmacêuticos.....	23
3.2 Compostos Inorgânicos Utilizados em Produtos Farmacêuticos	24
3.2.1 Carbonato de Cálcio – Características Gerais	25
3.3 Limites Máximos Estabelecidos para Impurezas Inorgânicas em CaCO ₃	26
3.4 Ensaio Recomendado para as Concentrações Limite de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ em CaCO ₃	27
3.5 Métodos de Preparo de Amostras.....	28
3.5.1 Extração	30
3.5.2 Métodos de Combustão	31
3.5.2.1 Combustão Iniciada por Micro-ondas.....	32
3.6 Técnicas Instrumentais para a Determinação de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻	36
3.6.1 Técnicas de Espectrometria Atômica	37
3.6.2 Espectrofotometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível (UV-VIS)	40
3.6.3 Potenciometria com Eletrodo Íon Seletivo (ISE)	42
3.6.4 Cromatografia de Íons (IC)	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Instrumentação	46
4.2 Reagentes.....	49
4.3 Descontaminação de Materiais Diversos	50
4.4 Amostras	51
4.5 Determinação dos Teores de Umidade e Cinzas.....	52
4.6 Extração Assistida por Radiação Micro-ondas.....	52
4.7 Combustão Iniciada por Micro-ondas.....	53

4.7.1	Avaliação do Tempo de Ignição e Combustão.....	55
4.7.2	Escolha do Material Utilizado como Auxiliar de Volatilização.....	56
4.7.3	Otimização da Massa de Matéria-prima e Auxiliar de Volatilização	57
4.7.4	Avaliação da Solução Absorvedora e do Tempo de Refluxo.....	57
4.7.5	Avaliação da Possibilidade de Formação de Clorato, Sulfeto e Sulfito Após a Combustão.....	58
4.8	Determinação de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ por IC	58
4.9	Determinação de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ por ISE e UV-VIS	59
4.10	Limites de Detecção.....	60
4.11	Avaliação da Exatidão dos Resultados Obtidos e Aplicação do Método Proposto.....	60
4.12	Aplicação do Método Proposto para o Produto Acabado.....	61
4.13	Ensaio Limite Recomendados pela Farmacopeia para o Controle de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ em CaCO ₃	62
4.13.1	Ensaio Limite para Cl ⁻ em CaCO ₃	62
4.13.2	Ensaio Limite para SO ₄ ²⁻ em CaCO ₃	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	Determinação do Teor de Umidade e Cinzas	66
5.2	Extração Assistida por Radiação Micro-ondas.....	67
5.3	Volatilização por Combustão Iniciada por Micro-ondas	68
5.3.1	Tempo de Ignição e Combustão.....	69
5.3.2.	Escolha do Material Utilizado como Auxiliar de Volatilização.....	70
5.3.3	Avaliação da Pressão Máxima do Sistema de Combustão	71
5.3.4	Avaliação da Solução Absorvedora na Recuperação de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻	72
5.3.5	Avaliação da Possibilidade de Formação de Clorato, Sulfeto e Sulfito após a Combustão	74
5.3.6	Avaliação da Etapa de Refluxo	76
5.3.7	Influência da Massa de CaCO ₃ e de Amido.....	78
5.3.8	Avaliação da Exatidão e Precisão dos Resultados Obtidos e Limites de Detecção do Método Proposto	80
5.3.9	Determinação de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ em CaCO ₃	81
5.3.10	Determinação de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ em Medicamentos Constituídos de CaCO ₃	83

5.4 Avaliação dos Ensaio Limite Recomendados pela Farmacopeia Brasileira para o Controle de Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻ em CaCO ₃	85
5.5 Comparação entre os Métodos de Preparo de Amostras Avaliados e os Ensaio Limite Recomendados pela Farmacopeia Brasileira.....	88
6 CONCLUSÃO	90
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 INTRODUÇÃO

A qualidade da matéria-prima utilizada em formulações farmacêuticas é extremamente importante para assegurar a saúde dos usuários. Nesse contexto, a determinação de impurezas é de extrema relevância visto que alguns elementos e compostos são considerados potencialmente tóxicos à saúde humana, além de poderem atuar como catalisadores na degradação da substância ativa.

O carbonato de cálcio é uma matéria-prima amplamente utilizada como substância ativa em medicamentos destinados para a suplementação de cálcio, alívio de hiperacidez gástrica, insuficiência renal, dentre outros. Além disso, em menores proporções nos medicamentos, é utilizado como excipiente para absorver umidade residual e como reagente tampão. Para assegurar a qualidade dos produtos, diferentes Farmacopeias como a Brasileira, a Europeia, Americana, Britânica e Indiana incluem limites e ensaios para a concentração máxima de cloreto e sulfato em CaCO_3 , tendo em vista que a presença dessas impurezas em elevadas concentrações, pode ocasionar a ineficácia terapêutica do produto acabado e expor os usuários a riscos.

Os ensaios limite para Cl^- e SO_4^{2-} recomendados pelas Farmacopeias são realizados através de uma comparação visual entre a turbidez da amostra com a de um reagente padrão - contendo a concentração limite - após a adição de um reagente precipitante. Através desses ensaios, é possível avaliar se a matéria-prima está de acordo com os limites máximos estabelecidos. Embora esses ensaios sejam amplamente utilizados para análise de rotina em indústrias farmacêuticas, vale mencionar que estes são semiquantitativos e fornecem uma avaliação subjetiva, que está relacionada a acuidade visual do analista e outros fatores como a luminosidade do ambiente. Nesse sentido, os ensaios limite recomendados pelas Farmacopeias para Cl^- e SO_4^{2-} podem não ser apropriados e os resultados devem ser interpretados com cautela.

Diante do exposto, lentamente vem sendo crescente a recomendação pelas Farmacopeias para o uso de técnicas instrumentais sensíveis e que possibilitem a quantificação de impurezas em produtos farmacêuticos em níveis de traço. Entretanto, para que isso seja possível, grande parte das técnicas analíticas necessitam que a amostra sólida seja totalmente convertida em uma solução adequada à determinação. Cabe destacar que apesar da introdução de técnicas instrumentais de determinação

nas Farmacopeias como alternativa aos ensaios limites, não há relatos de métodos de preparo de amostras adequados para tal finalidade.

Diversos métodos de preparo como, por exemplo, a extração, a dissolução, a decomposição por via úmida e a fusão, são convencionalmente utilizados para amostras inorgânicas como é o caso do CaCO_3 . Porém, na maioria dos casos, esses métodos são bastante morosos e propensos a contaminação, tendo em vista que necessitam do uso de uma quantidade excessiva de reagentes concentrados e apresentam muitas etapas durante a análise. Além disso, interferências relacionadas a utilização de reagente concentrados ou fundentes podem trazer problemas durante a etapa de determinação.

Nesse sentido, técnicas de determinação baseada na análise direta de sólidos como, por exemplo, a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) vem sendo relatada na literatura como alternativa para a determinação de impurezas em matérias-primas e produtos acabados constituídos de compostos inorgânicos. No entanto, a ET AAS trata-se de uma técnica monoelementar e que não possibilita a determinação de Cl e S a partir do uso de equipamentos convencionais, pois suas linhas de absorção estão localizadas em comprimentos de onda fora da faixa de trabalho (menores que 190 nm).

Uma alternativa para a determinação de Cl e S utilizando técnicas de determinação baseadas na análise direta de sólidos é a utilização da espectrometria de absorção molecular. Contudo, a utilização de massas inferiores a 100 mg pode dificultar a análise e comprometer a correta expressão dos resultados. Além disso, embora a análise direta de sólidos seja uma promissora estratégia para a determinação elementar em nível traço, ainda existem uma série de inconvenientes que estão relacionados, principalmente, à homogeneidade da amostra e as dificuldades para a calibração do equipamento.

Assim, uma alternativa para o preparo de CaCO_3 visando a posterior determinação de Cl^- e SO_4^{2-} é promover a volatilização dos elementos através da combustão iniciada por micro-ondas (MIC) com subsequente determinação por cromatografia de íons (IC). Esse método pode ser uma alternativa aos ensaios farmacopeicos para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 , além de poder ser aplicado para o controle de qualidade do produto acabado. O método proposto pode proporcionar a determinação quantitativa de ambas impurezas em um único procedimento, resultando em menor tempo de análise, bem como o uso de menores

quantidades de reagentes. Ademais, o método geralmente proporciona a utilização de massas elevadas de amostra, associada a possibilidade de separação dos analitos da matriz, minimizando assim possíveis interferências durante a etapa de determinação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver método que possibilite a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 matéria-prima e produtos acabados, a partir do preparo das amostras por combustão iniciada por micro-ondas (MIC) e posterior determinação por cromatografia de íons (IC).

2.2 Objetivos Específicos

- 1º - Revisar na literatura os métodos analíticos mencionados para a determinação de contaminantes em produtos farmacêuticos;
- 2º - Avaliar os ensaios limite recomendados pela Farmacopeia Brasileira (FB) para a concentração de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 ;
- 3º - Desenvolver métodos que possibilitem a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} ;
- 4º - Otimizar os parâmetros do método proposto como massa de amostra, solução absorvedora e utilização de auxiliares de volatilização, bem como avaliar a exatidão e a precisão;
- 5º - Desenvolver métodos de preparo de amostras que minimizem a geração de resíduos e que sejam compatíveis com técnicas comumente utilizadas para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} , principalmente a cromatografia de íons (IC), a potenciometria utilizando eletrodo íon seletivo (ISE) e espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-VIS);
- 6º - Comparar os resultados obtidos após o preparo das amostras por combustão iniciada por micro-ondas (MIC) e a extração assistida por radiação micro-ondas (MW-AE), bem como por diferentes técnicas de determinação (IC, ISE e UV-Vis);
- 7º - Determinar as concentrações de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 com grau farmacêutico;
- 8º - Determinar as concentrações de Cl^- e SO_4^{2-} em produtos farmacêuticos constituídos de CaCO_3 de marcas e atividades terapêuticas diferentes;
- 9º - Comparar os resultados obtidos com os limites máximos estabelecidos na FB.

10º - Demonstrar a importância do desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e adequados para a determinação de impurezas inorgânicas em baixas concentrações em medicamentos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Essa revisão bibliográfica está dividida em seis partes principais. Na primeira delas, são abordados alguns aspectos gerais sobre as impurezas que podem ser encontradas em produtos farmacêuticos. Na segunda parte será dado maior enfoque para compostos inorgânicos utilizados em produtos farmacêuticos. Na terceira parte serão apresentados os limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira para as principais impurezas inorgânicas. Na quarta parte, serão abordados os ensaios recomendados pela Farmacopeia Brasileira. Por fim, na quinta e na sexta parte serão apresentados os métodos de preparo de amostra e técnicas de determinação que podem ser alternativas para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 matéria-prima e produtos acabados.

3.1 Impurezas em Produtos Farmacêuticos

Efeitos toxicológicos e farmacológicos adversos podem ser acrescidos aos produtos farmacêuticos através de propriedades inerentes a presença de impurezas (GÖRÖG, 2000; GÖRÖG, 2006). Estas impurezas podem ser classificadas como orgânicas, solvente residual e inorgânicas (ICH, *International Conferences on Harmonization*, 2000), podendo ser transferidas para o medicamento durante as etapas de produção como, por exemplo, na purificação, cristalização e secagem, ou durante a armazenagem do produto final (GÖRÖG, 2000; GÖRÖG, 2006).

Nesse sentido, a análise de impurezas em produtos farmacêuticos merece destaque, pois além de fornecer informações necessárias no que diz respeito a compostos potencialmente tóxicos, pode instruir sobre a qualidade dos reagentes e dos processos utilizados durante as etapas de síntese (GIL, 2007). Cabe destacar que embora a variedade de impurezas orgânicas seja bastante superior, a frequência com que são feitas determinações de impurezas inorgânicas é maior, como demonstrado na Figura 1. Isso ocorre, pois, a presença de impurezas inorgânicas em produtos farmacêuticos, mesmo em baixas concentrações, pode oferecer riscos à saúde dos usuários, além de modificar a eficácia terapêutica do produto.

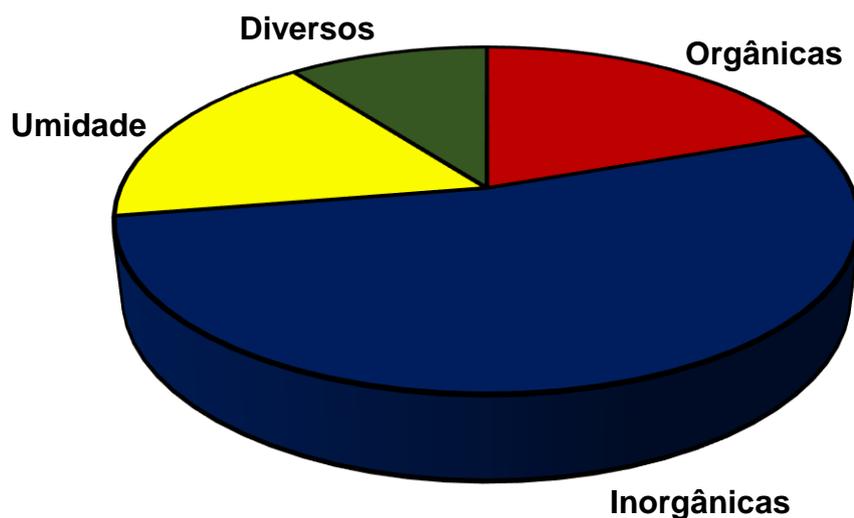


Figura 1. Perfil de frequência dos ensaios de impurezas (Adaptado de BRASIL, *Farmacopeia Brasileira*, 2010).

Dentre as impurezas inorgânicas mais comuns em produtos farmacêuticos pode-se destacar os metais pesados, cloretos e sulfatos (GIL, 2007). Cabe mencionar que essas impurezas geralmente encontram-se em nível de traço na matéria-prima, o que torna a quantificação dessas espécies uma difícil tarefa, especialmente quando métodos clássicos de análise, como os que são recomendados por compêndios oficiais (ex. Farmacopeias). Além de estar associada a matéria-prima, a presença de impurezas pode estar relacionada aos reagentes e/ou ao próprio processo de produção. Alguns fatores como o potencial hidrogeniônico (pH), o tempo de exposição e a temperatura podem potencializar a migração de elementos químicos indesejáveis para o produto final (QUINTAES *et al.*, 2004).

3.2 Compostos Inorgânicos Utilizados em Produtos Farmacêuticos

As inúmeras atividades biológicas exercidas por alguns íons metálicos quando em concentrações adequadas, tornam os compostos inorgânicos amplamente utilizados como matéria-prima em diversos tipos de produtos farmacêuticos (RODRIGUES, RUGGIERO & GUERRA, 2009; QUE JR & BANCI, 2002; ORVIG & ABRAMS, 1999). Embora o uso de compostos inorgânicos com finalidade medicinal seja muito antigo, o grande interesse em sintetizar ou entender as bases moleculares responsáveis pelos mecanismos de ação desses compostos, começou a partir da descoberta da atividade antitumoral do complexo de cisplatina (ROSENBERG, VAN CAMP & KRIGAS, 1965).

A partir disso, a utilização desses compostos como agentes terapêuticos, inibidores enzimáticos, radiofármacos, terapia de quelação, agentes contrastantes, dentre outros vem sendo estudada (ORVIG & ABRAMS, 1999; AHMAD *et al.*, 2006; BLOWER *et al.*, 2007; COHEN, 2007; VAN ELDIK, 2007). Na Tabela 1 estão listados vários exemplos de compostos inorgânicos atualmente disponíveis como substância ativa e seus respectivos usos clínicos e atividades terapêuticas.

Tabela 1. Compostos inorgânicos utilizados no tratamento e diagnóstico de doenças.

Composto	Uso clínico ou atividade terapêutica
Li_2CO_3	Tratamento de perturbação bipolar
CaCO_3	Antiácido e suplementação de Ca
$\text{Al}(\text{OH})_3$	Antiácido
$\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$	Tratamento de doença renal crônica
BaSO_4	Agente de contraste
$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$	Antitumoral
$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$	Vasodilatador

Diante da relevância do tema, é evidente que a utilização de substâncias ativas constituídas de compostos inorgânicos representa um potencial tecnológico considerável para aumentar a quantidade de produtos farmacêuticos disponíveis para o tratamento de diversas enfermidades (RONCONI & SADLER, 2007; BRUIJNINCX & SADLER, 2008). Entretanto, o consumo desses produtos deve ser tratado com cautela, visto que a bioacumulação de íons metálicos pode causar diversos efeitos colaterais graves (ZHANG & LIPPARD, 2003).

3.2.1 Carbonato de Cálcio – Características Gerais

O carbonato de cálcio é um composto inorgânico comumente utilizado como substância ativa em produtos farmacêuticos recomendados para a suplementação de cálcio no organismo, alívio da hiperacidez gástrica, insuficiência renal, dentre outros. Alguns desses produtos são comercializados em farmácias sem a necessidade de prescrição médica, o que potencializa o consumo e os riscos aos consumidores em vista da inexistência de um controle adequado.

O CaCO_3 apresenta-se na forma de um pó fino, microcristalino, branco, inodoro e insípido, sendo transformado no trato gastrointestinal em um sal solúvel, ionizável e absorvível (BRASIL, *Farmacopeia Brasileira*, 2010). Entretanto, é importante mencionar que visando facilitar a ingestão e potencializar a comercialização, alguns excipientes podem ser adicionados ao produto para fornecer aroma e/ou sabor, tais como açúcares, corante e aromatizantes. A presença desses excipientes deve ser evidenciada, pois além de poder conter diversos elementos químicos potencialmente

tóxicos, os quais apresentam ações adjacentes a da substância ativa e podem ocasionar reações de natureza alérgica ou danos mais graves aos usuários. Cabe mencionar que além de substâncias ativas, em menores proporções nos medicamentos, o CaCO_3 é utilizado em medicamentos como excipientes para absorver a umidade residual e como reagente tampão (PRISTA *et al.*, 2003).

O CaCO_3 pode ser obtido através de reações químicas em um processo sintético ou, ainda, através de sua extração da natureza, sendo necessário apenas um processo de moagem de acordo com a granulometria desejada. A síntese de CaCO_3 ocorre através de processos químicos que envolvem uma reação química entre cal hidratada com dióxido de carbono. Entretanto, para aplicações consideradas nobres, como é o caso do uso farmacêutico, faz-se necessário um processo mais complexo de beneficiamento, que tem como objetivo a eliminação de impurezas existentes no CaCO_3 , tanto de origem natural quanto sintética. Geralmente, essas etapas são compostas por mecanismos de separação/classificação, sistemas de flutuação, tratamentos químicos e filtração (GUTSCHICK, 1994).

Diante da possibilidade de elementos serem incorporados ao CaCO_3 durante as etapas de síntese ou até mesmo devido sua origem na natureza, as Farmacopeias descrevem métodos oficiais que auxiliam no controle de qualidade de insumos farmacêuticos. Esses métodos serão detalhados em itens posteriores.

3.3 Limites Máximos Estabelecidos para Impurezas Inorgânicas em CaCO_3

Diante da importância do controle das concentrações de impurezas inorgânicas, compêndios oficiais (p. ex. Farmacopeias) estabelecem ensaios e limites máximos para a matéria-prima previamente a comercialização do produto acabado. Dentre os elementos, maior ênfase tem se dado ao controle de metais pesados, principalmente, devido à elevada toxicidade, dificuldade de eliminação pelos organismos, além de permanecerem no meio ambiente por longo período (PASCALICCHIO, 2002). No entanto, além da concentração e do ensaio limite para o grupo dos metais pesados que compreende As, Ag, Bi, Cd, Cu, Cr, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Sn e V, as Farmacopeias estabelecem limites máximos para outros elementos químicos que podem trazer efeitos adversos ao organismo ou conferir propriedades inadequadas ao produto farmacêutico (Brasil, *Farmacopeia Brasileira*, 2010).

Para o CaCO_3 , além dos metais pesados, existem outras impurezas inorgânicas que possuem a concentração controlada por compêndios oficiais. Dentre as impurezas que devem ser controladas, pode-se destacar o cloreto e sulfato, visto que além de trazer efeitos adversos ao organismo quando em concentrações inadequadas, podem atuar como catalisadores na degradação do CaCO_3 e indicar sobre a qualidade dos reagentes, manuseio e/ou armazenamento (GIL, 2007). No Brasil, a Farmacopeia Brasileira estabelece os limites máximos de 350 mg kg^{-1} para o Cl^- e de 2500 mg kg^{-1} para o SO_4^{2-} em CaCO_3 .

3.4 Ensaio Recomendado para as Concentrações Limite de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3

Os ensaios limite para Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 recomendados pelas Farmacopeias, basicamente, consistem em uma dissolução da amostra em meio ácido e uma comparação visual entre a turbidez da amostra com a de um reagente padrão após a adição de um reagente precipitante. Embora apresentem simplicidade e baixo custo, esses ensaios podem não ser adequados e levarem a resultados falsos.

Com relação ao preparo da amostra, embora o método de dissolução seja um método bastante simples e barato, apenas a dissolução da amostra em uma solução sem alterar as características químicas, pode resultar em uma série de inconvenientes durante a etapa de determinação, principalmente quando necessita-se que os analitos estejam livres em solução. Nesse sentido para a realização da determinação de Cl^- e SO_4^{2-} , os analitos devem estar em uma forma adequada para poder interagir com o reagente precipitante adicionado. Além disso, os problemas relacionados a interferência de matriz podem ser pronunciados, uma vez que todos os constituintes da amostra se encontram dissolvidos em uma solução.

Com relação a etapa de determinação, os ensaios limite para Cl^- e SO_4^{2-} são, de uma maneira geral, realizados através da formação de partículas sólidas resultantes da reação do analito – disponibilizado em solução – com um íon adicionado no meio através de um reagente precipitante previamente padronizado. A partir disso, são realizadas comparações visuais entre a turbidez ocasionada pela formação dos precipitados de Cl^- (AgCl) e SO_4^{2-} (BaSO_4) e a das soluções de referência contendo as concentrações limite destes íons. Embora os ensaios limite sejam amplamente utilizados para análises de rotina de indústrias farmacêuticas, vale

mencionar que esses ensaios fornecem uma avaliação subjetiva relacionada a acuidade visual do analista e outros fatores como, por exemplo, a luminosidade do ambiente. Além disso, esses métodos não são recomendados para o produto acabado e podem ser considerados, no máximo, como métodos semiquantitativos.

Assim os procedimentos descritos pelas Farmacopeias apresentam inúmeras desvantagens, visto que utilizam grandes quantidades de reagentes, necessitam de constante supervisão do analista e são bastante morosos. Ademais, esses métodos utilizam várias etapas durante o preparo de cada replicata, além de serem efetuados em sistemas abertos, aumentando os riscos de perdas e/ou contaminação. Outro aspecto importante, é que nenhum procedimento de lavagem e/ou descontaminação de vidrarias e materiais é descrito.

Ainda com relação aos ensaios limite recomendados pelas Farmacopeias para a avaliação de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 , cabe destacar que são realizados ensaios distintos para cada elemento, o que culmina em elevado tempo para o controle das concentrações destes elementos no insumo farmacêutico. Além disso, esses métodos são recomendados apenas para o CaCO_3 , não sendo recomendados para a análise do produto acabado.

3.5 Métodos de Preparo de Amostras

Embora se saiba da importância do controle de impurezas nos mais diversos tipos de matéria-prima e produto acabado, a grande maioria dos trabalhos relatados na literatura tratam da análise de amostras orgânicas (AHSAN *et al.*, 1998; AHSAN *et al.*, 1999; LEWEN *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2007; KAUFFMAN *et al.*, 2007; RAO & TALLURI, 2007; ORISAKWE & NDUKA, 2009; CASSAP, 2011; DRESSLER *et al.*, 2011; LEWEN, 2011; NAM *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011; ANTOSZ *et al.*, 2012; CASSELLA *et al.*, 2012; VAN HOECK, CATRY & VANHAECKE, 2012). Uma alternativa que vem sendo relatada na literatura para a determinação de impurezas em produtos farmacêuticos constituídos de compostos inorgânicos é a utilização de técnicas de determinação baseadas na análise direta de sólidos como, por exemplo, a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) (AHSAN *et al.*, 1998 e 1999; FLORES *et al.*, 2007).

Embora os métodos de análise direta de sólidos sejam considerados ideias, pois reduzem os procedimentos relacionados ao preparo de amostras, inconvenientes

relacionados à homogeneidade e dificuldades para a calibração do equipamento podem dificultar a etapa de determinação. Além de se tratar de uma técnica monoelementar, elementos como o Cl e S não podem ser determinados por ET AAS utilizando equipamentos convencionais, pois suas linhas de absorção estão localizadas em comprimentos de onda fora da faixa de trabalho utilizada nesses equipamentos (190 - 800 nm). Contudo, a utilização de massas inferiores a 100 mg pode dificultar a análise e comprometer a correta expressão dos resultados.

Dentre os métodos de preparo para amostras inorgânicas, a fusão deve ser mencionada por apresentar baixo custo e possibilitar a utilização de elevada massa de amostra. A fusão, é amplamente recomendada para amostras que não são totalmente dissolvidas em ácidos minerais concentrados ou amostras que possuam componentes com tendência a formar precipitados (COSTA *et al.*, 2010). No entanto, perdas de alguns elementos na forma de suas espécies voláteis e contaminação por parte dos reagentes e do ambiente podem comprometer a análise. Ademais, a utilização de reagente fundente pode ocasionar o aumento dos brancos e interferências durante a etapa de determinação (COSTA *et al.*, 2010).

O uso da piroidrólise no preparo de amostras de difícil decomposição, também tem sido descrito na literatura (PENG *et al.*, 2013; PENG *et al.*, 2012; ANTES *et al.*, 2012). A principal vantagem do uso desse método está relacionada à possibilidade do analito ser separado da matriz minimizando, assim, possíveis interferências na etapa de determinação (ANTES *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2013). Apesar disso, sistemas não comerciais são utilizados e podem não reproduzir condições idênticas entre as replicatas, o que pode resultar em elevados desvios padrão relativos (RSD).

Com relação ao método de extração, deve-se mencionar que este pode ser uma alternativa para o preparo de amostras inorgânicas, principalmente quando associado a fontes de energias alternativas tais como o ultrassom (DERMONT *et al.*, 2008) e a radiação micro-ondas, as quais podem melhorar a eficiência de extração do analito da matriz (GU *et al.*, 1998). Além disso, o uso de soluções alcalinas ou até mesmo a água para o preparo de amostras vem demonstrando uma série de vantagens, dentre as quais destaca-se a possibilidade de se obter recuperações quantitativas inclusive para elementos que formam espécies voláteis em meio ácido (NÓBREGA *et al.*, 2006). Entretanto, a eficiência do método de extração nem sempre é alcançada, podendo ocorrer a extração não quantitativa dos analitos ou a extração de outros constituintes da matriz.

As técnicas de combustão também têm merecido destaque quando se almeja o preparo de amostras para a determinação de metais e não metais (BARIN, FLORES & KNAPP, 2006; FLORES *et al.*, 2007). Apesar dos métodos de combustão serem bastante consolidados para a decomposição de amostras orgânicas, existem estudos na literatura que também descrevem o preparo de amostras de composição majoritariamente e/ou totalmente inorgânica. Nesse sentido, pode-se destacar a combustão iniciada por micro-ondas (MIC), a qual foi recentemente utilizada para promover a volatilização dos analitos a partir de amostras com composição majoritariamente e/ou totalmente inorgânica (PICOLOTO *et al.*, 2012; PICOLOTO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2016). Entretanto, vale enfatizar que esse método ainda não foi aplicado para o preparo de matérias-primas ou produtos farmacêuticos constituídos de compostos inorgânicos. A partir disso, uma revisão mais detalhada dos métodos de preparo de amostras por extração e combustão serão abordadas a seguir, tendo em vista que foram as aplicadas neste trabalho.

3.5.1 Extração

Diversos elementos químicos podem ser lixiviados da amostra quando utilizados reagentes apropriados. Essa escolha irá depender de fatores relacionados a afinidade entre a solução utilizada e os analitos, sendo possível utilizar fontes de energias alternativas tais como o ultrassom (DERMONT *et al.*, 2008) e a radiação micro-ondas em busca de uma melhor eficiência de extração (GU *et al.*, 1998). De maneira geral, os reagentes mais utilizados nos processos de extração são ácidos, bases, surfactantes, agentes quelantes ou sais, os quais auxiliam na transferência dos elementos químicos da amostra para a solução. Entretanto, o uso de soluções aquosas e alcalinas para o preparo de amostras vem demonstrando uma série de vantagens, na qual destaca-se a possibilidade de obter-se recuperações quantitativas inclusive para elementos que formam espécies voláteis em meio ácido (NÓBREGA *et al.*, 2006; PEREIRA 2016).

A utilização de soluções aquosas e alcalinas apresentam-se como uma estratégia vantajosa nos casos em que a técnica de determinação ou os analitos não são compatíveis com a utilização de reagentes ácidos (POZEBON, DRESSLER & CURTIUS, 1998; NÓBREGA *et al.*, 2006). Ademais, é importante destacar que além das vantagens associadas à extração, o uso da radiação micro-ondas tem se

destacado por viabilizar rapidez em comparação a métodos que utilizam aquecimento convencional em virtude do alcance de elevadas temperaturas, principalmente quando combinado com sistemas fechados, que permite a utilização de elevadas pressões (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Diante do que foi exposto, vale ressaltar que o método de extração assistida por radiação micro-ondas pode ser uma alternativa para amostras inorgânicas, dada sua eficiência e simplicidade (NÓBREGA *et al.*, 2006).

Contudo, a utilização do método de extração nem sempre é uma tarefa trivial, visto que a eficiência do método geralmente está associada a complexidade da matriz e dos reagentes utilizados. Nesse sentido, por não se tratar de um método de decomposição, muitos componentes da matriz da amostra podem ser dissolvidos e interferir durante a etapa de determinação. Para amostras orgânicas, essas interferências estão relacionadas, principalmente, ao carbono lixiviado da matriz da amostra, enquanto que para amostras inorgânicas são causadas por eletrólitos provenientes da própria amostra ou dos reagentes utilizados (POZEBON, DRESSLER & CURTIUS, 1998; NÓBREGA *et al.*, 2006).

A extração assistida por radiação micro-ondas visando a determinação de metais e não metais foi aplicada para diferentes amostras, tais como sedimento (CID *et al.*, 2002), cimento (PEREIRA *et al.*, 2014), suplementos multivitamínicos (KREJCOVA *et al.*, 2006), entre outras. Ademais, é importante enfatizar que o método de extração é recomendado em compêndios oficiais para a posterior determinação de alguns metais e não metais em algumas matérias-primas.

3.5.2 Métodos de Combustão

Os métodos de preparo que envolvem a combustão de amostras são caracterizados pela oxidação da matriz orgânica através do fornecimento de energia na forma de calor, convertendo seus constituintes C, H, O e N em suas formas oxidadas CO₂, H₂O e NO_x e/ou N₂ (FLORES *et al.*, 2007). Esses métodos merecem destaque pelo fato de utilizar apenas oxigênio como reagente oxidante, além de possibilitar a escolha de uma solução adequada para absorver os analitos. Essas vantagens vêm ao encontro das desvantagens dos métodos de digestão por via úmida, visto que em muitos casos, não proporcionam uma decomposição satisfatória, além de necessitar da utilização de reagentes concentrados. Nesse sentido, os métodos de combustão representam um modo conveniente e efetivo para o

tratamento de amostras de modo a se obter mínimos teores de carbono residual e baixos valores de branco, minimizando problemas relacionados a interferências durante a etapa de determinação e contribuindo para a obtenção de baixos limites de detecção (FLORES *et al.*, 2007).

Segundo Knapp (1991), as técnicas de combustão podem ser classificadas em sistema aberto, fechado ou dinâmico. Dentre esse grupo de métodos, os que utilizam sistemas fechados de combustão merecem destaque, pois apresentam como principal vantagem a minimização de perdas por volatilização e de contaminações externas, por serem realizadas em recipientes fechados. Essas características, além de permitirem a possibilidade de escolha de uma solução adequada para a absorção dos analitos, fazem com que essas técnicas sejam apropriadas ao preparo de amostras visando a posterior determinação de elementos voláteis (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Os métodos de preparo de amostra por combustão em sistema fechado compreendem o frasco de Schöniger, a bomba de combustão e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC). Entretanto, é importante destacar que, atualmente, a combustão iniciada por micro-ondas tem merecido destaque em virtude das diversas vantagens associadas.

A seguir, serão abordados alguns aspectos gerais da MIC considerando a crescente aplicação deste método para o preparo de diferentes tipos de amostra. Cabe mencionar que não foram encontrados na literatura relatos do uso do frasco de Schöniger e da bomba de combustão para amostras com elevado teor de compostos inorgânicos.

3.5.2.1 Combustão Iniciada por Micro-ondas

No método de combustão iniciada por micro-ondas a queima da matéria orgânica é iniciada pela incidência da radiação micro-ondas em um papel filtro previamente umedecido com uma solução oxidante, em uma atmosfera enriquecida com oxigênio. Após a combustão, os analitos são liberados e, posteriormente, absorvidos em uma solução apropriada. Este procedimento associa as vantagens da digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas e da combustão em sistemas fechados, é um método bastante consolidado para o preparo de amostras orgânicas.

O primeiro trabalho utilizando a incidência da radiação micro-ondas para promover a combustão de amostras foi desenvolvido em 2003 (BARIN, 2003). Nesse trabalho foi realizado o preparo de amostras farmacêuticas utilizando um forno de micro-ondas de uso doméstico. Posteriormente, uma adaptação do método foi realizado por Flores *et al.* (2004) utilizando um forno de micro-ondas comercial de preparo de amostra (Multiwave 3000, Microwave Sample Preparation System, Anton Paar) equipado com frascos de quartzo, que permite o uso de pressões de até 80 bar e temperatura de 280 °C. As amostras são geralmente decompostas na forma de comprimidos em frascos fechados pressurizados com oxigênio, sobre um suporte de quartzo, (Figura 2), contendo papel filtro previamente umedecido com 50 µl de solução de nitrato de amônio 6 mol l⁻¹, que funciona como iniciador de combustão. Após a combustão, os analitos são absorvidos em uma solução apropriada. Ressalta-se que uma etapa de refluxo pode ser aplicada para auxiliar na recuperação quantitativa dos analitos.

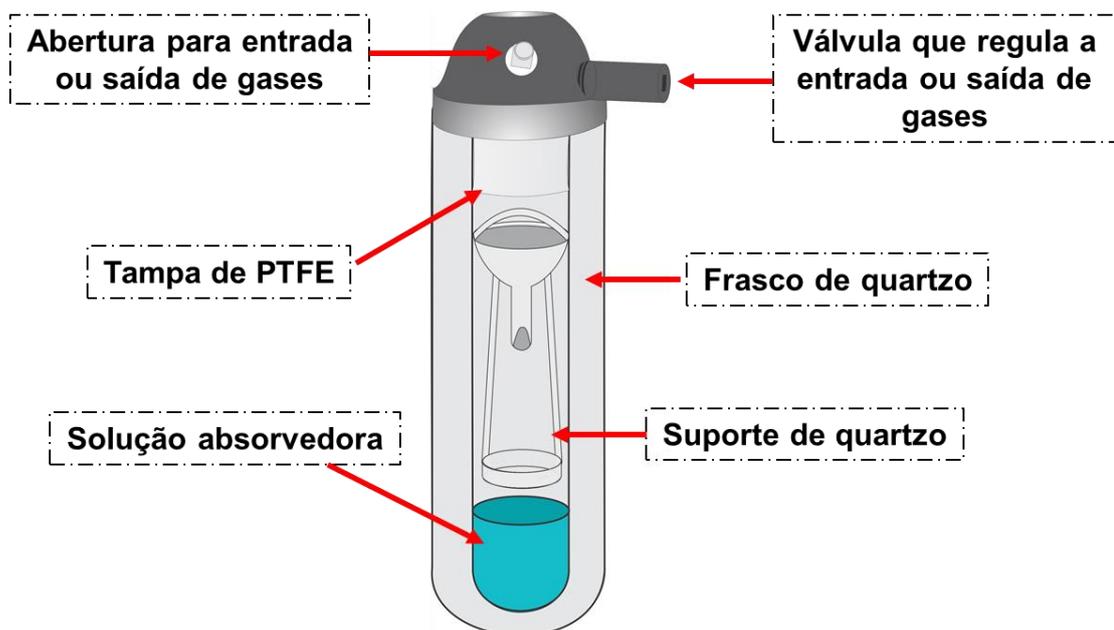


Figura 2. Frasco de quartzo e suporte empregados na combustão iniciada por micro-ondas (Adaptada de TORALLES, 2015).

Outro aspecto que deve ser mencionado diz respeito a forma em que a amostra pode ser inserida no sistema de decomposição. A utilização de comprimidos apresenta como benefício a facilidade de manuseio, e a minimização dos valores dos brancos, visto que não é necessária a utilização de nenhum material para envolver a

amostra (PEREIRA, 2016). Todavia, no caso de amostras líquidas ou semi-sólidas, faz-se necessário que estas sejam encapsuladas ou envoltas por algum material polimérico, como por exemplo, as cápsulas de policarbonato ou os filmes de polietileno. Além disso, a utilização de invólucros elimina a necessidade da utilização de prensas de alta pressão e possíveis perdas por adesão as paredes do equipamento (PEREIRA *et al.*, 2008; COSTA, 2015; BARIN *et al.*, 2014).

Com relação a solução absorvedora, é importante salientar que o método possibilita a escolha de uma solução adequada à absorção e estabilização dos analitos, e que ainda apresenta maior compatibilidade com a técnica de determinação. Nesse sentido, para a absorção de Cl^- e SO_4^{2-} em diferentes matrizes de amostras, diversas soluções na ordem de mmol l^{-1} , ou até mesmo H_2O são comumente utilizadas (PEREIRA *et al.*, 2009; FLORES *et al.*, 2007).

Assim, a MIC vem sendo aplicada em diversos trabalhos para a determinação de metais e não metais em diferentes amostras, tais como alimentos (DUARTE *et al.*, 2009 (a), DUARTE *et al.*, 2009 (b), MESKO *et al.*, 2010), amostras biológicas, (FLORES *et al.*, 2004) industriais (MORAES *et al.*, 2010, PEREIRA *et al.*, 2010), farmacêuticas (MULLER *et al.*, 2012, BARIN *et al.*, 2014) dentre outras. Isso está associado a este método possibilitar vantagens tais como baixos valores de branco, redução de tempo de decomposição, utilização de materiais inertes, uso de frascos de elevada pressão, baixos valores de carbono residual, elevada massa de amostra quando comparada a outros métodos de combustão, adequabilidade à determinação de não metais, e uso de menores volumes de reagentes (MESKO, 2008). A partir desses aspectos, a MIC tem sido proposta nos últimos anos, tendo em vista que permite a decomposição de amostras de difícil decomposição, com recuperação quantitativa dos analitos (FLORES *et al.*, 2007).

Diante da relevância e da eficiência do método, a MIC é recomendada pela Farmacopeia Brasileira como método alternativo para o preparo de amostras orgânicas de difícil digestão. Esse método é recomendado para o preparo de matérias-primas e produtos farmacêuticos constituídos de compostos orgânicos visando a posterior determinação de metais e não metais.

Apesar da MIC ser bastante consolidada para o preparo de amostras orgânicas, o seu uso para o preparo de amostras com elevados teores de constituintes inorgânicos é bastante recente e, baseia-se na volatilização dos analitos através do aquecimento da porção inorgânica. Este aquecimento se dá pela queima da fração

orgânica da amostra e, ainda, quando necessário, pelo uso de um auxiliar de volatilização que, a partir de sua queima, fornece a energia necessária para a volatilização dos analitos (PICOLOTO *et al.*, 2012).

O primeiro trabalho a utilizar a MIC para o preparo de amostras de elevado teor de constituintes inorgânicos foi desenvolvido por PICOLOTO *et al.*, 2012. Essa estratégia foi utilizada para a determinação de Hg, As, Cd e Pb em amostras de solo, visto que se trata de uma matriz com elevado teor de material inorgânico e, por consequência, não pode ser totalmente decomposta por reações de combustão. (PICOLOTO *et al.*, 2012; PICOLOTO *et al.*, 2013).

Nesse sentido, a alternativa encontrada pelos autores foi misturar a amostra de solo a celulose microcristalina, utilizada para auxiliar a volatilização dos elementos. Assim, em virtude da celulose ser um material facilmente decomposto por MIC, a energia liberada pela sua queima auxilia na volatilização dos analitos a partir da amostra. Ademais, os autores utilizaram como solução absorvedora para Hg HNO_3 (0,25 mol l^{-1}) seguida da determinação por geração de vapor frio acoplada a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (CVG-ICP-MS) (PICOLOTO *et al.*, 2012), e uma mistura de HNO_3 (2 mol l^{-1}) e HCl (2 mol l^{-1}) para absorver Hg, As, Cd e Pb visando posterior determinação por ICP-MS e ICP OES (PICOLOTO *et al.*, 2013).

Após o desenvolvimento desses trabalhos, Pereira *et al.*, 2016 propôs a utilização da MIC para o preparo de cimento Portland visando a posterior determinação de Cl e F por IC. Para tanto, foi necessário a utilização de um auxiliar de volatilização visando disponibilizar os elementos da amostra, tendo em vista que a amostra de cimento não é um material combustível. Nesse sentido, foram avaliadas variadas massas de celulose microcristalina (200, 300 ou 500 mg) e grafite em pó (100 ou 200 mg) como auxiliares de volatilização. Como solução absorvedora foram avaliadas as soluções de H_2O e NH_4OH (10, 25 ou 50 mmol l^{-1}). Assim, após todas as otimizações, os autores utilizaram 100 mg de amostra misturadas com 300 mg de celulose e água ultrapura como solução absorvedora para os analitos e obtiveram resultados precisos e exatos (PEREIRA *et al.*, 2016).

Diante do que foi exposto, é possível verificar as vantagens da MIC como, por exemplo, o mínimo consumo de reagentes e a elevada frequência de análise, visto que podem ser decompostas até 8 amostras em tempos inferiores a 30 min. Além disso, a MIC possibilita a escolha de uma solução absorvedora, o que é extremamente

importante, uma vez que essa escolha pode ser realizada a partir dos analitos e da técnica de determinação selecionada. Cabe ainda mencionar que existe a possibilidade de realizar uma etapa de refluxo após a decomposição das amostras, fazendo com que a solução absorvedora lave as paredes do frasco garantindo recuperações quantitativas dos analitos (FLORES *et al.*, 2004; BARIN *et al.*, 2014). Embora a MIC tenha sido aplicada para uma grande variedade de amostras orgânicas e ainda, aplicada recentemente como uma alternativa para o preparo de amostras com constituição inorgânica, não existem relatos na literatura da utilização desse método para o preparo de matérias-primas ou produtos farmacêuticos constituídos de compostos inorgânicos.

3.6 Técnicas Instrumentais para a Determinação de Cl^- e SO_4^{2-}

Diante da necessidade da quantificação de impurezas em produtos farmacêuticos, técnicas analíticas de determinação sensíveis estão sendo recentemente recomendadas pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, *Farmacopeia Brasileira*, 2010). Entretanto, para que essas técnicas instrumentais possam ser utilizadas, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras adequados, com o principal intuito de minimizar erros durante a etapa de determinação. A exceção fica por conta das técnicas baseadas na análise direta de sólidos como, por exemplo, a espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS-MAS). Nesse sentido, a escolha da técnica de determinação irá depender do tipo de amostra, do analito a ser determinado e de sua concentração na amostra (KNAPP, 1998).

Existem diversas técnicas que podem ser alternativas para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em matérias-primas e produtos farmacêuticos. Dentre as quais, pode-se destacar a potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE), a espectrofotometria molecular na região do ultravioleta e do visível (UV-VIS), a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a cromatográfica de íons (IC). Essas técnicas apresentam sensibilidade adequada, rapidez, precisão e exatidão, principalmente quando comparadas com os métodos clássicos de análise.

Dentre essas, destacam-se a ICP-MS, ICP-OES e a IC, pois apresentam capacidade multielementar e elevada sensibilidade. Embora a ISE e o UV-VIS sejam

técnicas de determinação monoelementares, tratam-se de técnicas vantajosas para a determinação elementar principalmente devido a seu baixo custo associado a rapidez, facilidade de operação, além de serem técnicas precisas e exatas (FERNANDES, KUBOTA & NETO, 2001). Ademais, cabe mencionar que a HR-CS-MAS é uma técnica que possibilita a determinação de Cl e S em diversas matrizes, necessitando de mínimo preparo das amostras previamente a análise, uma vez que permite a análise direta de sólidos (BUTCHER, 2013). No entanto, elevado sinal de fundo e inconvenientes relacionados à homogeneidade e dificuldades para a calibração do equipamento podem dificultar a etapa de determinação.

É importante destacar que não foram encontrados relatos na literatura de métodos quantitativos que utilizem técnicas analíticas para a determinação de Cl⁻ e SO₄²⁻ em CaCO₃ matéria-prima ou produtos farmacêuticos. A partir disso, uma revisão mais detalhada sobre as técnicas de determinação que podem ser alternativas para tal finalidade serão abordadas a seguir.

3.6.1 Técnicas de Espectrometria Atômica

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando técnicas de espectrometria atômica para a determinação de impurezas que encontram-se em baixas concentrações em produtos farmacêuticos (WANG, WALDEN & EGAN, 1997; ZACHARIADIS & KAPSIMALI, 2006; BARIN *et al.*, 2014). Dentre elas, técnicas de absorção atômica, espectrometria de massas e emissão atômica como, por exemplo, ET AAS, ICP-MS e ICP-OES, respectivamente, destacam-se por apresentarem elevada sensibilidade para esse tipo de análise (WANG, WALDEN & EGAN, 1997; ZACHARIADIS & KAPSIMALI, 2006; BARIN *et al.*, 2014).

A espectrometria de absorção atômica (AAS), por exemplo, baseia-se no princípio de que átomos no estado gasoso, gerados em um atomizador, são capazes de absorver radiação de frequência específica a partir de uma fonte de luz, sendo a energia absorvida proporcional a concentração do analito na amostra. Em instrumentos convencionais, usualmente uma fonte de radiação específica para cada elemento (fonte de linha) é utilizada, o que culmina em uma análise monoelementar.

A AAS foi inicialmente desenvolvida para a determinação de metais e de alguns não metais, não sendo possível a determinação de elementos que apresentem linhas de absorção localizadas em comprimentos de onda fora da faixa de trabalho,

normalmente, utilizada nos equipamentos (menor que 190 nm). Entretanto, percebeu-se que moléculas diatômicas formadas pela interação de duas espécies químicas, como por exemplo AlCl e CS - as quais possuem espectros de absorção molecular com estruturas muito estreitas e localizadas na região do visível e ultravioleta - poderiam ser utilizadas com o intuito de quantificar os elementos que possuíssem essa característica. Além disso, a utilização de equipamentos com fonte contínua e com monocromador duplo de alta resolução, como os utilizados na espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua (HR-CS-MAS), pode possibilitar a detecção multielementar, dependendo da região do espectro.

Embora os métodos de análise direta de sólidas necessitem de poucas etapas durante o preparo de amostras, inconvenientes relacionados à homogeneidade e dificuldades para a calibração do equipamento podem ocasionar problemas durante a etapa de determinação. Nesse contexto, a obtenção de resultados precisos e exatos não é uma tarefa trivial, uma vez que massas inferiores a 100 mg comumente utilizados, podem comprometer a representatividade, reprodutibilidade e repetitividade, não somente pelos erros associados às pesagens, como também pela falta de homogeneidade da amostra para alguns elementos.

Nesse sentido, outra técnica bastante aplicada para determinação de metais e não metais a níveis de traço em diferentes tipos de matrizes, dentre as quais destaca-se os medicamentos, é a ICP-MS (LEWEN *et al.*, 2004; HOECKE, CATRY & VANHAECKE, 2012; BARIN *et al.*, 2014). Essa técnica permite a determinação multielementar e se baseia na geração de íons positivamente carregados (M^+) em um plasma de argônio, no qual temperaturas elevadas são alcançadas. Geralmente, as amostras são introduzidas através de um nebulizador, na forma líquida, passando para uma câmara de nebulização. Os íons M^+ , gerados no plasma, são amostrados pela interface (cone de amostragem e *skimmer*) e conduzidos até o analisador de massas através da lente iônica pela aplicação de potenciais cada vez mais negativos. No analisador de massas, os íons são separados de acordo com sua m/z e finalmente conduzidos até o detector, no qual a corrente elétrica medida é convertida em contagens por segundo (THOMAS, 2001(a); THOMAS, 2001(b); THOMAS, 2001(c); BEAUCHEMIN, 2010).

Apesar de possuir uma série de vantagens, uma atenção maior deve ser dada para a determinação de alguns não metais por esta técnica, devido as sérias interferências espectrais (BU, WANG & HALL, 2003). Para a determinação de Cl e S

por ICP-MS, por exemplo, alguns cuidados devem ser tomados devido a possibilidade da formação de espécies poliatômicas no plasma. As principais interferências para Cl estão relacionadas a formação de $^{16}\text{O}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$ e $^{34}\text{S}^1\text{H}^+$ para o isótopo $^{35}\text{Cl}^+$ e as formações de $^{36}\text{Ar}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{S}^1\text{H}^+$ para o isótopo $^{37}\text{Cl}^+$. No caso do S, as razões massa/carga de seus principais isótopos $^{32}\text{S}^+$ e $^{34}\text{S}^+$ sobrepõem-se com as de alguns íons poliatômicos formados no plasma $^{16}\text{O}_2^+$, $(^{16}\text{OH})_2^+$, $^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$ e $^{14}\text{N}^{18}\text{O}^+$, comprometendo a exatidão, sensibilidade e precisão (TAN & HORLICK, 1986; YEH, JIANG, HIS & 2004). Diante disso, várias estratégias têm sido propostas para superar essas limitações, como o uso da cela colisão ou de reação (CRC), as quais são colocadas entre a interface e o separador de massa no espectrômetro (TANNER, BARANOV & BANDURA, 2002).

Além da possibilidade da formação de interferências poliatômicas, a sensibilidade da ICP-MS para a determinação de Cl e S é inferior quando comparada a sensibilidade para outros elementos metálicos, devido ao baixo grau de ionização desses elementos no plasma de argônio (JARVIS, GRAY & HOUK, 1992). Nesse sentido, a determinação desses analitos por ICP-MS é um desafio, fazendo-se necessário o uso de algumas estratégias como mencionado anteriormente. Além disso, a etapa de preparo de amostra deve ser bastante criteriosa, afim de eliminar interferências relacionadas a matriz e ao solvente. Ainda, cabe destacar que esta técnica apresenta um elevado custo de aquisição e manutenção, o que pode dificultar a aplicação em análises de rotina.

Nesse contexto, cabe mencionar que a ICP-OES também se trata de uma alternativa interessante para a análise de rotina de medicamentos visando a determinação elementar (RAZIC *et al.*, 2005; ZACHARIADIS & KAPSIMALI, 2006). Embora esta técnica apresente menor sensibilidade quando comparada com a ICP-MS para a determinação de metais, geralmente apresenta menor custo e maior robustez. Nas determinações por ICP-OES, assim como a ICP-MS, as amostras são introduzidas através de um nebulizador, geralmente na forma líquida, passando para uma câmara de nebulização formando um aerossol. Nessa câmara, gotículas maiores e menores são separadas, a fim de facilitar o processo de atomização, quando em contato com o plasma. A radiação emitida pelos elementos durante a ocorrência das transições eletrônicas é conduzida até o sistema óptico, no qual os comprimentos de onda são separados e, posteriormente, o sinal é transmitido ao detector (NÖLTE 2003).

Adicionalmente, é válido destacar que a determinação de não metais por ICP-OES é menos comum quando comparada a de metais, em virtude do elevado potencial de ionização de alguns destes elementos. Em relação a determinação de Cl e S, deve-se enfatizar que as linhas de emissão mais intensas destes elementos se encontram em comprimentos de onda abaixo de 200 nm. Nessa região do espectro eletromagnético, as análises ficam bastante suscetíveis a interferências causadas, principalmente, pela absorção de CO₂, O₂ e H₂O, geralmente proveniente da umidade do ar, o que torna a determinação desses analitos por ICP-OES uma difícil tarefa. Nesse contexto, com a finalidade de diminuir as interferências mencionadas e possibilitar a determinação desses elementos em baixas concentrações por ICP-OES, foram desenvolvidos sistemas ópticos purgados com gás inerte (Ar e N₂), que permitem a determinação de elementos com comprimentos de onda de emissão abaixo de 200 nm como, por exemplo, Br (154,07 nm), Cl (134,72 nm), I (178,28 nm), S (180,73 nm) e P (177,50 nm) (NÖLTE 2003).

Cabe ressaltar que embora esta técnica apresente maior robustez quando comparada com a ICP-MS, sua menor sensibilidade acaba dificultando a determinação de elementos em baixas concentrações. Além disso, interferências físicas ocasionadas pela escolha de um solvente inadequado, podem causar danos ao equipamento e levar a resultados não quantitativos.

3.6.2 Espectrofotometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível (UV-VIS)

A espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-VIS é uma técnica que vem sendo bastante utilizada, uma vez que tem possibilitado a determinação de elementos e compostos em diversas matrizes (SILVERSTEIN, BASSLER & MORRIL, 1994; HARGIS, 1998). Com relação a determinação elementar, cabe mencionar esta técnica não apresenta capacidade de determinação multielementar e elevada sensibilidade quando comparada com as técnicas espectrométricas, potenciométricas e cromatográficas. Entretanto, a UV-VIS apresenta-se como uma alternativa para a análise de rotina em laboratórios de pequeno porte por se tratar de uma técnica de determinação que apresenta instrumentação simples e de baixo custo, além de ser rápida, precisa e exata (HARGIS, 1998).

Em suma, a técnica se baseia na medida da luz absorvida ou emitida por uma espécie química. Para a realização das análises, em decorrência das interações dos fótons com os átomos ou moléculas absorventes, a intensidade de luz incidida é maior do que a intensidade final da luz. Assim, para que um analito seja determinado por métodos espectrofotométricos, a absorbância deve ser medida em um comprimento de onda que os demais componentes da amostra não absorvam. Na ausência de substâncias interferentes, a medida da absorbância deve ser realizada no comprimento de onda no qual a absorbância é mais sensível às mudanças de concentração (HARGIS, 1998).

Entretanto, poucos analitos absorvem suficientemente para serem determinados diretamente sem um prévio tratamento químico. Esse inconveniente pode ser superado através da adição de uma substância com o intuito de formar uma espécie com o analito que absorve luz na região do ultravioleta ou do visível (HARGIS, 1998). A espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta próximo e do visível é realizada pela absorção numa faixa comprimento de onda entre 200 e 700 nm (CHRISTIAN & O'REILLY, 1986).

Para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por meio de técnicas espectrofotométricas, são relatados na literatura métodos que utilizam determinações turbidimétricas ou colorimétricas. Dentre as determinações turbidimétricas visando a determinação de Cl^- , a análise comumente utilizada se procede através da formação do precipitado de AgCl , na qual a absorbância é monitorada em 500 nm (ZENKI & IWADOU, 2002). Por outro lado, a determinação colorimétrica ocorre através da reação do Cl^- com o tiocianato de mercúrio(II). Ao proceder a reação, os íons tiocianato são deslocados levando à formação de um complexo de coloração vermelho intenso com Fe^{3+} , sendo monitorado em 455 nm (GREENBERG, CLESCERI & EATON, 1992).

Com relação a determinação de SO_4^{2-} , uma análise turbidimétrica comumente utilizada ocorre através da formação do precipitado de BaSO_4 monitorado no comprimento de onda de 420 nm (KRUG *et al.*, 1977). Enquanto que para a determinação colorimétrica, a análise comumente utilizada procede através da reação do SO_4^{2-} com o reagente azul de metiltimol, sendo o complexo monitorado no comprimento de onda de 588 nm (MANIASSO, JACINTHO & GINÉ, 1995).

É importante enfatizar que apesar de possuir uma série de vantagens, um dos agravantes dessa técnica é a baixa sensibilidade para alguns analitos, compreendendo geralmente uma faixa linear a partir de 1 mg l^{-1} . Além disso, há a

possibilidade de interferências de outras espécies químicas que absorvem luz na região do ultravioleta e do visível, comprometendo a precisão e a exatidão dos resultados.

3.6.3 Potenciometria com Eletrodo Íon Seletivo (ISE)

A ISE é uma técnica bastante consolidada e, ainda hoje, bastante aplicada para a determinação de Cl^- em materiais geológicos (RICE, 1988), cimento (PEREIRA, 2016), alimentos (CRIZEL *et al.*, 2015), entre outros. Embora a determinação do íon SO_4^{2-} não seja possível, existe a possibilidade da utilização de um eletrodo íon seletivo para o íon S^{2-} .

Entretanto, para a determinação por ISE, faz-se necessária a conversão da amostra sólida em uma solução adequada a determinação. Nesse sentido, elementos como o cloro e o enxofre – ligados a matriz da amostra – são, geralmente, disponibilizados para a solução em suas formas mais estáveis (Cl^- e SO_4^{2-}). Assim, a conversão do enxofre para S^{2-} é um desafio dentro dos métodos de preparo de amostra. Uma alternativa comumente aplicada para o preparo de amostras sólidas visando a posterior determinação de S^{2-} utilizando o eletrodo íon seletivo é a realização de uma etapa de extração através da volatilização do íon S^{2-} (FAGNANI *et al.*, 2011). Nesse método, o analito é liberado na presença de HCl e arrastado por um gás inerte até uma solução absorvedora (ALLEN, FU & DENG, 1993). Entretanto, é importante destacar a possibilidade da ocorrência de perdas por vazamento dos gases e a conversão para o íon SO_4^{2-} , visto que a oxidação do S^{2-} a SO_4^{2-} é mais favorável (FAGNANI *et al.*, 2011).

A potenciometria utilizando o eletrodo íon seletivo é baseada na medida da diferença de potencial de uma célula eletroquímica e é utilizada para a determinação direta de um determinado íon em uma amostra através do emprego de um eletrodo sensível ao íon. Essa diferença de potencial é gerada por um íon que migra por uma membrana seletiva e está diretamente relacionada com a concentração da espécie iônica.

No entanto, alguns íons podem interferir na determinação de elementos. Para determinação de Cl^- , íons como, por exemplo, o brometo, carbonato, hidróxido e o tiosulfato podem ocasionar interferências, superestimando o sinal referente ao analito. Para a determinação do íon S^{2-} , as interferências podem ocorrer devido a

presença de íons em solução, que podem formar complexos estáveis com o elemento, suprimindo o sinal referente ao analito. Para minimizar algumas dessas interferências, soluções como, por exemplo, as denominadas de ISA (*Ionic Strength Adjusting*) e SOAB II (*Sulfide Anti-Oxidant Buffer*), além do tampão de pH de ácido acético/acetato de sódio (pH=4,75) são frequentemente utilizados, pois além de complexar com os íons metálicos, servem como tampão de pH, bem como para o ajuste da força iônica.

Embora a ISE seja uma técnica de determinação monoelementar, apresenta diversas vantagens quando comparada com os métodos clássicos de determinação, visto que dispensa vidrarias e reagentes comumente utilizados em técnicas volumétricas e gravimétricas clássicas. Além disso, apresenta baixo custo, rapidez, associado a boa exatidão, além de ser uma alternativa viável para a substituição de alguns métodos instrumentais principalmente quando deseja-se determinar apenas um elemento (FERNANDES, KUBOTA & NETO, 2001; FAGNANI *et al.*, 2011).

3.6.4 Cromatografia de Íons (IC)

Ainda com relação as técnicas de determinação que apresentam capacidade multielementar, a IC merece destaque devido a sua facilidade de separação, identificação e quantificação de espécies químicas. Quando comparada as técnicas espectrométricas, proporciona um custo relativamente menor, tanto no que tange à aquisição e manutenção do instrumento, quanto no que se refere à realização das análises, visto que não se faz necessário o uso de gases (MELLO *et al.*, 2013). A IC é uma das técnicas de determinação com grande aplicação no campo das determinações de Cl^- e SO_4^{2-} em diferentes amostras, sendo recentemente recomendada pela Farmacopeia Brasileira como técnica de determinação alternativa para o controle das concentrações destes elementos em produtos farmacêuticos.

Na IC a separação dos íons presentes na amostra ocorre devido a interação entre as espécies iônicas (analitos) e a fase estacionária. O mecanismo de interação dos íons com a fase estacionária é conhecido como troca iônica. Nesta técnica as colunas utilizadas são constituídas por uma matriz polimérica, que possui em sua superfície um grupo funcional ligado.

A fase móvel também contém espécies iônicas, dessa maneira, ocorre a competição das espécies presentes na amostra e das espécies presentes na fase móvel com os sítios ativos da fase estacionária. Para cada íon, o processo de troca é

caracterizado pelo equilíbrio de distribuição entre a fase móvel e a fase estacionária (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2006). O sistema de detecção utilizado na cromatografia aniônica é, geralmente, baseado na medida de condutividade das espécies iônicas separadas na coluna. Cabe enfatizar que a condutividade é uma propriedade comum a todas as espécies iônicas em solução. Portanto, quando se almeja a determinação de ânions, a presença de cátions em solução – os quais são oriundos da fase móvel ou até mesmo da solução da amostra – podem afetar de maneira significativa na detecção dos analitos, uma vez que o sinal gerado por cátions é substancialmente superior ao gerado por ânions nesse sistema. Esse problema pode ser contornado com o uso de um sistema de supressão, que permite a remoção dos cátions presentes no eluente e reduz a condutividade de fundo do eluente, melhorando a sensibilidade do sistema de medição (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2006).

Outro problema que pode ser observado durante a determinação por IC, é a possibilidade da sobreposição de picos, devido a separação inadequada dos analitos. Isso ocorre quando os analitos possuem afinidade bastante semelhante com as fases estacionária e móvel. Diante disso, íons como BrO_3^- e NO_3^- - principalmente quando em concentrações elevadas - podem eluir em tempos de retenção bastante próximo aos do Cl^- e do SO_4^{2-} , respectivamente, podendo ocasionar a sobreposição dos picos (GONÇALVES *et al.*, 2004; NOVIC *et al.*, 1995). Nesse sentido, alternativas como utilização de diferentes eluentes em concentrações distintas ou a alteração de parâmetros operacionais podem ser avaliados com o intuito de promover uma melhor separação dos analitos.

Embora exista a possibilidade de alguns inconvenientes, é importante destacar que a IC é uma técnica de determinação que apresenta diversas vantagens e deve ser considerada com uma das principais alternativas para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em medicamentos constituídos de compostos inorgânicos. Além da capacidade multielementar e de menores custos quando comparada a técnicas espectrométricas, a IC oferece algumas vantagens importantes como elevada sensibilidade, reduzido tempo de análise, pequenos volumes de amostra, ampla faixa linear, entre outras.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo serão descritos os equipamentos, os reagentes, as amostras, os procedimentos, bem como os parâmetros utilizados para o preparo e análise das amostras. Serão descritos também os ensaios limite para Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 recomendados pela 5ª Farmacopeia Brasileira.

Com o intuito de desenvolver um método para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} na matéria-prima, foi avaliada a possibilidade da volatilização dos elementos utilizando a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) para o preparo das amostras, nas quais três técnicas de determinação foram utilizadas: a cromatografia iônica (IC), a potenciometria com eletrodo íon seletivo (ISE) e a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e do visível (UV-VIS). Para a comparação dos resultados, as amostras também foram preparadas por extração assistida por radiação micro-ondas (MW-AE). Além disso, diferentes parâmetros de mérito do método proposto foram descritos, tendo em vista a obtenção de resultados de forma mais precisa e exata.

4.1 Instrumentação

Os métodos de preparo de amostras utilizados neste trabalho como a volatilização por MIC e a extração assistida por radiação micro-ondas (MW-AE) foram realizados em um sistema com aquecimento por radiação micro-ondas *Multiwave 3000*[®] (*Microwave sample preparation system*, Anton Paar, <http://www.anton-paar.com>, Áustria) contendo rotor com capacidade para oito frascos, conforme apresentada na Figura 3. O forno é equipado com sensores de temperatura e de pressão, que permitem o acompanhamento destes parâmetros em tempo real e, ainda, permite que a potência irradiada seja monitorada durante todo o programa de aquecimento.



Figura 3. Equipamento utilizado para o preparo de amostras: A) Forno de micro-ondas Multiwave 3000[®] e B) rotor equipado com oito frascos (Adaptada de PEREIRA, 2014).

Para o procedimento de volatilização por MIC, foram usados frascos de quartzo com volume interno de 80 ml sob condições máximas de 1400 W de potência, 280 °C de temperatura e 80 bar de pressão. Em contrapartida, para a MW-AE o sistema foi equipado com 8 frascos de politetrafluoretileno (PTFE) com um volume interno de 80 ml em condições máximas de 1400 W, 260 °C e 60 bar. Na Figura 4 são apresentados os frascos de (A) quartzo e (B) PTFE utilizados nos procedimentos de MIC e MW-AE, respectivamente.

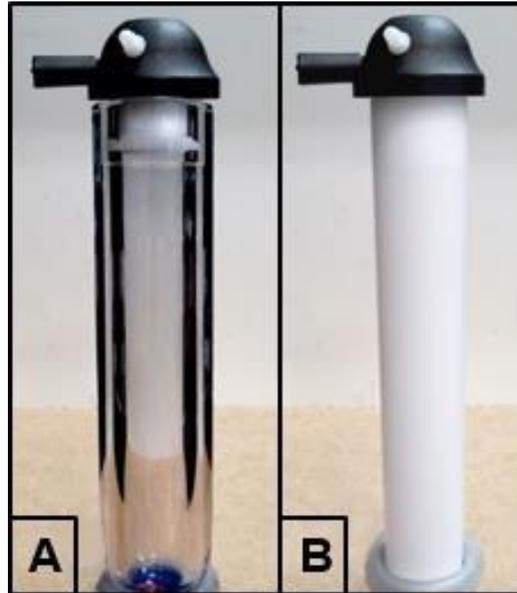


Figura 4. Frascos utilizados nos procedimentos que empregam a radiação micro-ondas: A) frasco de quartzo utilizado na volatilização por MIC e B) frasco de PTFE utilizado na MW-AE (Adaptada de PEREIRA, 2014).

Para a realização da volatilização por MIC foi necessário o uso de um dispositivo inserido no interior do frasco de quartzo como suporte para a amostra. Esse suporte é, também, constituído de quartzo e apresenta na parte superior um funil que, além de evitar que a tampa do frasco seja atingida por chamas provenientes da combustão, permite que a solução absorvedora promova uma lavagem efetiva do sistema. Na base do suporte existem fendas que permitem o maior contato de O_2 com a amostra no momento da combustão (MESKO *et al.*, 2008). Os suportes de quartzo utilizados para o desenvolvimento do trabalho foram confeccionados no Laboratório de Hialotecnica da Universidade Federal de Santa Maria (Figura 5).

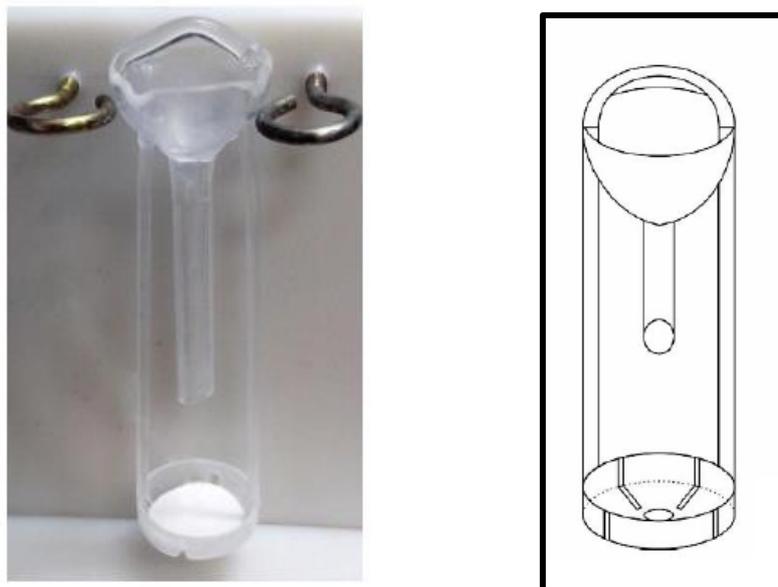


Figura 5. Dispositivo de quartzo utilizado na MIC como suporte para as amostras (Adaptada de COELHO JUNIOR, 2015).

As pesagens foram feitas em uma balança analítica modelo AY220 (Marte), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g. O pH das soluções foi medido com um medidor de pH modelo mPA-210 (TecnoPON). Uma capela de fluxo laminar, classe 100, modelo CFLH – 09 (Veco) foi utilizada para a secagem de materiais diversos e um banho de ultrassom modelo USC – 1800 A (Unique), com frequência de 40 kHz, foi utilizado para a descontaminação dos papéis filtro, celulose microcristalina e invólucros de polietileno utilizados na MIC.

A secagem das matérias-primas e dos medicamentos e a determinação do teor de umidade foram realizadas em uma estufa modelo 400/2ND (Nova Ética, Brasil). Para a determinação de cinzas, foi utilizado um forno mufla modelo 1C.318.24 (Quimis, Brasil). Os comprimidos dos medicamentos foram macerados com o auxílio de gal e pistilo constituídos de porcelana. Para a execução dos métodos recomendados pela Farmacopeia Brasileira, uma chapa de aquecimento com agitação magnética modelo RH Basic 2 (IKA) foi utilizada. Previamente a determinação por IC, as amostras foram centrifugadas em uma centrífuga modelo 80-2B (Daiki, Brasil).

A determinação da concentração de Cl^- e SO_4^{2-} nas amostras foi realizada em um cromatógrafo de íons com detector de condutividade modelo 861 *Advanced Compact IC* (Metrohm). Utilizou-se uma coluna de troca aniônica com grupos de

amônio quaternário suportados em poli(álcool vinílico), modelo *Metrosep A Supp 5* (250 x 4 mm d.i., 5 mm de diâmetro de partícula, Metrohm) e uma coluna-guarda de mesmo material de preenchimento da coluna de troca iônica, modelo *Metrosep A Supp 4/5 Guard* (5 x 4 mm d.i., 5 mm de diâmetro de partícula, Metrohm).

Adicionalmente, para a comparação dos resultados, foi realizada a determinação de Cl^- utilizando um potenciômetro digital modelo HI 3221 pH/ORP/ISE Meter (Hanna), equipado com um eletrodo combinado íon seletivo para cloreto modelo HI 4107 (Hanna). A determinação de SO_4^{2-} também foi realizada em um espectrofotômetro na faixa UV-VIS de 190 à 1100 nm modelo IL – 592 (Kasuki) com banda de passagem de 2 nm.

4.2 Reagentes

Para o preparo das soluções, diluição das amostras e limpeza dos materiais, foi utilizada água de elevada pureza obtida através em sistema de purificação (Mega Up, Megapurity, South Korea). O ácido nítrico (HNO_3 , Merck, Germany) utilizado como solução absorvedora nesse trabalho foi purificado em um sistema para purificação abaixo da temperatura de ebulição (Milestone, Model Duopor, Italy). A solução de hidróxido de amônio (NH_4OH), ácido nítrico (HNO_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e carbonato de amônio ($\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, utilizadas como solução absorvedora na MIC, foram preparadas a partir do reagente NH_4OH (27% de NH_3 em H_2O), HNO_3 (65% m/m), H_2O_2 (50% m/m) e pela dissolução de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Synth), respectivamente. Como iniciador de combustão, foi utilizada uma solução de nitrato de amônio (NH_4NO_3) 6 mol l^{-1} , que foi preparada a partir da dissolução do sal correspondente (Merck) em água ultrapura.

Com intuito de auxiliar na volatilização de Cl^- e SO_4^{2-} por MIC a partir da matéria-prima e do medicamento, foi avaliado o uso de celulose microcristalina ou amido, ambos de grau farmacêutico (pureza $\geq 90\%$), ou grafite em pó (pureza $\geq 99,99\%$, Merck) como auxiliares de volatilização. Para a pressurização dos frascos de decomposição foi utilizado oxigênio com elevado grau de pureza (99%, White Martins).

Para os ensaios limite recomendados pela Farmacopeia Brasileira para Cl^- e SO_4^{2-} foram utilizadas soluções de AgNO_3 (Merck) na concentração de 0,25 mol l^{-1} e BaCl_2 (Synth) na concentração de 0,5 mol l^{-1} , preparadas a partir da dissolução dos

respectivos sais em água ultrapura. Além disso, HCl na concentração de $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ e H_2SO_4 na concentração de $0,005 \text{ mol l}^{-1}$ foram utilizados para o preparo das soluções de referência contendo a concentração limite de Cl^- e SO_4^{2-} de acordo com a Farmacopeia Brasileira.

Na determinação por cromatografia de íons foram utilizadas soluções de Na_2CO_3 $3,2 \text{ mmol l}^{-1}$ / NaHCO_3 $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$ – como fase móvel – e H_2SO_4 200 mmol l^{-1} – como solução regeneradora do sistema de supressão. Essas soluções foram preparadas a partir de Na_2CO_3 p.a. (Synth), NaHCO_3 p.a. (Merck) e H_2SO_4 concentrado (Proquímios), respectivamente.

Na determinação de Cl^- por ISE, fez-se necessário o uso de uma solução tampão de acetato de amônio (HI 70467, Hanna) para garantir o ajuste e o condicionamento da concentração hidrogeniônica, bem como da força iônica da solução. Para a determinação de SO_4^{2-} por UV-VIS foram utilizados BaCl_2 (Synth) na concentração de 10% (m/v) e HCl (Synth) na concentração de $0,5 \text{ mol l}^{-1}$. Além disso, para maior dispersão do precipitado de BaSO_4 formado, foi preparada uma solução gelatinosa a partir de uma gelatina incolor comercial.

As soluções utilizadas para a calibração dos instrumentos de medição foram obtidas a partir da dissolução de sais de cloreto de sódio (Merck) e sulfato de sódio (Merck) em água ultrapura. Para a realização dos ensaios de recuperação, foram preparadas soluções de cloreto de sódio (Merck) e sulfato de sódio (Merck), sulfeto de sódio nonahidratado (Merck), sulfito de sódio (Merck) e clorato de bário (Merck) em água ultrapura.

4.3 Descontaminação de Materiais Diversos

O Gral e pistilo, assim como todas as vidrarias e materiais utilizados neste trabalho foram previamente descontaminados com solução de HNO_3 10 % (v/v), álcool etílico absoluto (Vetec) e água ultrapura. Os filmes de polietileno que foram usados como invólucros das amostras, foram descontaminados a partir da adaptação de procedimento proposto na literatura (PEREIRA *et al.*, 2014). Para isso, os invólucros foram imergidos em HNO_3 10% (v/v) por 24 h e, em seguida, os materiais foram lavados com água ultrapura e secos em capela de fluxo laminar. Para a celulose microcristalina e o amido, assim como os papéis filtro e discos empregados na MIC, além do procedimento anteriormente descrito, foi realizada uma etapa de

descontaminação em banho ultrassônico por 30 min com HNO₃ 5% (v/v) e, posteriormente, com álcool etílico absoluto e água ultrapura

A grafite foi descontaminada sob aquecimento em forno micro-ondas (Multiwave 3000) utilizando NH₄OH na concentração de 100 mmol l⁻¹ como solução absorvedora. Cabe destacar que para a realização desse procedimento foi utilizado um suporte de quartzo confeccionado especialmente para essa finalidade. O programa de aquecimento utilizado foi de 1400 W por 30 minutos e 0 W durante 20 minutos (CRUZ, 2013).

Os frascos e os suportes de quartzo, assim como os frascos de PTFE utilizados foram descontaminados com HNO₃ concentrado sob aquecimento em forno micro-ondas. O programa de irradiação empregado foi de 1400 W por 10 minutos, seguida de 20 minutos a 0 W (etapa de resfriamento). Previamente ao preparo de amostra por volatilização ou extração, esse procedimento de descontaminação foi repetido utilizando água ultrapura.

4.4 Amostras

As cinco matérias-primas utilizadas nesse trabalho oriundas das cidades de São Paulo (SP), Goiânia (GO) e Porto Alegre (RS) – Brasil foram adquiridas em farmácias de manipulação na cidade de Pelotas (RS) – Brasil. Estas matérias-primas foram denominadas como MP-1, MP-2, MP-3, MP-4 e MP-5.

Complementarmente, foram adquiridos medicamentos constituídos de CaCO₃ designado para o tratamento de hiperacidez gástrica e para a suplementação de cálcio no organismo. O medicamento para hiperacidez gástrica apresentava dosagens de 750 mg de CaCO₃ e foi fabricado em Saint Louis – EUA. Os medicamentos para a suplementação de cálcio foram oriundos das cidades de Caxias e Porto Alegre (RS) – Brasil e apresentavam as dosagens de 625 mg e 900 mg de CaCO₃, e continham 5 µg de vitamina D. Esses produtos foram denominados como PA-1, PA-2, e PA-3. Ambos medicamentos foram adquiridos na forma de comprimido em farmácias comerciais da cidade de Pelotas. Após a aquisição, os medicamentos foram macerados.

As matérias-primas e os medicamentos foram secos em estufa a 60 °C durante 4 h. Posteriormente foram armazenadas em frascos de polipropileno, previamente descontaminados com HNO₃ 10% (v/v) para posterior análise. Uma das matérias-

primas (MP-1) foi selecionada aleatoriamente para a realização das otimizações e posterior avaliação do método proposto para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por IC.

Por não haver um padrão de CaCO_3 com as concentrações de Cl^- e SO_4^{2-} certificada para avaliar a exatidão dos resultados obtidos com o método proposto, os materiais de referência certificados NIST 1515 (*Apple Leaves*), NIST 1547 (*Peach Leaves*) e NIST 8433 (*Corn Bran*) foram utilizados. Esses materiais foram previamente secos em estufa de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5 Determinação dos Teores de Umidade e Cinzas

Para a caracterização das amostras, foram realizadas as determinações dos teores de umidade e cinzas da matéria-prima e do produto acabado. O teor de umidade foi determinado conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, *Farmacopeia Brasileira*, 2010). Assim, para a realização dos experimentos, massas aproximadas de 1 g das amostras foram pesadas e transferidas para uma cápsula de porcelana previamente seca e descontaminada. A determinação do teor de umidade da matéria-prima e do produto acabado foi realizado em estufa na temperatura de 200 °C até a obtenção de peso constante.

Com relação ao de teor de cinzas, por não haver método específico descrito na Farmacopeia Brasileira, as determinações se procederam conforme método clássico gravimétrico para a determinação do teor cinzas de amostras ricas em carbonato (PEREIRA *et al.*, 2009). Para a realização dos experimentos, massas aproximadas de 1 g das amostras foram pesadas e transferidas para uma cápsula de porcelana de massa conhecida. Posteriormente, as amostras foram submetidas a temperaturas de 800 ± 50 °C em forno tipo mufla até peso constante.

4.6 Extração Assistida por Radiação Micro-ondas

Para a execução desse método, aproximadamente 1 g da matéria-prima ou do medicamento foram transferidos para frascos de PTFE, nos quais foram adicionados 6 ml de H_2O como solução extratora. Essa solução extratora foi utilizada de acordo com trabalhos relatados na literatura (PEREIRA, 2009; PEREIRA, 2014). Em seguida, os frascos foram fechados, fixados ao rotor e submetidos ao programa de irradiação com micro-ondas, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de irradiação utilizado na extração assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.

Etapa	Potência (W)	Tempo de permanência (min)	Exaustão
1	600	45	Fan 1
2	0	20	Fan 2*

Taxa de aumento de pressão: $0,5 \text{ bar s}^{-1}$, temperatura máxima: $240 \text{ }^\circ\text{C}$; pressão máxima: 60 bar; *Etapa de resfriamento.

As soluções obtidas após o término do programa de irradiação com micro-ondas foram filtradas em papel de filtração com porosidade média, previamente descontaminado com HNO_3 10% (v/v), diretamente para um balão volumétrico de 25 ml que foi aferido com água ultrapura. Por fim, as concentrações de Cl^- e SO_4^{2-} foram determinadas por IC.

4.7 Combustão Iniciada por Micro-ondas

Para a realização dos experimentos utilizando a MIC, as amostras foram envolvidas em filme de polietileno. Cabe mencionar que se optou por este modo de introdução da amostra no sistema de combustão em virtude de ser mais prático, apresentar menor possibilidade de perdas e maior segurança do operador quando comparado com o preparo de comprimidos (PEREIRA, 2014).

Posteriormente, a amostra foi disposta sobre o suporte de quartzo, que continha um disco de papel filtro previamente umedecido com $50 \mu\text{l}$ da solução de NH_4NO_3 6 mol l^{-1} , a qual tem sido utilizada como iniciador de combustão (MESKO, 2008). O suporte contendo a amostra foi transferido para o frasco de quartzo previamente preenchido com 6 ml de solução absorvedora, como pode ser observado na Figura 6.

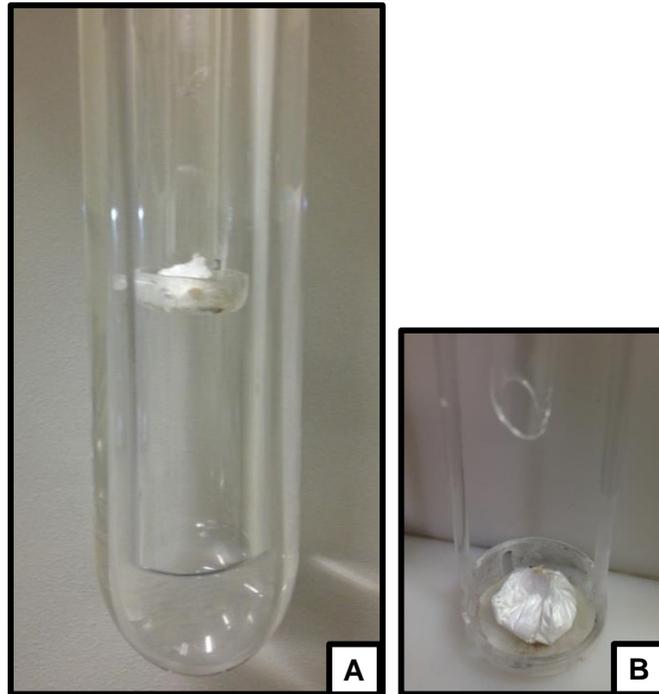


Figura 6. A) Frasco de quartzo contendo a solução absorvedora e suporte de quartzo e B) suporte de quartzo contendo a amostra na forma de invólucro e o papel filtro umedecido com 50 μl de NH_4NO_3 .

Por fim, os frascos foram fechados, fixados ao rotor, pressurizados com 20 bar de O_2 durante 50 segundos (Figura 7). Para isso, uma ponteira de PTFE foi posicionada no orifício utilizado para entrada/saída dos gases.

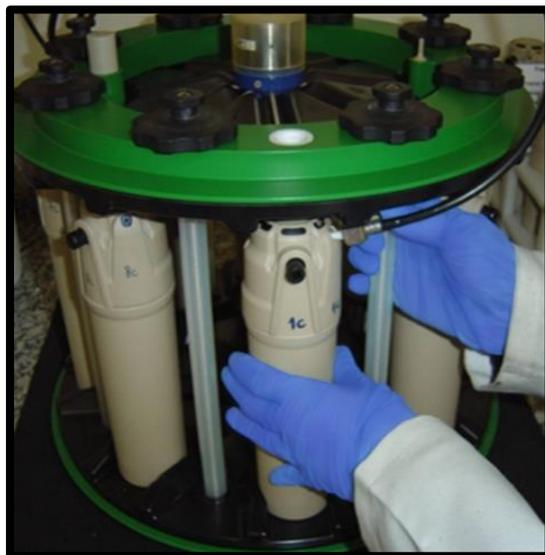


Figura 7. Fracos de quartzo fechados, fixados no rotor e sendo pressurizados com 20 bar de oxigênio.

Após os frascos serem pressurizados, colocou-se a capa de proteção no rotor e o sistema foi submetido ao programa de irradiação apresentado na Tabela 3. Cabe destacar que a massa de papel filtro utilizada como iniciador da combustão, a concentração e o volume de solução de NH_4NO_3 , assim como a pressão de O_2 utilizada no desenvolvimento deste método foram baseados em trabalhos anteriores (FLORES *et al.*, 2004; MESKO *et al.*, 2008).

Tabela 3. Programa de irradiação utilizado no processo de volatilização por combustão iniciada por micro-ondas.

Etapa	Potência (W)	Tempo de permanência	Exaustão
1	1400	50 s	Fan 1
2	0	1 min	Fan 1
3*	1400	0, 5 ou 10 min	Fan 1
4	0	20 min	Fan 2**

Taxa de aumento de pressão: $0,8 \text{ bar s}^{-1}$, temperatura máxima: $280 \text{ }^\circ\text{C}$; pressão máxima: 80 bar; *Etapa de refluxo a ser otimizada, **Etapa de resfriamento.

As soluções resultantes foram aferidas a 25 ml com água ultrapura e armazenadas para a posterior determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por IC. Além disso, comparativamente Cl^- foi determinado por ISE e SO_4^{2-} por UV-VIS. A seguir, são relatados todos os estudos de otimização realizados para a volatilização de Cl^- e SO_4^{2-} da matéria-prima e do medicamento através da MIC.

4.7.1 Avaliação do Tempo de Ignição e Combustão

O estudo foi realizado para avaliação do comportamento da amostra durante o processo de combustão na ausência e na presença dos auxiliares de volatilização (amido, celulose microcristalina e grafite). Além disso, o estudo teve como finalidade avaliar as diferentes etapas utilizadas no programa de aquecimento.

A partir disso, a capa de proteção de um dos frascos de quartzo foi adaptada com um corte frontal e, através dessa abertura, foi possível visualizar o processo de combustão. Além disso, esse estudo foi realizado com o equipamento disposto sem o uso da capa de proteção do rotor (Figura 8). No forno de micro-ondas foi utilizado um

programa recomendado para verificar a potência real irradiada (*power check*), pois esse programa não exige a utilização de todos os aparatos de segurança.

Os experimentos foram realizados utilizando 6 ml de H₂O ultrapura como solução absorvedora, 50 µl de uma solução de NH₄NO₃ 6 mol l⁻¹ como iniciador de combustão, e pressão de 20 bar de O₂, sendo que a irradiação de micro-ondas (1400 W) foi cessada após ser iniciada a reação de combustão.



Figura 8. Visualização da combustão de 100 mg de CaCO₃ com 300 mg de amido.

4.7.2 Escolha do Material Utilizado como Auxiliar de Volatilização

Tendo em vista que a amostra de CaCO₃ possui a matriz totalmente inorgânica e não reage com O₂, foi estudada uma forma de promover a volatilização dos analitos através da adição de um agente auxiliar. Nesse sentido, a amostra de CaCO₃ foi misturada com materiais que facilmente entram em combustão com o objetivo de propiciar o aumento da temperatura durante a sua combustão. Esse aumento de temperatura é fundamental para promover a volatilização dos analitos a partir da matriz da amostra.

Neste sentido, antes de iniciar o trabalho foram selecionados materiais que poderiam ser utilizados como auxiliares de volatilização, sendo avaliado a celulose microcristalina, o amido e a grafite. Primeiramente, com o intuito de avaliar a pureza desses materiais, foi realizado a determinação de Cl⁻ e SO₄²⁻ por IC. Para o procedimento, as amostras foram decompostas por MIC utilizando invólucros com 300

mg de amostra, e 6 mL de H₂O como solução absorvedora (Figura 9). O programa de aquecimento utilizado foi 1400 W (10 min), seguidos de 20 min para resfriamento dos frascos. Ao final, a solução obtida foi aferida para 25 mL com água.

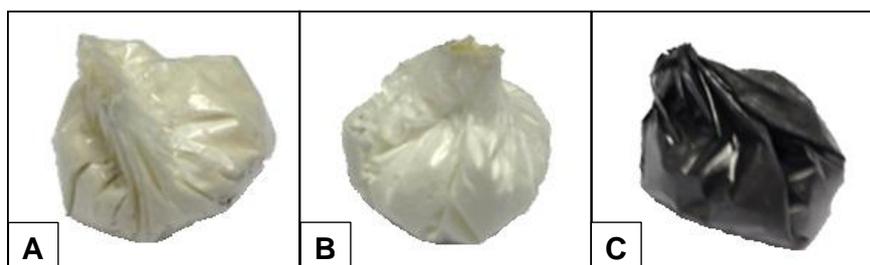


Figura 9. Auxiliares de volatilização a) amido, b) celulose microcristalina e c) grafite.

Para a escolha do auxiliar de volatilização, além do comportamento do material durante a queima – descritos no item 4.7.1 (*Avaliação do tempo de ignição e combustão - Materiais e métodos*) – foram avaliadas as concentrações de Cl⁻ e SO₄²⁻, uma vez que os valores dos brancos influenciam no LOD do método.

4.7.3 Otimização da Massa de Matéria-prima e Auxiliar de Volatilização

Foi feito um estudo para avaliar a massa máxima de CaCO₃ e de auxiliar de volatilização que poderia ser decomposta por MIC levando em consideração a pressão máxima do sistema e o aspecto do resíduo no suporte e da solução absorvedora. Para isso, foram preparados invólucros com massa fixa de 500 mg de auxiliar e foi variada a massa de CaCO₃ entre 100 e 500 mg. Os frascos foram, inicialmente, pressurizados com 20 bar de O₂ e as pressões durante a etapa de combustão, acompanhada através da pressão indicada no *software* do equipamento.

4.7.4 Avaliação da Solução Absorvedora e do Tempo de Refluxo

A avaliação da solução absorvedora foi realizada através de ensaios de recuperação. Para estas avaliações, foram adicionadas concentrações conhecidas de Cl⁻ e SO₄²⁻ (25 µ de uma solução contendo 500 mg l⁻¹ de Cl⁻ e 5000 mg l⁻¹ de SO₄²⁻) na condição de 100 mg de CaCO₃ misturada com 300 mg do auxiliar de volatilização. É importante mencionar que essa massa foi selecionada aleatoriamente. Com relação

a solução mais adequada para a absorção dos analitos volatilizados, foram avaliadas água ultrapura ou soluções de HNO_3 (100 ou 500 mmol l^{-1}), H_2O_2 (250 mmol l^{-1}), NH_4OH (50 mmol l^{-1}), NH_4CO_3 (50 mmol l^{-1}) e Na_2CO_3 3,2 mmol l^{-1} / NaHCO_3 1,0 mmol l^{-1} – solução utilizada como fase móvel na cromatografia de íons.

Após a escolha da solução mais adequada para absorver os analitos, foi feito um estudo relacionado ao tempo de refluxo após a volatilização dos analitos por MIC. Para este estudo, foram avaliadas condições com 0, 5 ou 10 minutos de irradiação com micro-ondas.

4.7.5 Avaliação da Possibilidade de Formação de Clorato, Sulfeto e Sulfito Após a Combustão

Além das otimizações do método, também foi feita a avaliação da conversão quantitativa de Cl e S para a forma dos íons Cl^- e SO_4^{2-} . Essa análise foi realizada visto que a formação de outras espécies como ClO_3^- , SO_3^{2-} e S^{2-} durante a combustão das amostras, não teriam o mesmo comportamento quando realizada a determinação por cromatografia de íons.

Nesse sentido, primeiramente, foi eluída uma solução de referência contendo 5 mg l^{-1} de ClO_3^- e 10 mg l^{-1} de SO_3^{2-} e S^{2-} para verificar os tempos de retenção destes íons. Posteriormente foi realizado a adição de concentração conhecida de ClO_3^- , SO_3^{2-} e S^{2-} (25 μl de uma solução contendo 500 mg l^{-1} de ClO_3^- , SO_3^{2-} e S^{2-}) em 100 mg de CaCO_3 misturado com 300 mg de amido utilizando HNO_3 0,1 mol l^{-1} como solução absorvedora previamente a decomposição e, posteriormente, foi realizada a análise da solução por IC.

4.8 Determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por IC

Após a execução do método proposto e da MW-AE, a determinação da concentração de Cl^- e SO_4^{2-} foi realizada por IC. Na Tabela 4 são apresentados alguns dos parâmetros que foram utilizados para a determinação.

Tabela 4: Parâmetros utilizados na determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por IC.

Parâmetros	IC
Fase móvel	3,2 mmol l^{-1} Na_2CO_3 /1,0 mmol l^{-1} NaHCO_3
Vazão do eluente	0,7 ml min^{-1}
Volume de injeção	20 μl
Modo de integração do sinal	Área de pico

As curvas de calibração utilizadas foram preparadas na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 mg l^{-1} a partir da diluição de soluções estoque de 100 mg l^{-1} de Cl^- e SO_4^{2-} , de acordo com o meio em que a amostra se encontrava no momento da análise. O objetivo disso foi evitar possíveis erros na etapa de determinação dos analitos.

4.9 Determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por ISE e UV-VIS

Comparativamente, com o intuito de avaliar a etapa de determinação do método proposto, foi realizada a determinação de Cl^- por ISE e de SO_4^{2-} por espectrofotometria na região do UV-VIS. Na Tabela 5 são apresentados alguns dos parâmetros utilizados para as determinações.

Tabela 5: Parâmetros utilizados na determinação de Cl^- por ISE e SO_4^{2-} por UV-VIS.

Parâmetros	Condições operacionais
ISE	
Solução para leitura	30 ml
Eletrodo para Cl^-	HI 4107
Proporção de tampão	1:50
UV-VIS	
Tipo de análise	Turbidimétrica
Comprimento de onda	420 nm
Precipitado	BaSO_4

As curvas de calibração utilizadas na determinação de Cl^- e SO_4^{2-} foram feitas com soluções de referência em diferentes faixas de concentração. Para Cl^- a faixa de concentração utilizada foi de 0,1 a 1,0 mg l^{-1} . Para e SO_4^{2-} a faixa de concentração foi

de 1 a 40 mg l⁻¹. Todas as soluções de calibração foram preparadas a partir de soluções estoque de 100 mg l⁻¹ de Cl⁻ e SO₄²⁻.

4.10 Limites de Detecção

O limite de detecção dos métodos avaliados foi realizado de acordo com método sugerido pelo Inmetro (INMETRO, 2010). Esse método é apresentado na Equação 1 e emprega a concentração em solução do branco da amostra como variável.

$$LOD = \bar{x} + t_{(n-1,1-\alpha)} \times S \quad \text{Equação 1.}$$

Nessa equação \bar{x} é a média das medidas do branco da amostra; t é um fator numérico oriundo da distribuição de *Student*, e S é o desvio padrão de no mínimo 7 medidas do branco da amostra. Em todos os casos as aferições, as massas de amostra e os fatores de diluição, quando necessários, foram considerados.

4.11 Avaliação da Exatidão dos Resultados Obtidos e Aplicação do Método Proposto

Após a otimização das condições do método proposto, foi avaliada a exatidão dos resultados obtidos com a utilização do método. Para isso, devido à ausência de um material de referência com os valores certificado para Cl⁻ e SO₄²⁻ em matriz semelhante à amostra, a avaliação da exatidão dos resultados obtidos com o método proposto foi realizada através de ensaios de recuperação com a adição de uma concentração conhecida dos analitos através de uma solução de referência de Cl⁻ e SO₄²⁻.

Além disso, foram realizados ensaios de recuperação na forma sólida através da mistura com um CRM. Para isso, foram utilizados 50 mg do CRM NIST 1515 (*Apple Leaves*) nas condições do método consideradas mais adequadas, sendo a determinação dos analitos realizada por IC. Ainda cabe salientar que, o CRM foi previamente seco em estufa de acordo com as recomendações do fabricante.

Outra maneira de avaliar a exatidão dos resultados obtidos pelo método proposto, seria a comparação dos resultados obtidos com os dos métodos oficiais.

Contudo, diante dos ensaios limites para Cl^- e SO_4^{2-} recomendados pela Farmacopeia Brasileira serem realizados através de uma comparação visual, estes fornecem apenas uma informação semiquantitativa e impossibilitam a comparação quantitativa dos resultados. Assim, os resultados do método proposto foram comparados com os obtidos após o preparo das amostras por MW-AE. Além disso, para avaliar a etapa de determinação, a concentração de Cl^- foi determinada por ISE e de SO_4^{2-} por UV-VIS.

Após a otimização dos parâmetros, o método proposto foi aplicado para a determinação da concentração de Cl^- e SO_4^{2-} nas matérias-primas de diferentes fabricantes. Adicionalmente, foi avaliada a aplicação do método para produtos acabados e, para isso, diferentes tipos de medicamentos constituídos de CaCO_3 foram analisados.

4.12 Aplicação do Método Proposto para o Produto Acabado

Adicionalmente, após estabelecidos os parâmetros mais adequados para o preparo da matéria-prima visando a posterior determinação de Cl^- e SO_4^{2-} , foi avaliada a aplicação do método para a análise do produto acabado. Primeiramente, o teor de CaCO_3 nos medicamentos avaliados foi estimado através de uma relação estequiométrica considerando o teor de cinzas das amostras. Posteriormente, considerou-se a massa de CaCO_3 mais elevada e a de auxiliar necessária para promover a volatilização quantitativa de Cl^- e SO_4^{2-} da matriz. Os demais parâmetros do método do proposto como, por exemplo, a solução absorvedora e o tempo de refluxo foram mantidos para essa avaliação.

A exatidão dos resultados obtidos utilizando o método proposto, foi avaliada através de ensaios de recuperação com a adição de concentrações conhecidas dos analitos a partir de uma solução de referência e na forma sólida através da mistura com CRM. Para as adições a partir de uma solução de referência, 25 μl de uma solução contendo 500 mg l^{-1} de Cl^- e 5000 mg l^{-1} de SO_4^{2-} foram adicionadas as amostras previamente a etapa de preparo. Para as adições na forma sólida, para a avaliação de Cl^- a amostra foi misturada a 60 mg do CRM NIST 1547, enquanto que para SO_4^{2-} foi misturada a 50 mg do CRM NIST 8433. A mistura foi introduzida no sistema na forma de invólucro e submetida as condições selecionadas para a matéria-prima.

4.13 Ensaio Limite Recomendados pela Farmacopeia para o Controle de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3

Os ensaios limite para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} são recomendados para uma grande variedade de matérias-primas. No entanto, para o controle específico de algumas matérias-primas, como é o caso de CaCO_3 , existem adequações para o preparo da amostra em virtude das características da matriz. Assim, os ensaios recomendados pelas Farmacopeias para a concentração limite de Cl^- e SO_4^{2-} consistem na dissolução do CaCO_3 em meio ácido. Para avaliar a concentração limite é realizada uma comparação visual entre a turbidez de uma solução de referência, preparada de acordo com os limites máximos estipulados para cada analito após a adição de um reagente precipitante.

4.13.1 Ensaio Limite para Cl^- em CaCO_3

O ensaio limite para Cl^- foi realizado através da adição de HNO_3 (1 mol l^{-1}) na amostra, sob agitação constante, até a completa dissolução. Posteriormente, foi preparada uma solução de referência, contendo a concentração de Cl^- de acordo com o limite máximo para o CaCO_3 . A partir disso, as soluções obtidas a partir da amostra e da solução de referência foram transferidas para tubos de ensaio, sendo acrescentados 1 ml da solução de AgNO_3 ($0,25 \text{ mol l}^{-1}$). Após serem diluídas e homogeneizadas, foram realizadas comparações visuais entre a turbidez da amostra e da solução de referência. Cabe salientar que a solução de referência foi preparada a partir de uma solução de HCl na concentração de $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ previamente padronizada.

4.13.2 Ensaio Limite para SO_4^{2-} em CaCO_3

Os ensaios limite para SO_4^{2-} foram realizados através da adição de HCl (3 mol l^{-1}) na amostra, sob agitação constante, até a completa dissolução. Após isso, as soluções foram aquecidas com o intuito de eliminar o CO_2 dissolvido. Posteriormente, foi preparada uma solução de referência, contendo a concentração de SO_4^{2-} de acordo com o limite máximo. As soluções obtidas a partir da amostra e da solução de referência foram transferidas para tubos de ensaio, sendo acrescentados 1 ml HCl (3 mol l^{-1}) e 3 ml da solução de BaCl_2 ($0,5 \text{ mol l}^{-1}$). Após serem diluídas e homogeneizadas,

foram realizadas comparações visuais entre a turbidez da amostra e da solução de referência. Cabe salientar que a solução de referência foi preparada a partir de uma solução de H_2SO_4 na concentração de $0,005 \text{ mol l}^{-1}$ previamente padronizada.

Em virtude de o método descrito pela Farmacopeia Brasileira ser recomendado apenas para a matéria-prima, foi realizada a avaliação da aplicação do método para o produto acabado. É importante mencionar que os produtos avaliados apresentavam diferentes características, principalmente em relação aos diferentes corantes e flavorizantes adicionados.

Na Figura 10 é mostrado um fluxograma dos experimentos realizados durante o desenvolvimento deste trabalho.

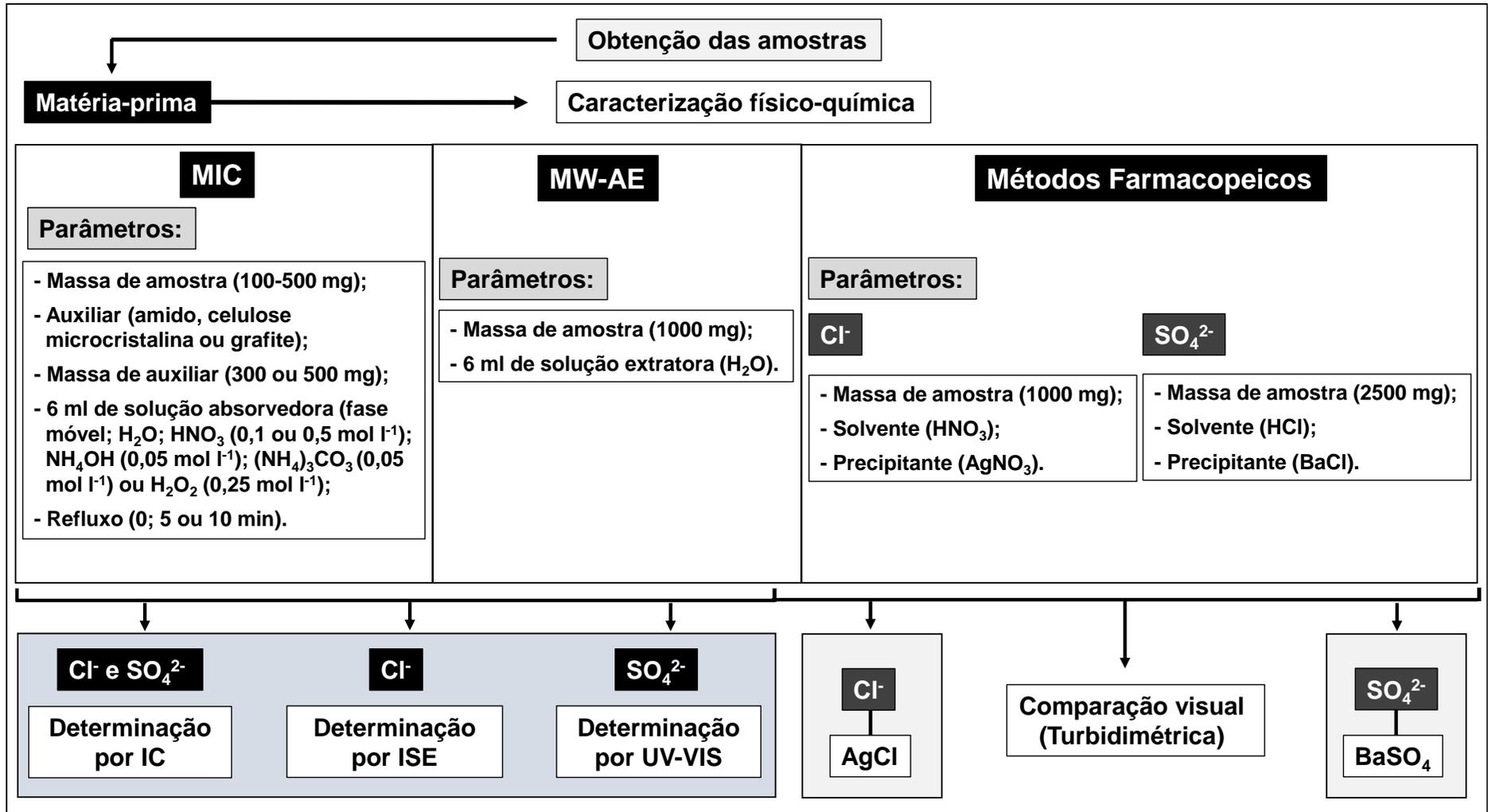


Figura 10. Etapas para a determinação de Cl⁻ e SO₄²⁻ em CaCO₃ através dos métodos avaliados e as etapas envolvidas nos métodos recomendados pela Farmacopeia Brasileira.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para as análises descritas no capítulo 4 (Materiais e métodos), os quais possibilitaram o desenvolvimento e avaliação dos procedimentos de preparo de amostras de CaCO_3 para a subsequente determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por IC.

A discussão dos resultados está subdividida em cinco partes principais. Na primeira delas, serão discutidos os resultados obtidos relacionados a caracterização físico-química das amostras. Na segunda parte serão discutidos os resultados obtidos após o preparo das amostras por MW-AE. Na terceira parte serão apresentados os resultados relacionados as otimizações para a volatilização de Cl^- e SO_4^{2-} da matéria-prima e do produto acabado. Na quarta parte, serão apresentados os resultados obtidos para os ensaios limites recomendados pela Farmacopeia Brasileira para Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 . Na quinta e última parte, serão apresentadas algumas observações frente aos métodos avaliados e os ensaios limites recomendados pela Farmacopeia Brasileira.

5.1 Determinação do Teor de Umidade e Cinzas

A determinação do teor de umidade é de extrema relevância para o desenvolvimento do método proposto, tendo em vista que a água presente nas amostras, pode influenciar no processo de volatilização. Além disso, a realização desse experimento é importante para a correta expressão dos resultados obtidos.

Com relação ao teor de cinzas, esta análise foi realizada com intuito de identificar a parcela inorgânica das matérias-primas e dos medicamentos avaliados. Além disso, foi realizada uma relação estequiométrica para estimar o teor de CaCO_3 nas diferentes amostras avaliadas. Para isso foi considerado que as cinzas formadas são constituídas majoritariamente de CaO . Na Tabela 6 são apresentados os teores de umidade e de cinzas médios obtidos para as amostras.

Tabela 6. Teores de umidade, cinzas e CaCO_3 médios obtidos para as matérias-primas e produtos acabados avaliados ($\bar{x} \pm \text{sd}$, %, n = 3).

Amostras	Umidade	Cinzas	CaCO_3
MP-1	< 1	58,5 ± 1,8	104 ± 4,6
MP-2	< 1	59,1 ± 1,4	106 ± 6,2
MP-3	< 1	57,2 ± 1,9	102 ± 3,4
MP-4	< 1	58,4 ± 2,8	104 ± 5,0
PA-1	1,5 ± 0,1	25,3 ± 0,2	45,1 ± 0,4
PA-2	1,8 ± 0,1	42,7 ± 0,2	76,3 ± 0,3
PA-3	1,3 ± 0,1	48,3 ± 0,2	86,3 ± 0,4

Como pode ser observado, não houve grande variação entre os teores de umidade entre as matérias-primas e os produtos acabados avaliados. Os teores observados para a matéria-prima, encontram-se de acordo com o valor estabelecido pela Farmacopeia Brasileira que é de até 2%. Embora os resultados obtidos para o teor de umidade das amostras não sejam elevados, para manter a condição de queima homogênea e os resultados mais precisos, as amostras foram previamente secas em estufa a aproximadamente 65 °C até peso constante e em seguida armazenadas em recipientes fechados.

Em relação ao teor de cinzas, pode-se observar que embora os produtos acabados avaliados apresentem um considerável percentual inorgânico (faixa de

cinzas de 25,3 a 48,3%), os teores de cinzas obtidos para as matérias-primas foram bastante superiores (faixa de cinzas de 57,2 a 59,1%). Esse resultado já era esperado, em virtude de a matéria-prima avaliada apresentar composição totalmente inorgânica constituída de aproximadamente 100% de CaCO_3 . Entretanto, através de uma relação estequiométrica, pode-se inferir que os medicamentos avaliados apresentaram uma faixa de CaCO_3 de 45,1-86,3%. Cabe mencionar que esses resultados serão considerados posteriormente visando avaliar a aplicação do método proposto para a matéria-prima e para o produto acabado.

5.2 Extração Assistida por Radiação Micro-ondas

As técnicas de extração utilizando diferentes tipos de soluções extratoras têm sido bastante utilizadas para a determinação de diversas espécies em amostras com elevado teor de constituintes inorgânicos, como é o caso das amostras avaliadas. Ademais, para alguns casos, até mesmo água pode ser utilizada como solução extratora (PEREIRA, 2009; PEREIRA, 2014). Diante disso, para a comparação entre os resultados, foi avaliada a possibilidade de extrair Cl^- e SO_4^{2-} da matéria-prima e, adicionalmente, do produto acabado, utilizando o método de MW-AE.

Com base nesse estudo foi possível observar que para o produto acabado, o aspecto da solução obtida após a extração apresentou uma coloração escura (Figura 11 A e B). Esse resultado, possivelmente está atrelado a uma transformação química quando a amostra e a solução extratora foram submetidas a elevadas temperaturas (cerca de 200 °C). Além disso, nessas condições houve, possivelmente, a extração de outros compostos pertencentes aos excipientes, resultando em uma solução com aspecto escuro. Nesse sentido, visando preservar a integridade do equipamento, não foram realizadas as determinações de Cl^- e SO_4^{2-} por IC nas soluções obtidas quando os medicamentos foram submetidos a MW-AE.

Em contrapartida, quando o método de extração foi aplicado para a matéria-prima, a solução apresentou um aspecto límpido, o qual foi considerado adequado para a determinação dos analitos por IC (Figura 11 C). Isso se deu em virtude da matéria-prima apresentar composição inorgânica quase que em sua totalidade, não apresentando assim, substâncias orgânicas suscetíveis à alterações em função do meio extrator e das elevadas temperaturas.

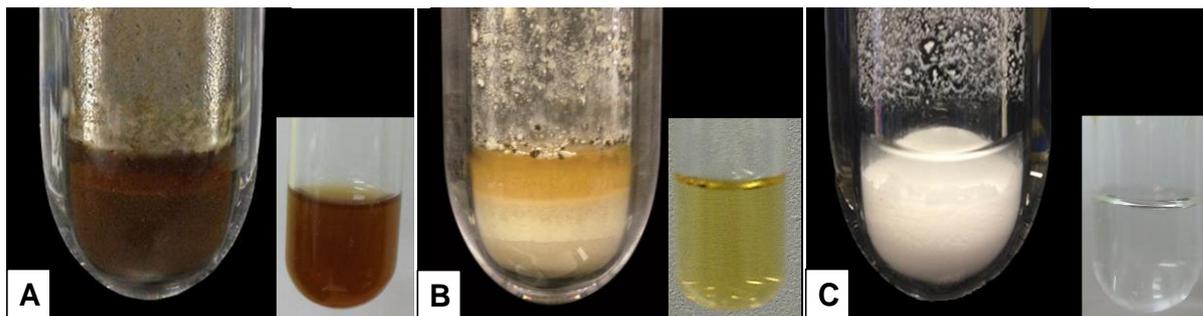


Figura 11. Aspecto da solução obtida após MW-AE utilizando água como solução extratora no A) produto acabado de coloração verde, B) de coloração branca e C) apenas na matéria-prima.

Por apresentar aspecto límpido, a solução resultante do método de extração para a matéria-prima foi analisada e a concentração de Cl^- e SO_4^{2-} foi determinada por IC. Com relação aos resultados, foram obtidas as concentrações de $20,7 \pm 4,9 \text{ mg kg}^{-1}$ para Cl^- e de $43,2 \pm 11 \text{ mg kg}^{-1}$ para SO_4^{2-} . Os elevados RSDs ($\sim 25\%$) observados estão, provavelmente, associados a limitada sensibilidade da técnica de determinação. Cabe mencionar que o LOD obtido para Cl^- e SO_4^{2-} foi de 5,5 e 30 mg kg^{-1} , respectivamente (considerando 1000 mg de amostra e a aferição de 25 ml). Posteriormente, esses resultados serão utilizados para a comparação das concentrações obtidas para a amostra após as otimizações do método proposto.

5.3 Volatilização por Combustão Iniciada por Micro-ondas

Diversos estudos foram realizados com o intuito de propiciar as melhores condições para a disponibilização de Cl^- e SO_4^{2-} do CaCO_3 através da MIC. A importância de tais estudos é justificada devido a amostra ser totalmente inorgânica, ou seja, uma amostra não combustível. Assim, em amostras com tais características, pequenas variações podem ocasionar diferenças significativas na liberação desses analitos da matriz. A seguir serão apresentados e discutidos os resultados referentes a todos os estudos realizados para a otimização deste novo método para preparo de matéria-prima (CaCO_3) visando a posterior determinação de Cl^- e SO_4^{2-} .

5.3.1 Tempo de Ignição e Combustão

Os tempos de ignição e de combustão da amostra na ausência e na presença de auxiliar de volatilização foram determinados visualmente e serviu como avaliação de alguns parâmetros como, por exemplo, para discussão dos resultados em relação aos auxiliares de volatilização. Na Tabela 7 é apresentado um resumo do que foi observado nesse estudo. Cabe mencionar que para a realização dos experimentos, foram utilizados 6 ml de H₂O ultrapura como solução absorvedora, 50 µl de uma solução de NH₄NO₃ 6 mol l⁻¹ como iniciador de combustão, e pressão de 20 bar de O₂, sendo que a irradiação de micro-ondas (1400 W) foi cessada após ser iniciada a reação de combustão.

Tabela 7. Tempos de ignição e combustão observados após queima de 100 mg de CaCO₃ misturadas com 300 mg de auxiliar de volatilização ($\bar{x} \pm sd$, s, n=3).

	Tempo de ignição (s)	Tempo de combustão (s)
Matéria-prima	6 ± 2	7 ± 3
Matéria-prima + amido	4 ± 2	31 ± 6
Matéria-prima + celulose	6 ± 1	17 ± 2
Matéria-prima + grafite	5 ± 2	50 ± 4

Como pode ser observado na Tabela 7, o tempo de ignição não varia significativamente quando utilizadas diferentes massas de medicamento ou quando foram misturados os auxiliares de volatilização. Esse resultado era esperado, visto que o tempo de ignição está relacionado com a interação da radiação micro-ondas com a solução de NH₄NO₃ responsável pela oxidação do papel filtro. Assim, mesmo mudando as características da constituição da amostra como nos casos da mistura da amostra com amido, celulose e grafite, o início da combustão não é alterado (COSTA, 2015; PEREIRA, 2014).

Com relação ao tempo de combustão, foi possível observar que quando foi feita a combustão apenas da amostra sem a adição de auxiliares de volatilização, o processo foi bastante rápido, provavelmente, devido a queima do papel filtro, uma vez que a matéria-prima (CaCO₃) não é combustível. Por outro lado, quando o CaCO₃ foi misturado com os auxiliares de volatilização, o tempo de duração da queima aumentou significativamente. Esse comportamento era esperado, uma vez que os

auxiliares são constituídos majoritariamente de C, H e O, ou seja, materiais combustíveis que são facilmente oxidados a CO_2 e H_2O .

Ainda com relação ao comportamento de queima dos auxiliares de volatilização, é importante mencionar que embora a grafite tenha apresentado maior tempo de combustão (50 ± 4 s) quando comparado com o amido (31 ± 6 s) e a celulose microcristalina (17 ± 2 s), uma queima heterogênea e com projeções da amostra nas paredes do frasco e na solução absorvedora foi observado. Vale destacar que quando utilizado amido e celulose microcristalina uma queima homogênea e sem projeções foi observada.

5.3.2. Escolha do Material Utilizado como Auxiliar de Volatilização

Para avaliar o material que seria mais adequado para ser utilizado com auxiliar na volatilização de Cl^- e SO_4^{2-} a partir do CaCO_3 , alguns parâmetros foram considerados como, por exemplo, o tempo e comportamento durante a combustão, o aspecto do resíduo no suporte e da solução absorvedora, além da pureza dos materiais em relação a concentração de Cl^- e SO_4^{2-} presente. Assim, os resultados obtidos para a concentração de Cl^- e SO_4^{2-} no amido, celulose microcristalina e grafite são apresentados na Figura 12.

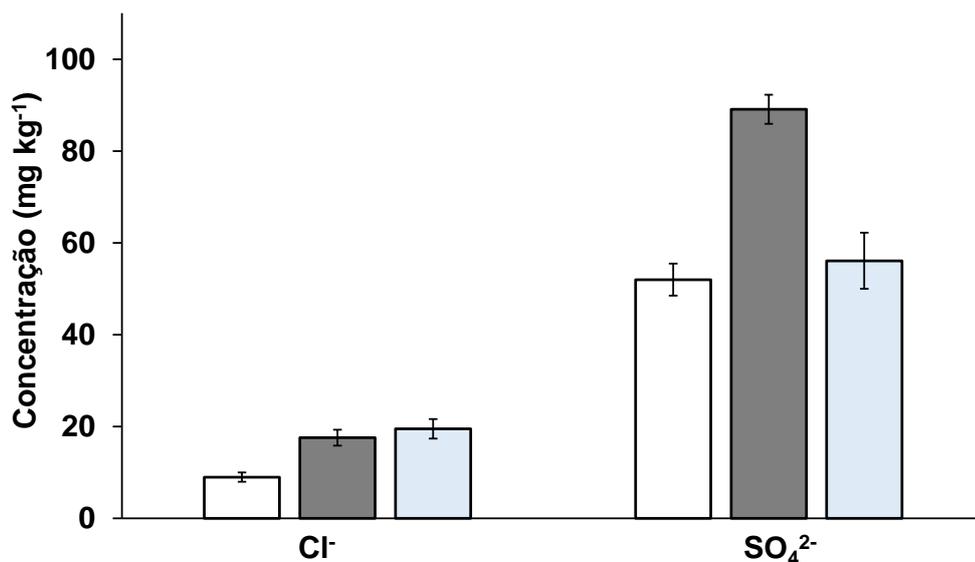


Figura 12. Concentração de Cl^- e SO_4^{2-} nos diferentes auxiliares de volatilização utilizados: □ amido; ■ celulose microcristalina e □ grafite.

Conforme pode ser observado na Figura 12, a celulose microcristalina utilizada nesse trabalho foi o auxiliar de volatilização que apresentou a maior concentração para ambos analitos, o que resultaria em maiores LODs para Cl^- e SO_4^{2-} em virtude dos valores dos brancos. Com relação a grafite conforme discutido no item 5.3.1 (Tempo de ignição e combustão – resultados e discussão), embora maiores tempos de combustão tenham sido observados, projeções no suporte e nas paredes do frasco também foram observadas.

Nesse sentido, por apresentar uma combustão homogênea, sem projeções e, nesse caso, menores concentrações de Cl^- e SO_4^{2-} , o amido foi selecionado como o auxiliar de volatilização mais adequado para a método proposto. Esse material, além de apresentar uma fácil manipulação e descontaminação, apresentam um baixo custo.

5.3.3 Avaliação da Pressão Máxima do Sistema de Combustão

Para os parâmetros de segurança do procedimento, assim como em outros trabalhos que visam o uso da MIC para a volatilização de elementos em amostras de difícil decomposição (PICOLATO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2016), a pressão do sistema foi avaliada em função do aumento da massa de amostra. Para tanto, foram preparados invólucros de polietileno da mistura de CaCO_3 e amido. A massa máxima de amido foi fixada em 500 mg e a massa de CaCO_3 foi variada entre 100 e 500 mg. Foi monitorada a pressão máxima atingida pelo sistema após a queima das amostras. Em todos os testes foram utilizados 6 mL de água como solução absorvedora, e a pressão de oxigênio inicial foi de 20 bar. Os resultados são apresentados na Figura 13.

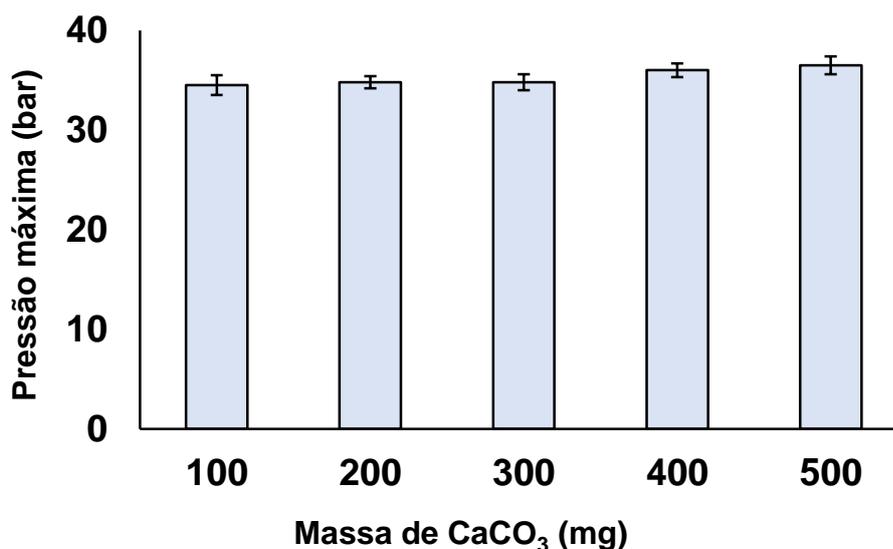


Figura 13. Pressão máxima atingida durante o procedimento de volatilização por MIC para o aumento da massa de matéria-prima utilizando 500 mg de amido (n=3).

A partir dos resultados obtidos, é possível perceber que com o aumento da massa de CaCO₃ não houve aumento significativo de pressão durante a etapa de combustão. Assim, o aumento da pressão ocorre, provavelmente, devido ao aumento da massa de amido. Sob este aspecto, cabe destacar que ao utilizar 500 mg de amido e a massa máxima de CaCO₃ (500 mg) a pressão máxima atingida (36,5 bar) foi bem inferior a pressão máxima de trabalho do equipamento que é de 80 bar. Assim sendo, o preparo da matéria-prima pelo método proposto pode ser considerado seguro, até mesmo quando utilizado a massa máxima de auxiliar de volatilização avaliada.

5.3.4 Avaliação da Solução Absorvedora na Recuperação de Cl⁻ e SO₄²⁻

A solução mais adequada para absorver os analitos foi investigada através de ensaios de recuperação. Para estas avaliações, concentrações conhecidas de Cl⁻ e SO₄²⁻ (25 µl de uma solução contendo 500 mg l⁻¹ de Cl⁻ e 5000 mg l⁻¹ de SO₄²⁻) foram adicionadas na condição de 100 mg de CaCO₃ misturada com 300 mg do auxiliar de volatilização. É importante mencionar que a amostra, e as massas de amostra e auxiliar foram selecionadas aleatoriamente. Com relação a solução mais adequada para a absorção dos analitos volatilizados, foram avaliadas água ultrapura ou soluções de HNO₃ (100 e 500 mmol l⁻¹), H₂O₂ (250 mmol l⁻¹), NH₄OH (50 mmol l⁻¹), NH₄CO₃ (50

mmol l⁻¹) e Na₂CO₃ 3,2 mmol l⁻¹/ NaHCO₃ 1,0 mmol l⁻¹ – solução utilizada como fase móvel na cromatografia de íons. Estas soluções foram selecionadas com base em estudos reportados na literatura para Cl⁻ e S (NÓBREGA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008 e 2009; NUNES *et al.*, 2015; KRZYZANIAK *et al.*, 2016). Na Figura 14 são apresentadas as recuperações obtidas para Cl⁻ e SO₄²⁻ após a volatilização por MIC para as soluções absorvedoras avaliadas.

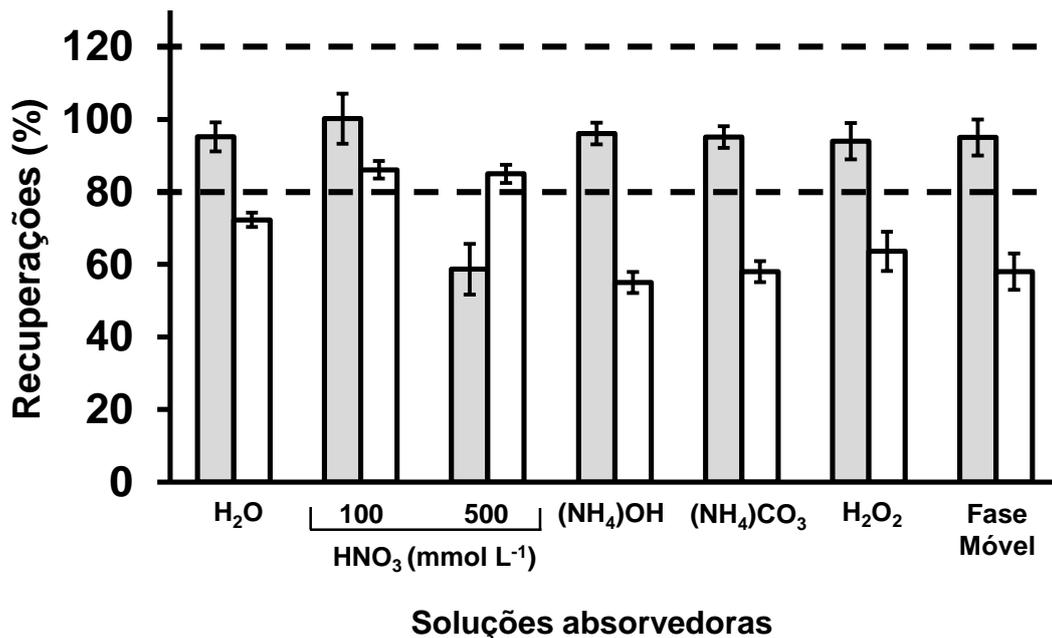


Figura 14. Recuperações obtidas para \square Cl⁻ e \square SO₄²⁻ com ensaio de recuperação em CaCO₃ após o preparo por MIC utilizando diferentes soluções absorvedoras. Determinação por IC ($\bar{x} \pm sd$, mg kg⁻¹, n=3).

Com relação aos resultados obtidos, recuperações insatisfatórias para Cl⁻ foram observadas apenas quando HNO₃ na concentração de 500 mmol l⁻¹ foi utilizado como solução absorvedora. Isso possivelmente está atrelado a perdas de Cl⁻ na forma de Cl₂ ou HCl associadas ao baixo pH da solução absorvedora após o preparo das amostras (solução com pH em torno de 2,0). Entretanto, é importante mencionar que ao utilizar HNO₃ na concentração de 100 mmol l⁻¹ como solução absorvedora, recuperações adequadas de Cl⁻ foram observadas nas soluções resultantes (pH em torno de 4,5). Esse valor de pH está associado, possivelmente, a lixiviação e formação parcial de CaOH após a lavagem do resíduo no suporte constituído basicamente de CaO. Quando comparadas as demais soluções absorvedoras, recuperações

adequadas de Cl^- foram observadas em todas soluções avaliadas (92 – 102%). Essas soluções apresentaram um pH em torno de 7,0 após o preparo da amostra.

É importante mencionar que para SO_4^{2-} , recuperações inadequadas foram obtidas para a maioria das soluções avaliadas. Isso está relacionado com a difícil tarefa em se determinar SO_4^{2-} em amostras de CaCO_3 e CaO uma vez que essas matrizes são utilizadas para a dessulfurização de gases de combustão em caldeiras de queima de combustíveis fósseis em processos industriais, através da formação de CaSO_4 (SOUND 2000; dos SANTOS, 2007;). Entretanto, é importante destacar que quando utilizado HNO_3 nas concentrações de 100 e 500 mmol l^{-1} recuperações adequadas para SO_4^{2-} foram obtidas. Isso possivelmente, pode estar associada a lixiviação de SO_4^{2-} durante a etapa de refluxo ou a disponibilização do íon para a solução, uma vez que pode ter ocorrido a formação parcial de CaSO_4 durante a liberação do analito da matriz. Maiores concentrações de HNO_3 não foram avaliadas em virtude de menores recuperações para Cl^- terem sido obtidas, além de uma coeluição observada sobre o pico do SO_4^{2-} quando utilizada maiores proporções de NO_3^- .

Diante do que foi apresentado, a solução de HNO_3 na concentração de 100 mmol l^{-1} foi selecionada para estudos posteriores, uma vez que possibilitou a recuperação para ambos analitos. Além disso, cabe mencionar que a solução selecionada é bastante diluída o que atrela menores custos, maior segurança para o analista e menor geração de resíduos.

5.3.5 Avaliação da Possibilidade de Formação de Clorato, Sulfeto e Sulfito após a Combustão

Para avaliar os tempos de retenção de diferentes espécies de Cl e S, primeiramente foi realizada uma análise cromatográfica de um padrão contendo concentrações conhecidas de ClO_3^- , S^{2-} e SO_3^{2-} . Na Figura 15 é apresentado o cromatograma obtido para o padrão quando adicionado 5 mg l^{-1} de clorato e 10 mg l^{-1} de sulfeto e sulfito em meio aquoso.

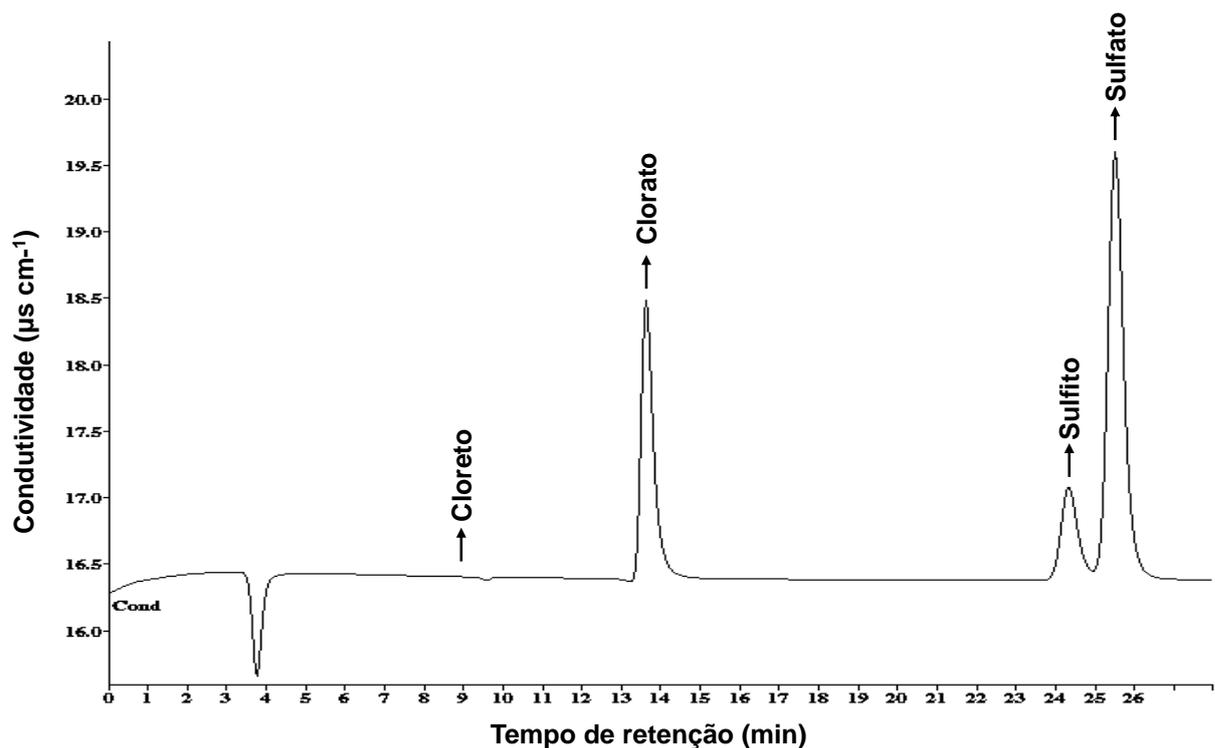


Figura 15. Cromatograma obtido para a solução de referência quando adicionado 5 mg l⁻¹ de clorato e 10 mg l⁻¹ de sulfeto e sulfito em meio aquoso.

Como pode ser observado na Figura 15, o tempo retenção do íon clorato (14 min) diferencia-se do tempo do íon cloreto (9 min). No entanto, para as soluções de referência contendo os íons sulfeto e sulfito, foi possível observar que há uma conversão parcial dos íons para a forma de sulfato (24,2 min). É importante mencionar que quando foram analisadas soluções de referência contendo concentrações conhecidas de sulfeto e sulfito individualmente, foi observado um compartimento bastante semelhante. Isso ocorreu, possivelmente devido a menor estabilidade do enxofre na forma desses íons em solução, os quais são oxidados para as suas formas mais estáveis (sulfito e sulfato).

Posteriormente foi realizado a adição de concentração conhecida de clorato, sulfito e sulfeto nas amostras previamente a decomposição e, posteriormente, foi realizada a análise da solução por IC. Na Figura 16 é mostrado o cromatograma obtido após a decomposição de 100 mg de CaCO₃ misturado com 300 mg de amido com a adição de clorato, sulfito e sulfeto.

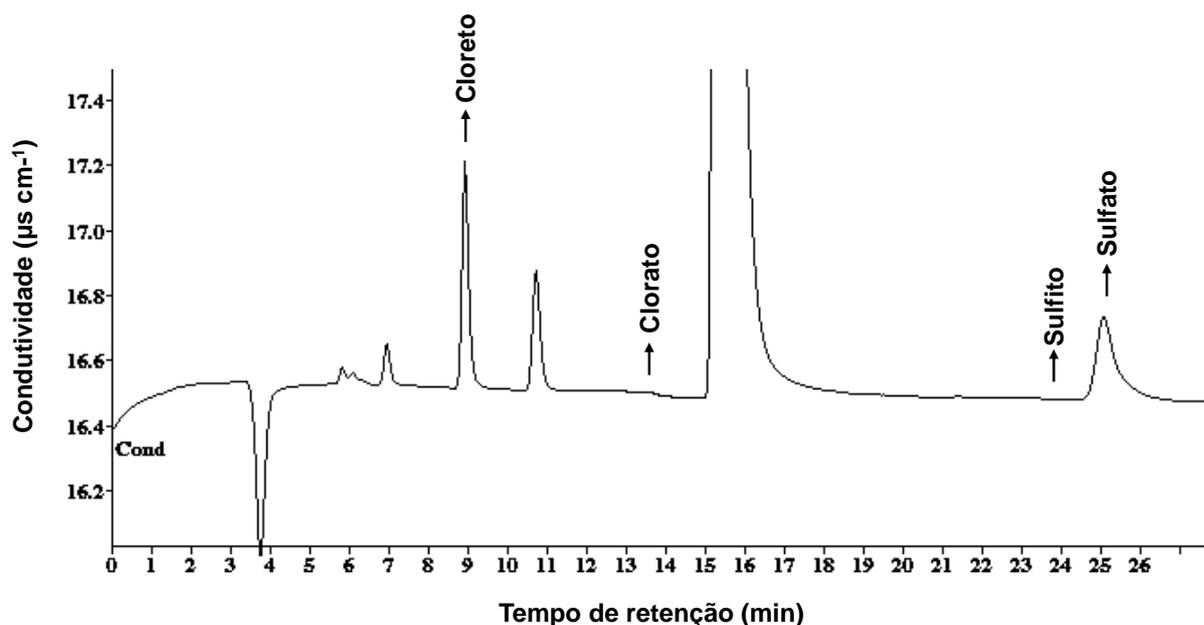


Figura 16. Cromatograma obtido para cloreto, clorato, sulfeto, sulfito e sulfato após a volatilização por MIC.

Diante desses resultados, pode-se verificar há a conversão total das espécies de Cl e S adicionadas a amostra de CaCO_3 em Cl^- e SO_4^{2-} durante a etapa de combustão. Quando realizada a adição de concentrações conhecidas de ClO_3^- , SO_3^{2-} e S^{2-} na matéria-prima misturada com amido na proporção de 100:300 mg, foram obtidas recuperações que variaram de 88 a 96% para Cl^- e SO_4^{2-} .

5.3.6 Avaliação da Etapa de Refluxo

A aplicação de uma etapa de refluxo com uma solução absorvedora adequada, após a etapa de combustão, pode garantir menores RSDs, bem como, recuperações quantitativas (FLORES *et al.*, 2004). Dessa forma, foram avaliados os tempos de 0, 5 ou 10 min para a etapa de refluxo utilizando HNO_3 na concentração de 100 mmol l^{-1} como solução absorvedora. Para essas avaliações foram realizadas adições de concentrações conhecidas de Cl^- e SO_4^{2-} ($25 \mu\text{l}$ de uma solução contendo 500 mg l^{-1} de Cl^- e 5000 mg l^{-1} de SO_4^{2-}) na condição de 100 mg de CaCO_3 misturada com 300 mg do auxiliar de volatilização. O programa de irradiação utilizado nesse estudo é o mesmo utilizado nos outros experimentos e apresentado na Tabela 3 (item 4.7. *Materiais e métodos*), com o diferencial de que o tempo de irradiação com micro-ondas

foi variado. As recuperações obtidas para Cl^- e SO_4^{2-} nestas condições estão apresentados na Figura 17.

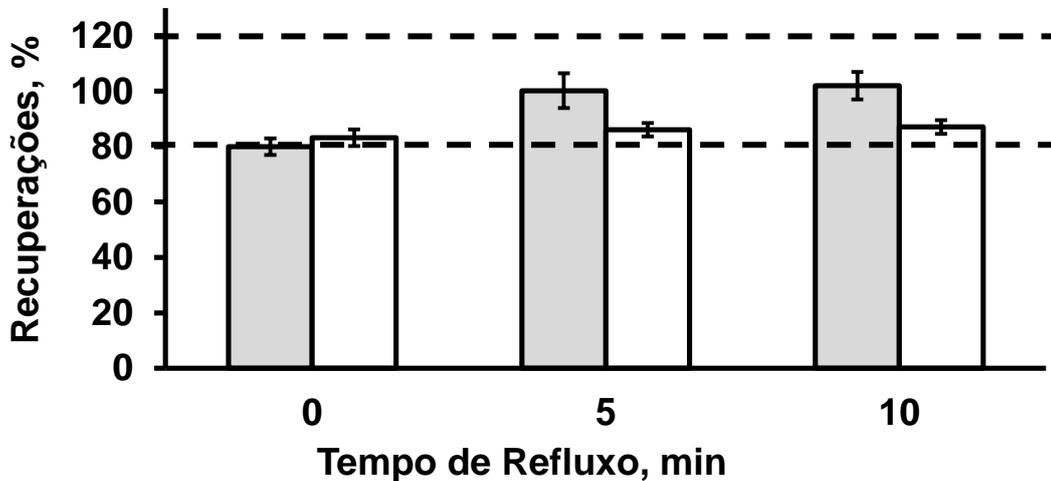


Figura 17. Recuperação de Cl^- e SO_4^{2-} na amostra de CaCO_3 após variação do tempo de refluxo no método de volatilização por MIC.

Com relação aos resultados obtidos, é possível perceber que somente houve diferença significativa (ANOVA, nível de confiança de 95%) para a concentração de Cl^- quando não utilizada a etapa de refluxo, ou seja, quando foi feita apenas a volatilização dos analitos. Nesse sentido, pode-se inferir que as menores concentrações de Cl^- observadas estão possivelmente associadas a volatilização incompleta de Cl^- no momento da combustão e a adsorção desse elemento nas paredes do frasco e/ou suporte. Além disso, isso também pode ser devido a perdas de cloro na forma de HCl e/ou Cl_2 em baixos valores de pH ($\sim 2,0$).

No entanto, após a realização de uma etapa de refluxo, possivelmente esse elemento foi transferido para a solução através da lixiviação a partir do resíduo ou a disponibilização do íon para a solução através da lavagem das paredes do frasco, suporte e resíduo. Além disso, quando realizada a etapa de refluxo, as soluções sempre apresentaram valor de pH acima de 4,0. Assim, diante dos resultados obtidos para ambos os elementos, o tempo de refluxo de 5 minutos foi adotado para o prosseguimento dos experimentos, visto que garantiu a recuperação quantitativa dos elementos sem necessitar de um maior tempo para a realização desta etapa.

5.3.7 Influência da Massa de CaCO_3 e de Amido

Tendo em vista que a amostra de CaCO_3 apresenta matriz inorgânica não combustível, foi avaliada a mistura de diferentes massas de amido a essa matéria-prima com o objetivo de alcançar elevada temperatura e, conseqüentemente, favorecer a volatilização completa dos analitos da matriz. Visando avaliar a influência da massa de CaCO_3 e amido, foram realizados ensaios de recuperação, com a adição de concentrações conhecidas de Cl^- e SO_4^{2-} (25 μl de uma solução contendo 500 mg l^{-1} de Cl^- e 5000 mg l^{-1} de SO_4^{2-}). Foram avaliadas massas de amido de 300 ou 500 mg e massas de CaCO_3 na faixa de 100 a 500 mg. Foi utilizado como solução absorvedora 6 mL de HNO_3 100 mmol l^{-1} para a posterior determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por IC. Os resultados referentes ao uso de 300 e 500 mg de amido estão apresentados na Figura 18 A e B.

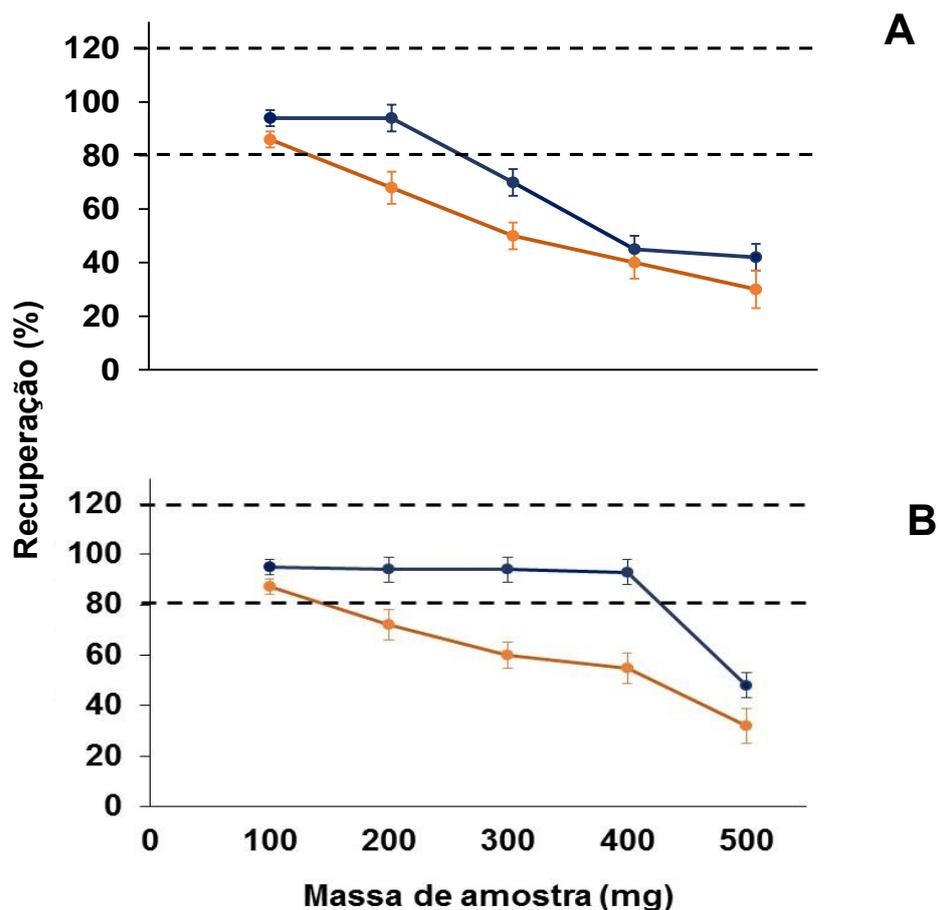


Figura 18. Avaliação da massa de CaCO_3 na volatilização de Cl^- e SO_4^{2-} com uso de A) 300 mg e B) 500 mg de amido. Como solução absorvedora foi utilizado HNO_3 100 mmol l^{-1} ($n = 3$).

Conforme verificado nas Figuras 18-A e B, as recuperações para a concentração de SO_4^{2-} foram diminuindo com o aumento da massa de CaCO_3 . Isso possivelmente está relacionado com a energia gerada na reação de combustão do amido não ser suficiente para a volatilização do analito da matriz. Ainda com relação aos resultados, foi possível observar que recuperações adequadas foram obtidas apenas quando utilizado massas de 100 mg de amostra independente da massa de amido utilizada (300 ou 500 mg).

Em relação as concentrações de Cl^- , recuperações satisfatórias foram obtidas para massas de até 200 mg de CaCO_3 quando 300 mg de amido foram utilizados como auxiliar de volatilização. Por outro lado, quando 500 mg de amido foram utilizados como auxiliar de volatilização, recuperações adequadas de Cl^- foram observadas para massas de até 400 mg de amostra.

Por sua vez, as recuperações para SO_4^{2-} foram obtidas apenas para a massa de 100 mg de CaCO_3 quando 300 ou 500 mg de amido foram utilizados como auxiliar de volatilização. Isso possivelmente está associada a maior dificuldade na disponibilização de S da matriz quando comparado com o Cl^- .

Esses resultados indicam que, caso fosse necessário, seria possível diminuir o limite de detecção do método para a determinação de Cl^- , no entanto, isso acarretaria na volatilização incompleta de S da amostra. Nesse sentido, a condição de 100 mg de CaCO_3 misturados a 300 mg de amido foi escolhida por ser considerada a mais adequada para a determinação de ambos analitos. Um fator importante que merece ser destacado é que a liberação dos analitos da matriz da amostra inorgânica e não combustível, ocorre através da energia fornecida pela decomposição do amido. Dessa forma, grande parte da amostra fica retida sobre a base do suporte de quartzo, como pode ser visto na Figura 19.



Figura 19. Aspecto da solução (A), e do resíduo no suporte (B) considerando o preparo de 100 mg de CaCO_3 + 300 mg de amido após a decomposição por MIC.

Assim, o método de combustão iniciada por micro-ondas se apresenta como uma alternativa promissora ao preparo das amostras de CaCO_3 visando a posterior determinação de Cl^- e SO_4^{2-} , visto que a volatilização dos analitos da matriz da amostra minimiza possíveis interferências durante a etapa de determinação. Isso se dá ao fato da separação dos componentes majoritários pertencentes a amostra da solução resultante para análise.

5.3.8 Avaliação da Exatidão e Precisão dos Resultados Obtidos e Limites de Detecção do Método Proposto

Após a seleção das condições mais adequadas para a volatilização dos analitos a partir da matriz da amostra, ou seja, a utilização de 100 mg de CaCO_3 misturada com 300 mg de amido, envoltas por invólucros de polietileno, na presença de HNO_3 100 mmol l^{-1} como solução absorvedora e com 5 min de refluxo, a exatidão foi avaliada.

Devido à ausência de CRMs de matrizes semelhantes que contivessem a concentração dos analitos, foram realizados ensaios de recuperação com adição de concentrações conhecidas de Cl^- e SO_4^{2-} a partir de uma solução de referência. Além disso, foram realizados ensaios de recuperação na forma sólida através da mistura de uma mistura de 50 mg do CRM NIST 1515 a 250 mg de amido e 100 mg da matéria-prima. Vale mencionar que o cálculo da recuperação da concentração certificada de S no CRM NIST 1515 foi realizada a partir de uma relação estequiométrica, considerando a conversão total do elemento para SO_4^{2-} . Além disso, foram realizadas adições de concentrações dos analitos relacionados aos limites máximos estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira para Cl^- e SO_4^{2-} no CaCO_3 . As proporções da amostra e dos CRMs utilizados foram estabelecidas considerando a massa de amostra otimizada. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Recuperações para Cl^- e SO_4^{2-} utilizando o CRM NIST 1515 ($\bar{x} \pm \text{sd}$, $n=3$).

Analito	Valor adicionado (mg kg^{-1})	Valor recuperado (mg kg^{-1})	Recuperação (%)
Cl^-	280 ± 11	265 ± 49	95
SO_4^{2-}	2768	2491 ± 172	90

Para o ensaio com o CRM, foram obtidas recuperações adequadas para ambos analitos. Além disso, para avaliar a exatidão dos resultados obtidos através do método proposto, foram realizadas adições 125 e 1250 mg kg^{-1} de Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente, a partir de uma solução de referência e recuperações adequadas foram obtidas ($100 \pm 4\%$ e $86 \pm 3\%$ para Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente).

5.3.9 Determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3

Após estabelecer as melhores condições para a volatilização de Cl^- e SO_4^{2-} por MIC e avaliar a exatidão, o método proposto foi aplicado para matérias-primas de diferentes fabricantes. Os resultados para Cl^- e SO_4^{2-} determinados por IC são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Concentrações de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 após volatilização por MIC e determinação por IC ($\bar{x} \pm \text{sd}$, mg kg^{-1} , $n=3$).

CaCO_3	Concentração mg kg^{-1}	
	Cl^-	SO_4^{2-}
MP-1	< 45*	178 \pm 13
MP-2	< 45*	168 \pm 12
MP-3	< 45*	< 142*
MP-4	< 45*	213 \pm 19
MP-5	< 45*	380 \pm 40

* LODs

Assim, com relação aos resultados obtidos para a matéria-prima, foi possível observar que as concentrações de Cl^- encontram-se abaixo do limite de detecção obtido para todas as amostras avaliadas. Entretanto, para SO_4^{2-} foi possível observar que houve uma grande variação nas concentrações (168 a 380 mg kg^{-1}), sendo que para uma das amostras analisadas, a concentração de SO_4^{2-} ficou abaixo do LOD. Nesse sentido, acredita-se que essa diferença possa estar associada a contaminações provenientes dos processos de produção ou armazenamento. Apesar disso, as concentrações dos analitos avaliados estão de acordo com os valores recomendados pela Farmacopeia Brasileira que é de até 350 e 2500 mg kg^{-1} para Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente.

Os LODs para Cl^- e SO_4^{2-} foram, respectivamente, de 45 e 142 mg kg^{-1} (considerando 100 mg de CaCO_3 + 300 mg de amido e 25 ml de solução final). Cabe mencionar que os LODs obtidos pelo método proposto possibilitam a determinação dos analitos em concentrações cerca de 8 e 18 vezes menores do que a concentração recomendada pela Farmacopeia Brasileira para Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente. É importante ressaltar que o uso de um volume menor de água ultrapura para a lavagem do frasco e suporte da amostra possibilitaria limites de detecção ainda menores. No entanto, isso poderia ocasionar a lavagem inadequada desses materiais e, conseqüentemente, na exatidão e precisão inadequadas do método.

Vale ressaltar que, quando as soluções obtidas após o preparo das amostras por MIC foram analisadas por ISE e UV-Vis visando a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente, os LODs (200 mg kg^{-1} para Cl^- e 978 mg kg^{-1} para SO_4^{2-}) não foram

adequados, inviabilizando a comparação dos resultados. Nesse sentido, cabe destacar que, além de apresentar a capacidade de determinação dos dois elementos em uma única análise, a IC possibilitou ao método proposto a obtenção de LODs em torno de seis vezes menores quando comparado com as demais técnicas de determinação utilizadas.

5.3.10 Determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em Medicamentos Constituídos de CaCO_3

Após a análise das matérias-primas, o método proposto foi avaliado para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} nos produtos acabados. Para isso, primeiramente como mencionado no item 5.1 (*Resultados e discussão*), foi estimado o percentual de CaCO_3 pertencente aos diferentes medicamentos avaliados. Diante dessa relação, foi considerada a proporção de matéria-prima (100 mg) e amido (300 mg) – utilizado com auxiliar de volatilização mais adequado – para a análise do medicamento.

Para avaliar a exatidão dos resultados, a amostra contendo o maior percentual de CaCO_3 (86%) e, considerada a mais complexa para a liberação de Cl^- e SO_4^{2-} , foi selecionada. Dessa forma os CRMs NIST 1547 e NIST 8433 foram misturados a amostra PA-3 na forma de um ensaio de recuperação. Para a realização desses experimentos, aproximadamente 100 mg de amostra + 240 mg de amido foram misturados com 60 mg de CRM 1547 para avaliar a exatidão dos resultados para Cl^- e, em um segundo momento, 100 mg do medicamento + 250 mg de amido foram misturados com 50 mg do CRM 8433 para avaliar a exatidão dos resultados obtidos para SO_4^{2-} . Cabe mencionar que em virtude do CRM NIST 8433 apresentar a concentração certificada para S, foi realizada uma relação estequiométrica considerando a conversão do elemento para SO_4^{2-} . As proporções de medicamento e dos CRMs utilizados foram estabelecidas considerando a massa de amostra otimizada e a concentração dos analitos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Recuperações para Cl⁻ e SO₄²⁻ em medicamento utilizando os CRMs NIST 1547 e NIST 8433 ($\bar{x} \pm sd$, n=3).

Analito	Valor adicionado	Valor recuperado	Recuperação
	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(%)
Cl ⁻ (CRM NIST 1547)	229 ± 12	237 ± 10	103
SO ₄ ²⁻ (CRM NIST 8433)	1313 ± 229	1192 ± 100	91

Dessa forma, como pode ser observado na Tabela 10, foram obtidas recuperações adequadas para ambos analitos, comprovando a exatidão dos resultados obtidos utilizando o método proposto. Cabe destacar que os RSDs, foram sempre entre 3 e 9% para ambos analitos. Após avaliar a exatidão dos resultados obtidos utilizando o método proposto, os diferentes medicamentos foram analisados por IC. As concentrações de Cl⁻ e SO₄²⁻ são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Concentrações de Cl⁻ e SO₄²⁻ em medicamentos constituídos de CaCO₃ após volatilização por MIC e determinação por IC ($\bar{x} \pm sd$, mg kg⁻¹, n=3).

Medicamento	Concentração	
	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
PA-1	71,0 ± 6,7	< 142
PA-2	298 ± 22	341 ± 5,6
PA-3	109 ± 1,5	< 142

Como pode ser observado na Tabela 11, houve uma grande variação nas concentrações de Cl⁻ (71,0 a 298 mg kg⁻¹) e SO₄²⁻ (< LOD a 341 mg kg⁻¹). Nesse sentido, possivelmente essa diferença possa estar associada a contaminações provenientes dos processos de produção e armazenamento ou pela presença de contaminantes nos excipientes ou na matéria-prima. As variações observadas para as concentrações de Cl⁻ e SO₄²⁻ nos medicamentos avaliados evidencia a necessidade de um controle de qualidade efetivo das concentrações destes elementos no produto acabado. Embora os limites de Cl⁻ e SO₄²⁻ sejam recomendados para a matéria-prima, cabe mencionar que os resultados obtidos para os medicamentos avaliados estão de acordo com os valores recomendados pelas Farmacopeia Brasileira.

5.4 Avaliação dos Ensaio Limite Recomendados pela Farmacopeia Brasileira para o Controle de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3

Conforme citado anteriormente (item 3.4 *Revisão Bibliográfica*), os ensaios limite recomendados pelas Farmacopeias para Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 são bastante semelhantes em relação às etapas de preparo e de determinação. Para o ensaio limite de Cl^- em CaCO_3 , a Farmacopeia Brasileira recomenda o preparo das amostras através da dissolução com HNO_3 . Esse método, conforme descrito no item 4.13 (*Materiais e Métodos*), baseia-se em uma comparação visual turbidimétrica com um reagente padrão. Para o preparo deste reagente padrão, foi realizada a adição referente a concentração limite de Cl^- na matéria-prima (350 mg kg^{-1}).

Cabe mencionar que a matéria-prima MP-1 foi selecionada para avaliar o ensaio, sendo este, também avaliado para os diferentes produtos acabados utilizados nesse trabalho. É importante destacar que os medicamentos avaliados apresentavam excipientes com diferentes colorações. Na Figura 20, são mostrados os aspectos das soluções obtidas para a matéria-prima (20 A), para os medicamentos (20 B-D) e para a solução de referência – 350 mg kg^{-1} de Cl^- - (20 E).

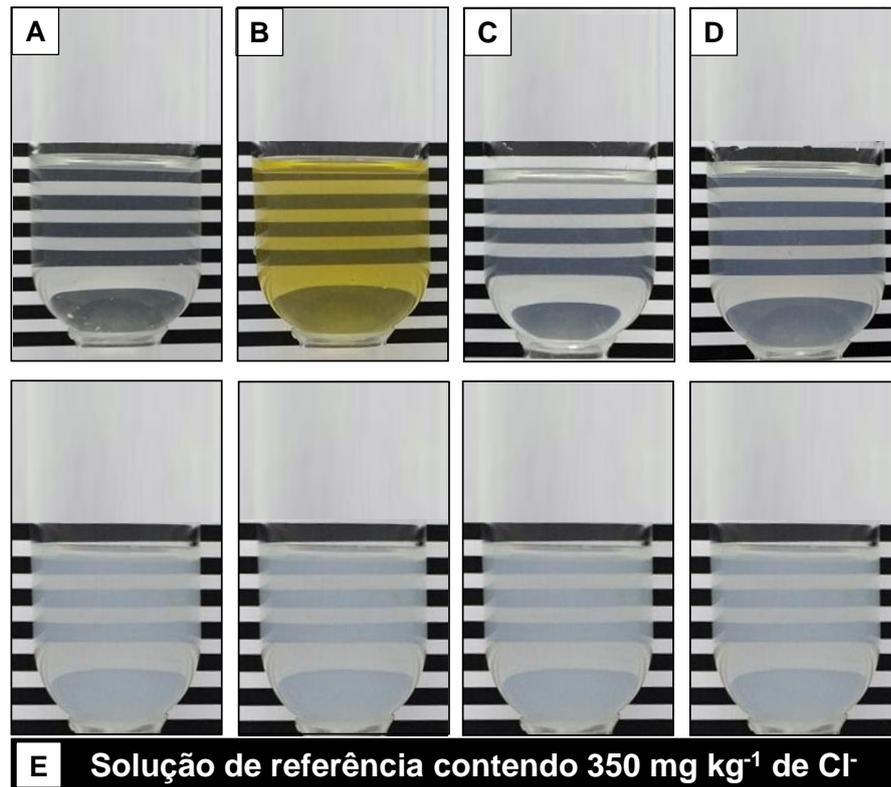


Figura 20. Aspecto das soluções obtidas para: (A) matéria-prima e para os medicamentos (B) PA-1 (C) PA-2 (D) PA-3 e (E) solução de referência contendo 350 mg kg^{-1} de Cl^- segundo o método descrito pela Farmacopeia Brasileira para o ensaio limite de Cl^- em CaCO_3

Com relação aos resultados, pode-se observar que a matéria-prima apresentou menor turbidez quando comparado com o reagente padrão. Nesse sentido, embora a matéria-prima seja aprovada no teste, o resultado da análise está diretamente relacionado com a acuidade visual do analista e a fatores como a luminosidade do ambiente. Quando o ensaio limite foi avaliado para os produtos acabados, as soluções apresentaram uma turbidez relacionada, principalmente, a dissolução dos excipientes, o que dificultou a comparação adequada entre a turbidez das soluções.

Para o ensaio limite de SO_4^{2-} em CaCO_3 , a Farmacopeia Brasileira recomenda o preparo das amostras através da dissolução com HCl . Esse método, conforme descrito no item 4.13 (*Materiais e Métodos*), baseia-se em uma comparação visual turbidimétrica. Para o preparo do reagente padrão, como mencionado para Cl^- , foi realizado a adição referente a concentração limite de SO_4^{2-} na matéria-prima (2500 mg kg^{-1}).

Cabe mencionar que a matéria-prima MP-1 foi selecionada para avaliar o ensaio, sendo este, também avaliado para os diferentes produtos acabados utilizados nesse trabalho. Na Figura 21, são mostrados os aspectos das soluções obtidas para a matéria-prima (21 A), para os medicamentos (21 B-D) e para a solução de referência – 2500 mg kg⁻¹ de SO₄²⁻ (21 E).

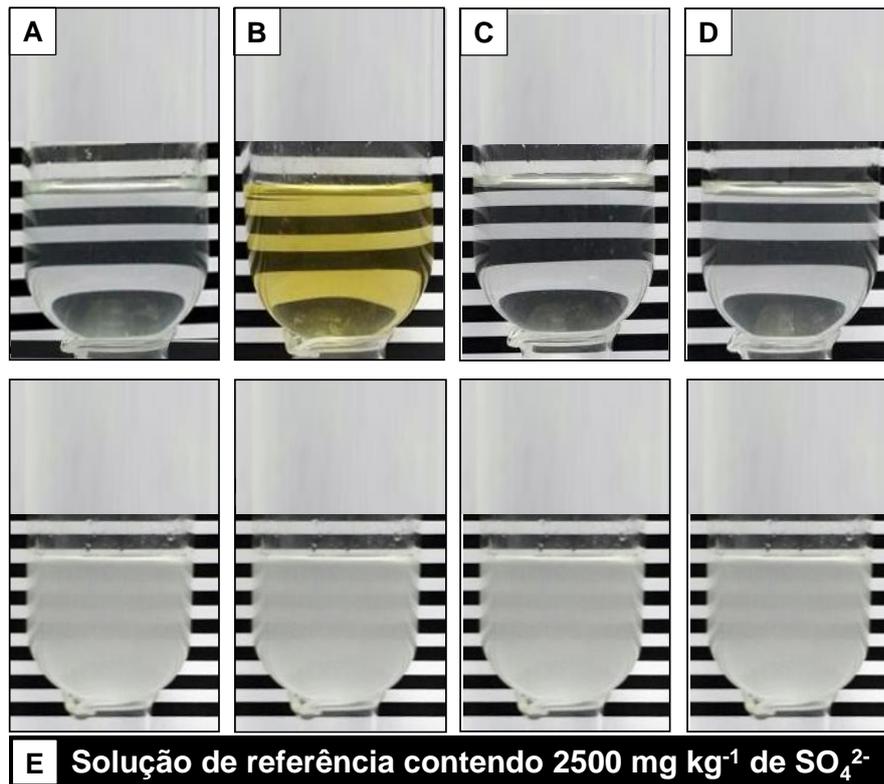


Figura 21. Aspecto das soluções obtidas para: (A) matéria-prima e para os medicamentos (B) PA-1 (C) PA-2 (D) PA-3 e (E) solução de referência contendo 2500 mg kg⁻¹ de SO₄²⁻ segundo o método descrito pela Farmacopeia Brasileira para o ensaio limite de SO₄²⁻ em CaCO₃.

Com relação aos resultados obtidos para SO₄²⁻, pode-se observar que a matéria-prima apresentou menor turbidez quando comparado com o reagente padrão. Nesse sentido, é possível verificar que, assim como o ensaio para Cl⁻, o resultado da análise está diretamente relacionado com a acuidade visual do analista e a fatores como a luminosidade do ambiente. Quando o ensaio limite foi avaliado para os produtos acabados, embora as amostras tenham apresentado menor turbidez quando comparado com o reagente padrão, a turbidez relacionada a dissolução dos excipientes pode dificultar a comparação adequada entre a turbidez das soluções.

Nesse sentido, diante dos resultados observados, é importante destacar que a os ensaios limite para Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 estão diretamente relacionados com a acuidade visual do analista e a fatores como a luminosidade do ambiente. Além disso, quando avaliada a possibilidade de analisar o produto acabado, excipientes capazes de conferir cor e turbidez a solução, podem dificultar a análise e até resultar em um falso positivo.

5.5 Comparação entre os Métodos de Preparo de Amostras Avaliados e os Ensaio Limite Recomendados pela Farmacopeia Brasileira

Com relação aos ensaios limites para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 , cabe salientar que além de fornecer uma informação semiquantitativa dos analitos através de uma comparação visual, estes ensaios monoelementares podem levar a resultados falsos. Ademais, estes ensaios são aplicáveis apenas para a matéria-prima, não sendo recomendados a produtos acabados. A extração assistida por radiação micro-ondas (MW-AE) avaliada nesse trabalho resultou em elevados RSDs para a extração de Cl^- e resultados inexatos para a concentração de SO_4^{2-} da matéria-prima. Além disso, a MW-AE não foi adequada para a extração dos analitos dos medicamentos, visto que a solução apresentou um aspecto inapropriado para a análise por IC.

Por fim, o método de volatilização de Cl^- e SO_4^{2-} a partir do CaCO_3 matéria-prima e produto acabado por MIC, mostrou-se adequado, pois além de permitir a determinação de ambos analitos em uma mesma análise cromatográfica, demonstrou baixos RSDs, elevada frequência de análise (decomposição de até 8 amostras simultaneamente) e pequena geração de efluentes. Nesse sentido, cabe destacar que a utilização de HNO_3 100 mmol l^{-1} como solução absorvedora reduz os custos com outros reagentes, e diminui os resíduos e os riscos. Na Tabela 12 é apresentado um resumo referente as principais características dos métodos avaliados neste trabalho.

Tabela 12. Principais características do método proposto e dos ensaios limite recomendados pela Farmacopeia Brasileira (FB).

Parâmetros	Volatilização por MIC	FB (Cl⁻)	FB (SO₄²⁻)
Analito (s)	Cl ⁻ e SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
Amostras	Matéria-prima e medicamento	Matéria-prima	Matéria-prima
Massa de amostra (g)	0,1	1,0	2,5
Reagentes	6 ml de HNO ₃ 0,1 mol l ⁻¹ ; 0,339 g de Na ₂ CO ₃ ; 0,084 g de NaHCO ₃ ; 0,3 g de amido.	10 ml de HNO ₃ 1,0 mol l ⁻¹ ; 1 ml de AgNO ₃ 0,25 mol l ⁻¹ ; 1 ml de HCl 0,01 mol l ⁻¹ .	20 ml de HCl 3,0 mol l ⁻¹ ; 3 ml de BaCl ₂ 0,5 mol l ⁻¹ ; 2,5 ml de H ₂ SO ₄ 0,005 mol l ⁻¹ .
Tempo de preparo de amostra (min)	26*	60	60
Nº de amostras preparadas por hora	Até 16	1 a 2	1 a 2
Determinação	IC, ISE ou UV-Vis	Visual	Visual
Tipo de determinação	Quantitativa	Semiquantitativa	Semiquantitativa

* Considerando apenas a etapa de preparo de amostra.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados apresentados, o método proposto para a volatilização de Cl^- e SO_4^{2-} do CaCO_3 matéria-prima e produto acabado por MIC e posterior determinação por IC foi considerado adequado. Além disso, o método apresenta características importantes para a aplicação em análises de rotina como, por exemplo, a segurança, a elevada frequência de análise (8 amostras simultaneamente) e o tempo reduzido de preparo da amostra (aproximadamente 26 minutos). Além disso, também se salienta o fato do método proposto estar de acordo com as tendências atuais para o preparo de amostras, como a mínima geração de resíduos, o uso de poucos reagentes, bem como a adequabilidade a outras técnicas de determinação como, por exemplo a ISE e a UV-VIS.

Cabe salientar que os ensaios limite recomendados pela Farmacopeia Brasileira para as concentrações de Cl^- e SO_4^{2-} em CaCO_3 , podem não ser adequados tendo em vista as etapas de preparo das amostras e de determinação recomendadas. Além de serem semiquantitativos e monoelementares, os ensaios farmacopeicos devem ser realizados com cautela, visto que por serem realizados por comparação visual, fornecem uma avaliação subjetiva e podem levar a resultados falsos em virtude da falta de acuidade visual do analista ou de outros fatores como a luminosidade do ambiente.

Quando avaliado a MW-AE, embora seja possível utilizar uma massa mais elevada de amostra quando comparada com a volatilização por MIC, este método não foi adequado para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} por IC. Embora não tenha sido possível a análise do medicamento por IC devido ao aspecto da solução, quando foi aplicado para a análise do princípio ativo os resultados apresentaram elevado RSD e inexatidão para as concentrações de SO_4^{2-} .

Após o método proposto ter sido aplicado para a análise de matérias-primas e produtos acabados, foi possível observar que há variação nas concentrações de Cl^- e SO_4^{2-} , o que evidencia a necessidade de um controle de qualidade efetivo das concentrações destes elementos. Entretanto, cabe mencionar que os resultados obtidos para ambos analitos nas matérias-primas avaliadas estão de acordo com os valores recomendados pelas Farmacopeia Brasileira que é de até 350 e 2500 mg kg^{-1} para Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente.

Com relação ao método proposto, este proporciona a separação dos analitos da matriz, minimizando possíveis interferências na etapa de determinação. Ademais o método possibilita a escolha da solução mais adequada para a absorção dos analitos, além da possibilidade do uso de uma etapa de refluxo, o que por sua vez, auxilia na recuperação quantitativa dos analitos. Além disso, este trabalho é o primeiro trabalho que propõem o preparo único para a determinação de Cl^- e SO_4^{2-} na matéria-prima e em medicamentos constituídos de CaCO_3 .

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S.; ISAB, A. A.; ALI, S.; AL-ARFAJ, A. R. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal base therapeutic agents. **Polyhedron**, v. 25, p. 1633-1645, 2006.

AHSAN, S.; KANECO, S.; OHTA, K.; MIZUNO, T.; SUZUKI, T.; MIYADA, M.; TANIGUCHI, Y. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead in calcium drug samples by direct atomization technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 362, p. 279-284, 1998.

AHSAN, S.; KANECO, S.; OHTA, K.; MIZUNO, T.; TANIGUCHI, Y. Direct determination of cadmium in calcium drug samples using electrothermal atomic absorption spectrometry with a metal tube atomizer and thiourea as a matrix modifier. **Talanta**, v. 48, p. 63–69, 1999.

ALLEN, H. E.; FU, G.; DENG, B. Analysis of acid-volatile (AVS) and simultaneously metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in the aquatic sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 12, p. 1441-1453, 1993.

ANDERSON, R. Decomposition and Dissolution of Inorganic Solids. In: ANDERSON, R. **Sample Pretreatment and Separation**. John Wiley & Sons, London, p. 29-80, 1987.

ANTES, F. G.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. L. M.; PANIZ, J. N. G.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Preparo de amostras de combustíveis fósseis por piroidrólise para a determinação de flúor e cloro. **Química Nova**, v. 33, p. 1130-1134, 2010.

ANTES, F. G.; PEREIRA, J. S. F.; ENDERS, M. S. P.; MOREIRA, C. M. M.; MÜLLER, E. I.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Pyrohydrolysis of carbon nanotubes for Br and I determination by ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 101, p. 54-58, 2012.

ANTOSZ, F. J.; XIANG, Y.; DIAZ, A. R.; JENSEN, A. J. The use of total reflectance X-ray fluorescence (TXRF) for the determination of metals in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 62, p. 17-22, 2012.

BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; KNAPP, G. Trends in sample preparation using combustion techniques. In: ARRUDA, M. A. Z. **Sample preparation**. Nova Science Publishersp, Graz, p. 53-83, 2006.

BARIN, J. S.; TISCHER, B.; PICOLOTO, R. S.; ANTES, F. G.; SILVA, F. E. B.; PAULA, F. R.; FLORES, E.M.M. Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: a critical study of digestion methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, p. 352-358, 2014.

BARIN, Juliano Smanioto. **Determinação de metais e não metais em produtos farmacêuticos após decomposição em sistema fechado por combustão iniciada por microondas**. 2003. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

BEAUCHEMIN, D. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 4786-4810, 2010.

BLOWER, P. J.; WOOD, K. A; HONESS, D. J.; MAXWELL, R. J.; WILSON, J.; PAUL, R. L.; O'DOHERTY;MARDSEN, P. K.; SANGHERA, B. Evaluation of the Effects of Blood Flow on ⁶⁴Cu-ATSM Uptake in a Rodent Tumour Model. **Clinical Oncology**, v.19, p. S50, 2007.

BRASIL, Farmacopeia Brasileira, 5ª Ed, volume 1 e 2, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

British Pharmacopoeia Commission medicines and healthcare products regulatory agency, MHRA, British Pharmacopoeia, Inglaterra, 2012.

BRUIJNINCX, P. C. A.; SADLER P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 197-206, 2008.

BU, X.; WANG, T.; HALL, G.; Determination of halogens in organic compounds by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v.18, p. 1443-1451, 2003.

Butcher, D. J., Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: A review, **Analytica Chimica Acta** v. 804, p. 1-15, 2013.

CASSAP, M. Using ICP-MS and ICP-OES to measure trace elemental impurities in pharmaceuticals in compliance with proposed pharmacopeia chapters. **Spectroscopy**, v. 26, p. 26-30, 2011.

CASSELLA, R. J.; PAULA, C. E. R.; CALDAS, L. F. S.; BRUM, D. M. Development of an ultrasonic slurry sampling method for the determination of Cu and Mn in antibiotic tablets by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 197-203, 2012.

CHRISTIAN, G. D., O'REILLY, J. E. **Instrumental analysis**. 2ed. Allyn and Bacon, London, 1986.

CID, B. P.; GONZALEZ, M. D.; GOMEZ, E. F. Comparison of single extraction procedures, using either conventional shaking or microwave heating, and the Tessier sequential extraction method for the fractionation of heavy metals from environmental samples. **Analyst**, v. 127, p. 681-688, 2002.

COELHO JUNIOR, Gilberto da Silva. **Determinação de halogênios e enxofre em casca de ovo usando a cromatografia de íons após a volatilização dos analitos por combustão iniciada por micro-ondas**. 2015. 78 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

COSTA, V. C.; PICOLOTO, R. S.; HARTWIG, C. A.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 7957-7964, 2015.

COHEN, S. M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, p. 115-120, 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Editora da UNICAMP, Campinas, 2006.

COSTA, A. C. S.; KRUG, F. J.; OLIVEIRA, E.; NÓBREGA, J. A.; MATIAS, T. B. Decomposição e solubilização de sólidos inorgânicos. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª ed. rev., CENA/USP, Piracicaba, p. 141-183, 2010.

CRIZEL, M. G.; HARTWIG, C. A.; NOVO, D. L. R.; TORALLES, I. G.; SCHMIDT, L.; MULLER, E. I.; MESKO, M. F. A new method for chlorine determination in commercial pet food after decomposition by microwave-induced combustion. **Analytical Methods**, v.7, p. 4315-4320, 2015.

CRUZ, Sandra Meinen. **Determinação de Halogênios em Grafite de Alta Pureza Após Volatilização Assistida por Radiação Micro-ondas**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

DERMONT, G.; BERGERON, M.; MERCIER G., RICHER-LAFLECHE, M. Soil washing for metal removal: A review of physical chemical technologies and field applications. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 1-31, 2008.

Dos Santos, Fabiane Binsfeld Ferreira. **Dissolução do Calcário no Processo de Dessulfurização de Gases de Combustão – Abordagem Experimental e Numérica**. 2007. 149f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

DRESSLER, V. L.; ANTES, F. G.; MESKO, M. F.; BARIN, J. S.; MOREIRA, C. M.; FLORES, E. M. M. Development of multi-elemental method for quality control of parenteral component solutions using ICP-MS, **Microchemical Journal**, v. 98, p. 144-149, 2011.

DUARTE, F. A.; BIZZI, C. A.; ANTES, F. G.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Organic, inorganic and total mercury determination in fish by chemical vapor generation with collection on a gold gauze and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 513-519, 2009a.

DUARTE, F. A.; PEREIRA, E. R.; FLORES, E. L. M.; MÜLLER, E. I.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Determinação espectrofotométrica de cloreto em cimento após preparo de amostra por piroidrólise. **Química Nova**, v. 36, p. 716-719, 2013.

DUARTE, F. A.; PEREIRA, J. S. F.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; KNAPP, G. Seafood digestion by microwave-induced combustion for total arsenic determination by atomic spectrometry techniques with hydride generation, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, p. 224-227, 2009b.

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM, European Pharmacopoeia 7th ed., França, 2010.

FAGNANI, E.; GUIMARÃES, J. R.; MOZETO, A. A.; FADINI, P. S. Sulfetos Volatilizáveis por Acidificação e Metais Extraídos Simultaneamente na Avaliação de Sedimentos de Água Doce. **Química Nova**, v. 34, p. 1618-1628, 2011

FERNANDES, J. C. B.; KUBOTA, L. T.; NETO, G. O. Eletrodos íon-seletivos: histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Química Nova**, v. 24, p. 120-130, 2001.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels – a brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B**, v.62, p. 1051-1064, 2007.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A.; KNAPP, G. Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination, **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 3525-3529, 2004.

FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; ARRUDA, M. A. Z. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª ed. rev., CENA/USP, Piracicaba, p.252-275, 2010.

FLORES, E. M. M.; BOLZAN, R. C.; RODRIGUES, L. F.; MATTOS, J. C. P.; DRESSLER, V. L. Chromium determination in pharmaceutical grade barium sulfate by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction, **Talanta**, v. 74, p. 119-124, 2007.

GIL, E. S.; **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**, 3ª ed., LMC-Pharmabooks ed., São Paulo, 2007.

GONÇALVES, M. E. P.; CAMÕES, M. F.; PAIVA, J. M., BENOLIEL, M. J.; CARNEIRO, R. N. Validação do Método de Determinação Simultânea dos Íons Brometo e Bromato por Cromatografia Iônica em Águas de Consumo Humano. **Química Nova**, v. 27, p. 503-507, 2004.

GÖRÖG, S. **Identification and determination of impurities in drugs**, 4th ed., Elsevier, Amsterdam, 2000.

GÖRÖG, S. The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 755-757, 2006.

GREENBERG, A. E.; CLESCERI, L. S.; EATON, A. D. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, Washington, 1992.

GU, W., ZHOU, C. Y., WONG, M. K., GAN L. M. Orthogonal array design (OAD) for the optimization of mercury extraction from soils by dilute acid with microwave heating. **Talanta**, v. 46, p. 1019-1029, 1998.

GUTSCHICK, K. A. **Lime and Limestone**. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. 4th Ed, John Wiley & Sons New York, p. 319-359, 1994.

KINGSTON, H. M.; WALTER, P. J.; CHALK, S.; LORENTZEN. E.; LINK, D. in: KINGSTON, H. M.; HASWELL, S. J. **Microwave - Enhanced Chemistry - Fundamentals, Sample Preparation and Applications**, ACS, Washington, 1997.

HARGIS, L. G. **Analytical chemistry: principles and techniques**. Prentice-Hall, New Jersey, 1988.

HUANG, J.; HU, X.; ZHANG, J.; LI, K.; YAN, Y.; XU, X. The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 227-234, 2006.

ICH: International Conferences on Harmonization, Draft Revised Guidance on Impurities in New Drug Substances. Q3A(R). **Federal Register**; 65(140):45085-45090, 2000.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008). Coordenação Geral de Acreditação, 2010. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf
Acessado em 07/04/2016.

JARVIS, K. E.; GRAY, A. L.; HOUK, R. S. **Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry**. Blackie, Glasgow, 1992.

KAUFFMAN, J. F.; WESTENBERGER, B. J.; ROBERTSON, J. D.; GUTHRIE, J.; JACOBS, A.; CUMMINS, S. K. Lead in pharmaceutical products and dietary supplements. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 128-134, 2007.

KNAPP, G. Mechanized techniques for sample decomposition and element preconcentration. **Microchimica Acta**, v. 104, p. 445-455, 1991.

KNAPP, G.; MAICHIN, B.; FECHER, P.; HASSE, S.; SCHRAMEL, P. Iodine determination in biological materials - options for sample preparation and final determination. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 362, p. 508-513, 1998.

KRATOCHVIL, B. G. Sampling and sample preparation for trace element analysis. In: MESTER, Z.; STURGEON, R.E. **Sample preparation for trace element analysis**. 1.ed., Elsevier, Amsterdam, p.1-21, 2003.

KREJCOVA, A.; KAHOUN, D.; CERNOHORSKY, T.; POUZAR, M. Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction. **Food Chemistry**, v. 98, p. 171-178, 2006.

KRUG, F. J.; BERGAMIN-FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G.; JORGENSEN, S. S. Rapid determination of sulphate in natural waters and plant digests by continuous flow injection turbidimetry. **The analyst**, v.102, p. 503-508, 1977.

KRZYZANIAK, S. R.; SANTOS, R. F.; NORA, F. M. D.; CRUZ, S. M.; FLORES, E. M. M., MELLO, P. A. Determination of halogens and sulfur in high-purity polyimide by IC after digestion by MIC. **Talanta**, v.158, p. 193–197, 2016

LAMBROPOULOS, J.; SPANOS, G. A.; LAZARIDIS, N. V.; INGALLINERA, T. S.; RODRIGUEZ, V. K. Development and validation of an HPLC assay for fentanyl and related substances in fentanyl citrate injection, USP. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 705–716, 1999.

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

LEWEN, N.; MATHEW, S.; SCHENKENBERGER, M.; RAGLIONE, T. A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.35, p. 739-752, 2004.

LIU, D. Q.; SUN, M.; KORD, A. S. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 999–1014, 2010.

MAGALHÃES, C. E. C.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª ed. rev., CENA/USP, Piracicaba, p. 184-251, 2010.

MANIASSO, N.; JACINTHO, A. O.; GINÉ, M. F. Determinação espectrofotométrica de sulfato em águas naturais empregando sistemas de injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 18, p. 147-150, 1995.

MELLO, P. A.; GIESBRECHT, C. K.; ALENCAR, M. S.; MOREIRA, E. M.; PANIZ, J. N. G.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Determination of Sulfur in Petroleum Coke Combining Closed Vessel Microwave-Induced Combustion and Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 41, p. 1623-1632, 2008.

MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; DUARTE, F. A.; BIZZI, C. A.; DIEHL, L. O.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7615-7642, 2013.

MESKO, M. F.; MELLO, P. A.; BIZZI, C. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1125-1131, 2010.

MESKO, Márcia Foster. **Determinação de halogênios em carvão, coque petroquímico e alimentos após combustão iniciada por microondas**. 2008. 156 f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S. F.; DIEHL, L. O.; MESKO, M. F.; DRESSLER, V. L.; PANIZ, J. N. G.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Evaluation of sample preparation methods for elastomers digestion for further halogens determination, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 563-570, 2010.

MULLER, A. L. H.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, p. 1889-1894, 2012.

NAM, K. H.; ISENSEE, R.; INFANTINO, G.; PUTYERA, K.; WANG, W. Microwave induced combustion for ICP-MS: A generic approach to trace elemental analyses of pharmaceutical products. **Spectroscopy**, v. 26, p. 36-41, 2011.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M.C.; SOUSA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Review: Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 61, p. 465-495, 2006.

NOGUEIRA, A. R. A.; MORAES, D. P.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; KNAPP, G.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Decomposições assistidas por radiação micro-ondas. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª ed. rev., CENA/USP, Piracicaba, p. 276-325, 2010.

NÖLTE, J. **ICP Emission spectrometry - a practical guide**. Wiley – VCH, New York, p. 267, 2003.

NOVIC, M.; DOVZAN, A.; PIHLAR, B., HUDNIK, V. Determination of chlorine, sulphur and phosphorus in organic materials by ion chromatography using electro dialysis sample pretreatment. **Journal of Chromatography A**, v.704 p. 530-534, 1995.

NUNES, T. S.; MULLER, C. C.; BALESTRIN, P.; MULLER, A. L. H.; MESKO, M. F.; MELLO, P. A.; MULLER, E. I. Determination of chlorine and sulfur in high purity flexible graphite using ion chromatography (IC) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) after pyrohydrolysis sample preparation. **Analytical Methods**, v.7, p. 2129-2134, 2015.

ORISAKWE, O. E.; NDUKA, J. K. Lead and cadmium levels of commonly administered pediatric syrups in Nigeria: A public health concern. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 5993-5996, 2009.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 99 p. 2201-2204, 1999.

PASCALICCHIO, A. **Contaminação por metais pesados: Saúde pública e medicina ortomolecular**, Annablume, São Paulo, Brasil, 2002.

PENG, B.; WU, D. Simultaneous determination of halogens (F, Cl, Br, and I) in coal using pyrohydrolysis combined with ion chromatography. **Fuel**, v. 94, p. 629-631, 2012.

PENG, B.; WU, D. Simultaneous Rapid Determination of Halogens in Clay Using Pyrohydrolysis Combined with Ion Chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 41, p. 1499-1504, 2013.

PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; MORAES, D. P.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Chlorine and sulfur determination in extra-heavy

crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 554–558, 2009.

PEREIRA, J. G.; OKUMURA, F.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G.; NÓBREGA, J. A. Termogravimetria: um Novo Enfoque Para a Clássica Determinação de Cálcio em Cascas de Ovos. **Química Nova**, v.32, p. 1661-1666, 2009.

PEREIRA, J. S. F., ANTES, F. G., DIEHL, L. O., KNORR, C. L., MORTARI, S. R., DRESSLER, V. L., FLORES, E. M. M, Microwave-induced combustion of carbon nanotubes for further halogens determination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, p. 1268-1274, 2010.

PEREIRA, J. S. F.; DIEHL, L. O.; DUARTE, F. A.; SANTOS, M. F. P.; GUIMARÃES, R. C. L.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Chloride determination by ion chromatography in petroleum coke after digestion by microwave-induced combustion. **Journal of Chromatography A**, v.1213, p. 249-252, 2008.

PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; MORAES, D. P.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Chlorine and sulfur determination in extra-heavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, p. 554-558, 2009.

PEREIRA, Rodrigo Mendes. **Combustão Iniciada por Micro-ondas: Um Método para a Volatilização de Cloro e Flúor em Cimento**. 2014. 86f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

PEREIRA, R. M.; COSTA, V. C.; HARTWIG, C. A.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. M. M.; DUARTE, F. A.; MESKO, M. F. Feasibility of halogen determination in noncombustible inorganic matrices by ion chromatography after a novel volatilization method using microwave-induced combustion. **Talanta**, v.147, p. 76-81, 2016.

PICOLOTO, R. S.; WILTSCHE, H.; KNAPP, G.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Mercury determination in soil by CVG-ICP-MS after volatilization using microwave-induced combustion. **Analytical Methods**, v. 4, p. 630-636, 2012.

PICOLOTO, R. S.; WILTSCHE, H.; KNAPP, G.; MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Determination of inorganic pollutants in soil after volatilization using microwave-induced combustion. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 123–130, 2013.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J. Determination of trace elements in biological materials by ETV-ICP-MS after dissolution or slurry formation with tetramethylammonium hydroxide. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, p. 1101–1105, 1998.

PRISTA, L. V. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. *Tecnologia Farmacêutica*. 6. ed.v.1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

QUE JR, L.; BANCI, L. Bioinorganic Chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.6, p.169-170, 2002.

QUINTAES, K. D.; FARFAN, J. A.; TOMAZINI, F. M.; MORGANO, M. A.; MANTOVANI, D. M. B. Migração de minerais de painéis brasileiros de aço inoxidável, ferro fundido e pedra-sabão (esteatito) para simulantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 397-402, 2004.

RAO, R. N.; TALLURI, M. V. N. K. An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p. 1-13, 2007.

RAZIC, S.; DOGO, S.; SLAVKOVIC L.; POPOVIC, A. Inorganic analysis of herbal drugs. Part I. Metal determination in herbal drugs originating from medicinal plants of the family Lamiaceae. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.70, p. 1347–1355, 2005

RICE, T. D. Determination of fluorine and chlorine in geological materials by induction furnace pyrohydrolysis and standard-addition ion-selective electrode measurement. **Talanta**, v. 35, p. 173-178, 1988.

RODRIGUES, M. A.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Compostos Inorgânicos como Fármacos. **Boletim da sociedade portuguesa de química**, v. 2, n. 15. p. 25-20. 2009.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1633-1648, 2007.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-699, 1965.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5ª ed., LTC, Rio de Janeiro, 1994.

SOUD, H. N. **Developments in FGD**. *IEA Coal Research*, CCC/29, 85pp, 2000.

TAN, S. H.; HORLICK, G. Background spectral features in inductively coupled plasma/mass spectrometry. **Applied Spectroscopy**. v.40, p. 445-460, 1986.

TANNER, S.D.; BARANOV; V.I.; BANDURA, D.R., Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review, **Spectrochimica Acta Part B**. v.57, p. 1361-1452, 2002.

THOMAS, R.A. Beginner's guide to ICP-MS: Part III: The plasma source. **Spectroscopy**, v. 6, p. 26-31, 2001a.

THOMAS, R. A. Beginner's guide to ICP-MS: Part IV: The interface region. **Spectroscopy**, v. 7, p. 26-34, 2001b.

THOMAS, R. A. Beginner's guide to ICP-MS: Part VI: The mass analyzer. **Spectroscopy**, v. 10, p. 44-49, 2001c.

TORALLES, Isis Gonçalves. **Desenvolvimento de Método para Determinação de Halogênios e Enxofre em Ovos Integrais e suas Frações**. 2015. 113f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

United States Pharmacopeial Convention, USP, United States Pharmacopoeia 35 – National Formulary 30, EUA, 2012.

VAN ELDIK, R. Fascinating inorganic/bioinorganic reaction mechanisms. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1649-1662, 2007.

VAN HOECKE, K.; CATRY, C.; VANHAECKE, F. Optimization of sample preparation and a quadrupole ICP-MS measurement protocol for the determination of elemental impurities in pharmaceutical substances in compliance with USP guidelines. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, p. 1909-1919, 2012.

YEH, C. F.; JIANG, S. J.; HIS, T. S. Determination of sulfur-containing amino acids by capillary electrophoresis dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.502, p 57-63, 2004.

WANG, T.; WALDEN, S.; EGAN, R. Development and validation of a general. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, p. 593–599, 1997.

WU, J.; TAN, Y.; WANG, Y.; XU, R. Toxic metal contamination in *Artemisia annua* L. herbal preparations from different commercial sources in China. **Journal of Natural Medicines**, v.65, p. 656-661, 2011.

ZACHARIADIS, G. A.; KAPSIMALI, D. Development of a rapid multi-element method of analysis of antitussive syrups by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and direct sample introduction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, pp. 1212-1219, 2006.

ZENKI, M.; IWADOU, Y. Repetitive determination of chloride using the circulation of the reagent solution in closed flow-through system. **Talanta**, v. 58, p. 1055-1061, 2002.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 481-489. 2003.