

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

AUGUSTO KÜLZER MENDONÇA

**VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL COMO ALTERNATIVA NA
FISCALIZAÇÃO DE METAIS PESADOS EM EXTRATOS VEGETAIS
USADOS EM SOLUÇÃO ORAL DIGESTIVA**

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

AUGUSTO KÜLZER MENDONÇA

**VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL COMO ALTERNATIVA NA
FISCALIZAÇÃO DE METAIS PESADOS EM EXTRATOS VEGETAIS
USADOS EM SOLUÇÃO ORAL DIGESTIVA**

Trabalho de Conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Projeto tecnológico - Química” do Curso de Bacharelado em Química Industrial como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre
Batista Schneider

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Mendonça, Augusto Külzer

Voltametria de pulso diferencial como alternativa na fiscalização de metais pesados em extratos vegetais usados em solução oral digestiva. / Augusto Külzer Mendonça. -- 2021.

52 f.

Orientador: Alexandre Batista Schneider.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Curso de Química Industrial, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Voltametria de redissolução anódica. 2. Pulso diferencial. 3. Cadmio. 4. Chumbo. 5. Extratos vegetais. I. Schneider, Alexandre Batista, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Cátia e Luis, por toda força e incentivo para que eu tivesse uma educação de qualidade e buscasse os meus sonhos. Seus princípios e ensinamentos me fizeram a pessoa que eu sou hoje. Ao meu irmão Afonso por todo incentivo e reconhecimento. Agraço também, a todos da minha família que, cada um da sua maneira, me deram apoio nessa jornada. Agradeço à minha namorada, Valentina Aubim, pelo apoio e por toda a compreensão com dias e noites necessárias para estudos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Schneider por todo o suporte, dedicação, pela atenção prestada em todas as reuniões, e exigência, para que este trabalho fosse o melhor possível. Ao doutorando Cristian Krause, meu agradecimento por todos os ensinamentos no laboratório D215, pelo auxílio técnico, teórico em conversas virtuais e em laboratório.

Aos meus colegas de vida acadêmica, cada qual com o seu valor na minha caminhada. Um destaque especial para as minhas colegas, e amigas, Camila Reginatto, Micaela Jardim e Karen Nunes, que foram minhas companheiras de estudos por longas e difíceis cadeiras.

Ao laboratório Wesp, o meu agradecimento pela disponibilidade do espaço físico e do auxílio teórico, além de todo o incentivo com o projeto. Obrigado a todos os meus colegas de trabalho que sempre me incentivaram e me auxiliaram por todos esses anos. Em especial, agradeço ao meu chefe Vinicius A. Predebon que viabilizou que eu estudasse na UFRGS e pudesse trabalhar ao mesmo tempo, além de sempre me ajudar em tudo que eu necessitei.

RESUMO

O presente trabalho descreve a utilização da técnica de voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial (DPASV) como alternativa para a fiscalização de Cd e Pb em duas amostras vegetais (Angélica, *Angelica archangelica*, e Genciana, *Gentiana lutea*) utilizadas como matérias primas de solução oral digestiva comercial. O método possibilitou a determinação simultânea desses analitos com limites de detecção e quantificação bem abaixo dos valores limites exigidos na legislação naquelas matrizes. O sistema incluiu uma célula com arranjo de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho, carbono vítreo modificado com filme de Bismuto (BiFGCE) formado *in situ*. Aplicou-se um método de abertura de amostra descrito na Farmacopeia brasileira, específico na determinação de metais pesados, que foi adaptado para ser compatível com o método voltamétrico. Realizou-se ensaios de recuperação com fortificações envolvendo três níveis de concentração próximos dos valores estabelecidos na legislação, nas amostras de Angélica e Genciana, obtendo-se resultados satisfatórios (entre 92% e 108% para Cd, entre 98% e 124% para Pb) para Angélica. Para Genciana, contudo, seria ainda necessário otimizar o método, para atingir melhores recuperações, embora já se tenha observado uma melhora considerável (52% para Cd e 98% para Pb), após utilização de outra abordagem na etapa de fortificação das amostras. Por fim, realizou-se uma avaliação de custos comparando o método voltamétrico proposto com os métodos de referência envolvendo as técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama e forno de grafite, considerando-se custos de aquisição, implantação, operação e manutenção. Destarte, verificou-se a viabilidade de aplicação de DPASV no monitoramento de Cd e Pb em amostras de Angélica e Genciana em laboratório fixo ou até de forma descentralizada.

Palavras-chave: voltametria de redissolução anódica. pulso diferencial. Angélica. Genciana. cádmio. chumbo.

ABSTRACT

The present work describes the use of differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) as an alternative for monitoring Cd and Pb in two vegetal samples (Angelica, *Angelica archangelica*, e Gentian, *Gentiana lutea*) used as raw materials for a commercial oral digestive solution. The method allowed the simultaneous determination of these analytes at detection and quantification limits much below the limits established by legislation in those matrices. The system included a cell with a three electrodes setup, including an in-situ bismuth-film modified glassy carbon electrode (BiFGCE) as working electrode. A sample digestion method described in the Brazilian Pharmacopoeia, which is specific for heavy metal determination, was adapted to be compatible with the voltammetric method. Recovery tests were carried out with spikes involving three levels of concentration in the samples from Angelica and Gentian, which were close to the values established in the legislation, and satisfactory results were obtained for Angelica (between 92% and 108% for Cd, between 98% and 124% for Pb). For Gentian, however, it would still be necessary to optimize the method to achieve better recoveries, although a considerable improvement has already been observed, after using another approach in the sample spiking step (52% for Cd and 98% for Pb). Finally, an evaluation of costs was carried out, comparing the proposed voltammetric method with the reference methods involving the techniques of flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry, considering acquisition, implementation, operation, and maintenance. Thus, it was verified the feasibility of applying DPASV in monitoring Cd and Pb in Angelica and Gentian samples in a fixed laboratory or even in a decentralized way.

Keywords: anodic stripping voltammetry. differential pulse. Angelica. Gentian. cadmium. lead.

LISTA DE ABREVIATÓES

ALA - ácido δ -aminolevulínico

ALAD - ácido δ -aminolevulínico desidratase

BiFGCE - *Bismuth film glassy carbon electrode*

DPASV - Voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial

EP - Farmacopeia Européia

FAAS - *Flame Atomic Absorption Spectrometry*

FB - Farmacopeia Brasileira

GF AAS - *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*

HMDE - *hanging mercury drop electrode*

ICH - *International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use*

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

NIST - *National Institute of Standards and Technology*

PDE- *Permitted Daily Exposure*

Ppm - Parte por milhão

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SQR - Substãncia química de referênciã

USP - *United States Pharmacopeia*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Preparo de amostra para o método de espectrometria de absorção atômica.....	21
Figura 2: Pulso sobre varredura em forma de escada.....	22
Figura 3: Sistema utilizado para as determinações voltamétricas.....	28
Figura 4: Voltamogramas para diferentes volumes de amostra.	31
Figura 5: Primeira faixa de linearidade das adições de Cd e Pb - Angélica	32
Figura 6: Segunda faixa de linearidade das adições de Cd e Pb - Angélica ...	33
Figura 7: Voltamogramas obtidos a partir das adições de padrão contendo Cd e Pb para o teste o teste de linearidade na amostra de Angélica.	34
Figura 8: Primeira faixa de linearidade para Cd e Pb na amostra de Genciana	35
Figura 9: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 1 de Angélica.....	38
Figura 10: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 2 de Angélica.....	39
Figura 11: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 3 de Angélica.....	40
Figura 12: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 1 de Genciana.	42
Figura 13: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 2 de Genciana.	43
Figura 14: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 3 de Genciana.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites permitidos de impurezas de metais e não metais estabelecidos na Farmacopeia brasileira.....	18
Tabela 2: Limites para metais pesados em drogas vegetais estabelecidos na Farmacopeia brasileira 6ªed.....	19
Tabela 3: Recuperações percentuais dos analitos contidos na amostra de Angélica.....	37
Tabela 4: Recuperações percentuais dos analitos contidos na amostra de Genciana.....	41
Tabela 5: Avaliação de custos para implantação do método de referência usando a técnica de absorção atômica e método proposto, utilizando voltametria.	45
Tabela 6: Avaliação de custos para aquisição de um destilador de ácidos e um Nobreak.....	47
Tabela 7: Parâmetros analíticos para Cd e Pb a partir da adição do padrão - Angélica	52
Tabela 8: Parâmetros analíticos para Cd e Pb a partir da adição do padrão - Genciana.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. MOTIVAÇÃO	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1. Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais	14
3.1.1. Extratos fluidos	14
3.1.2. Extratos moles	15
3.1.3. Extratos secos	15
3.1.4. Exsudatos e resinas	15
3.2. Metais pesados em medicamentos	15
3.3. Metais pesados em plantas medicinais	16
3.3.1. Contaminação do solo e Agrotóxicos	16
3.4. Casos de contaminação	17
3.5. Legislação	18
3.6. Determinação de metais pesados na Farmacopeia	19
3.6.1. Teste qualitativo.....	19
3.6.2. Espectrometria atômica	20
3.7. Voltametria	21
3.7.1. Voltametria de redissolução anódica	21
3.7.2. Voltametria de pulso diferencial.....	22
3.7.3. Célula voltamétrica	23
3.7.4. Filme de Bismuto	23
3.8. Validação do método	23
3.8.1. Limite de quantificação (LQ)	24
3.8.2. Limite de detecção (LD).....	24
3.8.3. Linearidade	24

3.8.4. Precisão.....	24
3.8.5. Exatidão.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo geral	26
4.2. Objetivos específicos.....	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1. Reagentes e soluções.....	27
5.2. Instrumentação.....	27
5.3. Obtenção e preparo de amostras.....	28
5.4. Procedimento analítico	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6.1. Parâmetros experimentais.....	30
6.2. Otimização do volume da amostra	30
6.3. Validação do método	32
6.3.1. Linearidade LQ e LD para a amostra de Angélica	32
6.3.2. Linearidade LQ e LD para a amostra de Genciana	35
6.4. Ensaio de recuperação na amostra de Angélica	36
6.5. Ensaio de recuperação da amostra de Genciana.....	40
7. AVALIAÇÃO DE CUSTOS.....	45
8. CONCLUSÃO	48
9. ESTUDOS FUTUROS	49
10. REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICE A – Parâmetros analíticos para as curvas de linearidade.....	52

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas e ervas com propriedades medicinais é encontrada na literatura desde os primeiros registros escritos de alternativas para tratamento para enfermidades. Até nos tempos atuais a aplicabilidade da medicina natural é utilizada como tratamento de doenças leves e até integrando a cultura local, como chás e etc.

O crescimento e desenvolvimento da produção de medicamentos de origem natural culminou na sua classificação dentro da legislação Brasileira como fitoterápicos. Por sua vez, controlados pela Anvisa e possuindo uma série de parâmetros físico-químicos e biológicos que devem analisados e controlados. Entre esses parâmetros, podemos destacar as contaminações de compostos químicos pelo uso de agrotóxicos e por metais pesados, podendo ocasionar severos prejuízos à saúde humana.

No que se refere a metais pesados, é dever das indústrias que fabricam esses medicamentos garantir que as concentrações totais dos metais pesados sejam inferiores a 20 ppm e dos metais como Cd, Pb, Hg e As estejam abaixo dos limites considerados seguros, sendo eles 1,0, 5,0, 0,1 e 5,0 ppm respectivamente. Atualmente a técnica de referência para determinação destes metais é a espectrometria de absorção atômica de chama e forno de grafite, contudo sua implantação e manutenção possui custos extremamente elevados.

Um conjunto de técnicas consideradas vantajosas, em inúmeros aspectos, para a determinação de metais traço é a voltametria. Voltametria se difundiu, principalmente, com a utilização do mercúrio como eletrodo de trabalho, contudo, impactos ambientais desse metal fomentaram a busca de outros eletrodos de trabalho igualmente eficazes.

Buscando desenvolver uma técnica alternativa que tenha um método analítico prático, econômico e que possua alta sensibilidade, este trabalho propõe a aplicação da técnica de voltametria de pulso diferencial utilizando eletrodo de carbono vítreo com filme de Bismuto *in situ* na determinação de Cd e Pb em amostras vegetais.

2. MOTIVAÇÃO

O laboratório Wesp Ltda. é um laboratório farmacêutico localizado na cidade de Canoas. Fundada em 1916 na Alemanha, a empresa se estabeleceu, primeiramente, em Porto Alegre. Seu criador João Wesp, conjuntamente com o Dr. J. Spanger, trouxeram da Alemanha a fórmula e os conhecimentos necessários para elaborar uma receita composta por 7 ervas que juntas compõem o medicamento Olina – Essência de Vida[®] e propiciam solução para problemas digestivos.

No laboratório Wesp, eu tive a oportunidade de concluir o meu estágio do curso técnico e, posteriormente, da graduação. Ao longo de mais de 6 anos de trabalho no Wesp, eu percebi a oportunidade de desenvolver um projeto de estudo na determinação de metais pesados nas matérias primas utilizando uma técnica mais rápida e economicamente mais viável, que propiciasse o mesmo rigor analítico que a técnica de referência.

Atualmente a Farmacopeia Brasileira exige que sejam emitidos laudos técnicos com a determinação de metais pesados nas matérias primas para aprovação das mesmas no uso industrial. No caso de matérias primas vegetais, os elementos a serem determinados são, cádmio, chumbo, mercúrio e arsênio (Item 5.3.2.3 da farmacopeia). A Farmacopeia dispõe também, de uma análise qualitativa para determinação de metais pesados totais, por formação de partículas sólidas de sulfetos, tendo este o limite de 20 ppm.

Estas determinações quantitativas são feitas por análise de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) por empresa terceirizada. Levando em consideração o contínuo aumento da demanda de análises, bem como o tempo limitado para que se aprove as matérias primas, a análise por voltametria de pulso diferencial traz agilidade e robustez na determinação de metais pesados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais

As plantas medicinais, também chamadas de drogas vegetais, têm a capacidade de aliviar ou curar enfermidades, possuindo geralmente tradição cultural de uso como remédio em uma comunidade. Normalmente, elas são utilizadas na forma de chás e infusões.

As drogas vegetais são derivadas de plantas inteiras ou de suas partes, que são geralmente secas e não processadas, podendo estar íntegras ou fragmentadas. Além do mais, incluem-se nesse contexto exsudatos, tais como gomas, resinas, mucilagens, látex e ceras, que não foram submetidos a tratamento específico [1].

Por outro lado, quando a planta medicinal é industrializada para se obter controle das características de um produto, tem-se como resultado o medicamento fitoterápico. O processo de industrialização evita contaminações por micro-organismos e substâncias estranhas, além de padronizar a quantidade e a forma certa que deve ser usada, permitindo uma maior segurança de uso. Os fitoterápicos industrializados devem ser regularizados na Anvisa antes de serem comercializados [2].

3.1.1. Extratos fluidos

Trata-se da preparação líquida obtida por extração com líquido apropriado em que, em geral, uma parte do extrato, em massa ou volume corresponde a uma parte, em massa, da droga vegetal seca utilizada na sua preparação. Adicionalmente, pode-se ainda incorporar conservantes. Estes devem apresentar especificações quanto ao teor de marcadores e resíduo seco. No caso de extratos classificados como padronizados, a proporção entre a droga vegetal e o extrato pode ser modificada em função dos ajustes necessários para obtenção do teor de constituintes ativos especificado.

3.1.2. Extratos moles

Extratos moles são produtos de consistência semissólida obtida por evaporação parcial do líquido extrator empregado, podendo ser utilizados como solventes, unicamente, álcool etílico, água, ou misturas de álcool etílico e água em proporção adequada. Esses extratos apresentam, no mínimo, 70% (m/m) de resíduo seco. Se necessário, conservantes podem ser adicionados [1].

3.1.3. Extratos secos

Extratos secos são sólidos obtidos por evaporação do solvente utilizado no processo de extração. Eles podem conter, também, materiais inertes adequados. Além do mais, eles possuem especificações quanto ao teor de marcadores. Em geral, possuem uma perda por dessecação não superior a 5% (m/m) [1].

3.1.4. Exsudatos e resinas

Os exsudatos e resinas podem surgir nas plantas quando elas sofrem algum machucado ou são atacadas por insetos. Quando essas lesões ocorrem, as plantas exsudam uma substância espessa que rapidamente fecha a ferida, protegendo assim o vegetal de ataques de microorganismos, infecções e secagem [3].

3.2. Metais pesados em medicamentos

Primeiramente devemos definir e entender melhor o conceito de metal pesado. O termo “metais pesados” é amplamente utilizado, além de ser frequentemente usado como um nome de grupo para metais e semimetais que são associados com contaminação e potencial toxicidade ou ecotoxicidade [4]. Ao passo que instituições regulatórias possuem definições próprias e listas que diferem entre si, o termo metais pesados não possui uma definição oficial a ser encontrada na literatura relevante.

Contudo, a *International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use* (ICH) descreveu diretrizes que classificam os elementos avaliando os riscos envolvendo a sua toxicidade e PDE (sigla em inglês para exposição diária permitida) e também a sua probabilidade de inclusão no medicamento durante o seu processo de fabricação. Os elementos Cd e Pb, (além de As, Hg) são considerados Classe 1 devido à sua toxicidade e bioacumulação. Estes quatro elementos requerem prioridade durante a avaliação de risco em todas as fontes potenciais de impurezas elementares e vias de administração [5].

3.3. Metais pesados em plantas medicinais

Autores consideram que o alto risco de toxidez por metais pesados em plantas medicinais seja uma realidade, embora a extensão do problema ainda não foi devidamente analisada. Os níveis e a fonte de contaminação variam bastante em função do vegetal e das etapas do processamento até o uso final. Algumas regiões do planeta detêm altíssimas concentrações desses contaminantes na sua forma solúvel, gerando um alto risco de fitoextração de metais pesados por parte das plantas [6].

3.3.1. Contaminação do solo e Agrotóxicos

A origem da contaminação por metais pesados em plantas medicinais pode ser diversa, incluindo fertilizantes minerais, principalmente os fosfatados, que tendem a acrescentar Cd ao solo. A utilização de água de irrigação contaminada também é importante fonte de metais pesados [6].

Estudos afirmam que a utilização de defensivos agrícolas tem um impacto significativo na contaminação desses elementos em diversas culturas vegetais. Outros estudos afirmam que a aplicação de fertilizantes com micronutrientes mostra uma efetiva disponibilização de Cd, Pb e Cr para as plantas de soja [7].

O aumento anormal das concentrações de metais pesados nos solos de agricultura altamente automatizada é resultado da deposição atmosférica e da

aplicação de agrotóxicos, resíduos orgânicos e inorgânicos urbanos industriais, fertilizantes e corretivos [7].

3.4. Casos de contaminação

Em sua tese de mestrado, Leonardo Lafetá conta que nos Estados Unidos, um homem de 45 anos apresentou um quadro de cólicas abdominais, dores musculares e fadiga, e níveis altos de ácido δ -aminolevulínico (ALA) na urina ($4,95 \text{ mg dL}^{-1}$) e de Pb sanguíneo ($76 \text{ } \mu\text{g dL}^{-1}$) [8].

O ácido δ -aminolevulínico é um indicador biológico que reflete a interferência do chumbo na síntese da Heme (agrupamento químico composto de um largo anel orgânico heterocíclico que contém ferro e integra a hemoglobina). O principal efeito do chumbo neste sistema é a redução dos níveis do grupo prostético heme, causado pela inibição de algumas enzimas utilizadas na síntese da hemoglobina, devido a ligação do metal à enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALA-D), causando o acúmulo do ácido delta aminolevulínico (ALA) no sangue e na urina [9].

O paciente relatou a ingestão de um preparado chinês à base de ervas, o *hai ge fen* (concha *cyclinae sinensis*), em forma de chá, por 5 semanas antes de se adoecer, contendo até 301 mg L^{-1} de Pb. Como o paciente ingeriu aproximadamente 470 mL do chá diariamente, sua ingestão total durante o período estima-se ser de 4,7 g [8].

Outros autores relataram uma série de cinco casos de envenenamento por chumbo devido à remédios "tradicionais" asiáticos, que ocorreram no centro-oeste da Inglaterra. Entre eles, havia uma mulher de 42 anos que consumiu tabletes provenientes da Índia contendo 10% de chumbo, e outra de 61 anos que também consumiu tabletes, os quais continham 6% de chumbo além de traços de mercúrio [10].

Há na literatura relatos de estudos onde foram examinados medicamentos chineses tradicionais, determinando níveis potencialmente tóxicos de mercúrio em certos preparados de ervas. Esses preparados eram dissolvidos em água e consumidos em forma de chá, usados para uma variedade de enfermidades, incluindo febre, reumatismo, apoplexia e catarata. Os níveis de mercúrio

encontrados estavam entre 7,8 e 621,3 mg por amostra, que pesavam entre 2,5 a 9,0 g [8].

3.5. Legislação

A Farmacopeia Brasileira, assim como a Européia (EP) e a Americana (USP), regulam, além dos métodos de quantificação e de metais pesados, as concentrações limites dos mesmos em produtos farmacêuticos. Esses compêndios levam em consideração a toxicidade do metal e a via de administração, atentando para a via parenteral, cuja criticidade do método é maior que a oral, tornando o medicamento com uma biodisponibilidade muito elevada [1]. Na Tabela 1, presente na Farmacopeia brasileira 6ª ed., estão descritos os limites de cada metal pesado relativo à via de administração utilizada. Devido ao alto nível de toxicidade, demos atentar para Cd, Pb, Hg e As, cujas concentrações limites são as menores. Já no caso de V, Ir, Os, Rh e Ru, a soma das concentrações desses metais não poderá exceder $10 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tabela 1: Limites permitidos de impurezas de metais e não metais estabelecidos na Farmacopeia brasileira.

Elemento	Uso oral Limite máximo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Uso parental Limite máximo ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Arsênio (As)	1,5	0,15
Cádmio (Cd)	0,5	0,05
Chumbo (Pb)	1,0	0,1
Mercúrio (Hg)	1,5	0,15
Cromo (Cr)	25	2,5
Cobre (Cu)	250	25
Manganês (Mn)	250	25
Molibdênio (Mo)	25	2,5
Níquel (Ni)	25	2,5
Paládio (Pd)	10	1,0
Platina (Pt)	10	1,0
Vanádio (V)	25	2,5
Írídio (Ir)		
Ósmio (Os)	O somatório da concentração não pode exceder 10	O somatório da concentração não pode exceder 10
Ródio (Rh)		
Rutênio (Ru)		

Além disso, a Farmacopeia Brasileira 6ª ed. contempla com exclusividade as drogas vegetais, propondo, seus limites específicos de metais pesados (Tabela 2). Esses limites podem ser característicos de uma droga em particular e, neste caso, serão especificados na monografia da mesma. Caso não conste na monografia, os limites deverão ser observados e o valor máximo total de metais pesados é de 20 ppm, não podendo ultrapassar os limites especificados na tabela 2 [1].

Tabela 2: Limites para metais pesados em drogas vegetais estabelecidos na Farmacopeia brasileira 6ªed.

Metais	Limite (ppm)
Cd	1,0
Pb	5,0
Hg	0,1
As	5,0

3.6. Determinação de metais pesados na Farmacopeia

A Farmacopeia Brasileira descreve dois métodos para a determinação de metais pesados, uma qualitativa e outra quantitativa. A primeira se trata da determinação de metais pesados por formação de partículas sólidas de sulfetos, já para o método quantitativo, utiliza-se a técnica de espectrometria de absorção atômica por chama, geração de hidretos, geração de vapor frio e forno de grafite, dependendo do elemento a ser determinado.

3.6.1. Teste qualitativo

Entre os métodos fornecidos na Farmacopeia Brasileira, o escolhido para abordar mais profundamente neste trabalho é o Método III (Ensaio limite para metais pesados), pois ele também é utilizado no Laboratório Wesp.

Neste método a quantidade de amostra utilizada, em gramas, é especificada na monografia ou deve ser calculada segundo a equação:

$$\text{Amostra (g)} = 2 / (1000l)$$

em que l = limite de metais pesados na amostra em porcentagem (m/m).

Para esse procedimento, é necessário que tenhamos uma solução padrão e uma solução de controle. A solução padrão se refere a um tubo contendo somente o solvente empregado na dissolução da amostra adicionado de 2 mL de padrão de chumbo 10 ppm. Já a solução controle é composta da solução da amostra preparada conforme a monografia juntamente com 2 mL de padrão de chumbo 10 ppm.

Assim é possível realizar uma comparação colorimétrica entre:

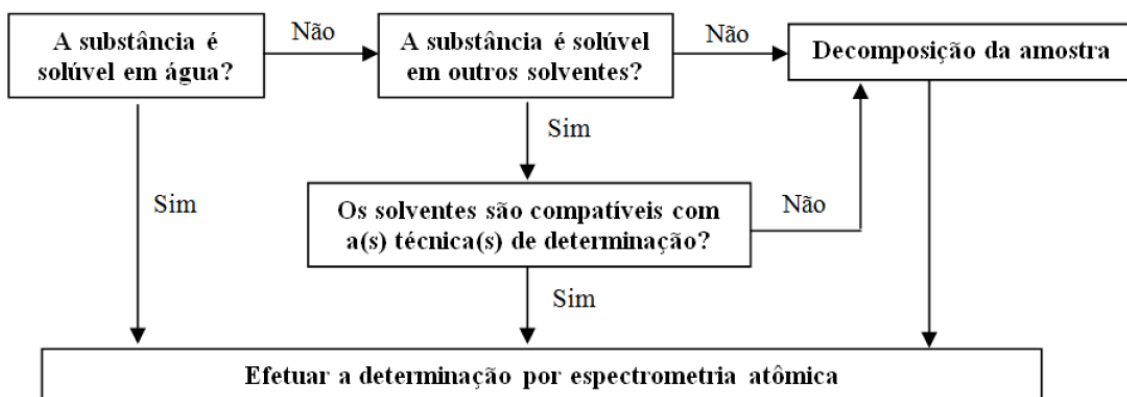
- a amostra a ser analisada;
- solvente + Pb 10 ppm
- solução contendo amostra + Pb 10 ppm

3.6.2. Espectrometria atômica

No caso de substâncias solúveis em água, não há necessidade da decomposição prévia da amostra e essa pode ser analisada diretamente após dissolução. Caso não seja solúvel em água e apresentar solubilidade em outro solvente, a substância pode ser analisada diretamente após dissolução se não houver incompatibilidade entre o solvente e a técnica de espectrometria atômica [1].

Quando nenhuma das condições anteriores for atendida, recomenda-se a decomposição prévia da amostra. Nesses casos, os procedimentos recomendados são: a) Decomposição por via úmida em sistema fechado com aquecimento convencional ou por microondas ou b) Método de combustão iniciada por micro-ondas em sistema pressurizado [1]. O fluxograma da análise por espectrometria atômica está descrito na Figura 1.

Figura 1: Preparo de amostra para o método de espectrometria de absorção atômica.



Fonte: Farmacopeia 6ªed.

3.7. Voltametria

Os métodos eletroanalíticos que dependem da medida da corrente em função do potencial aplicado, são chamados métodos voltamétricos. Esses métodos empregam condições que favorecem a polarização do eletrodo de trabalho. Geralmente, para aumentar a polarização, os eletrodos de trabalho utilizados na voltametria são relativamente pequenos, com áreas superficiais de alguns milímetros quadrados, e em algumas aplicações, apenas alguns micrômetros quadrados [11].

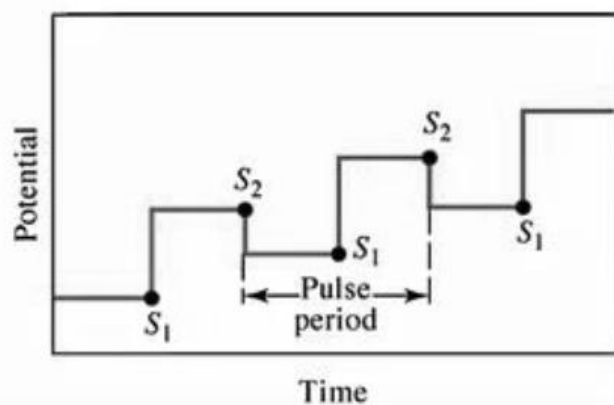
3.7.1. Voltametria de redissolução anódica

Nessa técnica, uma etapa prévia de eletrodeposição sob potencial negativo constante e sob agitação é utilizada para depositar o analito sobre um filme cobrindo o eletrodo de trabalho. Após essa etapa, é feita uma varredura na direção de valores positivos de potenciais (varredura anódica) para oxidar (redissolver) o metal presente no filme de volta para a solução, momento em que se registra a corrente [11]. O resultado desse processo é registrado em um diagrama chamado de voltamograma, nele podemos ver os picos dos analitos em seus respectivos potenciais de pico, cujo sinal analítico é a corrente de pico, que correlacionamos de maneira proporcional com a concentração da espécie em solução.

3.7.2. Voltametria de pulso diferencial

A técnica de pulso diferencial é amplamente difundida e utilizada, sendo sua maior sensibilidade atribuída a dois fatores, o aumento da corrente faradaica e a uma diminuição da corrente capacitiva. Outra vantagem é a obtenção de picos mais estreitos pela utilização desse procedimento, o que é desejável quando se necessita analisar misturas. Os instrumentos digitais normalmente empregam a forma de onda exposta na Figura 2, que envolve a combinação da aplicação de um pulso sobre uma varredura em forma de escada.

Figura 2: Pulso sobre varredura em forma de escada.



Fonte: Skoog 8ª ed. Copyright 2013 Cengage Learning.

Como pode ser visto na Figura 2, duas medidas de corrente são realizadas, uma em S1 logo antes da aplicação do pulso, e outra em S2, no final do pulso. A corrente faradaica (referente à reação de oxidação do analito) diminui linearmente com o tempo, enquanto a corrente capacitiva decresce exponencialmente com o tempo. A diferença dos dois pontos citados anteriormente propicia um maior sinal em relação à linha base. As diferenças das correntes ($\Delta i = S_2 - S_1$) são registradas em função da variação escalonada dos potenciais, sobre a qual são sobrepostos os pulsos. A altura do pico (corrente de pico) é diretamente proporcional à concentração.

3.7.3. Célula voltamétrica

A célula é composta de três eletrodos distintos (eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência), cada qual com a sua função, imersos em uma solução contendo o analito e também um eletrólito não reativo chamado eletrólito suporte. Na célula, a corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo.

O eletrodo de trabalho, neste estudo, tem a variação do seu potencial em relação a um eletrodo de referência variado de forma escalonada em relação ao tempo, com pulsos diferenciais periódicos sobrepostos, durante a varredura dos potenciais. A área do eletrodo de trabalho é pequena para aumentar sua tendência em se tornar polarizado. O eletrodo de referência tem um potencial que permanece constante durante o experimento. O terceiro eletrodo é um contra eletrodo, sendo que a corrente circula através da célula entre ele e o eletrodo de trabalho.

3.7.4. Filme de Bismuto

A modificação no eletrodo de trabalho de carbono vítreo utilizando-se filme de bismuto formado *in situ*, tem como finalidade melhorar a interação dos analitos com o eletrodo de trabalho. Esse filme vem sendo amplamente utilizado como alternativa ambientalmente correta. Combinado com a baixa toxicidade do bismuto, o BiFGCE são uma alternativa viável aos eletrodos de filme ou gota de mercúrio usados até agora. [12]

3.8. Validação do método

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 166/2017 promulga em seu art. 4º que a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos [13].

3.8.1. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ deve ser coerente com o limite de especificação da impureza [13].

3.8.2. Limite de detecção (LD)

O Art. 49 RDC 166/2017 dispõe que o limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

A determinação do limite de detecção pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado [13].

3.8.3. Linearidade

No Art. 23 da RDC 166/2017 é definida que a linearidade de um método é demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra.

Para estes ensaios as soluções utilizadas para avaliação da linearidade devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da substância química de referência (SQR).

3.8.4. Precisão

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade [13].

3.8.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro.

A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas em cada nível [13].

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi verificar a viabilidade de determinação de Cd e Pb em amostras de matéria prima vegetal de um medicamento fitoterápico, utilizando a técnica de voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial, para implantar esse método na rotina de fiscalização dessas matrizes.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar o método de abertura da amostra e sua compatibilidade com a técnica voltamétrica utilizada.
- Determinar LD, LQ, linearidade, exatidão e precisão do método.
- Verificar a viabilidade do método voltamétrico proposto neste trabalho em análises de rotina para determinação de Cd e Pb simultaneamente em amostras de Angélica e Genciana.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Reagentes e soluções

Para a execução deste trabalho foram selecionadas duas matérias primas que compõe a Olina[®], tratam-se do extrato mole da Genciana (*Gentiana lutea*) e do extrato fluido de Angélica (*Angelica archangelica*). As medidas foram realizadas utilizando-se as técnicas de voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial (DPASV).

Utilizou-se reagentes de grau analítico e água purificada de resistividade 18,2 MΩ cm (Milli-Q). Para o preparo da solução padrão de trabalho contendo Cd 5 mg L⁻¹ e Pb 5 mg L⁻¹ e da solução padrão usada nos ensaios de recuperação, contendo Cd 20 mg L⁻¹ e Pb 40 mg L⁻¹, utilizou-se soluções padrão de Cd 1000 mg L⁻¹ e Pb 1000 mg L⁻¹ (Dinâmica com rastreabilidade NIST). Preparou-se solução tampão de acetato de amônio (Ácido acético/Hidróxido de amônio), com pH 4,6. A solução padrão de Bi (III) 1000 mg kg⁻¹ foi preparada a partir da solução nitrato básico de bismuto III ((Bi₅O(OH)₉(NO₃)₄) (Merck).

5.2. Instrumentação

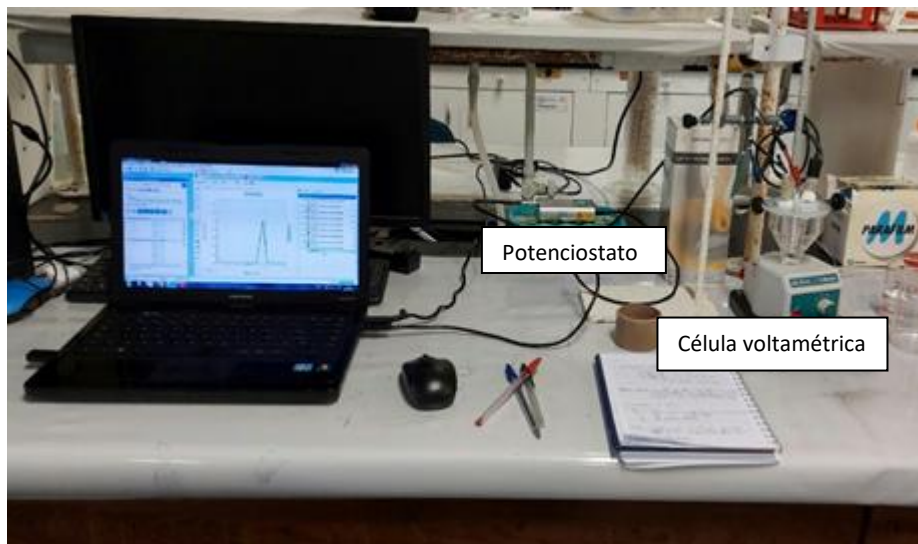
Para obtenção dos voltamogramas foi necessário um computador com o software *PSTrace* (Palmsens, Holanda), conectado ao potenciostato portátil *EmStatBlue* (Palmsens, Holanda).

Na célula voltamétrica foi montado o arranjo de três eletrodos sendo eletrodo de carbono vítreo de 3 mm de diâmetro como eletrodo de trabalho, barra de platina como contra eletrodo e Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) como eletrodo de referência. Podemos observar a montagem deste sistema na Figura 3. O polimento do eletrodo de trabalho foi realizado com suspensão de alumina antes da realização da análise de cada amostra.

Todos os materiais utilizados nos experimentos, como, célula eletroquímica e tampa, os béqueres e demais de vidrarias foram deixadas em HNO₃ 1% por 24 horas antes da utilização para descontaminação e lavados abundantemente com água Milli-Q antes do uso. Para os itens de plástico, se

utilizou HNO_3 10% em solução alcoólica (etanol 50%). As micropipetas de volume ajustável foram aferidas para os volumes utilizados.

Figura 3: Sistema utilizado para as determinações voltamétricas.



Fonte: Próprio autor.

5.3. Obtenção e preparo de amostras

As amostras de Angélica e Genciana analisadas foram disponibilizadas pelo Laboratório Wesp. Elas são de lotes antigos que não seriam mais usados pela empresa. A matriz vegetal Angélica compreendia um extrato fluido em que o solvente utilizado para extração era água. A matriz vegetal Genciana, por sua vez, se tratava de um extrato mole (mais viscoso que o extrato da Angélica) contendo 50% de etanol e 50% água. A abertura das amostras foi realizada no laboratório de controle de qualidade do Lab. Wesp conforme Método III (Ensaio limite para metais pesados) da Farmacopeia Brasileira 6^a ed. Esse método foi escolhido por já estar regulamentado na Farmacopeia Brasileira como um método válido e também por já ser utilizado nas rotinas de análise do Laboratório Wesp.

Para o processo de abertura, pesou-se exatamente cerca de 1 g de amostra. A amostra foi transferida para um cadinho de porcelana (previamente descontaminado em HNO_3 1%) onde adicionou-se H_2SO_4 suficiente para umedecer a substância. Em seguida, a amostra foi levada a uma chapa de

aquecimento na temperatura de 300°C. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de HNO₃ vagarosamente, mantendo-se o aquecimento até não desprenderem mais vapores brancos. A amostra foi, então, levada à mufla para um aquecimento de 500 – 600°C por 4 h, até a combustão completa.

Posteriormente, retirou-se a amostra da mufla e seguiu-se com o resfriamento da amostra à temperatura ambiente. Então, adicionou-se 4 mL de HCl 6 mol L⁻¹ na amostra cobrindo-a com vidro de relógio e deixando por 15 min em banho maria. Os cadinhos contendo a amostra foram, então, descobertos e evaporados até a secura. A amostra foi, em seguida, umedecida com 1 gota de HCl concentrado e adicionou-se 10 mL de água ultrapura quente, levando para mais 2 min de digestão em banho maria. Ao final, completou-se o volume da amostra para 25 mL em balão volumétrico. Vale ressaltar, que o método foi adaptado para a análise voltamétrica, sendo conduzido até a etapa que precedeu a adição de ácido acético e tioacetamida (para formação de sulfetos).

5.4. Procedimento analítico

Adicionou-se na célula 10,00 mL de água de Milli-Q, 1,00 mL de amostra preparada conforme seção 5.3, 24 µL de solução de Bi (III) 1000 mg L⁻¹ e 1,00 mL de tampão acetato de amônio (Ácido acético/Hidróxido de amônio), mantendo o pH em 4,6. Os parâmetros instrumentais utilizados foram 100 s de tempo de deposição (t_d), -1,4 V de potencial de deposição (E_d), 0,08 V s⁻¹ de velocidade de varredura (v) e 0,05 V de amplitude de pulso (E_{pulse}) [14]. O método de adição do padrão foi usado para quantificação, através da adição de 20 µL do padrão de trabalho contendo Cd e Pb cada um na concentração de 5 mg L⁻¹.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Parâmetros experimentais

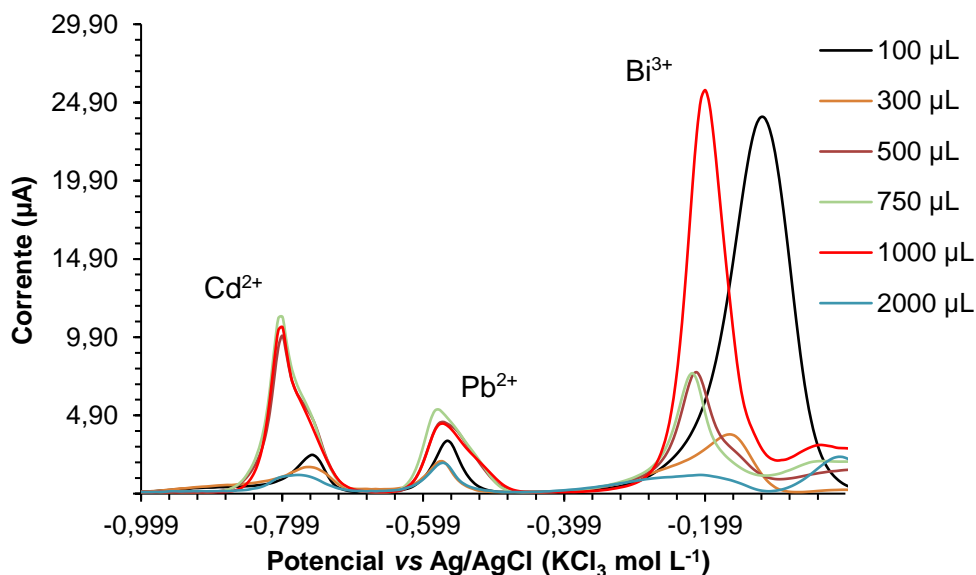
Para a validação do método aqui proposto, utilizou-se os parâmetros experimentais otimizados previamente por Alessi (2018), que se baseia na utilização de potencial de deposição (E_d) de -1,25 V, tempo de deposição (t_d) de 100 s, amplitude de pulso (E_{pulse}) de 0,05 V, velocidade de varredura (v) de 0,08 V s⁻¹, pH na célula de 4,6, e janela de potenciais de -1,25 V a 0,5 V, com uma etapa posterior de *cleanup* a 0,05 V por 30 s.

6.2. Otimização do volume da amostra

Primeiramente, estudou-se o volume adequado da amostra de Angélica digerida, a fim de assegurar que o maior volume de amostra possível pudesse ser utilizado, sem afetar a precisão entre as medidas das replicatas das correntes de pico (desvio padrão menor que 10%) e que assegurasse uma pequena linha base e um sinal de pico bem resolvido. Neste teste realizou-se a adição de volumes crescentes de amostra, iniciando com uma célula contendo 100 µL, e posteriormente, 300 µL, 500 µL, 750 µL, 1000 µL, 2000 µL. Em todas as células foi-se adicionado 50 µL de um padrão de 10 mg L⁻¹ de Cd e Pb.

A Figura 4 apresenta a variação da corrente de pico para Cd e Pb com a diferentes volumes da amostra na célula.

Figura 4: Voltamogramas para diferentes volumes de amostra.



Fonte: Próprio autor.

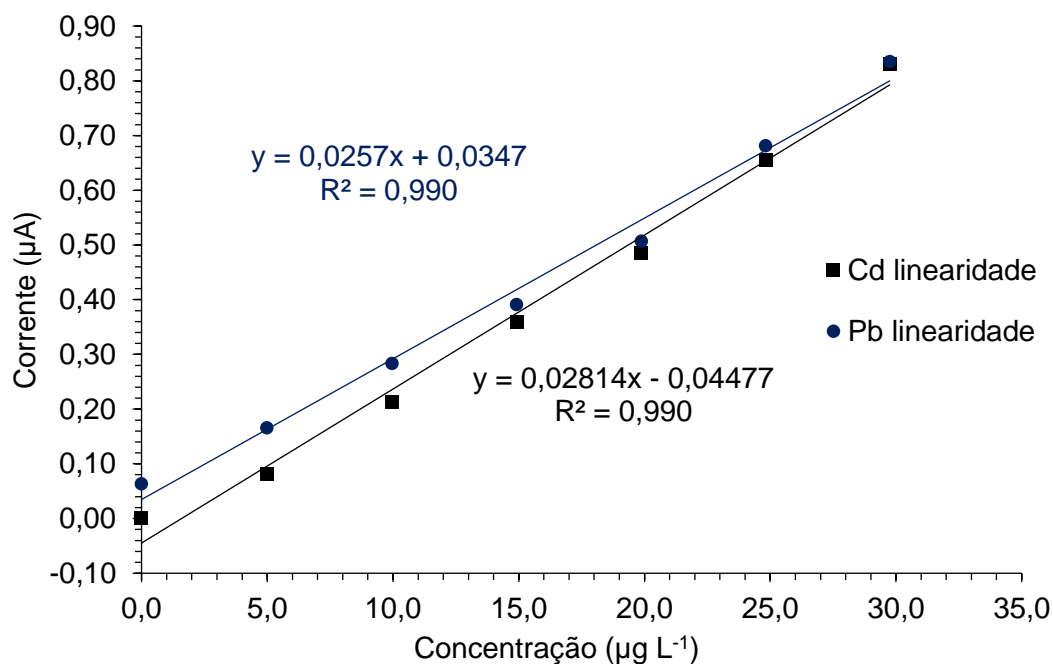
A partir dos voltamogramas obtidos com a amostra de Angélica para Cd e Pb, observa-se que a corrente de pico geralmente apresentou um aumento linear entre 100 µL e 1000 µL de volume de amostra. No volume de 750 µL não houve formação suficiente do filme de bismuto, detectado em aproximadamente -0,20 V, prejudicando a deposição dos metais no eletrodo de trabalho. Para estudos posteriores, o volume de 1000 µL de amostra foi escolhido, junto ao qual observou-se alta corrente de pico com um desvio padrão baixo entre as replicatas. Vale ressaltar, que os ombros que aparecem para alguns dos voltamogramas da figura 4 não foram verificados em ensaios posteriores, ao se utilizar 1000 µL de amostra. Observou-se, também, que diferentes volumes de amostra deslocam os voltamogramas para potenciais mais positivos ou negativos.

6.3. Validação do método

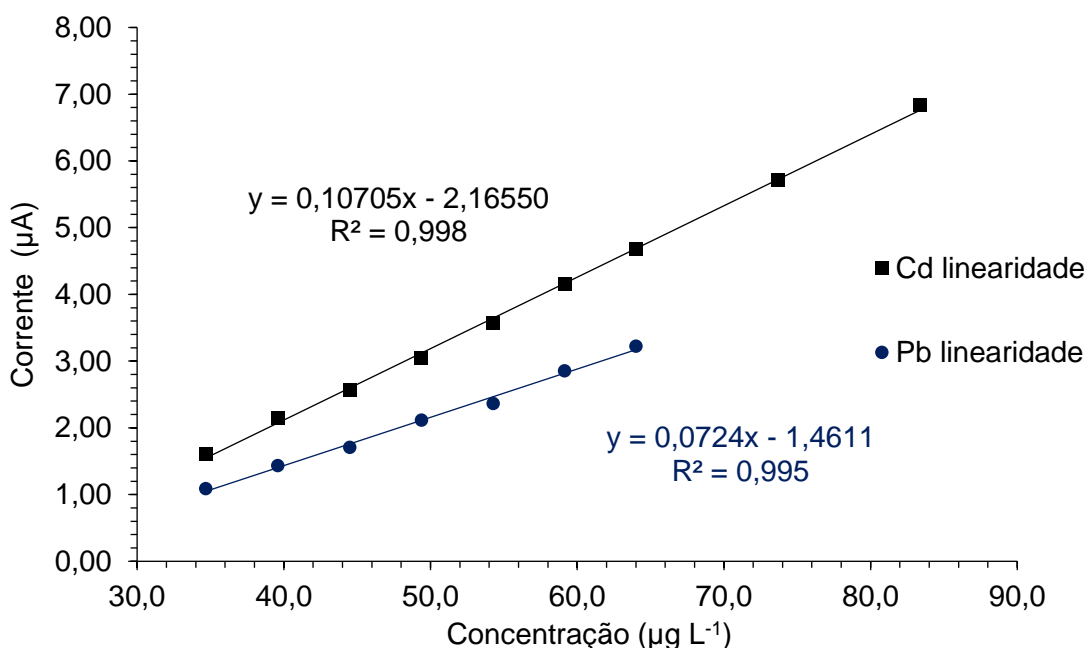
6.3.1. Linearidade LQ e LD para a amostra de Angélica

Para a determinação da linearidade foram realizadas adições crescentes dos padrões de Cd e Pb em uma célula voltamétrica, aplicando-se os parâmetros anteriormente otimizados, ou seja, potencial de deposição de -1,25 V para Cd e Pb, velocidade de varredura de $0,08 \text{ V s}^{-1}$ e tempo de deposição de 100 s. Para Cd e Pb, as concentrações utilizadas foram: $0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $5,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $14,9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $19,9 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $24,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $29,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $34,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $39,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $44,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $49,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $54,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $59,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $64,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $73,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $83,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para cada medida realizada. A Figura 5 apresenta o gráfico da corrente de pico versus concentração na primeira faixa de linearidade para Cd e Pb, onde é possível notar uma boa linearidade ($R^2 \approx 0,99$) até adições de $29,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ dos padrões.

Figura 5: Primeira faixa de linearidade das adições de Cd e Pb - Angélica



Fonte: Próprio autor.

Figura 6: Segunda faixa de linearidade das adições de Cd e Pb - Angélica

Fonte: Próprio autor.

Pode-se observar, devido alteração do coeficiente angular na regressão linear, que existem duas faixas com comportamento linear, ou seja, $R^2 \approx 0,99$, nos gráficos de adição de padrão de Cd e Pb. Para Cádmi e Chumbo, pode-se dividir a primeira faixa linear de 0 até 29,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ de concentração. A segunda faixa linear, para Cd partindo-se de 29,8 até 83,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ e tratando-se do Pb, a segunda faixa linear está entre 29,8 e 64,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para concentrações acima de 64,0, a curva do Pb tende a formar uma terceira faixa linear.

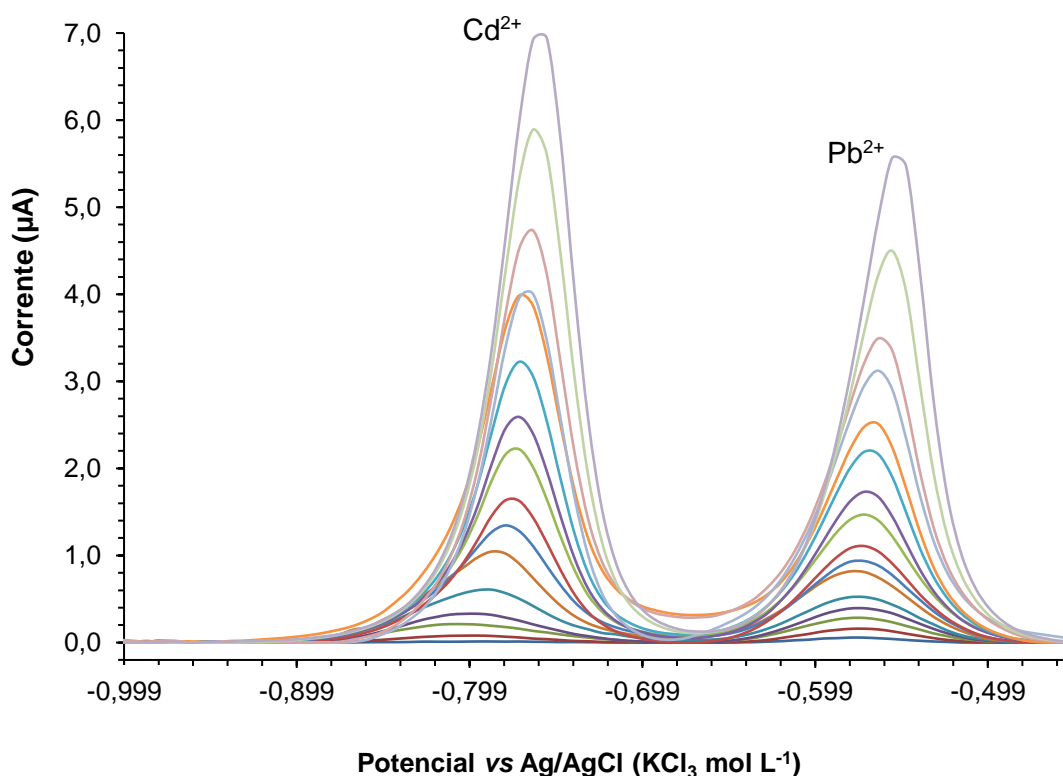
É possível, que a corrente de pico para Cd continuaria aumentando para concentrações maiores que 83,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, antes que houvesse saturação da superfície do eletrodo de trabalho. No entanto, optou-se por não continuar aumentando a concentração dos analitos na célula, uma vez que essa faixa de concentração já estaria muito além do limite exigido pela legislação vigente (Farmacopeia Brasileira 6 ed.), após todas as diluições descritas anteriormente.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com os critérios $3,3s/m$ e $10s/m$, respectivamente, sendo s o desvio padrão de 5 medidas da corrente do branco nos respectivos potenciais de pico de Cd e Pb, e m , o coeficiente angular da curva de adição do padrão. Vale ressaltar que o branco neste caso continha 1 mL da amostra ausente dos analitos, para possibilitar uma matriz do branco similar à amostra. O LD e o LQ

calculados para Cd foram de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Já para Pb, os valores foram de $0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ para o LD, e $2,7 \mu\text{g L}^{-1}$ para o LQ.

A Figura 7 apresenta os voltamogramas das adições do padrão de Cd e Pb referentes às correntes em função das concentrações do ensaio de linearidade (Figuras 5 e 6). Observou-se um aumento relativo às adições de padrão, verificando-se uma saturação de uma primeira camada de deposição na superfície do eletrodo de trabalho em $29,8 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos. A partir daí, evidenciou-se uma segunda faixa linear, possivelmente pela formação de uma segunda camada ou uma nova reestruturação dos analitos no filme de Bi sobre o eletrodo.

Figura 7: Voltamogramas obtidos a partir das adições de padrão contendo Cd e Pb para o teste de linearidade na amostra de Angélica.

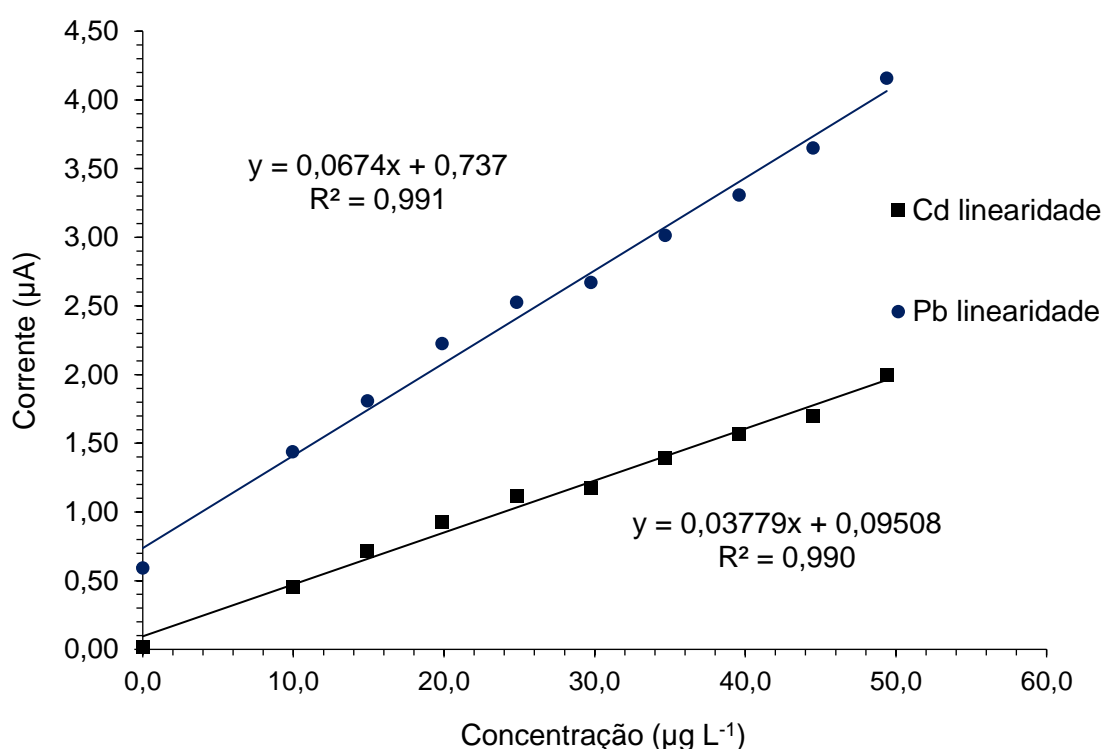


Fonte: Próprio autor.

6.3.2. Linearidade LQ e LD para a amostra de Genciana

Para a determinação da linearidade da segunda amostra foram realizados os mesmos procedimentos de adições crescentes dos padrões de Cd e Pb em uma célula voltamétrica. A Figura 8 apresenta a corrente de pico versus a concentração. Assim como foi observado na amostra de Angélica, na Genciana temos mais de uma faixa linear. Para Cd e Pb, pode-se dividir a primeira faixa linear de 0 até 49,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de concentração.

Figura 8: Primeira faixa de linearidade para Cd e Pb na amostra de Genciana



Fonte: Próprio autor.

Em adições acima de 49,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ as correntes de Cd e Pb não mantêm crescimento linear. Este comportamento pode ser devido a um diferente rearranjo dos metais depositados sobre o filme de Bi (III), inclusive formando múltiplas camadas.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com os mesmos critérios $3,3s/m$ e $10s/m$, respectivamente. O LD e o LQ calculados

para Cd foram de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Já para Pb, os valores foram de $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para o LD e $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$ para o LQ.

6.4. Ensaio de recuperação na amostra de Angélica

Para verificar a recuperação dos analitos, realizou-se a fortificação dos mesmos na amostra bruta, previamente à etapa de digestão, para que eles passassem por todas as etapas do método. Pesou-se exatamente cerca 5 g (com 4 casas decimais) de amostra de Angélica em 4 tubos cônicos de 50 mL. Em seguida, pipetou-se 0, 130, 340 e 610 μL da solução padrão de Cd 20 mg L^{-1} e Pb 40 mg L^{-1} para cada um dos tubos cônicos contendo as alíquotas de amostras, seguido de agitação manual vigorosa por 1 min. Posteriormente, mediu-se uma massa exata de cerca de 1 g de cada uma das amostras fortificadas em cadinhos de porcelana (previamente descontaminados), e seguiu-se o processo de abertura da amostra com a adição de H_2SO_4 concentrado suficiente para umedece-la. Em seguida, a amostra foi levada a uma chapa de aquecimento, que foi então mantida a 300°C . Posteriormente, adicionou-se 2 mL de HNO_3 concentrado vagarosamente, mantendo-se o aquecimento até não desprenderem mais vapores brancos. A amostra foi, então, levada à mufla para um aquecimento de $500 - 600^\circ\text{C}$ por 4 h, até a combustão completa. Então, retirou-se a amostra da mufla, deixando-a resfriar à temperatura ambiente. Subsequentemente, adicionou-se 4 mL de HCl 6 mol L^{-1} na amostra, cobrindo-a logo em seguida com vidro de relógio e deixando-a por 15 min em banho maria. Os cadinhos contendo a amostra foram, então, descobertos e evaporados até a secura. A amostra foi, em seguida, umedecida com 1 gota de HCl concentrado e adicionou-se 10 mL de água ultrapura quente (aproximadamente 80°C), mantendo ainda por mais 2 min em banho maria. Ao final, completou-se o volume da amostra para 25 mL em balão volumétrico.

Vale ressaltar, que a descontaminação dos cadinhos de porcelana foi essencial para diminuir o as concentrações de Cd e Pb no branco, sendo que antes da descontaminação encontrou-se $3,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e $21,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb na célula contendo o branco. Após a descontaminação em HNO_3 1% por 24h, as concentrações de Cd e Pb no branco foram $1,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$,

respectivamente. Vale também frisar, que não houve diferença nos valores do branco utilizando-se HCl e HNO₃ destilados ou não.

A Tabela 3 apresenta os resultados dos ensaios de recuperação na amostra de Angélica. O método apresentou recuperações entre 80 e 125%, ultrapassando levemente o limite superior que está sugerido pela orientação sobre validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) para níveis de ppm [15]. É importante frisar, que durante a etapa de digestão, que como citado anteriormente, é um método de referência da Farmacopeia Brasileira 6 ed. para ensaios de metais pesados presentes nessas matrizes vegetais, não houve perdas apreciáveis de Cd e Pb.

Para os cálculos nos ensaios de recuperação, usou-se a relação abaixo:

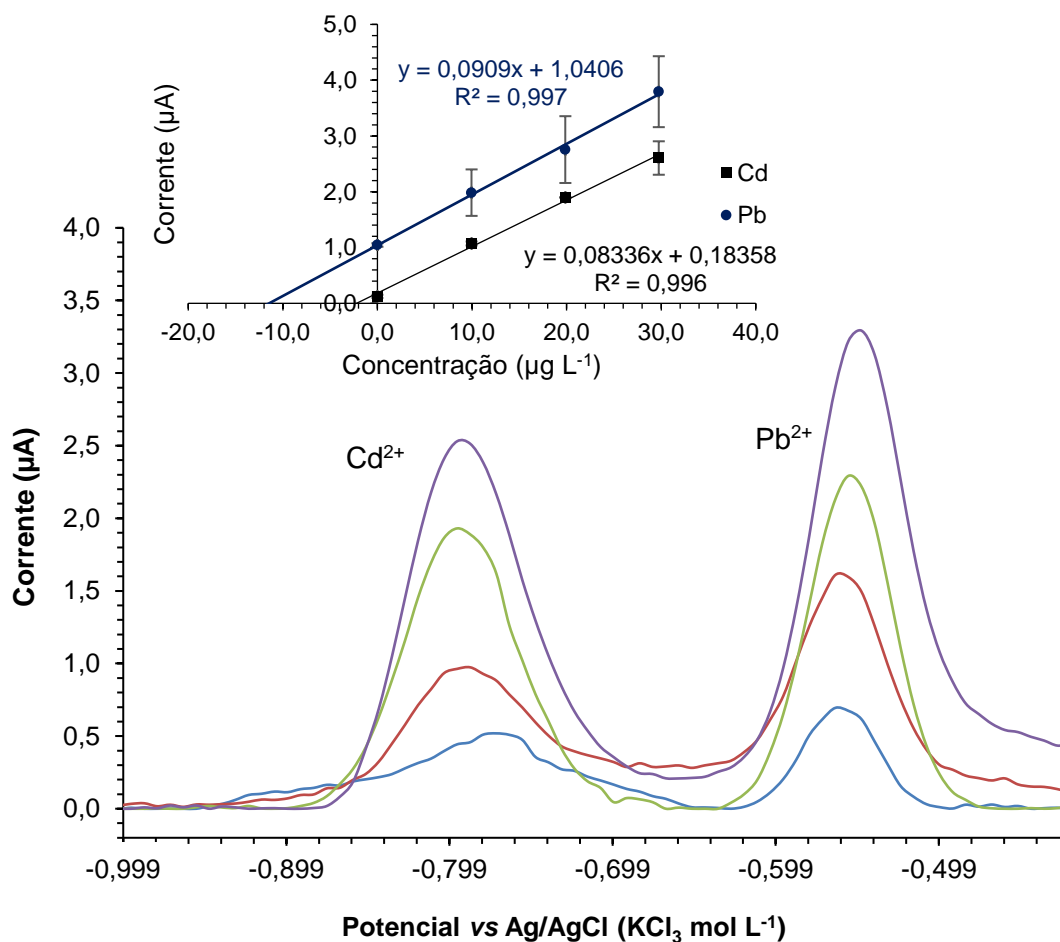
$$\frac{(\text{conc. após a fortificação}) - (\text{conc. na amostra})}{\text{Conc. adicionada na fortificação}} * 100$$

Tabela 3: Recuperações percentuais dos analitos contidos na amostra de Angélica.

Analito		Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
Cd	Conc. adicionada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0	0,51	0	1,26	0	2,49
	Conc. encontrada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0	0,55	0	1,15	0	2,32
	Recuperação (%)	-	108	-	92		93
Pb	Conc. adicionada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0	1,02	0	2,51	0	4,99
	Conc. encontrada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1,87	2,87	1,87	4,99	1,87	7,48
	Recuperação (%)	-	98	-	124	-	112

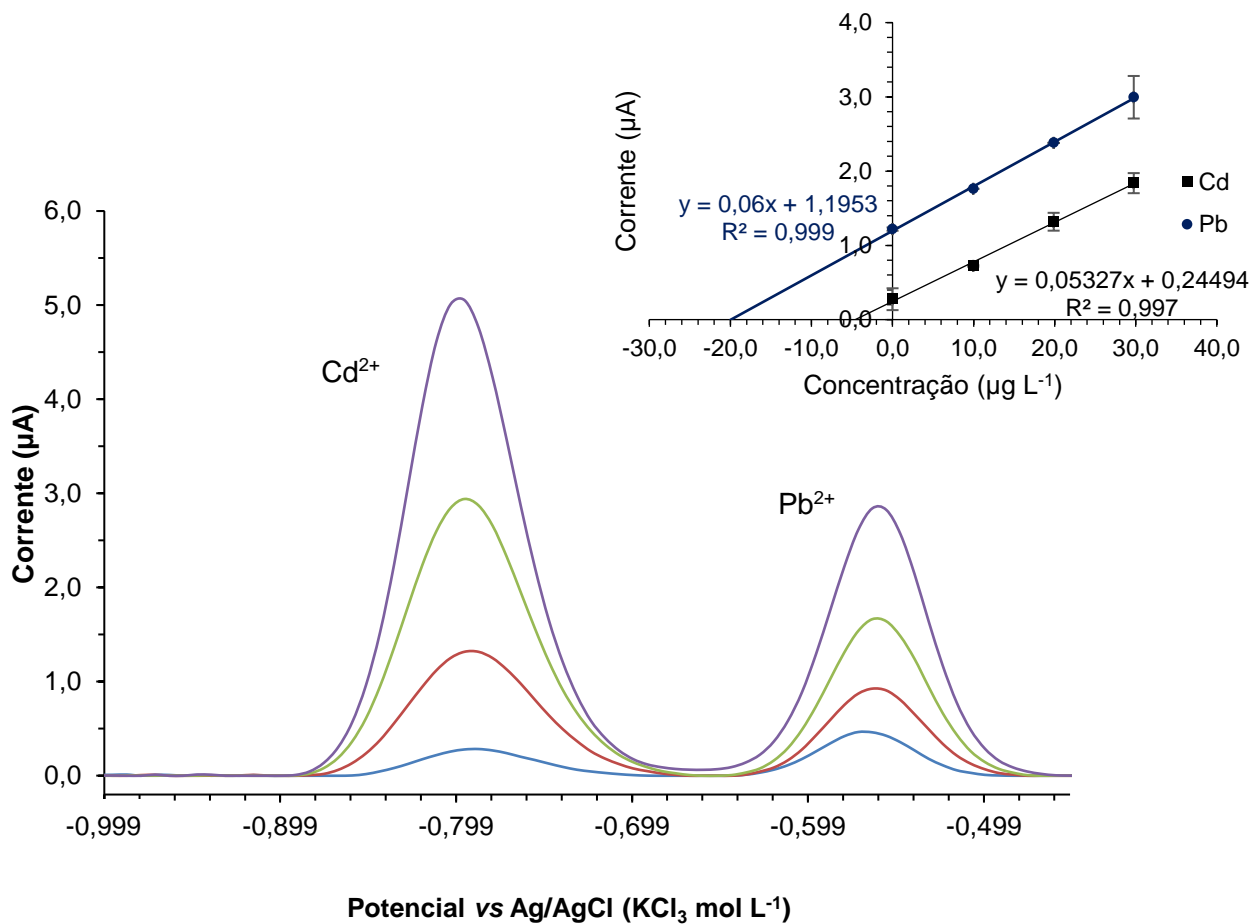
Os resultados da Tabela 3 foram obtidos por meio do método de adição do padrão. As Figuras 9, 10 e 11 mostram as curvas de adição do padrão para as fortificações de Cd e Pb utilizados para os cálculos de quantificação e recuperação.

Figura 9: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 1 de Angélica.



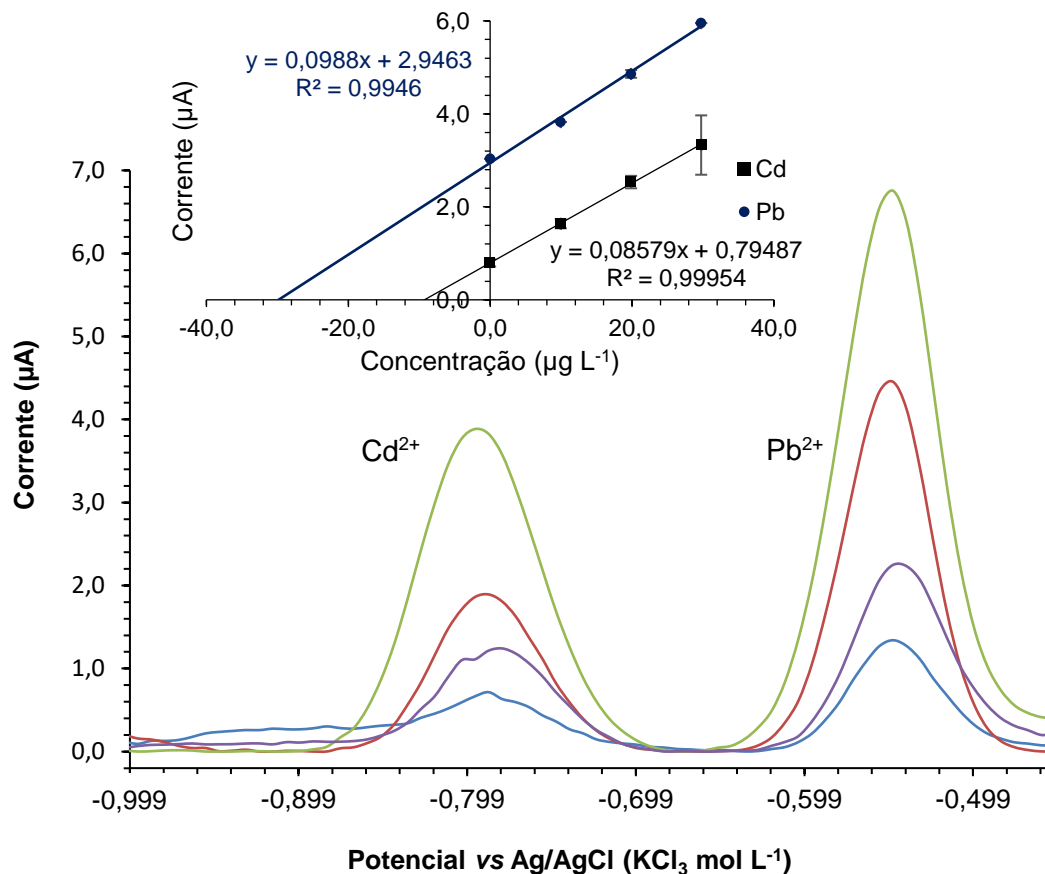
Fonte: Próprio autor.

Figura 10: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 2 de Angélica.



Fonte: Próprio autor.

Figura 11: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 3 de Angélica.



Fonte: Próprio autor.

6.5. Ensaio de recuperação da amostra de Genciana

Tratando-se da Genciana, aplicou-se primeiramente os mesmos procedimentos referentes à amostra de Angélica, descritos no item 6.3. Contudo, não se obteve êxito nas recuperações, ficando entre 6,5 a 52,8% para Cd e 5,8 a 135% para Pb. Entende-se que esta matéria prima, por ser muito viscosa, impediu a correta homogeneização do analito durante a fortificação. Portanto, adotou-se outra estratégia para este ensaio, junto a qual mediu-se uma massa exata de cerca de 1 g da amostra de Genciana em cadinhos de porcelana (previamente descontaminados), seguindo-se com as fortificações sobre as alíquotas da amostra já contidas no cadinho. Neste ensaio, pipetou-se 0, 30, 80

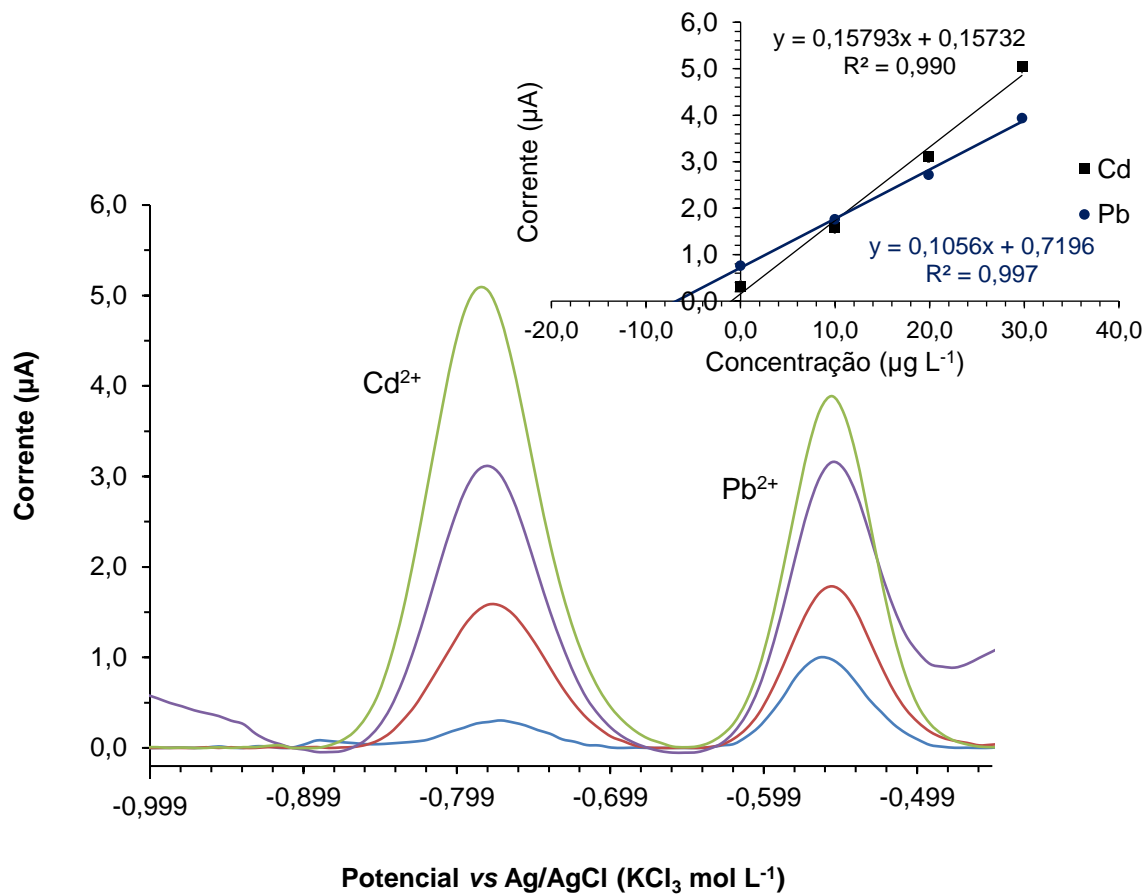
e 200 μL da solução padrão de Cd 20 mg L^{-1} e Pb 40 mg L^{-1} para cada um dos cadinhos contendo a amostra. Com um bastão de vidro, realizou-se a agitação, esperando-se uma completa homogeneização, sendo que também algumas gotas de H_2SO_4 , que de qualquer forma seriam usados na digestão, foram utilizados ao fim desse processo para remover parte da amostra que ficou cobrindo o bastão de vidro. Nas etapas subsequentes, realizou-se os mesmos procedimentos referentes à amostra de Angélica, descritos no item 6.3.

A Tabela 4 apresenta as recuperações para os 3 níveis de concentração na amostra de genciana, cujos voltamogramas e curvas de adição do padrão são mostradas nas Figuras 12, 13 e 14. Verifica-se que, após a adoção deste outro procedimento de fortificação descrito acima houve uma melhora considerável nas recuperações dos analitos, devido a uma maior homogeneização deles na matriz. No entanto, as recuperações ainda se encontram abaixo do aceitável para Cd, variando de 35 a 52%. Chumbo, por sua vez, apresentou recuperação de 98% para a amostra 1, mas valores insuficientes para as amostras 2 (50%) e 3 (65%). Destarte, ainda é preciso otimizar o processo de fortificação da Genciana, já que se trata de uma matriz singular, muito diferente da Angélica.

Tabela 4: Recuperações percentuais dos analitos contidos na amostra de Genciana.

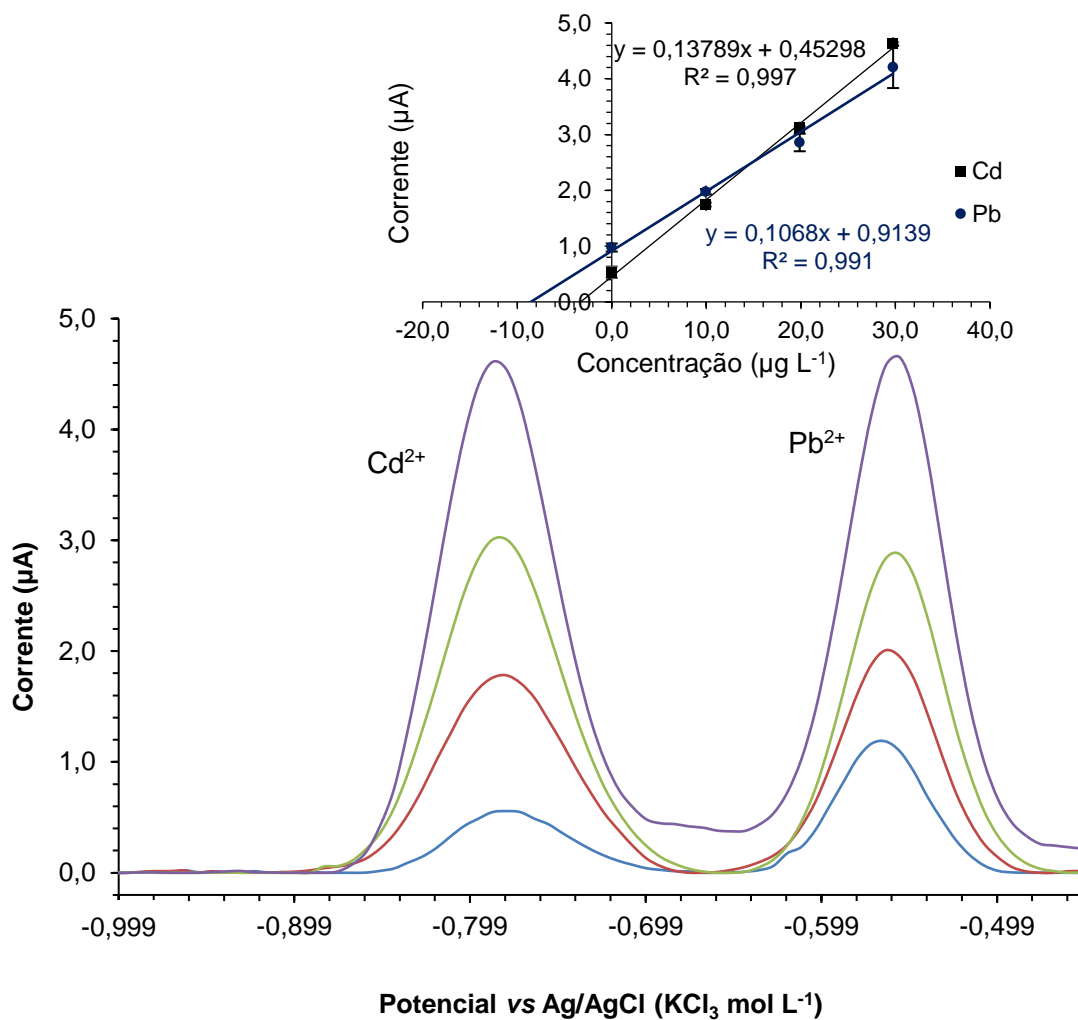
Analito		Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
Cd	Conc. adicionada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0	0,58	0	1,58	0	3,88
	Conc. encontrada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0	0,25	0	0,82	0	1,37
	Recuperação (%)	-	43	-	52	-	35
Pb	Conc. adicionada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0	1,16	0	3,15	0	7,76
	Conc. encontrada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,57	1,71	0,57	2,14	0,57	5,65
	Recuperação (%)	-	98	-	50	-	65

Figura 12: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 1 de Genciana.



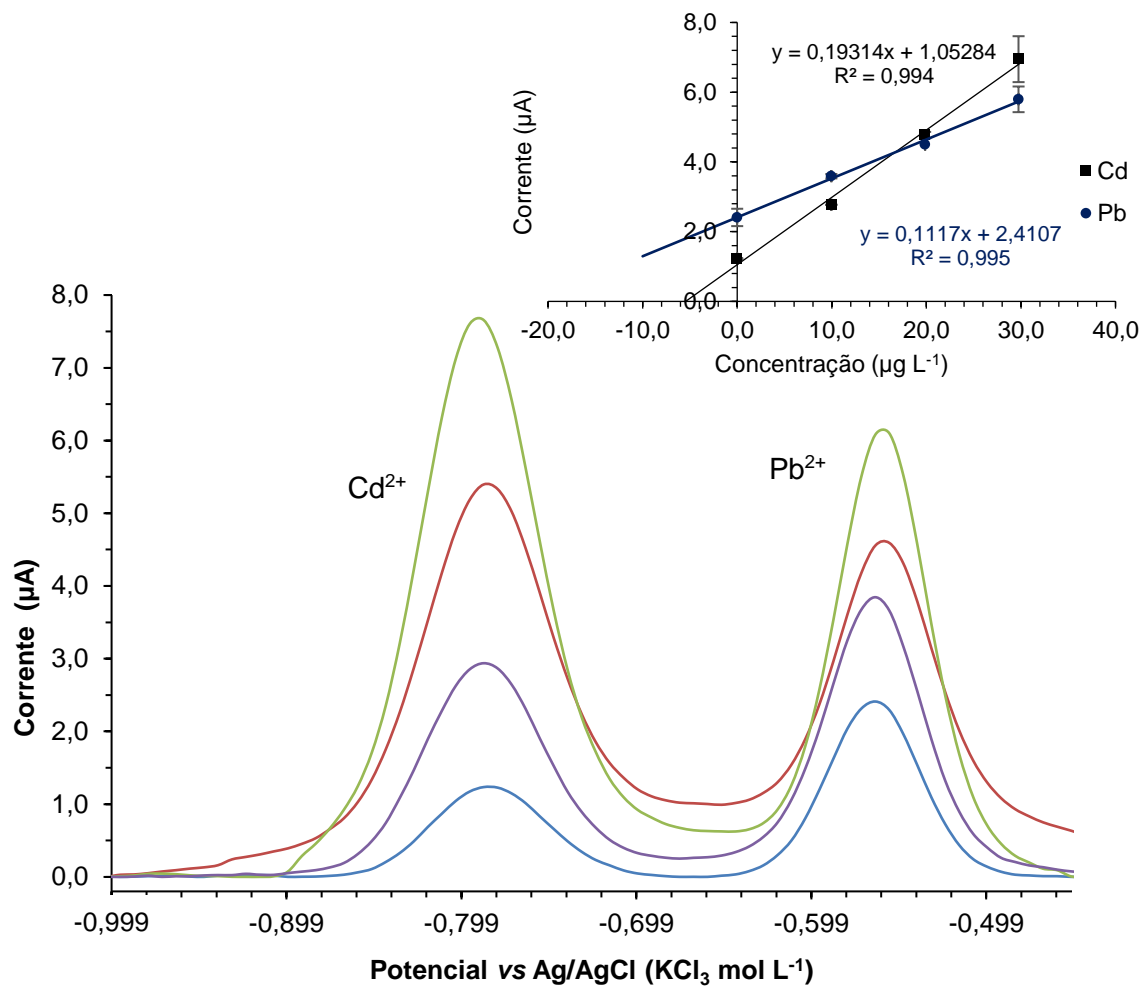
Fonte: Próprio autor.

Figura 13: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 2 de Genciana.



Fonte: Próprio autor.

Figura 14: Voltamogramas e curva de adição do padrão para o ensaio de recuperação da amostra 3 de Genciana.



Fonte: Próprio autor.

7. AVALIAÇÃO DE CUSTOS

Para análise de custos deste trabalho, comparou-se a aquisição de um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) e forno de grafite (GFAAS) e um potenciostato portátil, bem como todos os itens necessários para suas respectivas implantações. Alguns itens são adquiridos somente via importação e foram cotados diretamente com os representantes no Brasil, tendo seu preço final ligado à cotação do euro e do dólar. Outros itens de fabricação nacional foram cotados em empresas que trabalham com a venda direta, tendo seu preço já em real. Os preços cotados estão expostos na tabela 5.

Tabela 5: Avaliação de custos para implantação do método de referência usando a técnica de absorção atômica e método proposto, utilizando voltametria.

Espectroscopia de Absorção Atômica		Voltametria	
Item	Custo (R\$)	Item	Custo (R\$)
Espectrômetro de absorção atômica com chama e forno de grafite ¹	244.465,00	Potenciostato portátil ²	40.560,00
Lâmpada de catodo oco de Cd ¹	4.075,50	Eletrodo de Referência (Ag/AgCl)	2.440,00
Lâmpada de catodo oco de Pb ¹	3.945,50	Eletrodo de trabalho (carbono vítreo)	2.340,00
Gás acetileno 9Kg	2.500,00	Contra Eletrodo (Platina)	2.346,30
Ácido clorídrico 1L	21,28	Ácido clorídrico 1L	21,28
Ácido nítrico 1L	66,97	Ácido nítrico 1L	66,97
Ácido Sulfúrico 1L	66,91	Ácido Sulfúrico 1L	66,91
Padrão de Cd 1000 mg L ⁻¹ (125 mL)	115,00	Nitrato de Bismuto (100g)	350,77
Padrão de Pb 1000 mg L ⁻¹ (125 mL)	115,00	Padrão de Cd 1000 mg L ⁻¹ (125 mL)	115,00
		Padrão de Pb 1000 mg L ⁻¹ (125 mL)	115,00
		Suspensão de Alumina 0,05 micron 1L	197,24
		Pano para polimento 5un	141,34
TOTAL	R\$ 255.371,16	TOTAL	R\$ 48.760,81

¹Cotação dos itens em Euro: 1 euro = 6,50 reais

²Cotação dos itens em Dólar: 1 dólar = 5,60 reais

Os orçamentos dos equipamentos foram realizados diretamente com as empresas que realizam as vendas e importações dos mesmos, *Analytik Jena* no caso do espectrômetro de absorção atômica contendo os dois módulos de atomização (chama e forno de grafite) e *Interprise*, no caso do potenciostato portátil. Os demais itens foram cotados com empresas nacionais especializadas no comércio de reagentes e itens de consumo para laboratórios.

Na Tabela 6, são descritos todos os itens imprescindíveis para implantações e aplicações das duas técnicas mencionadas. Entretanto, não são considerados nesta tabela outros custos como adequação física para o projeto, como por exemplo tubulação e sala de gases, além de uma sala separada para o equipamento (no caso do FAAS e GF AAS). Já para o potenciostato portátil, os custos de projeto se tornam mais simples, visto que ele pode ser facilmente utilizado em uma bancada de laboratório, ou até de forma descentralizada, inclusive não necessitando de rede elétrica. É importante ressaltar que o potenciostato (*EmStatBlue*) possui bateria com autonomia de até 10h e interface com o seu software (*PSTrace*) no computador ou notebook através de cabo USB ou *bluetooth*. Há inclusive, uma versão do software para *smartphone* (*PStouch*). Vale destacar que a instrumentação envolvida em análises voltamétricas exigem menores custos de manutenção do que as técnicas de FAAS e GF AAS. Além do mais, é importante frisar que a instrumentação usada em voltametria geralmente não necessita de ações técnicas preventivas, por se tratar de um sistema bastante robusto.

Realizou-se, também, cotações para aprimorar ainda mais a implantação da técnica voltamétrica. Em razão desta análise envolver concentrações muito baixas dos analitos, se faz necessário que os ácidos utilizados sejam puros, embora para os ensaios realizados não se tenha verificado que os ácidos foram fontes de contaminação, uma vez que se comparou o uso de HCl e HNO₃ destilados e não. No entanto, sugere-se a aquisição de um destilador de ácidos, cujo custo benefício é extremamente favorável em comparação à compra direta de ácidos ultrapuros. Além do mais, verificou-se a necessidade de usar estabilizador ou nobreak nas análises realizadas no laboratório, já que a rede elétrica oscilava bastante, interferindo algumas vezes na reprodutibilidade das medidas de corrente, ou mesmo para prevenir quedas de energia elétrica, caso venha-se utilizar um computador desktop.

Em vista disso, considerou-se importante a aquisição de um nobreak para que não se tenha risco de dano ao equipamento, além de fornecer maior confiabilidade nas medidas voltamétricas realizadas em laboratório centralizado. A Tabela 6 apresenta os custos de aquisição de um destilador de ácidos e de um nobreak.

Tabela 6: Avaliação de custos para aquisição de um destilador de ácidos e um Nobreak

Item	Custo (R\$)
Sistema de destilação de ácidos ¹	60.742,50
Nobreak 1200VA	639,00
TOTAL	R\$ 61.381,50

8. CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste trabalho possibilitou corroborar a viabilidade da utilização da técnica de voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial na determinação de Cd e Pb em amostras de Angélica e, até certa extensão, Genciana, matérias primas do fitoterápico Olina[®].

Verificou-se que a etapa de abertura de amostra adaptou-se adequadamente ao método voltamétrico. A descontaminação do material também se mostrou determinante, nesse caso, para a diminuição da contaminação dos analitos no branco.

Os limites de detecção e quantificação determinados ficaram na faixa esperada de acordo com a técnica e satisfatoriamente abaixo dos limites máximos exigidos na legislação.

Analisando os ensaios de análise de recuperação, para o caso da amostra Angélica, os resultados se mostraram satisfatórios para níveis de concentração próximos aos estabelecidos pela legislação vigente, possibilitando que as concentrações dos analitos aplicadas nas fortificações fossem encontradas entre 35% e 124% após a aplicação do método voltamétrico proposto. Obteve-se baixas recuperações de Cd e Pb na amostra de Genciana, aplicando-se o mesmo método de fortificação usado na amostra de Angélica, embora se tenha observado aumento considerável nas recuperações após adaptações no método de fortificação, ou seja, no próprio cadinho usado na digestão, ao invés de realizar fortificação em uma massa maior da amostra em um tubo cônico. Em vista disso, necessita-se realizar mais estudos de otimização dos parâmetros do método, como volume de amostra e modo de fortificação, para a amostra de Genciana.

Além dos resultados, destaca-se que o custo de implantação da voltametria para análise de rotina de Cd e Pb seria 5 vezes menor do que os métodos de referência, utilizando as técnicas de FAAS e GF AAS, além de muitas outras vantagens relacionadas a tempo de análise, portabilidade, análise *in situ*, miniaturização e análises mais ambientalmente corretas.

9. ESTUDOS FUTUROS

É de grande interesse que se amplie o escopo das determinações de metais pesados (controlados por legislação específica) por voltametria em Angélica, Genciana e outras amostras vegetais utilizadas pelo Laboratório Wesp na produção da Olina[®]. A ampliação desta pesquisa poderia se dar no sentido de desenvolvimento de métodos para determinar Cd e Pb nas outras matérias primas, além de considerar outros analitos como As e Hg. Além do mais, sugere-se utilizar outros métodos de preparo de amostra, fora dos recomendados pela Farmacopeia brasileira, como por exemplo, em sistema fechado utilizando dedo frio ou microondas. Por fim, é de extrema importância atestar a exatidão dos métodos, tendo um método de outra técnica como referência, já que não existem materiais de referência certificados para estas matrizes.

10. REFERÊNCIAS

- [1] FARMACOPÉIA, A. N. D. V. S. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira, 6ª edição**, v. 1, p. 1–874, 2019.
- [2] ANVISA. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos/fitoterapicos>.
- [3] TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. [s.l.: s.n.].
- [4] DUFFUS, J. H. “heavy metals” - A meaningless term? (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.
- [5] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). ICH guideline Q3D (R1): Guideline for Elemental Impurities. **ICH Quality Guidelines**, n. March, p. 1–82, 2019.
- [6] FREIRE, M. DE F. I. Metais pesados e plantas medicinais. **Revista Científica Eletrônica De Agronomia**, v. 4, n. 8, p. 1–14, 2005.
- [7] GONÇALVES JUNIOR, A. C.; LUCHESE, E. B.; LENZI, E. Avaliação da fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em latossolo vermelho escuro tratado com fertilizantes comerciais. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 173–177, 2000.
- [8] MACHADO, L. L. Cadmio, chumbo e mercúrio em medicamentos fitoterápicos. p. 160, 2001.
- [9] CALDEIRA, C. et al. Limites de aplicabilidade da determinação do ácido delta-aminolevulínico urinário como teste screening na avaliação da intoxicação profissional pelo chumbo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 225–230, 2000.
- [10] BAYLY, G. R. et al. Lead poisoning from Asian traditional remedies in the West Midlands - report of a series of five cases. **Human & Experimental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 24–28, 1995.
- [11] SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. [s.l.] Thomson, 2006.

[12] HOČEVAR, S. B. et al. A study on operational parameters for advanced use of bismuth film electrode in anodic stripping voltammetry. **Electroanalysis**, v. 14, n. 24, p. 1707–1712, 2002.

[13] ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada - Rdc Nº 166, De 24 De Julho De 2017. **Diário oficial da União**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

[14] ALESSI, I. A. G. **Voltametria de pulso diferencial como alternativa no monitoramento de cádmio, chumbo e cobre em lodo de estações de tratamento de água para sua possível utilização na agricultura**. UFRGS. Porto Alegre: [s.n.].

[15] INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Inmetro**, v. 9, p. 30, 2020.

APÊNDICE A – Parâmetros analíticos para as curvas de linearidade**Tabela 7:** Parâmetros analíticos para Cd e Pb a partir da adição do padrão - Angélica

Parâmetro analítico	Cd	Pb
Potencial de pico (V)	-0,80	-0,55
Coeficiente de determinação R ²	0,99171	0,99950
Inclinação da reta ($\mu\text{A L } \mu\text{g}^{-1}$)	0,02238	0,02246
Desvio padrão de inclinação reta ($\mu\text{A L } \mu\text{g}^{-1}$)	0,00145	0,00021
Intercepto (μA)	-0,0118	0,05883
Desvio padrão do intercepto (μA)	0,01347	0,00332
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,2	0,9
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,7	2,7

Tabela 8: Parâmetros analíticos para Cd e Pb a partir da adição do padrão - Genciana

Parâmetro analítico	Cd	Pb
Potencial de pico (V)	-0,80	-0,55
Coeficiente de determinação R ²	0,99607	0,99722
Inclinação da reta ($\mu\text{A L } \mu\text{g}^{-1}$)	0,04207	0,06863
Desvio padrão de inclinação reta ($\mu\text{A L } \mu\text{g}^{-1}$)	0,00099	0,00115
Intercepto (μA)	0,02688	0,70111
Desvio padrão do intercepto (μA)	0,01568	0,02621
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,3	0,6
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,8	1,9