

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Preparo de amostras e análise elementar de  
produtos farmacêuticos**

**Mariana Ortega Garcia\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

**Orientador: Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega**

**\* Especialista de Produto na Nova Analítica Importação e Exportação Ltda**

**São Carlos - SP  
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G216p Garcia, Mariana Ortega  
Preparo de amostras e análise elementar de  
produtos farmacêuticos / Mariana Ortega Garcia. --  
São Carlos : UFSCar, 2016.  
98 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Química analítica. 2. Preparação de amostras  
(Química analítica). 3. Produtos farmacêuticos. I.  
Título.



---

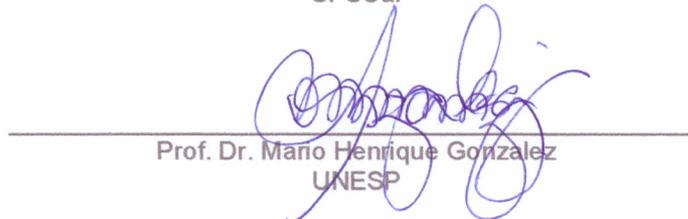
Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mariana Ortega Garcia, realizada em 17/08/2016:

  
Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega  
UFSCar

  
Prof. Dr. Francisco Wendel Batista de Aquino  
UFSCar

  
Prof. Dr. Mano Henrique Gonzalez  
UNESP

Dedico este trabalho à minha avó Maria,  
minha maior incentivadora.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus por todas as oportunidades que tive, especialmente em desenvolver este trabalho, pela força e proteção em tantas horas de estrada.

Meu agradecimento especial ao Professor Joaquim de Araújo Nóbrega, pela oportunidade que me foi dada, pela orientação, pela confiança em meu trabalho, pela paciência, pelo aprendizado e por tantas discussões e conversas enriquecedoras.

Agradeço também à Nova Analítica, em especial ao Luiz Bravo e Raquel Rainone, pela oportunidade em crescer e por confiarem em meu trabalho.

Aos colegas do GAIA, em especial à Dra. Lucimar Fialho, meus agradecimentos pela ajuda, cooperação, discussões e conversas tão proveitosas.

Agradeço aos meus amigos e colegas de empresa Bruno Menezes, Diego Leite, Emilly Imad e Valeska Meirelles não somente pelo apoio e ajuda direta e indireta neste trabalho, mas pelos anos de amizade e trabalho em equipe.

Meus agradecimentos ao Professor Stephan Hann da Universidade de Recursos Naturais e Ciências da Vida de Viena e seu grupo, em especial à Marianna Vitkova, por me receberem como parte do grupo, pelas discussões e ensinamentos.

Agradeço aos membros das bancas de admissão e qualificação, Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro, Prof. Dr. George Luis Donati e Dr. Francisco Wendel Batista de Aquino pela disponibilidade, pelas discussões e valiosas ideias.

Agradeço imensamente à minha família, meus pais Josefa e Reginaldo, meus irmãos Marcela e Felipe e minha avó Maria, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço ao meu namorado Fábio, pelo companheirismo, apoio e paciência nos momentos difíceis

Agradeço às minhas amigas queridas, Aline, Daniela, Erica e Raquel, não somente pelos momentos divertidos, mas por me apoiarem nas minhas loucuras e entenderem os momentos de ausência.

## Lista de Abreviaturas

<b>AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica, do inglês Atomic absorption spectrometry
<b>BEC</b>	Concentração equivalente ao sinal de fundo, do inglês Background equivalent concentration
<b>BP</b>	Farmacopéia britânica, do inglês British Pharmacopeia
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetraacético
<b>EMA</b>	Agência Europeia de Medicamentos, do inglês European Medicines Agency
<b>FAAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com atomização por chama, do inglês Flame atomic absorption spectrometry
<b>GFAAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com atomização por forno de grafite, do inglês Graphite furnace atomic absorption spectrometry
<b>ICH</b>	Conferência Internacional em Harmonização para Regulamentação Técnica para Registro de Fármacos para Uso Humano, do inglês International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
<b>ICP OES</b>	Espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado, do inglês Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado, do inglês Inductively coupled plasma mass spectrometry
<b>INAA</b>	Análise instrumental por ativação neutrônica, do inglês Instrumental neutron activation analysis
<b>IPEC</b>	Conselho Internacional de Excipientes Farmacêuticos, do inglês International Pharmaceutical Excipients Council
<b>IR</b>	Infra-vermelho, do inglês Infrared
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry

<b>J</b>	Concentração do elemento de interesse no limite alvo
<b>LA-ICP-MS</b>	Espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado com ablação a laser, do inglês Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry
<b>LIBS</b>	Espectroscopia de plasma induzido por laser, do inglês Laser induced breakdown spectroscopy
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>PDE</b>	Exposição diária permitida, do inglês Permitted daily dose
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno
<b>RSD</b>	Desvio padrão relativo, do inglês relative standard deviation
<b>SBR</b>	Razão sinal analítico/sinal de fundo, do inglês signal-to-background ratio
<b>SRC</b>	Câmara de reação única, do inglês Single reaction chamber
<b>TFM-PTFE</b>	Politetrafluoretileno com cadeia perfluoralcóxi, do inglês polytetrafluorethylene
<b>USP</b>	Farmacopeia Norte-Americana, do inglês United States Pharmacopea
<b>UV</b>	Ultra-violeta
<b>XRF</b>	Fluorescência de raios-x, do inglês X-ray fluorescence

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1	Características de algumas técnicas espectroanalíticas.....	07
Tabela 2.2	Limites de exposição estabelecidos pelo capítulo <232> da USP.....	11
Tabela 2.3	Limites de exposição estabelecidos pelo EMA.....	16
Tabela 2.4	Limites de exposição estabelecidos pelo ICH.....	18
Tabela 4.1	Impurezas residuais em água e ácidos em diferentes graus de pureza. Dados em µg/L.....	28
Tabela 4.2	Especificações técnicas do sistema de digestão por micro-ondas Speed Wave Four (Berghof).....	30
Tabela 4.3	Especificações técnica do ICP OES modelo iCAP 6500 (Thermo Scientific).....	32
Tabela 4.4	Especificação técnica do sistema de ICP-MS modelo iCAP Qc (Thermo Scientific).....	34
Tabela 4.5	Amostras de excipientes.....	36
Tabela 4.6	Amostras de medicamentos de uso contínuo.....	37
Tabela 4.7	Amostras de multivitamínicos, multiminerais e fitoterápicos .....	38
Tabela 5.1	Programa de aquecimento para a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.....	40
Tabela 5.2	Teor de carbono orgânico residual nos digeridos (%) determinado de acordo com a mistura ácida utilizando-se o comprimento de onda de C em 193,091 nm.....	43
Tabela 5.3	Teor de carbono orgânico dissolvido nos digeridos (%) determinado de acordo com a proporção amostra/mistura ácida utilizando-se ICPOES com visão axial.....	45
Tabela 5.4	Aspecto visual dos digeridos de amostras de medicamentos de uso contínuo.....	46
Tabela 5.5	Aspecto visual dos digeridos de amostras de excipientes .....	47

Tabela 5.6	Aspecto visual dos digeridos de amostras de multivitamínicos, multiminerais e produtos naturais.....	48
Tabela 6.1	Condições operacionais do ICP OES modelo iCAP 6500 (Thermo Scientific).....	54
Tabela 6.2	Dados experimentais sobre linhas de emissão para cada analito.....	55
Tabela 6.3	Comparativo de valores de PDE estabelecidos pelas normas USP, EMA e ICH.....	59
Tabela 6.4	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) das soluções analíticas para construção das curvas analíticas de calibração.....	60
Tabela 6.5	Limites de detecção e quantificação obtidos experimentalmente.....	62
Tabela 6.6	Análise qualitativa dos elementos alvo nos medicamentos estudados.....	64
Tabela 6.7	Concentrações (mg/kg) determinadas para as amostras de medicamentos de uso contínuo por ICP OES.....	67
Tabela 6.8	Concentrações (mg/kg) determinadas para as amostras de excipientes por ICP OES.....	68
Tabela 6.9	Concentrações (mg/kg) determinadas para as amostras de multivitamínicos por ICP OES.....	69
Tabela 6.10	Porcentagem de recuperação após adição de padrão de concentração 0,5J.....	71
Tabela 6.11	Porcentagem de recuperação após adição de padrão de concentração 1,5J.....	73
Tabela 7.1	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) das soluções analíticas para construção das curvas analíticas de calibração para ICP-MS .....	79
Tabela 7.2	Limites de detecção, quantificação e $R^2$ obtidos a partir das curvas analíticas de calibração.....	81

Tabela 7.3	Porcentagem de recuperação (%) após adição de padrão de concentração 0,5J.....	85
Tabela 7.4	Porcentagem de recuperação (%) após adição de padrão de concentração 1,5J.....	87

## Lista de Figuras

Figura 1.1	Linha do tempo das normas referentes aos contaminantes inorgânicos em medicamentos.....	03
Figura 2.1	Esquema simplificado de AA, ICP-OES e ICP-MS <sup>10</sup> .....	07
Figura 2.2	Fluxograma do preparo de amostras de acordo com capítulo <233> da USP <sup>6</sup> .....	13
Figura 4.1	Esquema do destilador de ácidos subboiling Distillacid (Berghof).....	28
Figura 4.2	Esquema de funcionamento do sistema de micro-ondas SpeedWave Four (Berghof).....	29
Figura 4.3	Esquema de funcionamento do sensor de pressão (Berghof).....	31
Figura 4.4	Esquema de funcionamento do sensor de temperatura (Berghof)..	31
Figura 4.5	Componentes de ICP OES modelo iCAP 6500 (Thermo Scientific).....	33
Figura 4.6	Composição esquemática do ICP-MS modelo iCAP Qc (Thermo Scientific).....	34
Figura 4.7	Potenciais fontes de contaminação de fármaco (adaptado de ICH).	35
Figura 5.1	Curvas analíticas de calibração para carbono.....	43
Figura 5.2	Curva analítica de calibração do carbono em 193,091 nm na visão axial.....	44
Figura 6.1	Otimização da intensidade de sinal em função da potência de radiofrequência (W).....	51
Figura 6.2	Otimização da intensidade de sinal em função da vazão (L/min) do gás de nebulização.....	52
Figura 6.3	Otimização da intensidade de sinal em função fluxo de gás auxiliar (L/min).....	53
Figura 6.4	Gráfico representativo das recuperações obtidas com adição de 0,5J de analito.....	75

Figura 6.5	Gráfico representativo das recuperações obtidas com adição de 1,5J de analito.....	76
Figura 7.1	Exemplo de otimização automática (tune) dos parâmetros de análise: posição da tocha (software Qtegra – Thermo Scientific).....	78
Figura 7.2	Recuperações para adição de 0,5J de cada analito.....	89
Figura 7.3	Recuperações para adição de 1,5J de cada analito.....	89

## Resumo

### Preparo de amostras e análise elementar de produtos farmacêuticos

O processo de manufatura de produtos farmacêuticos pode causar ao produto final contaminação por resíduos metálicos acarretando potenciais prejuízos à saúde humana. Com o objetivo de regulamentar a produção farmacêutica e estabelecer padrões de qualidade para o produto final, organizações como USP, EMA e ICH estipularam regulamentações para estabelecer a exposição máxima aos elementos-alvo, incluindo elementos notórios pela toxicidade ao ser humano. Outros elementos, apesar da essencialidade em certas concentrações requerem controle de exposição. Em geral, para que uma amostra seja analisada por técnicas de ICP requer-se que a mesma seja convertida em uma solução representativa, geralmente envolvendo digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. Este estudo buscou estabelecer um método geral de preparo de amostra e análise elementar de amostras de produtos farmacêuticos (entre excipientes e fármacos de uso contínuo, multivitamínicos, multiminerais e produtos naturais) visando atender a demanda da indústria farmacêutica. Iniciou-se o estudo de preparo de amostra avaliando-se as possíveis misturas ácidas para a digestão assistida por radiação micro-ondas, envolvendo ácido nítrico, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio. Para isso foi utilizado um programa de aquecimento de 41 min com temperatura máxima de 210 °C. A eficiência da digestão foi avaliada determinando-se o carbono orgânico dissolvido. O procedimento estabelecido envolveu o uso de 5 mL de água régia invertida para cada 500 mg de amostra (tanto excipiente quanto produto final) a ser digerida. Para a análise elementar foram utilizadas as técnicas de ICP OES e ICP-MS. Em ambos os casos as curvas analíticas de calibração foram construídas com base no J estabelecido pela USP, que considera a exposição diária permitida para o elemento alvo, a máxima dose diária do medicamento e o fator de diluição da amostra. Ambas as técnicas de mostraram adequadas para a determinação de impurezas metálicas. As recuperações apresentaram resultados próximos a 100% para a maioria das amostras para medidas usando ICP OES. Para a técnica de ICP-MS, apesar de apresentar valores dentro da variação de 70 a 150% estabelecida pela USP, os resultados de recuperação ainda requerem uma avaliação mais detalhada.

## **Abstract**

### **Sample preparation and elemental analysis of pharmaceutical samples**

The medicine manufacture process may cause the final product contamination with metallic residues to the detriment of human healthy. Aiming to regulate the pharmaceutical production and establish standards of final products quality, organizations such as the USP, EMA and ICH established regulations governing maximum exposure to target elements, including some metals that are known to be toxic to human health. Other elements, despite its essentiality in certain concentrations, require exposure control. Regularly a sample to be measured by ICP techniques requires its conversion to a representative solution, usually involving microwave-assisted acid digestion. Once decomposed, the elemental analysis is done using inductively coupled plasma techniques. This study aims to establish a general method of sample preparation and elemental analysis of drug samples (excipients, continuous use drugs, multivitamins, multimineral and natural products), in order to meet the demands of the pharmaceutical industry. In this sense, sample preparation was based on microwave assisted acid digestion using the following reagents: nitric acid, hydrochloric acid and hydrogen peroxide. The established procedure involves a 41 min heating program with a maximum temperature of 210 °C. The efficiency of digestion was assessed by determination of dissolved organic carbon. Best digestions were reached using 5 ml of inverted aqua regia for 500 mg of sample. The elemental analysis techniques used were ICP OES and ICP-MS. In both cases, analytical calibration curves were built based on the J value, established by USP, which takes into account the permitted daily exposure to the target element, the maximum daily dose of medicament and the sample dilution factor. Both techniques were suitable for metal impurities determination. For ICP OES recoveries were close to 100% for most analytes in all tested samples. For ICP-MS, despite being within the range from 70 to 150% set by USP, recoveries still require further evaluation.

## Sumário

Capítulo 1 – Introdução.....	01
1.1 Visão geral.....	02
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica.....	05
2.1 Análise elementar de produtos farmacêuticos – Antecedentes.....	06
2.2 Aspectos gerais sobre aplicações analíticas de ICP OES e ICP-MS.....	08
2.3 Normas.....	10
2.3.1 USP – Farmacopéia Norte-Americana.....	10
2.3.2 EMA – Agência Europeia de Medicamentos.....	14
2.3.3 ICH - Conselho Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Medicamentos para Uso Humano.....	17
2.4. Elementos.....	20
Capítulo 3 – Objetivos.....	23
Capítulo 4 - Materiais e métodos.....	25
4.1 Reagentes e soluções.....	26
4.2 Procedimentos.....	26
4.3 Instrumentação analítica.....	27
4.3.1 Destilador de ácidos.....	27
4.3.2 Sistema de digestão ácida assistido por micro-ondas.....	29
4.3.3 ICP OES.....	32
4.3.4 ICP-MS.....	33
4.4 Amostras.....	35
Capítulo 5 - Digestão ácida assistida por micro-ondas.....	39
5.1 Ácidos e outros reagentes.....	41
5.2 Seleção da mistura ácida.....	42
5.3 Avaliação da proporção amostra/mistura ácida.....	44
5.4 Avaliação dos digeridos.....	46

Capítulo 6 - Análise elementar por ICP OES.....	49
6.1 Ajuste das condições operacionais.....	50
6.1.1 Potência aplicada de radiofrequência.....	50
6.1.2 Vazão do gás de nebulização.....	51
6.1.3 Vazão do gás auxiliar.....	52
6.1.4 Linhas de emissão.....	54
6.2 Curvas analíticas de calibração.....	58
6.3 Resultados e discussão.....	61
6.3.1 Limites de detecção e quantificação.....	61
6.3.2 Análise elementar.....	63
6.3.3 Experimentos de Adição e Recuperação.....	70
Capítulo 7 – Análise elementar por ICP-MS.....	77
7.1 Ajuste das condições operacionais do ICP-MS.....	78
7.2 Curvas analíticas de calibração.....	79
7.3 Resultados preliminares e discussão.....	80
Capítulo 8 – Conclusão.....	91
Capítulo 9 – Referências bibliográficas.....	95
Apêndice	

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução

### 1.1 Visão geral

Ciente da necessidade de regulamentar a presença de impurezas elementares, em 1905 a USP (United States Pharmacopeia) publicou pela primeira vez um capítulo referente ao tema<sup>1</sup>. Intitulado Metais Pesados, o capítulo 231 estabeleceu limites e verificações de conformidade de elementos como chumbo, mercúrio, bismuto, arsênio, estanho, cádmio, prata, cobre e molibdênio<sup>2</sup>. Tal procedimento envolve a precipitação de cátions de elementos metálicos na forma de sais de sulfeto em solução aquosa. O resultado é obtido por comparação visual entre amostra e solução padrão de Hg(II).

Esse procedimento de análise vem sendo usado há mais de 100 anos. Contudo, mesmo tendo passado por algumas revisões, esse procedimento foi implementado antes do advento da instrumentação analítica moderna, tornando necessária sua atualização e modernização.

O procedimento recomendado pelo capítulo 231 não é seletivo e apresenta diversas desvantagens, tais como a examinação visual subjetiva, uso de grandes quantidades de amostras, toxicidade do reagente, perda de elementos voláteis, além de não fornecer informações qualitativas ou quantitativas específicas para cada elemento<sup>3</sup>.

No início dos anos 2000 novas normas começaram a ser publicadas, com o objetivo de especificar, modernizar e padronizar a análise elementar de produtos farmacêuticos. A evolução das normas pode ser observada no infográfico da Figura 1.

Em 2008 foi publicado e posteriormente implementado para novos produtos o Guia de Limites de Especificação de Resíduos de Catalisadores Metálicos ou Reagentes Metálicos. Nesse Guia, os elementos alvo são classificados de acordo com sua toxicidade e têm seus limites permitidos determinados<sup>4</sup>. Nenhum procedimento analítico é especificado.

Em 2010 a Farmacopeia Norte-Americana publicou novos capítulos <232> e <233>, intitulados, respectivamente, “Impurezas Elementares – Limites” e “Impurezas Elementares – Procedimentos”. Esses capítulos estabelecem limites para

Cd, Pb, As, Hg, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Cr, Mo, Ni, V e Cu<sup>5</sup>, além de estabelecer procedimentos de análise e validação<sup>6</sup>.

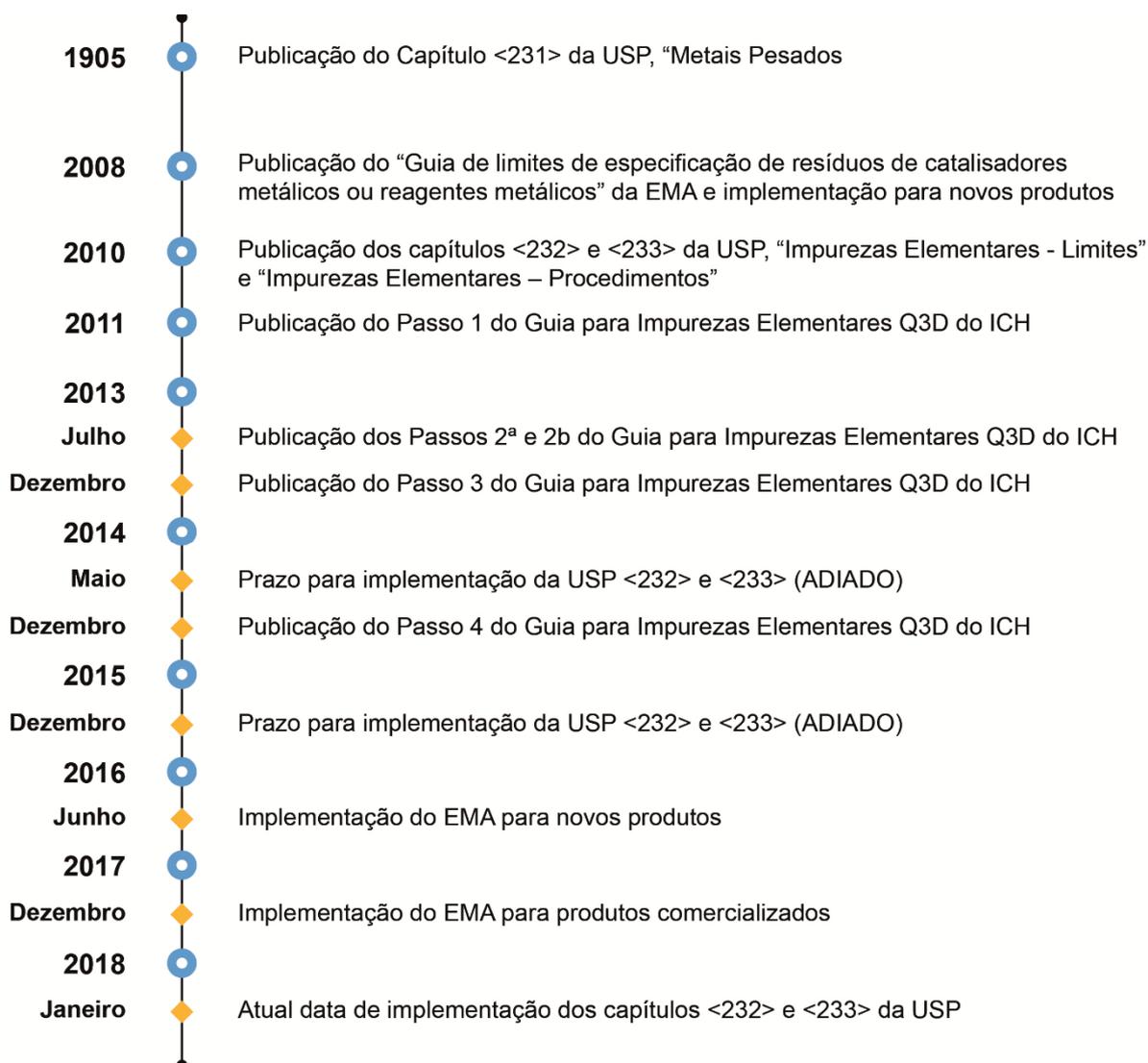


Figura 1.1 Linha do tempo das normas referentes aos contaminantes inorgânicos em medicamentos

Em 2011, o primeiro passo do Guia para Impurezas Elementares do ICH (Conselho Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Medicamentos para Uso Humano) foi publicado. Durante 4 anos esse guia foi atualizado até chegar à sua versão final, no passo 4. Com o intuito de harmonizar as diferentes normas já publicadas, foram adicionados ainda outros elementos que ainda não tinham sido considerados e estabelecidos limites - Co, Tl, Au, Se, Ag, Li, Sb, Ba e Sn<sup>7</sup>. Assim como EMA, esse guia não estabelece nenhum procedimento analítico específico, mas sugere que procedimentos publicados pela farmacopeia sejam seguidos.

O prazo de implementação dos capítulos da USP estabelecido inicialmente para 2014 foi adiado para 2015 e, posteriormente, novamente adiado. O atual prazo estabelecido é janeiro de 2018.

O prazo de implementação do órgão europeu é 2016 para novos produtos e 2017 para os produtos já comercializados.

As três normas aqui citadas serão posteriormente detalhadas na Revisão Bibliográfica.

# **CAPÍTULO 2**

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Análise elementar de produtos farmacêuticos – Antecedentes

Mesmo antes da publicação dessas normas, o meio acadêmico já demonstrava interesse na determinação de elementos-traço em produtos farmacêuticos. Em 2007 Rao et al. publicaram uma revisão sobre a análise de produtos farmacêuticos por ICP-MS incluindo artigos publicados desde meados da década de 1990. Nessa revisão foram comparados métodos de preparo de amostra, analitos de interesse, tecnologia empregada na detecção dos elementos e até mesmo especificação de certos elementos<sup>8</sup>.

A preocupação com a seriedade das possíveis consequências no caso de intoxicação e a iminência de implementação de novas diretrizes, contribuíram ainda mais para que novos estudos envolvendo os elementos-alvo fossem publicados.

Lewen<sup>9</sup> revisou as principais técnicas espectroanalíticas empregadas na avaliação de produtos farmacêuticos. Foram considerados estudos envolvendo espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), AAS com forno de grafite (GFAAS), espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

A Figura 2.1 mostra um esquema simplificado das principais técnicas espectroanalíticas citadas.

A espectrometria atômica fundamenta-se na medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de radiação primária por átomos gasosos no estado fundamental. A atomização pode ocorrer através de chama, forno de grafite, atomizadores metálicos, vapor frio e geração de hidretos.

A ICP OES está baseada no princípio de emissão de energia dos átomos ou íons excitados ao decaírem para o estado fundamental de energia. Já a ICP-MS tem como princípio a detecção da carga/massa de um íon gerado pelo plasma.

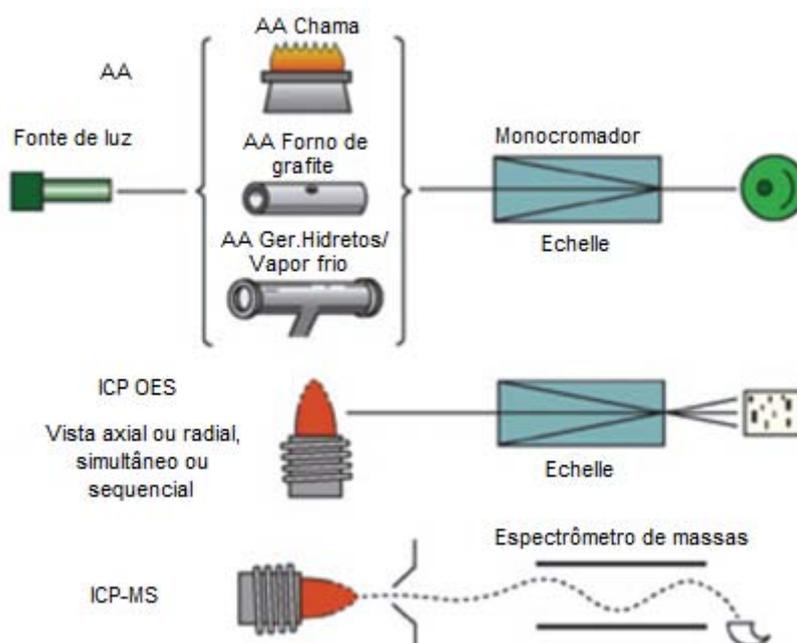


Figura 2.1 Esquema simplificado de AA, ICP-OES e ICP-MS<sup>10</sup>

Ao escolher a técnica mais adequada é necessário considerar diversos fatores, entre eles, a capacidade de detecção, faixa de trabalho e frequência analítica<sup>10</sup>. Algumas características dessas técnicas estão apresentadas na Tabela 2.1

Tabela 2.1 Características de algumas técnicas espectroanalíticas<sup>10</sup>

	Técnica	Volume de amostra	Capacidade de detecção ( $\mu\text{g/L}$ )	Faixa típica de trabalho ( $\text{mg/L}$ )	Frequência analítica**
Técnicas de absorção atômica	FAAS	2-5 mL/min	1 - 100	10 - 1000	10 amostras/hora
	GFAAS	50 $\mu\text{L}$	0,01 - 1	10 - 100*	1 amostra/hora
Técnicas de emissão atômica	ICP OES axial	1 mL/min	0,01 - 10	1 - 100	20 amostras/hora
	ICP OES radial	1 mL/min	0,1 - 100	10 - 1000	20 amostras/hora
ICP-MS	ICP-MS	1 mL/min	0,0001 - 1	0,1 - 100	20 amostras/hora

\*  $\mu\text{g/L}$

\*\* Considerando 15 elementos por amostra

A atomização por chama em espectrometria de absorção atômica possui a menor capacidade de detecção, não atendendo aos limites estabelecidos pelas normas. Apesar disso, alguns estudos aplicaram essa técnica.

Orisakwe et al. determinaram chumbo e cádmio em diferentes xaropes pediátricos<sup>11</sup>. Sugisawa et al. determinaram magnésio em tablets<sup>12</sup> e Issa et al.

determinaram ferro em antibióticos<sup>13</sup>. Já Zachariadis et al. determinaram ferro, zinco, cálcio e magnésio em levedura seca utilizada para formulações farmacêuticas<sup>14</sup>.

Por se tratar de técnica monoelementar, percebe-se que poucos elementos são avaliados por amostra. Essa característica fica ainda mais acentuada ao considerarmos a atomização por forno de grafite. Apesar da alta capacidade de detecção, a frequência analítica da GFAAS acaba limitando seu uso no caso de demandas analíticas que exigem determinações multielementares. Princípios ativos tiveram seu teor de paládio avaliado por GFAAS em estudos realizados por Wang et al.<sup>15</sup> e Jia et al.<sup>16</sup>.

As técnicas de ICP OES e ICP-MS apresentam maior aplicabilidade às normas devido à alta capacidade de detecção combinada à alta frequência analítica.

Zachariadis et al.<sup>17</sup> determinaram 21 elementos em antibióticos por ICP OES. Zuccarello et al.<sup>18</sup> avaliaram 64 elementos extraíveis e/ou lixiviáveis de matérias de embalagem de produtos farmacêuticos, envolvendo tanto ICP OES quanto ICP-MS.

Owen et al.<sup>19</sup> fizeram fingerprint de remédio a base de ervas usando ICP OES. Foram determinados 16 elementos em amostras de diferentes processamentos.

Wang et al.<sup>20</sup> desenvolveram um procedimento de análise para screening por ICP-MS em substituição ao procedimento antiquado preconizado pelo capítulo 231 da USP, EP (European Pharmacopeia) e BP (British Pharmacopeia).

Apesar da característica multielementar da técnica, Kaufmann<sup>21</sup> avaliou o teor de chumbo em 45 produtos farmacêuticos utilizando ICP-MS. Dentre esses produtos – excipientes, produtos farmacêuticos e complementos - percebeu-se uma baixa contaminação do elemento em questão. Apesar disso é necessário observar a dose diária recomendada de cada um dos produtos a fim de avaliar os reais riscos à saúde que acarretam.

## **2.2 Aspectos gerais sobre aplicações analíticas usando ICP OES e ICP-MS**

A iminência de implementação de novas técnicas na análise elementar de medicamentos promoveu um maior estudo em relação ao assunto. Além de novos estudos publicados envolvendo preparo de amostras e técnicas de plasma indutivamente acoplado, revisões e compilações foram publicadas.

De acordo com Lewen<sup>22</sup> o principal desafio está presente no preparo da amostra e não na análise elementar em si. Considerando essa informação foi feito um levantamento das principais estratégias de preparo, com seus respectivos potenciais e inconvenientes. As diluições diretas, tanto em meio aquoso quanto em solvente orgânico podem ser estratégias eficientes e rápidas, porém é preciso garantir que toda a amostra seja solubilizada. A digestão ácida apesar de eficiente pode introduzir possíveis interferentes. Por outro lado, técnicas que envolvem a introdução direta de sólidos, tais como ablação laser, espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (LIBS) e fluorescência de raios X (XRF), apesar de exigir limitado preparo da amostra, requerem cuidadosa calibração para corrigir efeitos de matriz.

A fim de aumentar a eficiência no preparo de amostra, Tu<sup>23</sup> avaliou a dissolução das amostras em solvente orgânico para determinação elementar usando ICP OES. Foram avaliados DMSO e DMF. Uma vez que o DMSO apresenta alto ponto de ebulição, isso dificultaria o uso de acessório dessolvador, dando-se prioridade ao uso de DMF. Após observar a instabilidade de alguns elementos no solvente em questão foi adicionado EDTA à mistura, além de Y como padrão interno. A melhoria foi observada em testes de recuperação. O procedimento proposto mostrou-se eficiente para a redução do tempo de preparo de amostra, além de garantir melhorias na sensibilidade e níveis aceitáveis de precisão e recuperação.

Muller et al.<sup>24</sup> publicaram estudo envolvendo o preparo de amostras e análise por ICP-MS de amostras de princípios ativos farmacêuticos a fim de obedecer às novas normas da USP. Devido à possíveis presenças de anéis aromáticos nas estruturas desses compostos, foi utilizado, além de sistema de digestão por micro-ondas convencional, um sistema especial, chamado SRC, câmara de reação única, do inglês single reaction chamber, que permite a aplicação de altas pressões e temperaturas. As misturas ácidas para o preparo foram avaliadas considerando-se o teor de carbono orgânico residual presente nos digeridos e as possibilidades de formação de interferentes na quantificação por ICP-MS. O procedimento se mostrou adequado e os limites de quantificação obtidos foram compatíveis com os limites estabelecidos pela norma.

STOVING et al.<sup>25</sup> desenvolveram e validaram um procedimento por ICP OES para determinação dos elementos alvo tanto da USP quanto da EMA. Amostras foram digeridas em forno de micro-ondas utilizando água régia invertida como mistura ácida. O procedimento foi eficiente, porém houve dificuldades causadas por efeitos de

memória na quantificação de Hg e Os. O problema com a determinação de Hg foi solucionado por Van Hoecke et al.<sup>26</sup> ao utilizar uma mistura de KBr e KBrO<sub>3</sub> como solução de limpeza entre as amostras. Foram utilizados dois procedimentos de preparo de amostras – dissolução direta e digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. Duas amostras de excipientes farmacêuticos foram digeridas e, posteriormente, os analitos foram determinados por ICP-MS.

Fisher et al.<sup>27</sup> combinaram injeção em fluxo com ICP-MS, tanto quadrupolo quanto de alta resolução, para a análise de amostras de princípio ativo de o-AAS e L-serine.

Recentemente, Balaram<sup>28</sup> conhecendo a inadequação da metodologia proposta pelo capítulo 231 e a iminente implementação dos capítulos 232 e 233 fez um levantamento de técnicas analíticas potencialmente aplicáveis com base na sensibilidade. Além de trazer uma visão geral e algumas aplicações sobre as técnicas de emissão indicadas pela USP, ainda traz técnicas como XRF, análise instrumental por ativação neutrônica (INAA), espectrometria de emissão atômica por plasma de micro-ondas (MP-AES) e até mesmo o uso de ablação a laser como sistema de introdução de amostras em ICP-MS (LA-ICP-MS), em substituição aos sistemas convencionais que requerem preparo de amostra. Já Barin et al.<sup>29</sup> publicaram uma revisão de métodos baseados apenas em plasma indutivamente acoplado aplicados à análise de impurezas elementares, conforme indicação da Farmacopeia Norte-Americana. A abrangente pesquisa mostra desde técnicas de preparo de amostra até as diferenças entre ICPs, e discussão sobre contaminantes e interferências e como avaliar cada caso. Barin et al.<sup>30</sup> desenvolveu metodologia para análise de fármacos tricíclicos, como a carbamazepina, uma vez que a digestão desse tipo de amostra não é trivial e necessita de condições mais drásticas que as obtidas em sistema de micro-ondas convencional.

## **2.3 Normas**

### **2.3.1 USP – Farmacopéia Norte-Americana**

O capítulo 232 da USP, “Impurezas Elementares – Limites”, além de estabelecer as concentrações limite dos elementos alvo nas diversas formulações, também estabelece quais amostras são compreendidas pela norma. Fazem parte do escopo dos capítulos 232 e 233 amostras de produtos farmacêuticos (produto final).

Não fazem parte do escopo suplementos dietéticos, vacinas convencionais, produtos veterinários, produtos de nutrição parenteral e dialisados. Os limites apresentados nesse capítulo não são aplicados aos excipientes e outras matérias primas, porém o nível presente em cada um deles deve ser reportado.

Quando impurezas elementares são conhecidas por estarem presentes, terem sido adicionadas ou terem potencial para a introdução, a garantia de cumprimento com os níveis especificados é necessária. Devido à natureza onipresente e riscos associados, As, Cd, Hg e Pb devem sempre ser reportados.

Arsênio e Hg tem seus limites baseados na forma inorgânica. No caso do As, é assim considerado uma vez que essa é a forma mais tóxica do elemento. Caso o limite seja excedido é necessário um procedimento de especiação para avaliar o real risco do mesmo. Já o Hg possui na sua forma orgânica a maior toxicidade, porém essa forma é bastante improvável de ser encontrada em produtos farmacêuticos. No caso de produtos farmacêuticos que possuam potencial de conter a forma orgânica, metil-mercúrio, como no caso de derivados de peixe, a análise de especiação química também se faz necessária.

É possível observar na Tabela 2.2 diferentes limites para cada elemento. Isso ocorre devido ao fato da toxicidade de cada elemento estar relacionada à extensão de exposição (biodisponibilidade) do mesmo no organismo. Para casos de administração tópica ou via mucosa, os valores de administração via oral devem ser considerados. Independentemente da abordagem utilizada, o cumprimento dos limites especificados é necessário para todos os fármacos.

Tabela 2.2 Limites de exposição estabelecidos pelo capítulo <232> da USP<sup>5</sup>

Elemento	Exposição oral		Exposição parenteral		Exposição por inalação	
	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)
Cádmio	25	2,5	2,5	0,25	1,5	0,15
Chumbo	5	0,5	5	0,5	5	0,5
Arsênio inorg.	1,5	0,15	1,5	0,15	1,5	0,15
Mercúrio inorg.	15	1,5	1,5	0,15	1,5	0,15
Írídio	100	10	10	1	1,5	0,15
Ósmio	100	10	10	1	1,5	0,15

Continuação da Tabela 2.2 Limites de exposição estabelecidos pelo capítulo <232> da USP<sup>5</sup>

Elemento	Exposição oral		Exposição parenteral		Exposição por inalação	
	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)
Paládio	100	10	10	1	1,5	0,15
Platina	100	10	10	1	1,5	0,15
Ródio	100	10	10	1	1,5	0,15
Rutênio	100	10	10	1	1,5	0,15
Cromo	--	--	--	--	10	2,5
Molibdênio	100	10	10	1	10	1
Níquel	500	50	50	5	1,5	0,15
Vanádio	100	10	10	1	30	3
Cobre	1000	100	100	10	100	10

-- Elementos não compreendidos pela norma em determinado tipo de exposição.

A conformidade com a norma pode ser demonstrada por duas maneiras: opção pela análise do produto, na qual o resultado obtido a partir da análise de uma unidade de dosagem típica, dimensionado para uma dose diária máxima é comparada com a dose diária e, ainda, a opção pela soma, na qual o resultado é demonstrado através da soma de cada elemento em cada componente do fármaco.

Para casos nos quais há processo validado ou existe controle na cadeia de suprimentos, fornecedores podem demonstrar a qualidade do suprimento, fazendo com que testes adicionais não sejam necessários. Para demonstrar a conformidade são necessários procedimentos descritos no capítulo 233.

O capítulo 233 descreve dois procedimentos analíticos para a avaliação dos níveis de impurezas metálicas em produtos farmacêuticos. Além disso, estabelece procedimentos alternativos para a validação de outros procedimentos.

Antes que as amostras sejam analisadas é necessário que se faça a preparação das mesmas. O fluxograma da Figura 2.2 resume os procedimentos que devem ser obedecidos para o preparo de amostras.

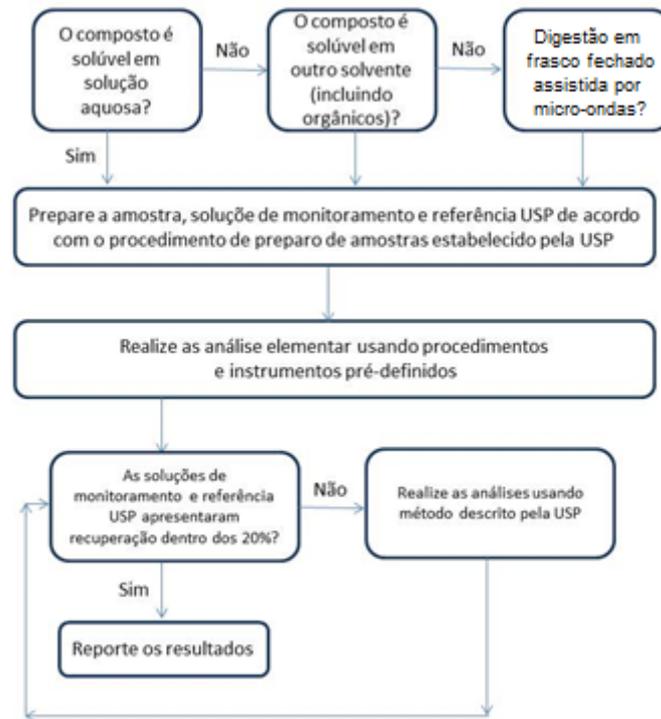


Figura 2.2 Fluxograma do preparo de amostras de acordo com capítulo <233> da USP<sup>6</sup>

Caso a amostra seja solúvel, em água ou solvente aquoso, ela pode ser dissolvida em meio apropriado. Quando o material não é diretamente solúvel é necessário utilizar método indireto, i.e. digestão em frasco fechado. Esse procedimento é indicado para evitar a perda de impurezas voláteis.

Para a descrição dos procedimentos de análise elementar é introduzido o conceito de J, concentração do elemento de interesse no limite alvo:

$$J = \frac{PDE}{MDD \cdot DL}$$

onde PDE é a exposição diária permitida para o elemento, MDD é máxima dose diária do medicamento e DL é o fator de diluição da amostra após o preparo da mesma.

Os procedimentos espectroanalíticos indicados pela norma são ICP OES e ICP-MS. Para ambas as técnicas são descritos modos de preparo de amostras, soluções de padronização, limites máximos de variação de resultados entre outros procedimentos.

Para métodos alternativos são estabelecidos critérios de validação do método, que envolvem detectabilidade, precisão, especificidade, exatidão e robustez. A precisão é avaliada analisando-se seis amostras independentemente preparadas.

A variação de concentração não deve ser maior que 20%. A exatidão é avaliada através de adição e recuperação, com faixa de variação aceitável entre 70 e 150%.

Entre março e abril de 2016 foi publicado documento no site da USP através do qual foi comunicada a possível atualização do capítulo 232, em função da harmonização com o documento final do ICH, Q3D passo 4, possibilitando a inserção de novos elementos e a alteração dos limites já estabelecidos<sup>30</sup>. Em maio do mesmo ano uma nova versão do capítulo 232 foi publicada, com alterações previstas nos limites estabelecidos de exposição diária para cada elemento. Apesar da adequação dos valores, nenhum elemento foi adicionado à lista de elementos-alvo da norma<sup>31</sup>.

Já capítulo 233 sofreu pequenas mudanças em dezembro de 2015. Nos procedimentos de ICP OES e ICP-MS, soluções padrão para verificação de parâmetros de metodologia eram utilizadas com concentração de 0,5J e 2,0J. Na versão atual, esse valor foi modificado para 0,5J e 1,5J<sup>32</sup>.

### **2.3.2 EMA – Agência Europeia de Medicamentos**

A Agência Europeia de Medicamentos, conhecida como EMA (European Medicine Agency) é uma agência descentralizada da União Europeia. Em operação desde 1995, é responsável pela avaliação científica, supervisão e segurança, monitoramento de medicamentos desenvolvidos por empresas farmacêuticas para uso na UE.

Em fevereiro de 2008 foram publicadas pelo Comitê de Produtos Medicinais para Uso Humano, o CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use), diretrizes para especificação dos limites de resíduos metálicos de catalisadores ou reagentes.

Os metais citados no documento são normalmente utilizados no processo de catálise ou como reagentes no processo de sínteses de substâncias farmacêuticas, tanto princípios ativos quanto excipientes. Uma vez que esses resíduos não possuem benefícios terapêuticos para o paciente é necessário que se avalie a presença dos mesmos. Os resíduos metálicos são classificados em três categorias, de acordo com o nível de segurança de cada um deles, o que estabelece uma concentração limite. Essa concentração é baseada na máxima dose diária,

duração do tratamento, via de administração do fármaco e exposição diária permitida do resíduo metálico.

O principal objetivo das diretrizes é recomendar limites de concentração máxima aceitável para resíduos metálicos provenientes de catalisadores e reagentes metálicos durante o processo de síntese de compostos farmacêuticos.

Estabelece-se que as diretrizes não se aplicam em casos nos quais o metal é componente da substância farmacêutica, como por exemplo um contra-íon de um sal, ou são usados como excipientes, como no caso de pigmentos de óxido de ferro<sup>4</sup>.

A via de administração pode influenciar a exposição do corpo humano ao metal. Uma vez que a biodisponibilidade oral é mais limitada, são estabelecidos limites diferenciados para a exposição parenteral<sup>4</sup>. A exposição por inalação também possui limites estabelecidos especificamente.

Classe 1: Metais de alta periculosidade (significant safety concern): estão inclusos neste grupo metais que são conhecidos ou suspeitos de serem carcinogênicos ou outras toxicidades.

1A Platinóides: limites relacionados aos metais individualmente;

1B Platinóides: limite de exposição relacionado à quantidade total de metais listados;

1C: limites relacionados aos metais individualmente.

Classe 2: Metais de baixa periculosidade (low safety concern): inclui metais de baixo potencial tóxico para os seres humanos. Em geral são tolerados nas concentrações comumente encontradas. Além disso, são encontrados na forma de metais essenciais em alimentos e outros suplementos.

Classe 3: Elementos de mínima periculosidade (minimal safety concern): inclui metais sem toxicidade significativa.

A concentração limite pode ser calculada de duas maneiras. Na mais usual assume-se uma quantidade de 10 g de fármaco como dose diária e a concentração é calculada usando-se a expressão:

$$\text{Concentração (ppm)} = \frac{\text{PDE } (\mu\text{g/dia})}{\text{dose diária (g/dia)}}$$

Tabela 2.3 Limites de exposição estabelecidos pelo EMA<sup>4</sup>

Elemento	Exposição oral		Exposição parenteral		Exposição por inalação	
	PDE ( $\mu\text{g/dia}$ )	Conc. (PPM)	PDE ( $\mu\text{g/dia}$ )	Conc. (PPM)	PDE ( $\mu\text{g/dia}$ )	Conc. (PPM)
Platina	100	10	10	1	70	--
Paládio	100	10	10	1	--	--
Iródio	100	10	10	1	--	--
Ródio	100	10	10	1	--	--
Rutênio	100	10	10	1	--	--
Ósmio	100	10	10	1	--	--
Molibdênio	250	25	25	2,5	--	--
Níquel	250	25	25	2,5	100	--
Cromo	250	25	25	2,5	10	--
Vanádio	250	25	25	2,5	--	--
Cobre	2500	250	250	25	--	--
Manganês	2500	250	250	25	--	--
Ferro	13000	1300	1300	130	--	--
Zinco	13000	1300	1300	130	--	--

-- Elementos não compreendidos pela norma em determinado tipo de exposição.

É possível observar que os limites de concentração variam de acordo com a via de administração. Isso ocorre devido à biodisponibilidade do elemento em cada uma delas. No caso de administração cutânea, limites de administração oral são considerados, mas no geral, para outras vias de administração, são considerados os mesmos valores calculados para a administração parenteral.

Há especificação para Cr e Ni para via oral devido estudos mostrarem que Cr(VI) e Ni quando inalados podem ser carcinogênicos.

Todos os valores citados nas tabelas são baseados em uso crônico do medicamento. Esses valores podem ser reconsiderados no caso de administração por curtos períodos ou em casos extremos de risco de morte.

A norma não especifica nenhum método analítico específico, apenas indica que deve ser utilizado método adequado e validado.

EMA e a Farmacopeia Europeia indicaram que vão harmonizar 100% de seus conteúdos com documento final do ICH<sup>33</sup>. Isso pode ser constatado com documento publicado no *site* da instituição em fevereiro de 2015. Os produtos farmacêuticos deverão cumprir com as diretrizes estabelecidas pelo ICH/CHMP em junho de 2016 (novos produtos) e dezembro de 2017 (produtos já comercializados)<sup>34</sup>.

### **2.3.3 ICH - Conselho Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Medicamentos para Uso Humano**

O Conselho Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Medicamentos para Uso Humano, conhecido como ICH, é uma organização que reúne as autoridades reguladoras e da indústria farmacêutica para discutir aspectos científicos e técnicos de registro de medicamentos. O principal objetivo do ICH é fazer recomendações no sentido de alcançar uma maior harmonização na interpretação e aplicação das diretrizes e requisitos para registro de produtos farmacêuticos técnicos, reduzindo ou eliminando a duplicação de testes realizados durante a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para uso humano. O desenvolvimento de diretrizes através de um processo de consenso científico entre órgãos reguladores e indústria trabalhando lado a lado garante a harmonização desejada<sup>7</sup>.

Estão dentro do escopo das diretrizes do ICH novos medicamentos acabados e produtos novos com substância medicamentosa já existente. Produtos contendo proteínas purificadas e polipeptídeos também fazem parte do escopo. Produtos à base de plantas, radiofármacos, vacinas, metabolitos celulares, produtos de DNA, derivados de sangue, soluções de diálise, entre outros não fazem parte do escopo da diretriz.

Os limites estabelecidos pela norma podem ser observados na Tabela 2.4. Pode-se observar que os elementos são classificados em grupos de acordo com sua toxicidade.

Elementos da Classe 1 são tóxicos para seres humanos e têm uso limitado ou proibido para a fabricação de produtos farmacêuticos. Devido sua natureza, tais elementos devem ser avaliados em todas as fontes potenciais de contaminação. Não se espera que todos os componentes exigirão testes para essa

classe de elementos, mas sim aqueles que tiverem ameaças identificadas nas avaliações de riscos. Fazem parte desse grupo: As, Cd, Hg e Pb.

Elementos da Classe 2 são tóxicos aos seres humanos dependendo da rota. São ainda divididos em dois subgrupos. Elementos de classe 2A têm probabilidade relativamente alta de ocorrência no processo de manufatura do medicamento. São eles: Co, Ni e V. Elementos de classe 2B possuem uma probabilidade menor de serem encontrados nos medicamentos, devido sua baixa abundância. Podem ser excluídos da avaliação de risco caso não sejam adicionados intencionalmente ao processo. São eles: Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se e Tl.

Os elementos da Classe 3 são conhecidos pela toxicidade relativamente baixa por administração via oral, mas devem exigir maior consideração em avaliações de inalação e via parenteral. São eles: Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb e Sn.

Tabela 2.4 Limites de exposição estabelecidos pelo ICH<sup>7</sup>

Elemento	Classe	Exposição oral		Exposição parenteral		Exposição por inalação	
		PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)
Cádmio	1	5	0,5	2	0,2	2	0,2
Chumbo		5	0,5	3	0,5	5	0,5
Arsênio		15	1,5	15	1,5	2	0,2
Mercúrio		30	3	3	0,3	1	0,1
Cobalto	2A	50	5	5	0,5	3	0,3
Vanádio		100	10	10	1	1	0,1
Níquel		200	20	20	2	5	0,5
Tálio	2B	8	0,8	8	0,8	8	0,8
Ouro		100	10	100	10	1	0,1
Paládio		100	10	10	1	1	0,1
Írídio		100	10	10	1	1	0,1
Ósmio		100	10	10	1	1	0,1
Ródio		100	10	10	1	1	0,1

Continuação da Tabela 2.4 Limites de exposição estabelecidos pelo ICH<sup>7</sup>

Elemento	Classe	Exposição oral		Exposição parenteral		Exposição por inalação	
		PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)	PDE (µg/dia)	Conc. (PPM)
Rutênio	2B	100	10	10	1	1	0,1
Selênio		150	10	80	8	130	10
Prata		150	15	10	1	7	0,7
Platina		100	10	10	1	1	0,1
Lítio	3	550	55	250	25	25	2,5
Antimônio		1200	120	90	9	20	2
Bário		1400	140	700	70	300	30
Molibdênio		3000	300	1500	150	10	1
Cobre		3000	300	300	30	30	3
Estanho		6000	600	600	60	60	6
Cromo		11000	1100	1100	110	3	0,3

Para estabelecer os PDEs, limites diários de exposição, permitidos são considerados diversos fatores, entre eles: o estado de oxidação do elemento no medicamento, exposição humana e de dados de segurança, estudos em animal mais relevante e via de administração.

Os PDEs, como visto, são expressados em µg/dia, refletindo apenas exposição máxima diária permitida. A conversão para concentração permite uma maior facilidade na avaliação das impurezas elementares. Diferentes abordagens podem ser estabelecidas para isso, porém no método mais comum, assume-se uma máxima dose diária não maior do que 10 mg/dia. Nesses casos a conversão de PDE em concentração dá-se pela fórmula<sup>7</sup>

$$\text{Concentração (µg/g)} = \frac{\text{PDE (µg/dia)}}{\text{dose diária (g/dia)}}$$

Os níveis de impurezas elementares mais elevados do que PDE estabelecidos podem ser aceitáveis em casos específicos, como dosagem intermitente, dosagem de curta duração (até 30 dias), risco de vida e doenças raras.

As diretrizes do ICH não estabelecem método analítico específico para a determinação das impurezas elementares, apenas apontam que devem ser seguidos métodos específicos para cada elemento em questão. É sugerido o uso de procedimentos farmacopeicos e outros procedimentos similares adequados.

## 2.4 Elementos

É possível observar um significativo aumento de elementos alvo comparando-se as normas atuais com aquelas que estão programadas para vigorar nos próximos anos.

A USP dá prioridade aos elementos de maior toxicidade, conhecidos como *Big 4* (As, Cd, Hg e Pb) e não inclui diversos elementos inclusos na EMA e ICH. Enquanto isso, EMA e ICH obedecem um critério de categorização dos elementos de acordo com toxicidade.

O capítulo 231 da USP, por exemplo, engloba em sua maioria metais de alta toxicidade, enquanto as normas mais atuais englobam outros tantos possíveis contaminantes. Isso ocorre porque uma vez que os resíduos metálicos não possuem nenhuma função terapêutica ao paciente, há a necessidade de avaliar esses contaminantes para que o fármaco esteja dentro de especificações de qualidade e segurança, não causando danos à saúde do usuário.

Esses resíduos metálicos em substâncias farmacêuticas podem ser originários de diversas fontes, tais como a catálise metálica e os reagentes metálicos usados durante a síntese de um princípio ativo e excipientes, equipamentos e tubulações durante a fabricação, embalagens, solventes, entre outros<sup>4</sup>.

Com exceções de As e Pb, todos os demais elementos fazem parte do grupo conhecido como metais de transição, largamente utilizados na indústria farmacêutica como catalisadores.

Os metais de transição são definidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) como “um elemento cujo átomo possui um subnível d incompleto ou que possa vir a formar cátions com um subnível d incompleto”. Também conhecidos como elementos do bloco d, os mesmos possuem a seguinte configuração eletrônica [gás inerte]  $(n-1)d^{1-10} n s^1-2$ <sup>35</sup>.

Devido à camada d semi-preenchida, os elementos de transição possuem propriedades que não são encontradas em outros elementos da tabela

periódica, como por exemplo, coloração e paramagnetismo. Além dessas características, devido à baixa reatividade do elétron desemparelhado, os elementos do bloco d são encontrados em muitos estados de oxidação, o que explica sua elevada capacidade de formar diversos compostos de coordenação.

A toxicidade e carcinogenicidade de elementos de transição estão na sua capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Muitos desses elementos essenciais, como o Cu, por exemplo, participam do controle de diversas vias metabólicas, porém a sua elevada capacidade de formação de compostos de coordenação e propriedades redox tornam-no capaz de influenciar mecanismos de controle como homeostase, transporte, compartimentalizações e ligações para constituintes das células<sup>36</sup>.

Conhecidos como elementos-traço essenciais (essential trace elements), Fe, Co, Cu, Zn, Mn, Mo, Se, (além de Br e I), são considerados elementos essenciais para a manutenção do corpo humano, uma vez que participam de reações metabólicas, porém em altas concentrações trazem prejuízos à saúde. A maioria desses elementos possui diversos estados de oxidação e a toxicidade dos mesmos está relacionada à apenas uma espécie específica<sup>37</sup>.

Metais como Fe, Co, Cr, Cu e V estão envolvidos na reação de Fenton decomposição metalo-dependente do peróxido de hidrogênio gerando radical hidroxila. Esse último reage com os mais diversos tipos de biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA. O mecanismo citado pode ser observado abaixo<sup>36</sup>.



Elementos conhecidos como platinóides, Pt, Pd, Ir, Os, Rh e Ru, possuem propriedades físicas e químicas semelhantes<sup>7</sup>. Platina e Pd são os elementos mais reativos, sendo utilizados como catalisadores em diversas reações de óxido-redução e decomposição utilizadas na indústria. Ródio e Ru aparentam ser menos tóxicos que demais elementos do grupo. Platinóides possuem uma baixa taxa de absorção pelo trato gastrointestinal. Dados toxicológicos sobre esses elementos são bastante limitados<sup>7</sup>.

Exceções aos elementos de transição são o Pb e o As, pertencentes às famílias 4A e 5A, respectivamente. Juntamente com Hg e Cd são conhecidos como *Big Four* e muitas vezes chamados de Metais Pesados. Apesar das controvérsias

envolvendo essa nomenclatura<sup>38</sup>, são assim conhecidos devido sua alta toxicidade, uma vez que a maioria dos seres vivos não consegue metabolizá-los, acumulando-se nos organismos.

De acordo com a IARC, Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer, As e Cd em suas formas inorgânicas são genotóxicos, porém não mutagênicos e são reconhecidos como carcinogênicos para seres humanos. Já o Hg inorgânico não é classificado como carcinogênico, devido sua baixa biodisponibilidade oral, especialmente quando comparado à sua forma orgânica. Apesar disso induz diversos outros efeitos toxicológicos, como neurológicos, corrosivo, hematopoiéticos, efeitos renais e doenças cutâneas. Assim como o Hg, o Pb também não possui características carcinogênicas, mas possui efeitos na saúde neurológica, reprodutora, imunológica, cardiovascular e renal<sup>7</sup>.

# **CAPÍTULO 3**

## **OBJETIVOS**

### **3. Objetivos**

Está programada para 2018 a implementação dos novos capítulos da farmacopeia norte-americana (USP), capítulos esses que estarão em consenso com outras normas internacionais, como outras farmacopeias, Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e Conferência Internacional em Harmonização para Regulamentação Técnica para Registro de Fármacos para Uso Humano (ICH). A tendência é que as normas brasileiras sigam o mesmo caminho que as normas internacionais. Com isso identificou-se a necessidade de desenvolvimento de procedimentos de preparo de amostras e análise elementar de produtos farmacêuticos. Este projeto tem como objetivo investigar procedimentos tanto de digestão de produtos farmacêuticos (tanto excipientes quanto medicamentos), como de determinação dos elementos estabelecidos pelas legislações usando ICP OES e ICP-MS, visando atender iminente.

# **CAPÍTULO 4**

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4. Materiais e métodos

### 4.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas no presente estudo foram preparadas utilizando água ultra pura, com resistividade de 18,0 M $\Omega$  cm, obtida usando o sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, Estados Unidos).

Para o estudo de digestão ácida, foram utilizados os seguintes reagentes: HF 40% m/m (Nuclear, Diadema, Brasil), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% V/V (Synth, Diadema, Brasil), HNO<sub>3</sub> 65% m/m (Synth) e HCl 37% m/m (Synth). Foi utilizado, ainda, uréia (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) para preparar as soluções analíticas visando a determinação de carbono por ICP OES.

Soluções-padrão foram preparadas a partir de soluções estoque monoelementares contendo 1000 mg/L (Specsol, São Paulo, Brasil)

Todo o material utilizado no preparo de padrões e amostras, como ponteira, tubos Falcon e vidrarias passaram por processo de descontaminação em banho de HNO<sub>3</sub> 10% v/v por, no mínimo, 8 h.

Argônio líquido 99,999% de pureza (White Martins, Sertãozinho, Brasil) foi utilizado tanto em ICP OES como em ICP-MS.

### 4.2 Procedimentos

A amostras de excipientes foram doadas por colegas, enquanto as amostras de medicamentos utilizados no presente trabalho foram compradas em farmácias.

As amostras de excipientes estavam em forma de pó. Já os medicamentos na forma de comprimido. Estes últimos foram retirados da embalagem e uma quantidade apropriada foi inserida em almofariz, onde foram macerados com a ajuda de pistilo. Em seguida, as amostras foram pesadas utilizando-se papel manteiga como suporte e balança analítica (Bel Engineering, Itália) e transferidas para frasco de digestão, no qual foi adicionada mistura ácida em estudo, preparada a partir de ácidos subdestilados. Após a adição de ácido aguardou-se 15 min para o fechamento do frasco, a fim de permitir a liberação inicial de gases da reação. O frasco foi inserido no sistema de digestão assistido por radiação micro-ondas, no qual sofreu

aquecimento de acordo com procedimento desenvolvido. Uma vez que a amostra tenha sido digerida, a mesma foi transferida para tubos plásticos 50 mL (Falcon, Estados Unidos), onde o volume da solução foi completado para 50 mL.

A análise elementar foi realizada utilizando-se um espectrômetro de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrômetro de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

## 4.3 Instrumentação analítica

### 4.3.1 Destilador de ácidos

A análise elementar, especialmente quando trabalhando com elementos-traço requer o uso de reagentes em grau ultra puro, uma vez que ácidos inorgânicos são consideráveis fontes de contaminação,

Um ácido comercial ultra-puro pode custar quase 20 vezes mais caro que um ácido P.A., conforme cotação realizada em janeiro de 2015.

Visando baixar o custo da análise e garantir a qualidade necessária foi utilizado um sistema de destilação de ácidos, que garante pureza superior ao grau ultra- puro.

Para isso foi utilizado sistema de subdestilação modelo Distillacid BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Alemanha).

Nesse sistema o ácido é introduzido e aquecido pela lâmpada infravermelha, em uma temperatura de 10 a 20 °C abaixo de seu ponto de ebulição. Conforme observado no esquema da Figura 4.1, o ácido evaporado entra em contato com a superfície fria do frasco central, no qual há circulação de água, e condensa, sendo coletado no frasco lateral<sup>39</sup>.

O aquecimento suave do sistema *subboiling* previne a formação de aerossol e gotas, que contaminariam o ácido final.

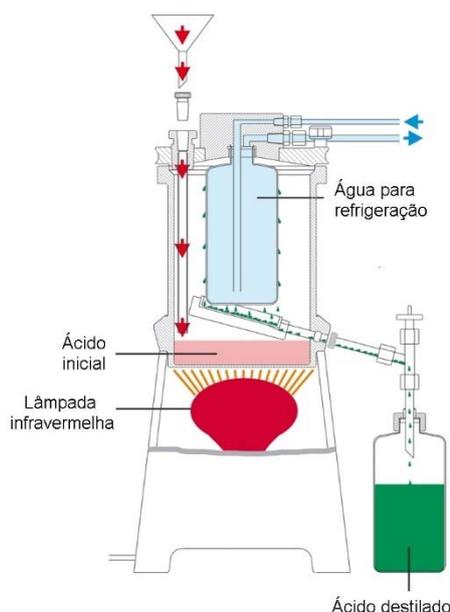


Figura 4.1 Esquema do destilador de ácidos subboiling Distillacid (Berghof)

O destilador Distillacid é construído totalmente de TFM e PFA, sem qualquer parte metálica. O vapor de ácido e seu condensado somente entram em contato com PFA de alta pureza, o que garante a qualidade final do destilado.

A concentração de alguns elementos em ácidos de diferentes graus de pureza está apresentada na Tabela 4.1. É possível observar que ácidos destilados em sistema subboiling possuem níveis de contaminantes consideravelmente mais baixos que ácidos ultrapuros comerciais.

Tabela 4.1 Impurezas residuais em água e ácidos em diferentes graus de pureza. Dados em  $\mu\text{g/L}$ .<sup>40</sup>

Reagente	Cd	Cu	Fe	Al	Pb	Mg	Zn
<b>H<sub>2</sub>O sub-boiling</b>	0,01	0,04	0,32	<0,05	0,02	<0,02	<0,04
<b>10 M HCl sub-boiling</b>	0,01	0,07	0,6	0,07	0,05	0,2	0,2
<b>10 M HCl ultrapuro</b>	0,03	0,2	11	0,8	0,13	0,5	0,3
<b>12 M HCl pró-analise</b>	0,1	1	100	10	0,5	14	8
<b>15 M HNO<sub>3</sub> sub-boiling</b>	0,001	0,25	0,2	<0,005	<0,002	0,15	0,04
<b>15 M HNO<sub>3</sub> ultrapuro</b>	0,06	3	14	18	0,7	1,5	5
<b>15 M HNO<sub>3</sub> pró-analise</b>	0,1	2	25	10	0,5	22	3
<b>54% HF sub-boiling</b>	0,01	0,5	1,2	2	0,5	1,5	1
<b>40% HF ultrapuro</b>	0,01	0,1	3	1	3	2	1,3
<b>54% HF pró-analise</b>	0,06	2	100	5	4	3	5

### 4.3.2 Sistema de digestão ácida assistida por micro-ondas

Para a digestão de amostras foi utilizado sistema de digestão assistido por radiação micro-ondas SpeedWave Four (Berghof).

A Figura 4.2 mostra esquematicamente o funcionamento do equipamento utilizado.

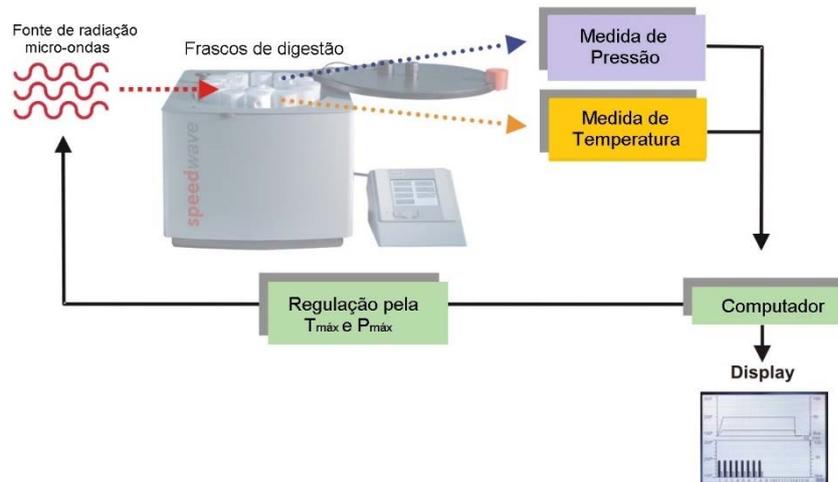


Figura 4.2 Esquema de funcionamento do sistema de micro-ondas SpeedWave Four (Berghof)

Os fornos de micro-ondas para fins analíticos são compostos pelo magnetron, guia de ondas, distribuidor de ondas, cavidade, frasco de digestão e rotor.

A radiação produzida pelo magnetron é transportada através do guia de ondas para a cavidade, onde é dispersa pelo distribuidor possibilitando uma maior irradiação da zona próxima ao centro da cavidade. A bandeja rotatória possibilita expor a amostra a uma radiação homogênea e reprodutível, dependendo do projeto do forno. Diferentemente dos demais fornos de micro-ondas comerciais, esse equipamento apresenta cavidade redonda, que possibilita que a distribuição da radiação micro-ondas seja mais homogênea e torne a digestão mais eficiente<sup>39</sup>.

Tal como padronizado pela legislação da área, esse equipamento trabalha com frequência de 2450 MHz. Quando se utiliza essa frequência para as micro-ondas, o alinhamento das moléculas (causado pelo efeito do campo elétrico sobre moléculas polares e íons) e seu retorno ao estado de desordem ocorrem  $4,9 \times 10^9$  vezes por segundo, resultando em aquecimento rápido e eficiente<sup>37</sup>.

A Tabela 4.2 mostra as especificações técnicas do sistema utilizado.

Tabela 4.2 Especificações técnicas do sistema de digestão por micro-ondas Speed Wave Four (Berghof)

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Frequência	2450 MHz
Potência	1450 W
Medida de temperatura	80 a 300 °C $\pm$ 1°C (a 200 °C)
Medida de pressão	0 a 150 bar
Rotor	12 posições
Volume do frasco	60 mL
Pressão máxima do frasco	40 bar
Temperatura máxima do frasco	260 °C

O uso de frascos fechados para digestões assistidas por radiação micro-ondas tem sido geralmente recomendado nos casos em que é preciso aproveitar o efeito das altas temperaturas para dissolver amostras de difícil decomposição, nas quais se pretende determinar componentes voláteis. Além disso, a ocorrência de contaminações é melhor controlada e a perda de analitos voláteis é evitada.

Foram utilizados frascos do tipo DAP-60, que possuem capacidade de 60 mL e suportam até 40 bar de pressão. Esses frascos são fabricados em TFM e PTFE de maneira isostática, o que garante maior alongamento na ruptura e menor porosidade (garantindo menor contaminação e efeito memória). Esse material é transparente às micro-ondas, de tal forma que a radiação é absorvida apenas pela solução do meio reacional.

O modelo SpeedWave Four utiliza sensores que possibilitam a medida de temperatura e pressão independente em cada um dos frascos, o que possibilitou, conseqüentemente, a digestão de amostras de diferentes composições em uma

mesma rodada de digestão. Tais sensores não entram em contato com a amostra, o que evita possíveis contaminações.

O sensor de pressão funciona através de uma radiação polarizada que incide no prisma localizado na tampa do frasco. A pressão interna do frasco faz com que haja compressão do anel de vidro que envolve o prisma. À medida que ocorre essa compressão ocorre também o desvio da luz polarizada. Esse desvio é proporcional à pressão interna, permitindo que a medida seja, novamente, independente em cada um dos frascos<sup>39</sup>.

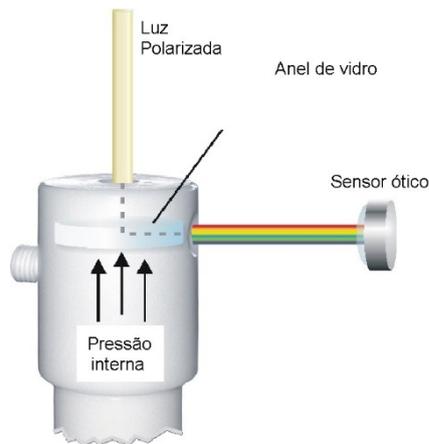


Figura 4.3 Esquema de funcionamento do sensor de pressão (Berghof)

O sensor infra-vermelho de controle de temperatura trabalha em um comprimento de onda no qual o material do frasco é transparente, o que faz com que a temperatura real da amostra seja medida<sup>39</sup>.

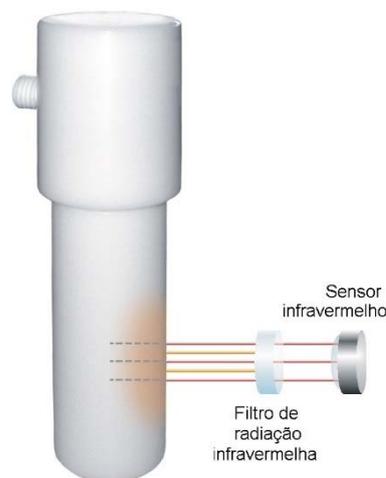


Figura 4.4 Esquema de funcionamento do sensor de temperatura (Berghof).

### 4.3.3 ICP OES

A análise elementar foi feita através de espectrômetro de emissão ótica modelo iCAP 6500 Duo (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha), acoplado a um amostrador automático modelo ASX-520 (CETAC, Omaha, Estados Unidos). Esse equipamento possui detector simultâneo de estado sólido CID (do inglês, Charge Injection Device), gerador de radiofrequência de 27,12 MHz que permite variação de potência entre 750 e 1350 W, além do modelo duo possibilitar a obtenção simultânea de sinais de emissão tanto na vista axial (permite atingir limites de detecção mais baixos) quanto na radial do plasma (permite minimizar efeitos de matriz). Outras especificações do equipamento podem ser observadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Especificações técnica do ICP OES modelo iCAP 6500 (Thermo Scientific)

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Detector	Detector de estado sólido de alta performance CID86
Gerador de rádio-frequência	27,12 MHz / 750 a 1350 W
Faixa Espectral	166 a 847 nm
Policromador	tipo Echelle com 52,91 ranhuras/mm
Largura de banda espectral	7 pm em 200 nm
Vazão do gás do plasma	Controlador de fluxo mássico - 0 a 20 L/min
Vazão do gás auxiliar	Controlador de fluxo mássico - 0 a 2 L/min
Vazão do gás de nebulização	Controlador de fluxo mássico - 0 a 1,5 L/min
Bomba peristáltica	0 a 100 rpm
Câmara de nebulização	Ciclônica de quartzo
Nebulizador	Concêntrico
Tubo Injetor	2,0 mm de diâmetro interno

Os componentes do ICP OES podem ser observados na Figura 4.5. A introdução de amostras foi feita através de nebulizador concêntrico, câmara de nebulização ciclônica e tubo injetor de 2,0 mm de diâmetro interno. Uma vez inserida a amostra, a radiação emitida no plasma é direcionada para a pré-óptica do iCAP, viabilizando um alinhamento automático e focalização eficiente no canal da amostra.

O arranjo óptico “lado a lado” do equipamento permite, entre outras vantagens, uma melhor resolução, aperfeiçoando a razão sinal analítico / sinal de

fundo o que possibilita atingir melhores limites de detecção. O detector de estado sólido, CID, além da detecção e quantificação usuais, possibilita uma foto espectral, conhecida como echelograma, além da possibilidade de análises semi-quantitativas<sup>41</sup>.

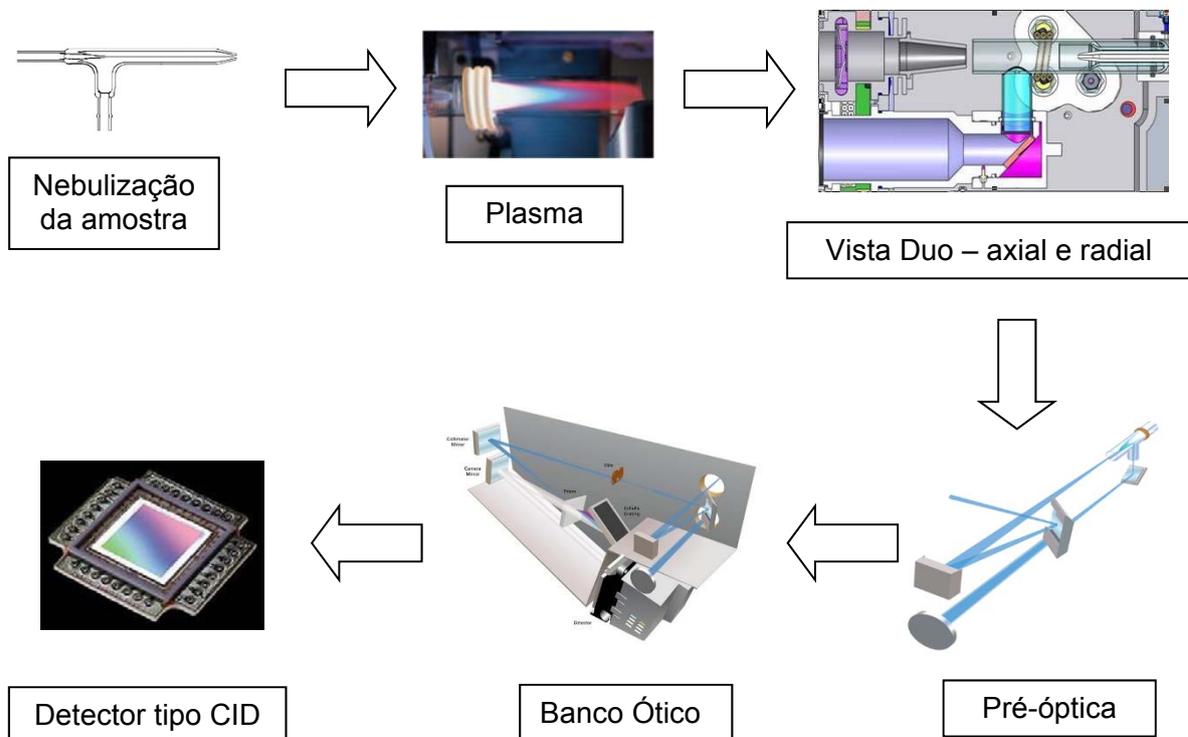


Figura 4.5 Componentes de ICP OES modelo iCAP 6500 (Thermo Scientific)

#### 4.3.4 ICP-MS

A análise elementar usando um espectrômetro de massas foi realizada utilizando-se o equipamento modelo iCAPQc (Thermo Scientific), sistema com analisador de massas quadrupolo, acoplado à amostrador automático ASX-520 (CETAC). As especificações técnicas desse equipamento estão apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Especificações técnicas do sistema de ICP-MS modelo iCAP Qc (Thermo Scientific)

Característica	Valor
Gerador de rádio-frequência	27 MHz - 500 a 1600W
Sistema de refrigeração Peltier	10 a 20 °C
Cone de amostragem	Ni - 1,1 mm de diâmetro
Cone <i>skimmer</i>	Ni - 0,5 mm de diâmetro
Câmara de nebulização	ciclônica de quartzo
Nebulizador	PFA, com fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$
Tubo Injetor	2,0 mm de diâmetro interno

A composição esquemática do sistema de ICP-MS pode ser observada na Figura 4.6. A amostra nebulizada é introduzida no plasma de argônio e os íons gerados são, predominantemente monovalentes. Os íons formados são extraídos pelos cones de amostragem e skimmer e as lentes focalizam e otimizam a transmissão dos íons para o quadrupolo.

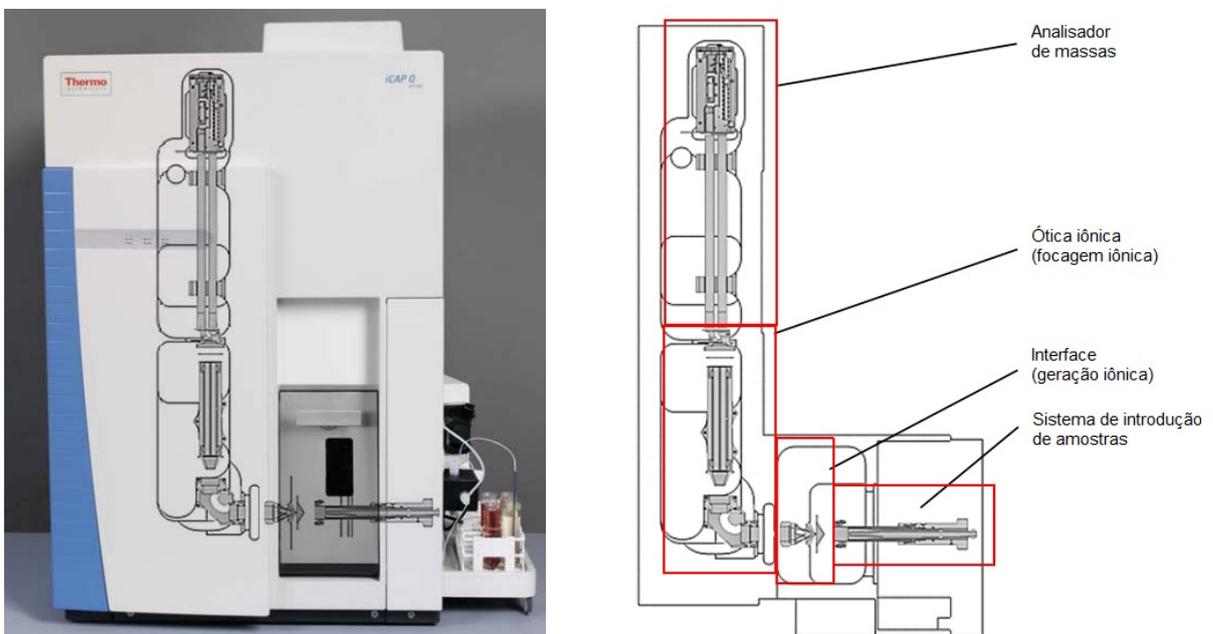


Figura 4.6 Composição esquemática do ICP-MS modelo iCAP Qc (Thermo Scientific)

As lentes utilizadas no iCAPQ são do tipo RAPID, através das quais a colimação do íon ocorre a 90° com deflexão total a três dimensões e eliminação das espécies neutras, o que fornece alta razão sinal analítico / sinal de fundo.

O sistema é, ainda, dotado de uma tecnologia denominada Q-cell, uma célula de colisão/reação com tecnologia plana não polarizada, com prioridade em massas baixas, através da qual é possível obter uma melhora significativa na transmissão iônica. Essa melhora é explicada com a eliminação dos precursores de interferentes, tais como C, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, S e Cl, usando-se o sistema *cut-off*)<sup>41</sup>.

Uma vez no quadrupolo, o íon é transferido ao detector, que possui faixa linear maior que nove ordens de grandeza, garantindo versatilidade para o mesmo.

#### 4.4 Amostras

Para o desenvolvimento deste trabalho foram considerados dois tipos de amostras: excipientes e produto final, todas em estado sólido. As amostras de excipientes foram doadas por colegas, enquanto as amostras de medicamentos foram adquiridas em farmácias.

Através da Figura 4.7, também conhecida como diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe, é possível analisar as potenciais fontes de contaminação. Observa-se que o contaminante é inserido ou através da matéria prima dos produtos farmacêuticos ou do sistema de manufatura, tendo sido intencionalmente inserido ou não. Não foram analisadas amostras de princípio ativo uma vez que sua proporção em relação ao excipiente é consideravelmente menor.

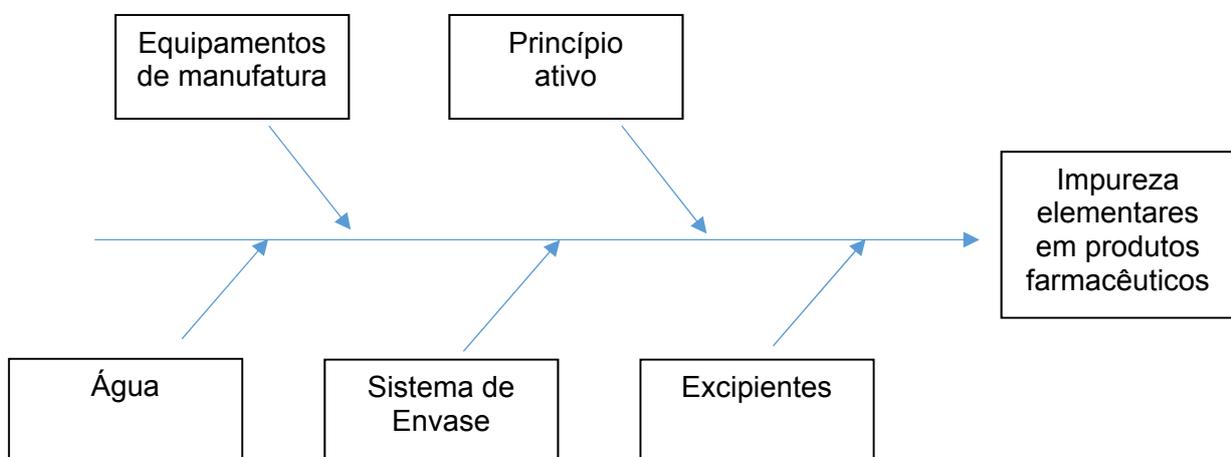


Figura 4.7 Potenciais fontes de contaminação de fármaco (adaptado de ICH)

Três grupos de amostras foram estudados. O primeiro grupo é constituído por amostras de excipientes, explicitados na Tabela 4.5. Considerados antigamente como simples adjuvantes e veículos, os excipientes são hoje conceituados de acordo com sua real importância no desenvolvimento do fármaco<sup>42</sup>. De acordo com IPEC (International Pharmaceutical Excipients Council) os excipientes exercem um papel crítico na produção de medicamentos, ajudando a preservar a eficácia, segurança e estabilidade do ingrediente ativo e ainda garantindo os benefícios ao paciente<sup>43</sup>.

Tabela 4.5 Amostras de excipientes

<b>Amostra</b>	<b>Função</b>	<b>Composição</b>
EX01	diluyente, absorvente	Carbonato de magnésio básico
EX02	diluyente	Amido farmacêutico
EX03	diluyente, desagregante, lubrificante, desintegrante, adsorvente	Celulose microcristalina
EX04	diluyente	Lactose monoidratada
EX05	diluyente, absorvente	Óxido de magnésio
EX06	diluyente, edulcorante, veículo	Manitol oral
EX07	diluyente, agente tamponante, abrasivo	Fosfato de cálcio bibásico
EX08	diluyente, lubrificante	Talco farmacêutico
EX09		Maltodextrina
EX10	diluyente	Carbonato de cálcio

No segundo grupo escolheu-se trabalhar com amostras de medicamentos de uso contínuo. Considera-se mais grave a contaminação em medicamentos de uso crônico, uma vez que o paciente está em contato diário com a contaminação. Assim, foram avaliadas amostras de anticoncepcionais e medicamentos para tratamento de diabetes, pressão alta e disfunção da tireóide. Os medicamentos em questão estão listados na Tabela 4.6.

O terceiro grupo, mostrado na Tabela 4.7, é constituído de multivitamínicos, multiminerais e produtos naturais, provindos de um trabalho colaborativo com grupos de pesquisa da Universidade Federal de Pelotas e do Conselho Nacional de Energia Nuclear da Argentina.

Tabela 4.6 Amostras de medicamentos de uso contínuo

Amostra	Função	Princípio Ativo	Composição	
				Excipientes
UC01	Anticoncepcional	Levonorgestrel e Etinilestradiol	Lactose, povidona, celulose microcristalina, laurilsulfato de sódio, croscarmelose sódica e macrogol.	
UC02	Anticoncepcional	Levonorgestrel e Etinilestradiol	Lactose, amido, povidona, talco, estearato de sacarose, macrogol, carbonato de cálcio, glicerol, dióxido de titânio, pigmento óxido de ferro amarelo e cera montanglicol.	
UC03	Anticoncepcional	Gestodeno e Etinilestradiol	Lactose monoidratada, celulose microcristalina, estearato de magnésio, povidona, croscarmelose sódica, edetato dissódico diidratado, dióxido de silício, macrogol, hipromelose e dióxido de titânio.	
UC04	Pressão alta	Glibenclamida	Lactose monidratada, amido pregelatinizado, estearato de magnésio, croscarmelose sódica, dióxido de silício e laurilsulfato de sódio.	
UC05	Pressão alta	Cloridrato de Metformina	Estearato de magnésio, Hipromelose e Povidona.	
UC06	Pressão alta	Cloridrato de Metformina	Celulose microcristalina, crospovidona, dióxido de silício, estearato de magnésio, povidona, hipromelose e macrogol.	
UC07	Diabetes	Captopril	Celulose microcristalina, amido, lactose e ácido esteárico.	
UC08	Diabetes	Hidroclorotiazida	Lactose monoidratada, amido pré gelatinizado, celulose monocristalina e estearato de magnésio.	
UC09	Diabetes	Cloridrato de Propanolol	Lactose monoidratada, celulose microcristalina, dióxido de silício, ácido esteárico e estearato de magnésio.	
UC10	Tireóide	Levotiroxina sódica	Não informado.	
UC11	Tireóide	Levotiroxina sódica	Manitol, bicarbonato de sódio, estearato de magnésio, dióxido de silício, croscarmelose sódica e povidona.	
UC12	Tireóide	Levotiroxina sódica	Manitol, amido de milho, celulose monocristalina e estearato de magnésio.	

Tabela 4.7 Amostras de multivitamínicos, multiminerais e fitoterápicos

<b>Amostra</b>	<b>Função</b>	<b>Composição</b>
MV01	Multivitamínico	Vitamina A , vitaminas B1, B2, B5, B6 e B12, vitamina PP, H, C, D, E, cálcio, ferro , fósforo, magnésio, manganês, cobre , zinco, molibdênio e boro.
MV02	Multivitamínico	Selênio, fosfato dicálcio, celulose vegetal, levedura de Brewer, ácido esteárico vegetal, estearato de magnésio vegetal, sílica
MV03	Multivitamínico	Niacina, ácido panotênico, carbonato de cálcio, complexo beta sitosterol, farelo de aveia, lecitina, L-carnitina, fumarato, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, ácido esteárico, esmalte farmacêutico, maltodextrina, sílica, estearato de magnésio, talco e farinha de arroz.
MV04	Multivitamínico	Fosfato dibásico de cálcio diidratado, carbonato de cálcio, óxido de magnésio, ácido ascórbico, fumarato ferroso, Acetato de dl-alfa-tocoferol, niacina, óxido de zinco, pantotenato de cálcio, betacaroteno, sulfato de manganês monoidratado, acetato de vitamina A, vitamina D, vitamina K, cloridrato de piridoxina, riboflavina, mononitrato de tiamina, sulfato de cobre anidro, ácido fólico, cianocobalamina, cloreto hexaidratado de cromo, lactose, molibdato de sódio, selenato de sódio, iodeto de potássio, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, hidroxipropilmetilcelulose, dióxido de titânio, umectante triacetina, corante artificial amarelo crepúsculo, polisorbato 80 e dióxido de silício.
MV05	Multivitamínico	Cálcio, magnésio, vitamina C, ferro, vitamina E, zinco, manganês, vitamina B1, B2, B3, B6 e B12, cobre, vitamina A, ácido fólico, iodo, molibdênio, cromo, selênio, biotina, vitamina D, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio e dióxido de silício.
MV06	Fitoterápico	Guaraná em pó
MV07	Fitoterápico	Passiflora incarnata L., Passifloraceae, celulose microcristalina, talco, opadry YS-1-7006, estearato de magnésio, croscarmelose sódica, dióxido de silício coloidal e polietilenoglicol.
MV08	Fitoterápico	Cynara scolymus L
MV09	Multivitamínico	Carbonato de cálcio, amido, estearato de cálcio, talco farmacêutico, amidoglicolato de sódio, sólidos de xarope de milho, polissorbato 80, metilparabeno, propilparabeno, butilidroxitolueno, álcool polivinílico, dióxido de titânio, macrogol e óxido de ferro amarelo.
MV10	Multivitamínico	Não há informações de bula

# **CAPÍTULO 5**

## **DIGESTÃO ÁCIDA ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS**

## 5. Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

Uma vez estabelecidas quais seriam as amostras para estudo, iniciou-se o processo de otimização de digestão ácida das mesmas. Conforme citado utilizou-se para esta finalidade o sistema de digestão por radiação micro-ondas SpeedWave Four (Berghof, Alemanha). Escolheu-se utilizar programa de aquecimento sugerido pelo fabricante do equipamento conforme apresentado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Programa de aquecimento para a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

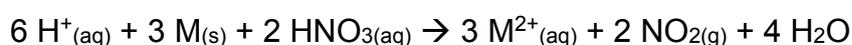
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Pressão máxima (bar)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Rampa (min)</b>	<b>Potência do magnetron (%)</b>
170	35	2	5	80
190	35	2	10	80
210	35	2	20	90

Ao desenvolver um procedimento de digestão, escolhe-se a temperatura desejada para cada etapa. O intervalo de tempo de rampa é o tempo que o sistema demora para atingir a temperatura estabelecida a partir da temperatura imediatamente anterior. Intervalo de tempo de patamar é o intervalo de tempo no qual a temperatura estabelecida permanecerá estável. Para atingir essa temperatura estabelece-se a porcentagem de potência máxima que o magnetron utilizará. Para a primeira etapa, por exemplo, indica-se que o magnetron utilizará 80% dos 1450 W totais de sua capacidade. Não necessariamente serão necessários os 1160 W de potência. O mesmo ocorre para a pressão estabelecida. Utilizou-se frasco com capacidade de até 40 bar de pressão, porém foi inserido no procedimento um valor máximo de 35 bar. Esse valor não será necessariamente atingido pelo frasco fechado durante o processo reacional, mas caso o sistema detecte tal pressão o analista será notificado e a digestão pode ser interrompida por questões de segurança.

## 5.1 Ácidos e outros reagentes

Para que ocorra a digestão da amostra é necessário que seja adicionada uma mistura ácida escolhida de acordo com o material a ser digerido e as propriedades dos reagentes a serem utilizados. Os reagentes mais utilizados são os ácidos inorgânicos, tais como HNO<sub>3</sub>, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HF, além do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

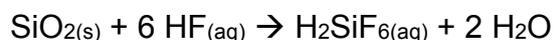
O ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) é um ácido forte e um agente oxidante poderoso, capaz de digerir amostras orgânicas ((CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>) e diversos metais (M):



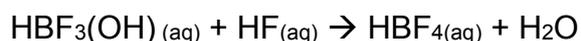
O ácido clorídrico (HCl) é um ácido não oxidante. É bastante utilizado em mistura com o ácido nítrico, em uma proporção conhecida como água régia, sendo 1 parte de HNO<sub>3</sub> para 3 partes de HCl concentrado. O ácido nítrico oxida o ácido clorídrico, dando origem a produtos de oxidação como o cloro molecular (Cl<sub>2</sub>) e o cloreto de nitrosila (NOCl), produtos intensamente reativos e com alto poder de oxidante. Essa propriedade, associada à ação complexante do íon cloreto faz com que a mistura seja altamente eficiente na digestão de metais nobres. A água régia é ainda utilizada para digerir muitos metais e ligas metálicas<sup>37</sup>. Com proporção inversa, a água régia invertida também é bastante utilizada.

O ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) é um ácido forte e, quando aquecido, é capaz de oxidar um grande número de metais, reduzindo-se a SO<sub>2</sub>, S elementar ou H<sub>2</sub>S. Possui também propriedades desidratantes, além de ser capaz de destruir parcial ou totalmente quase todos os compostos orgânicos.

O ácido fluorídrico (HF) é um ácido fraco, não oxidante, cuja reatividade se baseia na sua natureza complexante. O íon fluoreto é um poderoso ânion complexante, reagindo especialmente com aqueles elementos que formam óxidos refratários, os mais difíceis de serem dissolvidos uma vez que formam óxidos estáveis insolúveis, tais como:



Uma vez que o HF reage com a sílica, é necessário que, para a introdução do digerido no instrumento, seja utilizado um sistema de introdução adequado e resistente à HF ou que a amostra preparada seja tratada com ácido bórico a fim de neutralizar o HF conforme as seguintes equações químicas:



O peróxido de hidrogênio, também conhecido como água oxigenada, é bastante utilizado na digestão de amostras, devido suas propriedades oxidantes. Geralmente é utilizado em combinação com os ácidos nítrico ou sulfúrico, na digestão, principalmente, de matrizes orgânicas.

## 5.2 Seleção da mistura ácida

Considerando as propriedades dos ácidos, escolheu-se utilizar para avaliação o ácido nítrico combinado com ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio em diferentes proporções. Foram avaliadas as seguintes misturas ácidas (V/V):

- 4 HNO<sub>3</sub>:1H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 3 HNO<sub>3</sub>:2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 1 HNO<sub>3</sub>:3 HCl (água régia)
- 3 HNO<sub>3</sub>:1HCl (água régia invertida).

Adicionou-se 5 mL de mistura ácida a 100 mg de amostra macerada de medicamentos de uso contínuo, que foram posteriormente submetidos ao programa de aquecimento apresentado na Tabela 5.1.

O teor de carbono orgânico residual dissolvido foi determinado operando o ICP OES em condições convencionais e usando as linhas de emissão atômica em 193,091 e 247,856 nm, tanto no modo axial quanto no radial.

Foram construídas as curvas de calibração utilizando-se soluções analíticas contendo 0 (branco), 0,05%, 0,10%, 0,25%, 0,50% e 1,0% m/v de carbono, preparadas a partir de uréia. Amostras de medicamentos de uso contínuo foram utilizadas na avaliação da eficiência de digestão.

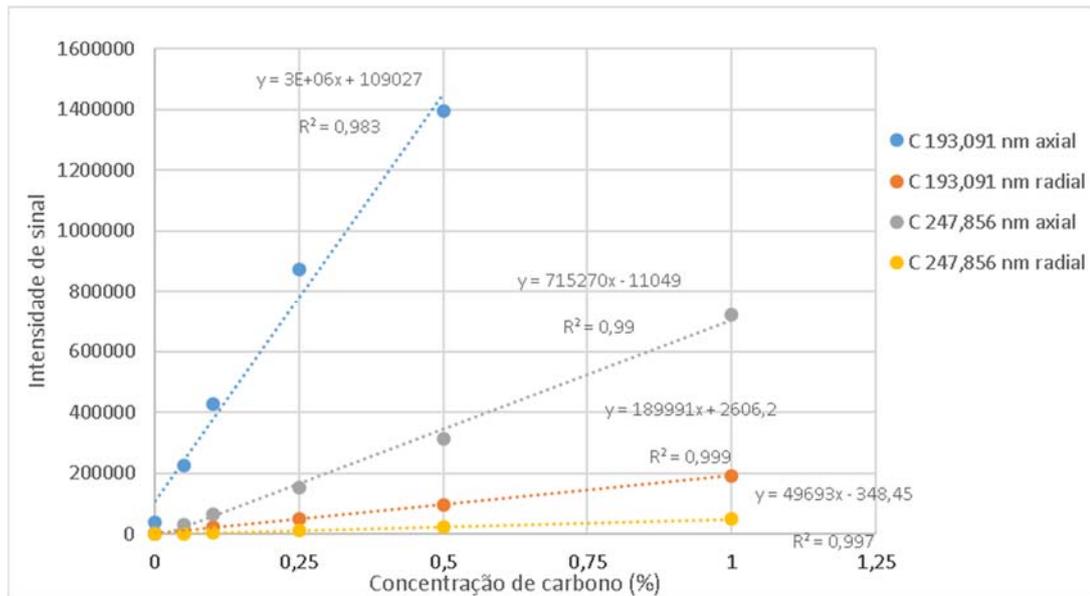


Figura 5.1. Curvas analíticas de calibração para carbono

Sabe-se que ocorre interferência de Fe na linha espectral de C em 247,856 nm<sup>43</sup>. Contudo, com os resultados obtidos pode-se supor que a concentração de Fe nas amostras estudadas é baixa e resultados similares foram obtidos usando ambas as linhas de emissão de C. Resultados similares também foram obtidos nas duas visões do plasma, axial e radial, para os dois comprimentos de onda estudados.

Tabela 5.2 Teor de carbono orgânico residual nos digeridos (%) determinado de acordo com a mistura ácida utilizando-se o comprimento de onda de C em 193,091 nm em vista axial.

<b>Fármaco</b>	<b>4HNO<sub>3</sub>:1H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>3HCl:1HNO<sub>3</sub></b>	<b>3HNO<sub>3</sub>:1HCl</b>	<b>3HNO<sub>3</sub>:2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>
UC01	6,57 ± 0,17	9,06 ± 0,05	0,84 ± 0,06	3,56 ± 0,07
UC02	5,68 ± 0,09	4,53 ± 0,05	0,05 ± 0,01	2,51 ± 0,03
UC03	6,71 ± 0,03	7,67 ± 0,06	2,54 ± 0,03	1,80 ± 0,003
UC04	7,07 ± 0,01	5,38 ± 0,02	2,33 ± 0,03	3,02 ± 0,02
UC05	5,12 ± 0,01	4,74 ± 0,03	0,46 ± 0,03	1,21 ± 0,02
UC06	7,26 ± 0,01	8,95 ± 0,07	5,08 ± 0,04	3,42 ± 0,02
UC07	9,21 ± 0,10	9,98 ± 0,01	6,90 ± 0,07	4,46 ± 0,03
UC08	8,32 ± 0,05	11,34 ± 0,04	9,40 ± 0,05	3,23 ± 0,02
UC09	9,08 ± 0,03	11,04 ± 0,11	8,17 ± 0,03	3,64 ± 0,02
UC10	9,57 ± 0,02	9,05 ± 0,11	5,10 ± 0,10	2,29 ± 0,02
UC11	7,18 ± 0,03	6,14 ± 0,01	8,02 ± 0,02	3,05 ± 0,01
UC12	7,82 ± 0,04	8,60 ± 0,04	5,76 ± 0,05	4,49 ± 0,03

Digeridos com menores teores de carbono dissolvido refletem melhores condições de digestão, uma vez que houve maior conversão de compostos orgânicos em CO<sub>2</sub>. Assim, é possível inferir pela Tabela 5.2 que o reagente composto por ácido

nítrico e peróxido de hidrogênio na proporção 3:2 V/V mostrou-se mais eficiente na digestão das amostras de produtos farmacêuticos, seguido da água régia invertida, que apresentou o segundo melhor resultado. Ambas as misturas foram testadas posteriormente quanto à proporcionalidade.

### 5.3 Avaliação da proporção amostra/mistura ácida

A segunda etapa de avaliação da digestão envolveu a determinação da proporção entre amostra e mistura ácida. Para esta otimização utilizou-se valores estabelecidos pelo fabricante do equipamento. Utilizou-se o volume mínimo de ácido permitido, 5 mL, enquanto a quantidade de amostra foi variada até atingir o máximo permitido, 500 mg. Foram utilizadas as duas melhores misturas citadas anteriormente, porém variando a quantidade de amostra: 100; 300 e 500 mg.

O objetivo desta etapa é avaliar a capacidade de digestão das misturas ácidas utilizando uma maior quantidade de amostra.

Foi construída uma nova curva analítica para carbono, porém somente utilizando o comprimento de onda principal, 193,091 nm, na visão axial.

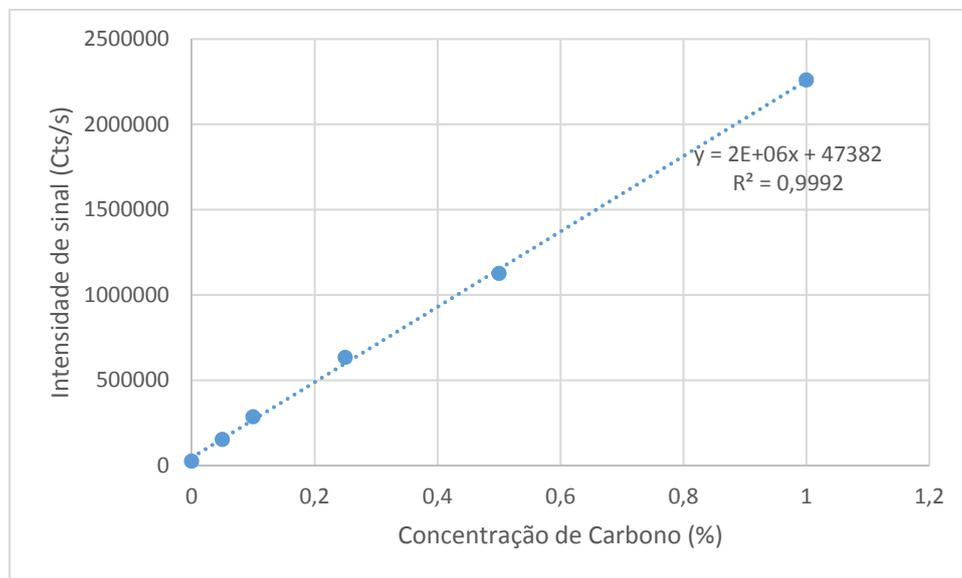


Figura 5.2 Curva analítica de calibração do carbono em 193,091 nm na visão axial

A Tabela 5.3 representa o teor de carbono orgânico residual em cada amostra à medida que a quantidade de amostra é aumentada. É possível perceber que, ao comparar a eficiência de digestão de ambas as misturas, a mistura de ácido

nítrico com peróxido de hidrogênio foi menos eficiente que a água régia invertida. Tanto ácido clorídrico quanto o peróxido são comumente adicionados ao ácido nítrico a fim de potencializar o poder oxidante do reagente. A adição de HCl pode levar à adição de potenciais interferentes em ICP-MS (Cl se combina com outros elementos formando interferências poliatômicas), enquanto o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode significar a adição de contaminantes devido à pureza do reagente, além de eventualmente necessitar o uso de estabilizantes<sup>22</sup>

Tabela 5.3 Teor de carbono orgânico dissolvido nos digeridos (%) determinado de acordo com a proporção amostra/mistura ácida utilizando-se ICPOES com visão axial

	3HNO <sub>3</sub> :1HCl			3HNO <sub>3</sub> :2H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
	0,100 mg	0,300 mg	0,500 mg	0,100 mg	0,300 mg	0,500 mg
UC01	0,84 ± 0,06	1,76 + 0,03	3,82 + 0,07	3,56 ± 0,07	6,38 + 0,03	7,56 + 0,15
UC02	0,05 ± 0,01	1,88 + 0,01	1,58 + 0,03	2,51 ± 0,03	8,75 + 0,04	9,72 + 0,11
UC03	2,54 ± 0,03	17,64 + 0,11	12,19 + 0,04	1,80 ± 0,003	18,5 + 0,08	25,12 + 0,04
UC04	2,33 ± 0,03	14,74 + 0,03	16,15 + 0,2	3,02 ± 0,02	14,38 + 0,05	16,45 + 0,09
UC05	0,46 ± 0,03	14,96 + 0,06	12,73 + 0,06	1,21 ± 0,02	12,23 + 0,02	15,92 + 0,13
UC06	5,08 ± 0,04	11,86 + 0,09	11,99 + 0,15	3,42 ± 0,02	10,33 + 0,01	16,55 + 0,06
UC07	6,90 ± 0,07	9,39 + 0,01	12,46 + 0,02	4,46 ± 0,03	16,40 + 0,09	17,36 + 0,03
UC08	9,40 ± 0,05	10,78 + 0,06	11,15 + 0,09	3,23 ± 0,02	13,65 + 0,05	15,89 + 0,09
UC09	8,17 ± 0,03	4,86 + 0,03	6,26 + 0,07	3,64 ± 0,02	15,80 + 0,03	17,22 + 0,11
UC10	5,10 ± 0,10	2,99 + 0,05	2,03 + 0,04	2,29 ± 0,02	12,37 + 0,05	9,18 + 0,07
UC11	8,02 ± 0,02	15,98 + 0,03	14,87 + 0,02	3,05 ± 0,01	17,06 + 0,07	21,36 + 0,13
UC12	5,76 ± 0,05	8,78 + 0,12	10,90 + 0,08	4,49 ± 0,03	16,87 + 0,12	15,94 + 0,07

Optou-se pelo uso da água régia invertida para digestão das amostras porque além de possuir resultados mais eficientes, a obtenção de ácidos nítrico e clorídrico ultrapuros é mais fácil e mais barata do que a obtenção de nítrico e peróxido ultrapuros. Os ácidos utilizados foram destilados em destilador sob temperatura abaixo do ponto de ebulição, o que torna o preparo da amostra mais barato e possibilita melhor controle dos brancos analíticos. A impossibilidade de destilar peróxido de hidrogênio faria com que fosse necessário a compra do reagente ultrapuro, o que encareceria consideravelmente o procedimento.

#### 5.4 Avaliação dos digeridos

As amostras foram digeridas em três grupos. O primeiro grupo, constituído por amostras de medicamentos de uso contínuo, tem seus resultados de digestão reportados na Tabela 5.4 de acordo com o aspecto visual dos digeridos.

Tabela 5.4 Aspecto visual dos digeridos de amostras de medicamentos de uso contínuo

<b>Medicamento</b>	<b>Aspecto visual</b>
UC01	Completa
UC02	Presença de sólidos residuais
UC03	Presença de sólidos residuais
UC04	Presença de sólidos residuais
UC05	Completa
UC06	Presença de sólidos residuais
UC07	Completa
UC08	Completa
UC09	Completa
UC10	Completa
UC11	Presença de sólidos residuais
UC12	Completa

Amostras como UC02, UC03, UC04, UC06 e UC11 apresentaram precipitados brancos nos digeridos.

A presença de sólidos residuais pode ser explicada através da composição de cada um desses medicamentos. O anticoncepcional UC02 além de conter dióxido de titânio em sua composição, ainda contém talco farmacêutico (Silicato de magnésio). UC03 contém dióxidos de titânio e de silício. Esse último composto ainda pode ser encontrado em UC04, UC06 e UC11. Compostos de silício e titânio requerem a utilização de ácido fluorídrico para a digestão completa dos mesmos.

Visando confirmar as informações da bula, a digestão das amostras citadas anteriormente foi refeita, porém adicionando-se 1 mL de HF à mistura ácida. Todos os produtos foram completamente digeridos nessa nova condição.

A única informação divergente encontrada está na composição do medicamento para diabetes UC09. Apesar da bula informar a presença de dióxido de

silício a digestão ocorreu de maneira completa em todas as vezes que a amostra foi submetida ao processo de digestão ácida por radiação micro-ondas utilizando-se água régia invertida como mistura ácida reagente.

O aspecto visual dos digeridos das amostras de excipiente estão reportados na Tabela 5.5. Conforme esperado, a amostra EX08, composta de talco farmacêutico, nome comercial do silicato de magnésio, apresentou sólidos residuais nos digeridos. Pode-se supor que, apesar de não ser possível digerir talco farmacêutico com mistura ácida de ácido nítrico e ácido clorídrico, tal mistura é capaz de extrair possíveis contaminantes.

Tabela 5.5 Aspecto visual dos digeridos de amostras de excipientes

<b>Medicamento</b>	<b>Aspecto visual</b>
EX01	Completa
EX02	Completa
EX03	Completa
EX04	Completa
EX05	Completa
EX06	Completa
EX07	Completa
EX08	Presença de sólidos residuais
EX09	Completa
EX10	Completa

O aspecto visual da digestão do terceiro grupo de amostras, constituído por amostras de multivitamínicos, multiminerais e produtos naturais, está descrito na Tabela 5.6 a seguir.

Tabela 5.6 Aspecto visual dos digeridos de amostras de multivitamínicos, multiminerais e produtos naturais

<b>Medicamento</b>	<b>Resultado da Digestão</b>
MV01	Presença de sólidos residuais
MV02	Presença de sólidos residuais
MV03	Completa
MV04	Presença de sólidos residuais
MV05	Presença de sólidos residuais
MV06	Completa
MV07	Presença de sólidos residuais
MV08	Completa
MV09	Presença de sólidos residuais
MV10	Presença de sólidos residuais

Assim como no caso dos medicamentos de uso contínuo, a digestão incompleta também está associada à presença de compostos de titânio e silício como excipientes do medicamento. A presença de sólidos residuais é explicada pela presença de dióxido de silício em MV02, MV04, MV05 e MV07, de dióxido de titânio em MV04e MV09 e talco farmacêutico em MV07 e MV09.

Todas as amostras digeridas tiveram seu volume ajustado, ao final do processo, para 50 mL em tubo Falcon calibrado. Essa diluição garante um digerido final com teor ácido na faixa de 10% V/V, o que viabiliza a nebulização pneumática e inserção segura da amostra no equipamento de ICP OES. Além disso, alta acidez das soluções analíticas faz com que componentes do sistema de introdução de amostras tenham uma menor vida útil.

## **CAPÍTULO 6**

# **ANÁLISE ELEMENTAR POR ICP OES**

## **6. Análise elementar por ICP OES**

### **6.1 Ajuste das condições operacionais**

Para efetuar a análise elementar dos digeridos das amostras por ICP OES é necessário estabelecer condições operacionais que possibilitem obter os menores limites de detecção e quantificação possíveis e, conseqüentemente, maiores sensibilidades. É necessário, também, considerar possíveis interferências, espectrais, químicas ou físicas.

Os parâmetros operacionais mais críticos são a potência aplicada da fonte de radiofrequência, a vazão do gás de nebulização e a região de observação, pois estão diretamente ligados ao processo de geração de átomos e íons. Há ainda outros parâmetros a serem considerados, tais como a vazão do gás auxiliar e as linhas de emissão do analito.

Para a otimização da potência aplicada de rádio frequência e das vazões do gás de nebulização e do gás auxiliar preparou-se uma solução padrão contendo os analitos e cada parâmetro foi avaliado mantendo-se os demais constantes. Uma vez que as condições operacionais do ICP OES foram estabelecidas, preparou-se soluções analíticas de calibração visando seleção das linhas de emissão para cada um dos elementos a serem determinados. Para esses testes foram utilizadas as linhas de emissão mais sensíveis para cada elemento com vista axial e com ambiente espectral livre de interferências.

#### **6.1.1 Potência aplicada de radiofrequência**

A potência aplicada de radiofrequência é responsável pela criação do campo magnético encarregado de ionizar e manter a ionização do argônio, formando o plasma. Quanto maior essa potência, maior a capacidade do plasma em atomizar, ionizar e excitar os elementos presentes na amostra. Observa-se na Figura 6.1 que quanto maior a potência aplicada, mais altos foram os sinais obtidos de emissão.

Para o instrumento usado, a potência de radiofrequência pode ser variada na faixa entre 750 e 1350 W.

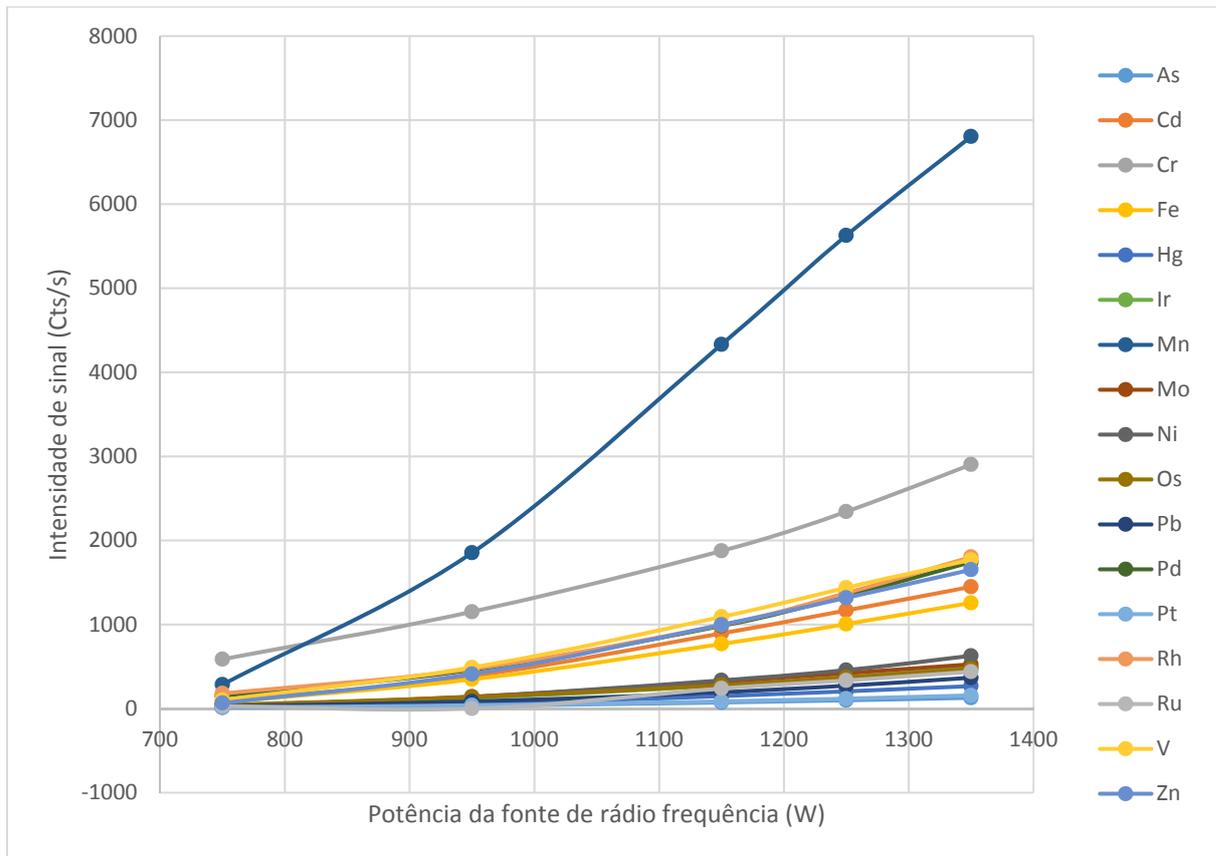


Figura 6.1 Otimização da intensidade de sinal em função da potência de radiofrequência (W)

Além do aumento da intensidade de sinal não ser significativo para a maioria dos elementos estudados entre 1250 e 1350 W, sabe-se que trabalhar no limite da potência acarreta um maior desgaste da fonte de radiofrequência e da tocha de quartzo. Como este estudo visa estabelecer condições que possam ser adotadas em análises de rotina de um laboratório farmacêutico, optou-se por trabalhar com potência aplicada de 1250 W.

### 6.1.2 Vazão do gás de nebulização

O gás de nebulização é o responsável pelo transporte do aerossol contendo as gotículas da amostra em direção ao plasma.

Na Figura 6.2 é possível perceber que para alguns elementos a intensidade de sinal aumentou com o aumento da vazão de gás, atingiu um valor máximo e voltou a decrescer. Isso ocorreu porque a condição ótima de eficiência de nebulização foi atingida, no qual as partículas do aerossol atingem o tamanho ideal

para serem encaminhadas para o plasma e serem atomizadas. Quando a vazão é alta, o tempo de residência das gotículas da amostra no plasma diminui e, conseqüentemente, a sensibilidade também diminui. Escolheu-se, com isso, trabalhar com fluxo de gás de nebulização em 0,45 L/min

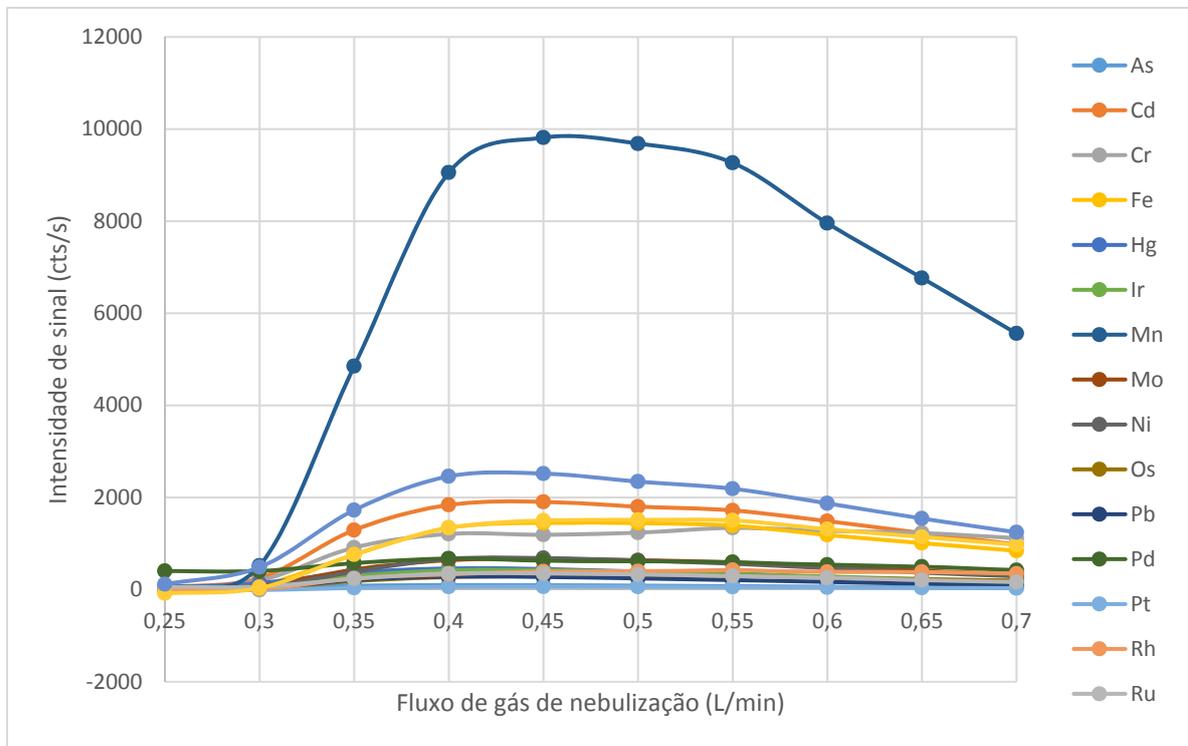


Figura 6.2 Otimização da intensidade de sinal em função da vazão (L/min) do gás de nebulização

### 6.1.3 Vazão do gás auxiliar

O gás auxiliar possui duas funções importantes: além de auxiliar na transferência de energia entre plasma e amostra, ele também evita entupimento do tubo injetor por conta de processos de cristalização de constituintes da matriz da amostra. Esse último efeito está relacionado com a ação do gás auxiliar sobre o posicionamento espacial do plasma de argônio com relação à tocha de quartzo. Pode ser usado com as seguintes vazões: 0, 0,5, 1,0 e 1,5 L/min.

Quando esse gás não é utilizado há um maior tempo de residência da amostra no plasma, além do gás não diluir o aerossol da amostra, o que faz com que a vazão do gás auxiliar e o sinal analítico sejam inversamente proporcionais, como é observado na Figura 6.3. Porém, ao trabalhar com amostras de diferentes

composições corre-se o risco de formação de depósitos de material no capilar do nebulizador. Evita-se, assim, a operação sem nenhuma introdução do gás auxiliar. Escolhe-se, assim o menor valor possível. Nesse caso, o valor otimizado foi de 0,5 L/min.

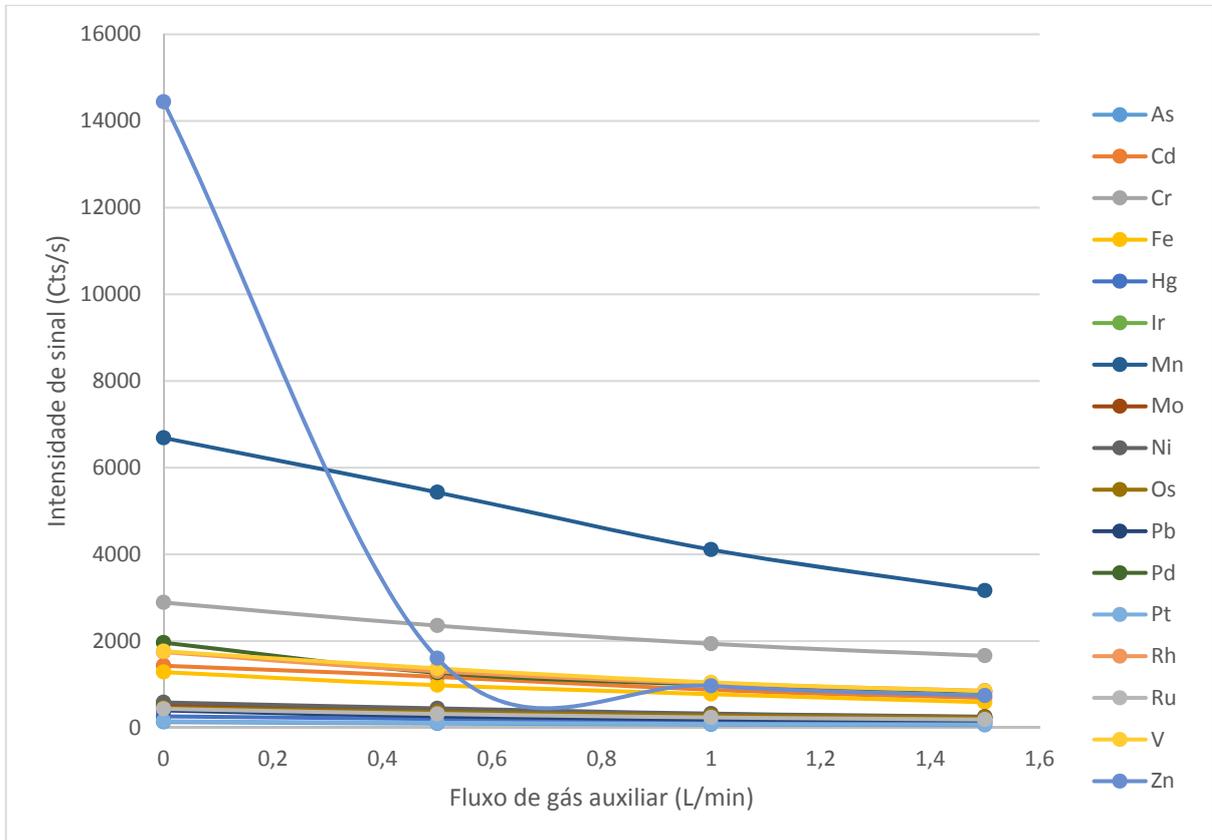


Figura 6.3 Otimização da intensidade de sinal em função fluxo de gás auxiliar (L/min)

As condições operacionais do ICP OES adotadas para a análise elementar de produtos farmacêuticos podem ser observadas na Tabela 6.1. Além dos valores otimizados, também estão presentes outros parâmetros, como vazão do gás de refrigeração, velocidade de rotação da bomba peristáltica e tempo de integração do sinal analítico. Para esses parâmetros foram utilizados valores pré-definidos pelo programa de aquisição de dados.

Tabela 6.1 Condições operacionais do ICP OES modelo iCAP 6500 (Thermo Scientific)

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor utilizado</b>
Potência de radiofrequência	1250 W
Vazão do gás de refrigeração	12 L/min
Vazão do gás de nebulização	0,45 L/min
Vazão do gás auxiliar	0,5 L/min
Velocidade da bomba peristáltica	50 RPM
Tempo de integração	5 s para altos comprimentos de onda 15 s para baixos comprimentos de onda

#### 6.1.4 Linhas de emissão

Sabe-se que um mesmo elemento pode emitir radiação em diversos comprimentos de onda ao retornar ao seu estado fundamental de energia. A emissão de elementos concomitantes em um mesmo comprimento de onda é uma das causas de interferências espectrais. Além disso, sabe-se que para cada elemento, quanto maior a probabilidade de transição, maior será a intensidade de emissão da linha espectral em um dado comprimento de onda, portanto maior será a sensibilidade da medida em ICP OES.

Considerando-se tais informações, é necessário escolher a linha de emissão mais adequada para cada elemento a ser determinado. Em uma análise preliminar foram construídas curvas analíticas de calibração em pelo menos 3 linhas de emissão para cada um dos elementos. Algumas amostras foram analisadas e os resultados foram avaliados e comparados. Cada comprimento de onda foi avaliado de acordo com os seguintes parâmetros: intensidade do sinal relativo, linearidade da curva analítica de calibração (através do  $R^2$ ), limites de detecção e quantificação e ambiente espectral. Com base nesses critérios, as linhas de emissão selecionadas estão marcadas em negrito na Tabela 6.2.

Tabela 6.2. Dados experimentais sobre linhas de emissão para cada analito.

Elemento	Linha de emissão (nm)	Intensidade relativa	R <sup>2</sup> da curva calibração	Limite de detecção (µg/L)	Limite de quantificação (µg/L)
Ag	243,779	30.000	1,0000	1,8	6,0
	<b>328,068</b>	1.500.000	1,0000	1,2	4,2
	338,289	900.000	0,9999	2,7	9,1
As	<b>189,042</b>	150.000	0,9998	0,07	0,2
	193,759	120.000	0,9907	0,3	1,1
	449,423	120.000	0,7639	0,5	1,9
Au	208,209	200.000	0,9998	1,6	5,3
	242,795	1.200.000	0,9999	1,7	5,7
	<b>267,595</b>	750.000	0,9996	2,1	7,1
Ba	233,527	1.800.000	1,0000	0,2	0,7
	455,403	15.000.000	0,9997	0,05	0,2
	<b>493,409</b>	9.000.000	0,9997	0,05	0,2
Cd	214,438	1.000.000	0,9998	0,08	0,2
	<b>226,502</b>	1.500.000	0,9999	0,1	0,3
	228,802	2.000.000	0,9997	0,1	0,4
Co	<b>228,616</b>	1.000.000	0,9999	0,2	0,6
	237,862	700.000	0,9997	1,5	5,2
	238,892	1.000.000	---		
Cr	<b>267,716</b>	1.000.000	1,0000	0,4	1,2
	283,563	1.500.000	1,0000	0,3	1,0
	284,325	1.000.000	1,0000	0,6	2,2
	357,869	900.000	0,9996	1,0	3,3
Cu	224,7	1.000.000	0,9999	0,5	1,8
	<b>324,754</b>	5.000.000	0,9998	0,5	1,7
	327,396	3.000.000	0,9999	1,1	3,5
Fe	238,204	1.800.000	0,9995	0,6	2,2
	239,562	900.000	0,9999	0,5	1,9
	<b>259,94</b>	2.000.000	0,9999	0,4	1,6
Hg	<b>184,95</b>	360.000	0,9998	0,5	1,8
	194,227	360.000	0,9995	1,0	3,4
	253,652	250.000	---		

Continuação da Tabela 6.2. Dados experimentais sobre linhas de emissão para cada analito

Elemento	Linha de emissão (nm)	Intensidade relativa	R <sup>2</sup> da curva calibração	Limite de detecção (µg/L)	Limite de quantificação (µg/L)
Ir	205,222	182.353	0,9972	22,56	75,19
	212,621	400.000	0,9999	1,21	4,05
	<b>224,268</b>	500.000	0,9999	0,13	0,42
Li	460,286	500.000	0,9997	22,37	74,56
	610,362	500.000	0,9995	1,19	3,96
	<b>670,784</b>	12.000.000	0,9999	0,01	0,05
Mn	<b>257,61</b>	10.000.000	0,9999	0,06	0,21
	259,373	9.000.000	0,9999	0,13	0,43
	260,569	7.000.000	0,9999	0,14	0,47
Mo	<b>202,032</b>	500.000	0,9998	0,45	1,5
	204,598	300.000	0,9999	0,6	1,99
	281,615	400.000	0,9999	1,89	6,3
Ni	221,647	600.000	1,0000	0,22	0,74
	<b>231,604</b>	600.000	1,0000	0,55	1,82
	341,476	300.000	0,9997	3,69	12,3
Os	225,585	1.000.000	0,9990	0,52	1,74
	<b>228,226</b>	600.000	0,9990	0,88	2,92
	233,68	300.000			
Pb	216,9 {155}	90.000	0,9460	6,16	20,52
	216,9 {455}	90.000	0,9968	0,7	2,34
	220,353 {153}	120.000	0,9744	2,48	8,28
	<b>220,353 {453}</b>	120.000	0,9987	0,84	2,79
	261,418	70.000	0,9916	-0,04	-0,13
Pd	324,27	200.000	0,9995	5,75	19,16
	<b>340,458</b>	400.000	0,9999	2,59	8,65
	363,47	200.000	0,9990	8,66	28,85
Pt	<b>203,646</b>	100.000	1,0000	0,82	2,74
	214,423	150.000			
	265,945	150.000	0,9992	6,95	23,16

Continuação da Tabela 6.2. Dados experimentais sobre linhas de emissão para cada analito

Elemento	Linha de emissão (nm)	Intensidade relativa	R <sup>2</sup> da curva calibração	Limite de detecção (µg/L)	Limite de quantificação (µg/L)
Rh	233,477	100.000	0,9945	0,9	3
	343,489	250.000	0,9998	3,36	11,21
	<b>369,236</b>	180.000	0,9998	2,07	6,91
Ru	240,272	200.000	1,0000	1,57	5,24
	266,161	80.000	0,9994	6,6	22,01
	<b>267,876</b>	250.000	0,9999	1,29	4,29
Sb	206,833	180.000	0,9997	2,05	6,84
	<b>217,581</b>	180.000	0,9998	1,91	6,35
	231,147	150.000	0,9992	11,7	38,99
Se	<b>196,09</b>	100.000	0,9999	2,51	8,36
	207	60.000	0,0894	459,06	1530,2
	241	25.000	1,0000		
Sn	<b>189,989</b>	150.000	0,9934	0,31	1,05
	242,949	90.000	0,9956	14,15	47,16
	283,999	100.000	0,9955	11,35	37,82
Tl	<b>190,856</b>	120.000	0,9856	2,87	9,57
	276,787	80.000	0,9886	5,01	16,71
	351,924	60.000	0,8803	6,92	23,05
V	<b>292,402</b>	1.800.000	0,9999	0,63	2,1
	310,23	2.000.000	1,0000	0,66	2,18
	309,311	2.500.000	0,9998	0,92	3,07
Zn	<b>202,548</b>	1.000.000	0,9959	0,26	0,87
	206,2	900.000	0,9991	0,25	0,82
	213,856	3.000.000	0,9954	0,3	0,98

Para os elementos Ag, As, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Pb, Pd, Ru, Sb, Se, Sn e Tl foram escolhidas as linhas de emissão que apresentam maiores intensidades relativas e menores limites de detecção e quantificação. Para os elementos Au, Cr, Os, Pt e Rh não foram escolhidas as linhas de emissão com maiores intensidades relativas devido à ocorrência de sinais causados por interferentes nas proximidades

das respectivas linhas de emissão. Assim, escolheu-se para cada elemento a linha de emissão com segunda maior intensidade relativa. No caso da Pt e do Rh, apesar de não se utilizar as linhas principais, melhores limites de detecção e quantificação foram obtidos.

A linha de emissão de maior intensidade relativa do Ba apresentou sinais de saturação, assim foi escolhida a linha com a segunda maior intensidade relativa. Essa linha apresenta limites de detecção e quantificação semelhantes à primeira, o que mostra sua eficiência do método na quantificação do elemento.

Para os elementos Co e Ni escolheram-se as linhas de emissão com maiores intensidades relativas, sendo que as outras duas foram descartadas pela ocorrência de interferências nas proximidades de cada respectiva linha de emissão.

Para o Zn a linha de emissão com maior intensidade relativa não apresentou os melhores limites de quantificação e detecção, assim selecionou-se a segunda linha de emissão mais intensa.

## **6.2 Curvas analíticas de calibração**

Para construir as curvas analíticas de calibração foram considerados os menores valores de exposição diária permitida entre aqueles estabelecidos pelas normas da USP, EMA e ICH. A única exceção foi o As. Para o menor valor, 1,5 µg/dia, seria necessário utilizar geração de hidretos para atingir os limites de quantificação necessários. Porém, a Farmacopeia Norte-Americana divulgou em seu website a harmonização de limites com o ICH, alterando esse valor<sup>32</sup>. Assim, foi considerado o valor de 15 µg/dia, conforme estipulado pelo ICH. Os valores utilizados podem ser observados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 Comparativo de valores de PDE estabelecidos pelas normas USP, EMA e ICH.

Elemento	PDE ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) em exposição oral de medicamento			PDE considerado
	USP	EMA	ICH	
Ag	--	--	150	150
As	1,5	--	15	15
Au	--	--	100	100
Ba	--	--	1400	1400
Cd	25	--	5	5
Co	--	--	50	50
Cr	--	250	11000	250
Cu	1000	2500	3000	1000
Fe	--	13000	--	13000
Hg	15	--	30	15
Ir	--	100	100	100
Li	--	--	550	550
Mn	--	2500	--	2500
Mo	100	250	3000	100
Ni	500	250	--	250
Os	100	100	100	100
Pb	5	100	100	5
Pd	100	100	100	100
Pt	100	100	100	100
Rh	100	100	100	100
Ru	100	100	100	100
Sb	--	--	1200	1200
Se	--	--	150	150
Sn	--	--	6000	6000
Tl	--	--	8	8
V	100	250	100	100
Zn	--	13000	--	13000

-- Elementos não compreendidos pela norma em determinado tipo de exposição.

Conforme especificado no capítulo 233 da Farmacopeia Norte-Americana<sup>6</sup>, foram calculados os valores de J, concentração do elemento de interesse no limite alvo, apropriadamente diluído. O J pode ser calculado usando-se a expressão abaixo, citada anteriormente no subitem denominado “USP – Farmacopeia Norte-Americana”.

$$J = \frac{PDE}{MDD \times FD}$$

Foram considerados valores de PDE ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) conforme a última coluna da Tabela 6.3, máxima dose diária de medicamento de 10 g/dia e fator de diluição de 100. Uma vez calculado o valor de J, foram construídas uma curva analítica para cada elemento alvo nas seguintes concentrações de solução padrão: 0; 0,1J; 0,25J; 0,5J; 0,75J; 1,0J; 1,5J e 2,0J. Os valores, em concentração, podem ser observados na Tabela 6.4. As curvas analíticas obtidas nas medidas por ICP OES podem ser visualizadas no Apêndice I.

Tabela 6.4 Concentração ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) das soluções analíticas para construção das curvas analíticas de calibração

<b>Elemento</b>	<b>0 J</b>	<b>0,1 J</b>	<b>0,25 J</b>	<b>0,5 J</b>	<b>0,75 J</b>	<b>1,0 J</b>	<b>1,5 J</b>	<b>2,0 J</b>
Ag	0	15	37,5	75	112,5	150	225	300
As	0	1,5	3,75	7,5	11,25	15	22,5	30
Au	0	10	25	50	75	100	150	200
Ba	0	140	350	700	1050	1400	2100	2800
Cd	0	0,5	1,25	2,5	3,75	5	7,5	10
Co	0	5	12,5	25	37,5	50	75	100
Cr	0	25	62,5	125	187,5	250	375	500
Cu	0	100	250	500	750	1000	1500	2000
Fe	0	1300	3250	6500	9750	13000	19500	26000
Hg	0	1,5	3,75	7,5	11,25	15	22,5	30
Ir	0	10	25	50	75	100	150	200
Li	0	55	137,5	275	412,5	550	825	1100
Mn	0	250	625	1250	1875	2500	3750	5000
Mo	0	10	25	50	75	100	150	200

Continuação da Tabela 6.4 Concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) das soluções analíticas para construção das curvas analíticas de calibração

Elemento	0 J	0,1 J	0,25 J	0,5 J	0,75 J	1,0 J	1,5 J	2,0 J
Ni	0	25	62,5	125	187,5	250	375	500
Os	0	10	25	50	75	100	150	200
Pb	0	0,5	1,25	2,5	3,75	5	7,5	10
Pd	0	10	25	50	75	100	150	200
Pt	0	10	25	50	75	100	150	200
Rh	0	10	25	50	75	100	150	200
Ru	0	10	25	50	75	100	150	200
Sb	0	120	300	600	900	1200	1800	2400
Se	0	15	37,5	75	112,5	150	225	300
Sn	0	600	1500	3000	4500	6000	9000	12000
Tl	0	0,8	2	4	6	8	12	16
V	0	10	25	50	75	100	150	200
Zn	0	1300	3250	6500	9750	13000	19500	26000

## 6.3 Resultados e discussão

### 6.3.1 Limites de detecção e quantificação

A partir da construção das curvas analíticas de calibração citadas no item 6.2 foram calculados os limites de detecção e quantificação para cada um dos elementos.

Para o cálculo de limite de detecção utilizou-se a fórmula que considera a razão entre o sinal analítico e o sinal de fundo (SBR, do inglês signal-to-background ratio) e a concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC, do inglês background equivalente concentration). Para isso escolheu-se o padrão de 0,5 J como referência para o cálculo.

O desvio padrão relativo (RSD) do branco foi calculado a partir da intensidade de sinal obtida em 10 leituras independentes do padrão.

$$\text{SBR} = \frac{I_{0,5J} - I_{\text{branco}}}{I_{\text{branco}}}$$

$$\text{BEC} = \frac{C_{0,5J}}{\text{SBR}}$$

$$\text{LD} = \frac{3 \times \text{BEC} \times \text{RSD}}{100}$$

sendo  $I_{0,5J}$  a intensidade de sinal da solução padrão de 0,5 J de concentração,  $I_{branco}$  a intensidade de sinal da solução branco,  $C_{0,5J}$  a concentração da solução padrão de 0,5 J e RSD o desvio padrão relativo do branco.

O limite de quantificação foi calculado a partir do limite de detecção.

$$LQ = 3,3 \times LD$$

Tabela 6.5. Limites de detecção e quantificação obtidos experimentalmente ( $\mu\text{g/L}$ )

<b>Elemento</b>	<b>Limite de detecção</b>	<b>Limite de quantificação</b>
Ag	0,87	2,60
As	1,51	4,52
Au	1,93	5,80
Ba	0,14	0,42
Cd	0,08	0,23
Co	0,17	0,51
Cr	0,48	1,43
Cu	0,34	1,03
Fe	3,91	11,73
Hg	0,40	1,19
Ir	0,13	0,39
Li	0,03	0,09
Mn	0,09	0,27
Mo	0,68	2,03
Ni	0,38	1,13
Os	0,80	2,40
Pb	0,84	2,53
Pd	3,27	9,80
Pt	1,05	3,16
Rh	3,44	10,32
Ru	1,05	3,16
Sb	3,10	9,31
Se	3,91	11,72
Sn	2,51	7,54
Tl	2,99	8,98
V	0,50	1,49
Zn	0,14	0,41

### 6.3.2 Análise elementar

Antes de reportar os valores de concentração obtidos para cada medicamento, avaliou-se qualitativamente a presença dos elementos alvo em cada um deles. Constatou-se a ausência de Ag, As, Hg, Os, Rh, Sn e Tl em todos os grupos de medicamentos.

Os medicamentos de uso contínuo são os que apresentaram a menor quantidade de elementos. O Ni foi o único elemento que foi quantificado em todos medicamentos.

Já os multivitamínicos e multiminerais foram os que apresentaram a maior quantidade de elementos na análise elementar. Isso ocorre porque vários analitos são parte do princípio ativo de cada medicamento.

A Tabela 6.6 resume a avaliação qualitativa dos elementos alvo nos medicamentos estudados.

A análise quantitativa evidenciou que, na maioria dos casos, os analitos em questão ocorreram em concentrações significativamente inferiores aos limites estabelecidos pelas normas.

Tabela 6.6 Análise qualitativa dos elementos alvo nos medicamentos estudados

	<b>Excipientes</b>	<b>Medicamentos de uso contínuo</b>	<b>Multivitamínicos</b>
<b>Ag</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>As</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>Au</b>	EX01 e EX05	UC02	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>Ba</b>	EX01 e EX10	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>Cd</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	UC02 e UC03	MV01, MV04, MV05, MV07 e MV10
<b>Co</b>	Todos, exceto EX04 e EX06	UC01, UC02, UC03, UC05, UC06, UC08 e UC11	Todos
<b>Cr</b>	EX07 e EX08	Valores abaixo do limite de quantificação	MV01, MV02, MV03, MV04, MV05 e MV10
<b>Cu</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação	MV01, MV02, MV04, MV05, MV06 e MV10
<b>Fe</b>	EX01, EX05, EX07, EX08 e EX10	UC02	Todos
<b>Hg</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>Ir</b>	EX05, EX07 e EX10	Valores abaixo do limite de quantificação	Todos, exceto MV03 e MV09
<b>Li</b>	EX01, EX05, EX07, EX08, EX09 e EX10	UC02	Todos, exceto MV07
<b>Mn</b>	EX01, EX05, EX07, EX08 e EX10	Valores abaixo do limite de quantificação	Todos

Continuação da Tabela 6.6 Análise qualitativa dos elementos alvo nos medicamentos estudados

	<b>Excipientes</b>	<b>Medicamentos de uso contínuo</b>	<b>Multivitamínicos</b>
<b>Mo</b>	EX05	Valores abaixo do limite de quantificação	MV05 e MV04
<b>Ni</b>	Todos	Todos	Todos
<b>Os</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>Pb</b>	EX08		
<b>Pd</b>	EX03	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>Pt</b>			Todos, exceto MV08
<b>Rh</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>Ru</b>	MV01, MV03, MV04 e MV05	Valores abaixo do limite de quantificação	MV01, MV03, MV04 e MV05
<b>Sb</b>	EX07	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>Se</b>	EX07 e EX09	UC04, UC07, UC09	MV01, MV02, MV03, MV04, MV05 e MV09
<b>Sn</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>Tl</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação
<b>V</b>	EX01, EX05, EX07, EX08 e EX10	UC02, UC03, UC05, UC06, UC08 e UC11	Todos, exceto MV08
<b>Zn</b>	Valores abaixo do limite de quantificação	Valores abaixo do limite de quantificação	MV01, MV04, MV051 e MV10

A Tabela 6.7 contém as concentrações determinadas para as amostras de medicamentos de uso contínuo, enquanto a Tabela 6.8 lista os teores estabelecidos de metais nos excipientes. Em ambas é possível observar que a maioria dos elementos alvo não foram detectados, por estarem ausentes ou em quantidades abaixo do limite de detecção do método. Nos dois casos apenas duas amostras apresentaram quantidades excedentes aos limites da norma, uma para o Fe e outra para Pb. A Tabela 6.9 contém os teores determinados para amostras de multivitamínicos e multiminerais. Nesse caso é possível observar que elementos conhecidos como elementos-traço essenciais - Fe, Cu, Mn, Mo, Se e Zn - fundamentais para a manutenção do corpo humano, estão presentes em quantidades acima dos limites estabelecidos pelo capítulo 232. Isso pode ser explicado pelo fato desses elementos, no caso de multivitamínicos, não serem considerados contaminantes nos medicamentos, mas sim os princípios ativos dos mesmos. Esse tipo de medicamento não faz parte do escopo do capítulo 232, mas sim do 2232, no qual são estabelecidas doses diárias máximas permitidas apenas para mercúrio, arsênio, chumbo e cádmio<sup>44</sup>.

Os valores de desvio padrão para as concentrações apresentados nas Tabelas 6.7, 6.8 e 6.9 encontram-se no Apêndice II.

Resultados obtidos para a concentração de amostras de uso contínuo e excipientes apresentaram variações menores que 10% para a maioria das amostras. Já amostras de multivitamínicos apresentaram variações menores, na faixa de 1% para a maioria das amostras.

Tabela 6.7 Concentrações (mg/kg) determinadas para as amostras de medicamentos de uso contínuo por ICP OES

<b>Amostra</b>	<b>Au</b>	<b>Cd</b>	<b>Co</b>	<b>Fe</b>	<b>Li</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Pt</b>	<b>Se</b>	<b>V</b>
UC01	<LD	<LD	0,03	<LD	<LD	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
UC02	6,71	0,06	2,2	397,67	1,55	0,28	1,29	1,99	<LD	1,52
UC03	<LD	0,04	2,57	<LD	<LD	0,1	<LD	<LD	<LD	1,54
UC04	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,04	<LD	<LD	0,05	<LD
UC05	<LD	<LD	0,03	<LD	<LD	0,14	<LD	0,04	<LD	0,26
UC06	<LD	<LD	1,43	<LD	<LD	0,36	<LD	0	<LD	1,03
UC07	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,08	0,05	<LD	0,11	<LD
UC08	<LD	<LD	0,03	<LD	<LD	0,07	0,04	<LD	<LD	0,27
UC09	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,06	<LD	<LD	0,03	<LD
UC10	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,05	<LD	<LD	<LD	<LD
UC11	<LD	<LD	0,03	<LD	<LD	0,06	<LD	<LD	<LD	0,28
UC12	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,06	<LD	<LD	<LD	<LD
<b>LD (µg/kg)</b>	<b>1,93</b>	<b>0,08</b>	<b>0,17</b>	<b>3,91</b>	<b>0,03</b>	<b>0,38</b>	<b>0,84</b>	<b>1,05</b>	<b>3,91</b>	<b>0,5</b>
<b>LQ (µg/kg)</b>	<b>5,8</b>	<b>0,23</b>	<b>0,51</b>	<b>11,73</b>	<b>0,09</b>	<b>1,13</b>	<b>2,53</b>	<b>3,16</b>	<b>11,72</b>	<b>1,49</b>
<b>PDE (µg/dia)</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>50</b>	<b>13000</b>	<b>550</b>	<b>250</b>	<b>5</b>	<b>100</b>	<b>150</b>	<b>100</b>
<b>CONC (mg/kg)</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>130</b>	<b>550</b>	<b>25</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>10</b>

Tabela 6.8 Concentrações (mg/kg) determinadas para as amostras de excipientes por ICP OES

<b>Amostra</b>	<b>Au</b>	<b>Ba</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Fe</b>	<b>Ir</b>	<b>Li</b>	<b>Mn</b>	<b>Mo</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Pd</b>	<b>Pt</b>	<b>Ru</b>	<b>Sb</b>	<b>Se</b>	<b>V</b>
EX01	0,89	0,18	0,08	< LD	99,02	< LD	0,97	7,8	< LD	0,74	< LD	< LD	0,53	< LD	< LD	< LD	0,52
EX02	< LD	< LD	0,03	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,11	< LD	< LD					
EX03	< LD	< LD	0,04	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,1	< LD	0,34	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
EX04	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,07	< LD	< LD									
EX05	2,08	< LD	0,09	< LD	82,4	0,04	1,01	8,54	2,71	3,94	< LD	< LD	0,47	< LD	< LD	< LD	1,39
EX06	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,19	< LD	< LD									
EX07	< LD	< LD	0,09	3,6	62,37	5,88	< LD	47,28	< LD	0,26	< LD	< LD	0,45	< LD	0,07	0,05	0,33
EX08	< LD	< LD	0,31	1,19	150,29	< LD	1,14	6,75	< LD	1,74	1,09	< LD	0,78	0,37	< LD	< LD	0,45
EX09	< LD	< LD	1,62	< LD	< LD	< LD	0,9	< LD	< LD	0,11	< LD	< LD	0,01	< LD	< LD	0,16	< LD
EX10	< LD	14,6	0,07	< LD	47,22	0,03	4,22	20,49	< LD	0,14	< LD	< LD	0,32	< LD	< LD	< LD	0,37
<b>LD (µg/kg)</b>	<b>1,93</b>	<b>0,14</b>	<b>0,17</b>	<b>0,48</b>	<b>3,91</b>	<b>0,13</b>	<b>0,03</b>	<b>0,09</b>	<b>0,68</b>	<b>0,38</b>	<b>0,84</b>	<b>3,27</b>	<b>1,05</b>	<b>1,05</b>	<b>3,1</b>	<b>3,91</b>	<b>0,5</b>
<b>LQ (µg/kg)</b>	<b>5,8</b>	<b>0,42</b>	<b>0,51</b>	<b>1,43</b>	<b>11,73</b>	<b>0,39</b>	<b>0,09</b>	<b>0,27</b>	<b>2,03</b>	<b>1,13</b>	<b>2,53</b>	<b>9,8</b>	<b>3,16</b>	<b>3,16</b>	<b>9,31</b>	<b>11,72</b>	<b>1,49</b>
<b>PDE (µg/dia)</b>	<b>100</b>	<b>1400</b>	<b>50</b>	<b>250</b>	<b>13000</b>	<b>100</b>	<b>550</b>	<b>2500</b>	<b>100</b>	<b>250</b>	<b>5</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>1200</b>	<b>150</b>	<b>100</b>
<b>CONC (mg/kg)</b>	<b>10</b>	<b>140</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>130</b>	<b>10</b>	<b>550</b>	<b>250</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>120</b>	<b>15</b>	<b>10</b>

Tabela 6.9 Concentrações (mg/kg) determinadas para as amostras de multivitamínicos por ICP OES

<b>Amostra</b>	<b>Ba</b>	<b>Cd</b>	<b>Co</b>	<b>Cr</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Ir</b>	<b>Li</b>	<b>Mn</b>	<b>Mo</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Pt</b>	<b>Ru</b>	<b>Se</b>	<b>V</b>	<b>Zn</b>
MV01	<LD	0,33	1,17	3,52	543,43	4924,1	44,83	2,32	491,52	<LD	1,72	<LD	25,03	0,6	0,42	1,63	3611,2
MV02	<LD	<LD	0,5	0,55	5,33	109,57	2,39	2,47	3,14	<LD	0,51	<LD	0,6	<LD	326,14	1,36	<LD
MV03	<LD	<LD	0,08	47,62	<LD	143,43	<LD	3,24	7,86	<LD	0,4	<LD	0,65	13,33	0,29	0,65	<LD
MV04	<LD	0,73	3,81	17,97	1361,9	8278	107,02	2,98	1545,7	17,69	4,68	0,65	43,85	4,26	17,76	11,85	7228,4
MV05	<LD	0,23	0,68	12,72	354,03	3456,6	28,18	2,8	733,13	12,34	1,05	<LD	17,64	3,51	12,87	1,34	2149
MV06	<LD	<LD	0,35	<LD	12,62	227,21	1,28	<LD	19,44	<LD	2,14	<LD	1,11	<LD	<LD	0,85	<LD
MV07	<LD	0,1	0,27	<LD	<LD	2732	0,14	1,86	6,22	<LD	0,51	<LD	13,76	<LD	<LD	0,67	<LD
MV08	<LD	<LD	0,09	<LD	<LD	4,74	0,04	1,8	39,68	<LD	0,35	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
MV09	<LD	<LD	0,54	<LD	<LD	193,15	<LD	5,31	21,15	<LD	0,36	<LD	1,04	<LD	0,21	0,99	<LD
MV10	<LD	0,48	0,38	1,58	1511,4	6980,9	122,78	2,47	1747,3	<LD	1,35	1,03	36,55	<LD	<LD	1,13	686,92
<b>LD (µg/kg)</b>	<b>0,14</b>	<b>0,08</b>	<b>0,17</b>	<b>0,48</b>	<b>0,34</b>	<b>3,91</b>	<b>0,13</b>	<b>0,03</b>	<b>0,09</b>	<b>0,68</b>	<b>0,38</b>	<b>0,84</b>	<b>1,05</b>	<b>1,05</b>	<b>3,91</b>	<b>0,5</b>	<b>0,14</b>
<b>LQ (µg/kg)</b>	<b>0,42</b>	<b>0,23</b>	<b>0,51</b>	<b>1,43</b>	<b>1,03</b>	<b>11,73</b>	<b>0,39</b>	<b>0,09</b>	<b>0,27</b>	<b>2,03</b>	<b>1,13</b>	<b>2,53</b>	<b>3,16</b>	<b>3,16</b>	<b>11,72</b>	<b>1,49</b>	<b>0,41</b>
<b>PDE (µg/dia)</b>	<b>1400</b>	<b>5</b>	<b>50</b>	<b>250</b>	<b>1000</b>	<b>13000</b>	<b>100</b>	<b>550</b>	<b>2500</b>	<b>100</b>	<b>250</b>	<b>5</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>150</b>	<b>100</b>	<b>13000</b>
<b>CONC (mg/kg)</b>	<b>140</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>130</b>	<b>10</b>	<b>550</b>	<b>250</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>1300</b>

### **6.3.3 Experimentos de Adição e Recuperação**

Os experimentos de adição e recuperação foram feitos utilizando as amostras de medicamentos de uso contínuo. Foram adicionadas soluções com concentrações conhecidas (0,5J e 1,5J) de cada um dos elementos em cada amostra antes da etapa de digestão. As porcentagens de recuperação de cada analito em ambas as concentrações podem ser observados nas Tabelas 6.10 e 6.11.

No caso de adição de padrão em concentração de 0,5J são observadas recuperações próximas a 100%, salvo algumas exceções. É possível notar que a amostra UC03 apresenta valores de recuperação abaixo da média apresentada para todos os elementos. A princípio esses valores mais baixos poderiam ser explicados por uma maior interferência da matriz dessa amostra ou até mesmo por eventual erro de diluição.

Em geral, observa-se que as recuperações foram mais quantitativas para adições de 1,5J de concentração.

Tabela 6.10 Porcentagem de recuperação após adição de padrão de concentração 0,5J

<b>Amostra</b>	<b>UC01</b>	<b>UC02</b>	<b>UC03</b>	<b>UC04</b>	<b>UC05</b>	<b>UC06</b>	<b>UC07</b>	<b>UC08</b>	<b>UC09</b>	<b>UC10</b>	<b>UC11</b>	<b>UC12</b>
<b>Ag</b>	99,0	101,2	76,8	102,4	101,7	102,0	103,5	102,5	97,9	98,6	107,9	100,9
<b>As</b>	123,5	87,7	92,7	101,8	112,9	104,8	120,6	133,0	142,9	114,8	109,2	114,1
<b>Au</b>	93,2	93,9	65,5	92,6	94,5	91,7	94,1	98,0	93,8	98,2	90,6	94,4
<b>Ba</b>	96,4	87,9	69,6	99,0	98,5	98,8	98,5	97,4	98,3	96,4	87,0	99,3
<b>Cd</b>	74,1	104,4	97,4	75,0	76,1	113,8	79,5	78,8	79,0	76,2	72,2	74,1
<b>Co</b>	103,4	143,6	193,4	102,0	101,3	194,9	104,4	103,4	104,5	103,1	100,3	102,3
<b>Cr</b>	100,9	95,8	72,5	100,0	99,6	105,4	103,3	100,8	102,3	101,4	94,3	99,8
<b>Cu</b>	96,3	92,6	71,5	99,8	96,6	100,1	99,1	98,5	99,3	98,4	92,3	98,8
<b>Fe</b>	107,8	157,8	78,9	106,6	106,3	107,8	110,0	108,8	109,7	106,9	98,6	106,4
<b>Hg</b>	87,9	80,2	68,2	85,5	90,6	88,6	86,9	86,6	85,7	91,8	95,6	85,8
<b>Ir</b>	96,9	87,5	71,7	98,2	95,6	98,5	98,0	97,3	97,3	97,4	92,8	96,4
<b>Li</b>	117,4	145,5	83,0	105,4	103,9	105,7	108,8	106,3	104,6	119,6	139,7	104,1
<b>Mn</b>	104,6	102,7	75,7	103,7	98,6	107,8	106,5	104,4	108,4	104,4	93,1	107,2

Continuação da Tabela 6.10 Porcentagem de recuperação após adição de padrão de concentração 0,5J

<b>Amostra</b>	<b>UC01</b>	<b>UC02</b>	<b>UC03</b>	<b>UC04</b>	<b>UC05</b>	<b>UC06</b>	<b>UC07</b>	<b>UC08</b>	<b>UC09</b>	<b>UC10</b>	<b>UC11</b>	<b>UC12</b>
<b>Mo</b>	78,1	62,9	46,4	84,1	84,3	69,0	86,6	88,5	87,7	88,2	86,2	84,6
<b>Ni</b>	102,0	95,2	74,5	102,1	101,0	103,8	104,0	101,9	104,2	102,0	98,8	101,9
<b>Os</b>	69,3	56,1	48,0	70,7	18,4	25,3	72,6	71,1	72,9	72,3	68,0	74,2
<b>Pb</b>	-73,1	488,2	145,0	52,2	172,4	321,7	243,6	106,6	88,4	-172,4	42,9	-191,1
<b>Pd</b>	107,9	85,4	78,5	111,6	109,4	107,7	112,4	113,5	111,8	111,9	103,9	108,9
<b>Pt</b>	103,8	134,4	75,8	101,6	101,4	104,0	105,9	103,6	105,0	104,3	99,9	102,7
<b>Rh</b>	50,7	50,0	24,6	51,9	47,4	46,4	48,7	47,7	52,4	48,9	34,5	49,7
<b>Ru</b>	97,8	91,7	71,2	97,8	97,1	102,4	101,0	100,6	102,0	101,1	93,0	100,8
<b>Sb</b>	98,5	82,7	71,7	100,1	99,2	96,4	98,8	98,0	98,3	100,5	93,0	100,1
<b>Se</b>	95,9	99,3	72,7	101,3	103,1	100,0	110,3	106,0	105,0	101,7	105,0	101,3
<b>Sn</b>	91,8	87,5	73,2	94,8	98,9	97,8	97,3	98,5	100,7	99,4	88,7	99,0
<b>Tl</b>	81,4	-34,8	-266,8	71,6	91,4	-211,5	69,3	77,8	58,1	91,9	79,7	77,9
<b>V</b>	113,2	124,2	114,3	113,0	111,2	137,5	114,6	116,3	114,8	114,4	106,8	112,1
<b>Zn</b>	101,0	91,6	72,2	99,3	98,5	99,3	101,6	101,4	101,8	101,6	99,0	99,5

Tabela 6.11 Porcentagem de recuperação após adição de padrão de concentração 1,5J

<b>Amostra</b>	<b>UC01</b>	<b>UC02</b>	<b>UC03</b>	<b>UC04</b>	<b>UC05</b>	<b>UC06</b>	<b>UC07</b>	<b>UC08</b>	<b>UC09</b>	<b>UC10</b>	<b>UC11</b>	<b>UC12</b>
<b>Ag</b>	102,0	99,1	81,4	106,1	103,4	121,8	104,0	104,2	99,6	105,1	100,2	103,4
<b>As</b>	106,0	106,1	109,2	102,7	113,4	137,0	108,7	187,7	102,0	105,1	113,9	11,2
<b>Au</b>	101,9	97,1	77,7	105,4	101,4	102,3	101,9	101,5	98,5	105,8	100,1	101,3
<b>Ba</b>	101,8	93,8	81,0	106,6	106,6	104,1	106,3	104,4	100,8	104,6	93,8	104,5
<b>Cd</b>	94,3	101,4	83,1	95,8	93,6	105,0	95,2	94,2	90,0	95,7	92,4	93,7
<b>Co</b>	103,2	118,3	110,7	105,2	102,1	127,5	103,7	103,3	99,4	105,1	99,3	104,0
<b>Cr</b>	103,1	93,9	78,5	104,8	101,3	104,4	104,3	103,4	98,7	104,3	96,6	104,6
<b>Cu</b>	102,3	98,0	81,3	107,7	107,6	107,6	107,4	106,3	101,6	106,2	98,1	104,6
<b>Fe</b>	103,7	113,2	77,0	104,3	101,5	102,3	103,2	102,8	98,2	103,1	95,2	101,7
<b>Hg</b>	97,8	86,6	74,8	99,1	96,0	96,7	94,3	93,6	90,9	97,3	94,1	95,5
<b>Ir</b>	100,1	89,4	78,1	103,9	103,2	102,0	103,0	101,8	96,6	102,0	95,8	100,6
<b>Li</b>	117,9	136,8	88,1	110,9	108,4	112,0	108,4	107,6	105,1	122,4	135,6	106,8
<b>Mn</b>	99,8	92,0	78,0	103,4	99,9	100,9	102,3	101,3	95,8	100,3	92,4	100,4

Continuação da Tabela 6.11 Porcentagem de recuperação após adição de padrão de concentração 1,5J

<b>Amostra</b>	<b>UC01</b>	<b>UC02</b>	<b>UC03</b>	<b>UC04</b>	<b>UC05</b>	<b>UC06</b>	<b>UC07</b>	<b>UC08</b>	<b>UC09</b>	<b>UC10</b>	<b>UC11</b>	<b>UC12</b>
<b>Mo</b>	100,2	84,6	71,2	104,3	99,6	97,7	101,8	102,7	93,6	103,0	98,8	101,4
<b>Ni</b>	102,0	92,5	79,2	104,2	101,2	104,1	103,3	103,0	99,3	103,9	98,2	103,8
<b>Os</b>	73,5	64,0	55,7	76,7	24,2	25,5	75,0	73,7	71,2	75,6	70,5	73,7
<b>Pb</b>	409,0	506,4	479,1	354,0	522,2	774,5	371,9	294,2	321,3	471,7	297,9	250,1
<b>Pd</b>	104,8	93,4	81,7	111,2	106,4	108,6	108,4	108,0	102,8	109,1	101,5	105,4
<b>Pt</b>	102,9	107,7	76,7	104,5	101,6	102,0	102,6	102,2	97,8	103,9	98,2	101,5
<b>Rh</b>	72,9	73,2	49,3	79,0	72,7	75,8	77,1	75,8	69,2	77,1	68,4	74,9
<b>Ru</b>	102,2	92,3	79,1	105,9	102,4	104,6	105,4	104,6	100,0	105,4	97,2	105,8
<b>Sb</b>	104,6	91,4	80,6	107,2	108,5	105,3	103,8	104,3	99,1	106,1	98,6	104,1
<b>Se</b>	102,2	97,9	81,0	106,0	103,8	105,7	107,4	105,7	100,3	105,8	103,2	103,9
<b>Sn</b>	98,3	85,7	76,9	99,3	98,0	96,6	95,2	95,8	93,2	96,9	88,3	95,5
<b>Tl</b>	99,7	17,3	-21,0	97,0	96,7	25,0	90,7	90,2	91,6	97,9	89,6	90,3
<b>V</b>	108,3	108,8	91,6	111,7	107,2	113,8	109,5	109,4	103,4	110,4	101,9	108,4
<b>Zn</b>	95,8	85,0	74,9	97,0	94,5	95,1	96,7	95,7	91,3	96,6	94,0	94,9

Com exceção dos resultados apresentados para Pb, Rh e Os, a maioria dos demais elementos apresentou recuperações de 100% com variação de 10%. Todas elas estão dentro do intervalo aceitável da USP <233> entre 70 e 150%. Essa variação é melhor observada nas Figuras 6.1 e 6.2.

As barras azuis representam cada medicamento, as linhas vermelhas são os limites mínimo (70%) e máximo (150%) estabelecidos pela USP <233>, enquanto a linha laranja representa o valor ideal de 100% de recuperação.

Os altos valores encontrados para o Pb podem ser explicados pela presença de interferentes que não foram detectados no desenvolvimento do método. Tal problema pode ser solucionado utilizando-se outra linha de emissão ou utilizando método de inter-elementar de correção de interferências chamado IEC, do inglês inter-element correction, disponível no programa de controle do equipamento.

Apesar da concentração de 0,5 J para o Rh, 50 µg/L, ser consideravelmente maior que o limite de detecção do método, 10 µg/L, os valores de recuperação ficaram abaixo do esperado. Novos estudos deverão ser realizados a fim de solucionar tal questão.

Já os problemas com o Os já haviam sido constatado na literatura<sup>25</sup>, tanto causados por volatilização quanto por efeitos de memória.

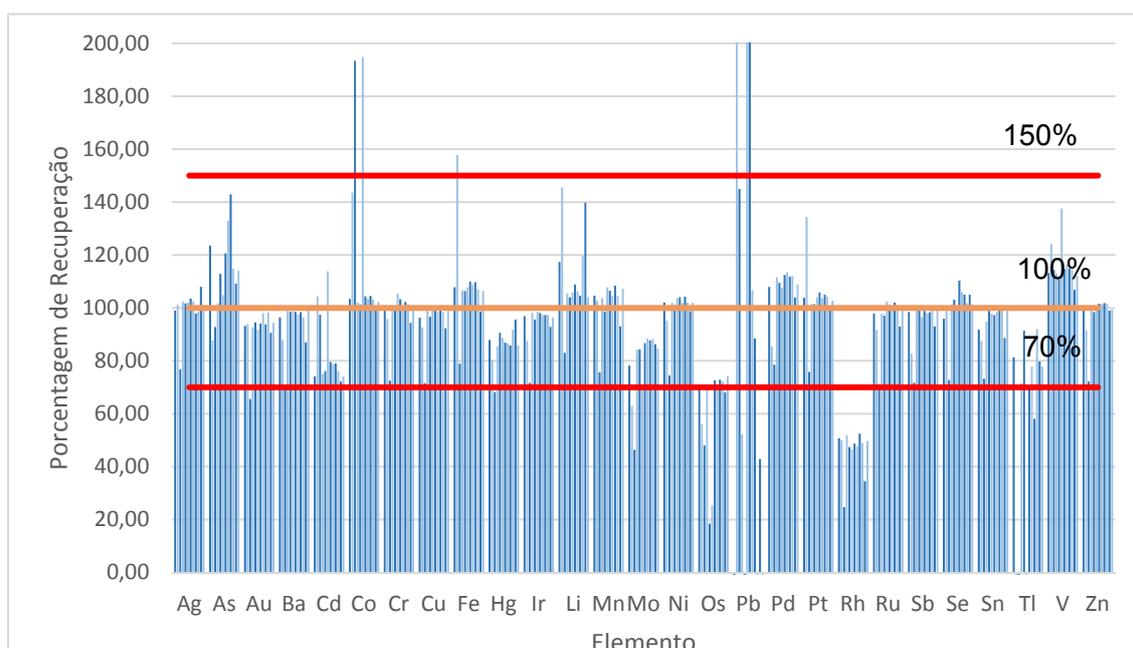


Figura 6.4 Gráfico representativo das recuperações obtidas com adição de 0,5J de analito

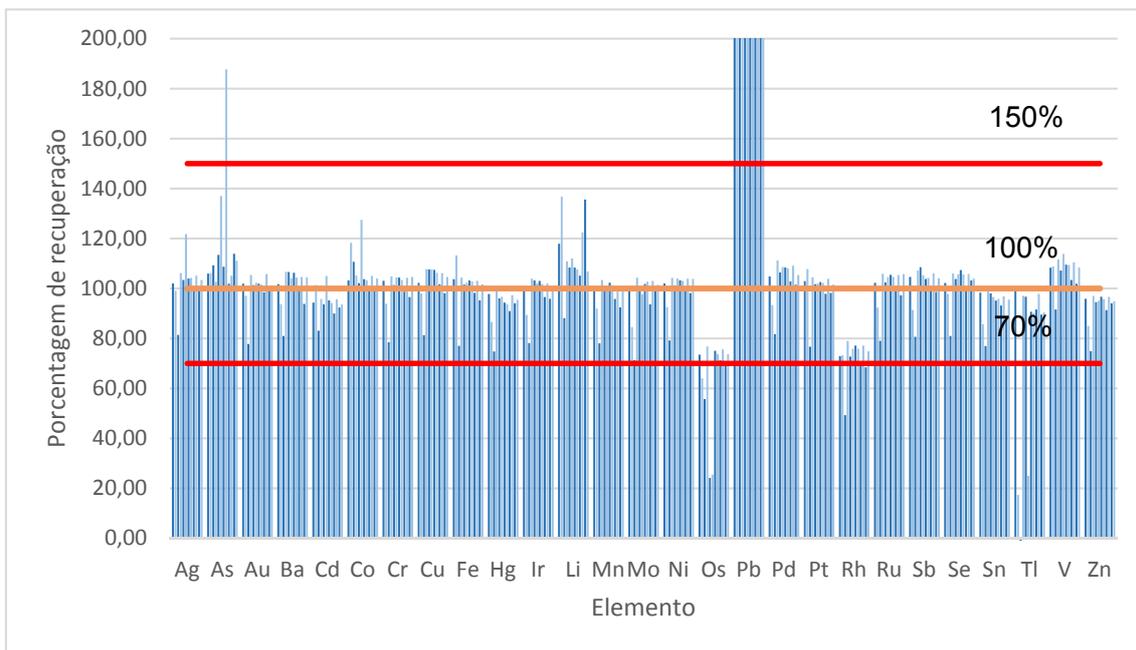


Figura 6.5 Gráfico representativo das recuperações obtidas com adição de 1,5J de analito

# **CAPÍTULO 7**

## **ANÁLISE ELEMENTAR POR ICP-MS**

## 7. Análise elementar por ICP-MS

### 7.1 Ajuste das condições operacionais do ICP-MS

O ajuste das condições operacionais do ICP-MS ocorre de maneira automática usando uma função no programa de controle denominada Tune. O objetivo do Tune é possibilitar que o equipamento opere na maior sensibilidade, com a menor formação de potenciais interferentes (óxidos e íons de dupla carga) possível. Usando a função Autotune Source Tune High Matrix, o programa ajusta os parâmetros a fim de aumentar a sensibilidade para as massas  ${}^7\text{Li}^+$ ,  ${}^{59}\text{Co}^+$ ,  ${}^{115}\text{In}^+$  e  ${}^{238}\text{U}^+$  e, além disso, simultaneamente mantém a formação de  ${}^{140}\text{Ce}{}^{16}\text{O}^+$  menor que 2%, a fim de garantir a robustez do plasma. São ajustadas as seguintes condições operacionais: vazão do gás de nebulização, posição da tocha (x,y) (como pode ser observado na Figura 7.1), voltagem das lentes de extração 2 e de focalização da CCT. Outros parâmetros instrumentais, como vazão do gás auxiliar, vazão do gás de resfriamento, potência aplicada de RF, entre outros, são mantidos fixos e não são otimizados, de acordo com indicações do fabricante do equipamento.

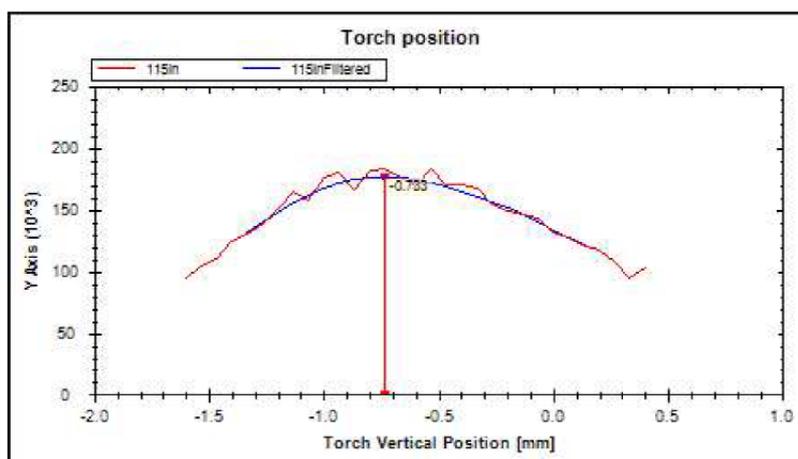


Figura 7.1 Exemplo de otimização automática (tune) dos parâmetros de análise: posição da tocha (software Qtegra – Thermo Scientific)

## 7.2 Soluções analíticas de calibração

Procedimento semelhante ao descrito no item 6.2 foi realizado por ICP-MS. Foram comparados os valores de exposição diária permitida, PDE, para cada um dos elementos de acordo com as normas estudadas e considerado o menor valor. Assim, foram considerados valores de PDE ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) conforme a última coluna da Tabela 6.3 citada anteriormente, máxima dose diária de medicamento de 10 mg/dia e fator de diluição de 1000. Uma vez que se trata de uma técnica mais sensível, o valor J foi recalculado, utilizando-se um fator de diluição maior que o utilizado por ICP OES.

Calculados os valores de J, foram construídas uma curva analítica para cada elemento alvo nas seguintes concentrações de solução padrão: 0; 0,1J; 0,25J; 0,5J; 0,75J; 1,0J; 1,5J e 2,0J. Os valores, em concentração, podem ser observados na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 Concentração ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) das soluções analíticas para construção das curvas analíticas de calibração para ICP-MS

Elemento	0 J	0,1 J	0,25 J	0,5 J	0,75 J	1,0 J	1,5 J	2,0 J
Ag	0	1,5	3,75	7,5	11,25	15	22,5	30
As	0	0,15	0,375	0,75	1,125	1,5	2,25	3
Au	0	1	2,5	5	7,5	10	15	20
Ba	0	14	35	70	105	140	210	280
Cd	0	0,05	0,125	0,25	0,375	0,5	0,75	1
Co	0	0,5	1,25	2,5	3,75	5	7,5	10
Cr	0	2,5	6,25	12,5	18,75	25	37,5	500,3
Cu	0	10	25	50	75	100	150	200
Fe	0	130	325	650	975	1300	1950	2600
Hg	0	0,15	0,375	0,75	1,125	1,5	2,25	3
Ir	0	1	2,5	5	7,5	10	15	20
Li	0	5,5	13,75	27,5	41,25	55	82,5	110
Mn	0	25	62,5	125	187,5	250	375	500
Mo	0	1	2,5	5	7,5	10	15	20

Continuação da Tabela 7.1 Concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) das soluções analíticas para construção das curvas analíticas de calibração para ICP-MS

Elemento	0 J	0,1 J	0,25 J	0,5 J	0,75 J	1,0 J	1,5 J	2,0 J
Ni	0	2,5	6,25	12,5	18,75	25	37,5	50
Os	0	1	2,5	5	7,5	10	15	20
Pb	0	0,05	0,125	0,25	0,375	0,5	0,75	1
Pd	0	1	2,5	5	7,5	10	15	20
Pt	0	1	2,5	5	7,5	10	15	20
Rh	0	1	2,5	5	7,5	10	15	20
Ru	0	1	2,5	5	7,5	10	15	20
Sb	0	12	30	60	90	120	180	240
Se	0	1,5	3,75	7,5	11,25	15	22,5	30
Sn	0	60	150	300	450	600	900	1200
Tl	0	0,08	0,2	0,4	0,6	0,8	1,2	1,6
V	0	1	2,5	5	7,5	10	15	20
Zn	0	130	325	650	975	1300	1950	2600

### 7.3 Resultados preliminares e discussão

A partir das curvas analíticas de calibração citadas no item 7.2 foram calculados os limites de detecção e quantificação para cada um dos analitos. Semelhante ao procedimento em ICP OES, foram considerados para o cálculo dos limites de detecção os valores de razão entre sinais analíticos e sinais de fundo, SBR, e a concentração equivalente ao sinal de fundo, BEC.

A Tabela 7.2 mostra os valores de  $R^2$  das curvas analíticas de calibração, limites de detecção e de quantificação calculados para os elementos alvos e seus isótopos mais abundantes, tanto no modo STD (modo padrão) quanto no modo KED (com discriminação por energia cinética).

Tabela 7.2 Limites de detecção, quantificação e R<sup>2</sup> obtidos a partir das curvas analíticas de calibração

m/z	Elemento	Abundância (%)	R <sup>2</sup>	Modo STD LD (µg/L)	LQ (µg/L)	R <sup>2</sup>	Modo KED LD (µg/L)	LQ (µg/L)
6	Li	7,5	0,9998	0,02	0,06	0,9702	3,05	9,14
7	Li	92,5	0,9993	0,02	0,06	0,9991	0,42	1,27
50	Cr	4,35	0,9936	0,17	0,52	0,9994	0,19	0,57
50	V	0,25	0,9986	0,08	0,24	0,9991	0,13	0,39
51	V	99,75	0,8751	0,0001	0,0004	0,9993	0,21	0,62
52	Cr	83,79	0,9988	0,00005	0,00015	0,9996	0,0001	0,0003
53	Cr	9,5	0,819	0,0004	0,0013	0,9997	0,18	0,54
54	Fe	5,8	0,9997	0,000586	0,001757	0,9998	3,66	10,98
55	Mn	100	0,9873	0,000005	0,000015	0,994	0,31	0,93
56	Fe	91,72	0,9999	0,006	0,017	0,9998	0,0003	0,0008
58	Ni	68,27	0,9998	0,000015	0,000045	0,9996	0,00003	0,0001
59	Co	100	0,9997	0,01	0,03	0,9997	0,01	0,04
60	Ni	26,1	0,9995	0,006	0,018	0,9995	0,15	0,45
63	Cu	69,17	0,9938	0,00002	0,00005	0,9983	0,0003	0,0009
64	Zn	48,6	0,9993	0,0001	0,0004	0,9996	0,0011	0,0034
65	Cu	30,83	0,9958	0,00002	0,00006	0,9983	0,0003	0,001
66	Zn	27,9	0,9991	0,0001	0,0003	0,9998	0,0012	0,0037
68	Zn	18,8	0,9992	0,0001	0,0004	0,9995	0,0013	0,004
75	As	100	0,3241	0,000004	0,000012	0,6734	0,03	0,1
78	Se	23,6	0,9879	0,0003	0,001	0,9882	0,34	1,03
80	Se	49,7	0,0685	0,0002	0,0007	0,9726	0,0007	0,002
82	Se	9,2	0,99	0,05	0,15	0,9952	0,26	0,77
95	Mo	15,92	0,9957	0,000023	0,000068	0,998	0,02	0,06
96	Mo	16,68	0,997	0,000017	0,000051	0,9985	0,02	0,07
98	Mo	24,13	0,9965	0,000029	0,000087	0,998	0,02	0,05
101	Ru	17	0,9997	0,006	0,018	0,9997	0,007	0,021
102	Ru	31,6	0,9997	0,0008	0,0025	0,9995	0,004	0,012
103	Rh	100	0,9998	0,002	0,005	0,9998	0,004	0,012

Continuação da Tabela 7.2 Limites de detecção, quantificação e R<sup>2</sup> obtidos a partir das curvas analíticas de calibração

m/z	Elemento	Abundância (%)	R <sup>2</sup>	Modo STD LD (µg/L)	LQ (µg/L)	R <sup>2</sup>	Modo KED LD (µg/L)	LQ (µg/L)
105	Pd	22,33	0,9983	0,009	0,028	0,9987	0,01	0,029
106	Pd	27,33	0,9983	0,03	0,08	0,9987	0,017	0,051
107	Ag	51,84	0,9986	0	0,01	0,9994	0,064	0,192
108	Pd	26,46	0,9986	0,02	0,05	0,9988	0,005	0,016
109	Ag	48,16	0,9983	0,003	0,009	0,9991	0,067	0,2
111	Cd	12,8	0,994	0,004	0,013	0,9923	0,017	0,052
112	Cd	24,13	0,997	0,000001	0,000002	0,9995	0,0004	0,0011
114	Cd	28,73	0,9986	0,000001	0,000002	0,9994	0,0009	0,0028
116	Sn	14,53	0,9988	0,0009	0,0026	0,9995	0,0001	0,0003
118	Sn	24,22	0,9974	0,0006	0,0019	0,9996	0,0001	0,0002
120	Sn	32,59	0,9991	0,0006	0,0019	0,9997	0,0001	0,0002
121	Sb	57,3	0,9998	0,000023	0,000068	1	0,03	0,08
123	Sb	42,7	0,9989	0,000023	0,000069	0,9998	0,02	0,05
135	Ba	6,59	0,9996	0,009	0,027	0,9998	0,11	0,32
136	Ba	7,85	0,9999	0,07	0,22	1	0,08	0,23
137	Ba	11,23	0,9998	0,006	0,019	0,9999	0,06	0,17
138	Ba	71,7	0,9999	0,000002	0,000006	1	0,00003	0,00008
190	Os	26,4	0,9996	0,002	0,007	0,9994	0,002	0,006
191	Ir	37,3	0,9996	0,009	0,026	0,9991	0,006	0,018
192	Os	41	0,999	0,001	0,004	0,9999	0,001	0,004
193	Ir	62,7	0,9992	0,000004	0,000012	0,9994	0,004	0,012
194	Pt	32,9	0,9996	0,003	0,01	0,9999	0,01	0,04
195	Pt	33,8	0,9998	0,003	0,01	0,9997	0,009	0,027
196	Pt	25,3	0,9997	0,002	0,005	0,9996	0,01	0,04
197	Au	100	0,9597	0,01	0,04	0,9822	0,004	0,013
199	Hg	16,84	0,994	0,02	0,05	0,996	0,03	0,08
200	Hg	23,13	0,9939	0,01	0,04	0,9949	0,03	0,1
202	Hg	29,8	0,9939	0,05	0,15	0,9961	0,02	0,07
203	Tl	29,52	0,9981	0,003	0,01	0,9991	0,008	0,024

Continuação da Tabela 7.2 Limites de detecção, quantificação e  $R^2$  obtidos a partir das curvas analíticas de calibração

m/z	Elemento	Abundância (%)	$R^2$	Modo STD LD ( $\mu\text{g/L}$ )	LQ ( $\mu\text{g/L}$ )	$R^2$	Modo KED LD ( $\mu\text{g/L}$ )	LQ ( $\mu\text{g/L}$ )
205	Tl	70,48	0,9986	0,004	0,011	0,999	0,000005	0,000015
206	Pb	24,1	0,9464	0,000003	0,000008	0,9629	0,00002	0,00006
207	Pb	22,1	0,9353	0,000004	0,000013	0,9556	0,000008	0,000023
208	Pb	52,4	0,9359	0,000003	0,000008	0,9622	0,000009	0,000026

Optou-se por iniciar os estudos de ICP-MS aplicando experimentos de adição e recuperação para os elementos nas amostras de uso contínuo. Para isso foram utilizados os isótopos de maior abundância para cada elemento, com exceção do  $^{80}\text{Se}^+$ , uma vez que sofre uma interferência severa do dímero de argônio ( $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ ). Nesse caso, foi utilizado o segundo isótopo em abundância ( $^{78}\text{Se}^+$ ).

Os resultados de recuperação obtidos com a adição de 0,5J e 1,5J de cada um dos elementos alvo nas amostras estão mostrados nas Tabelas 7.3 e 7.4, respectivamente. Ressalta-se que a USP 232 estabelece que as recuperações devem se situar entre 70 e 150%.

Não foram apresentados os resultados obtidos para As, Pb e V, uma vez que geraram valores que não podem ser considerados como quantitativos.

Os resultados acima da norma apresentados pelo vanádio –  $^{51}\text{V}$  podem ser explicados pela presença de diversos interferentes, entre esses a combinação de cloro e oxigênio –  $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ .

Para o As, a dificuldade de obtenção de sinal confiável já é percebida na curva analítica de calibração, que não pode ser considerada para a quantificação do elemento. Para esse analito, que possui somente um isótopo natural, é altamente recomendável o uso de gás colisional e discriminação por energia cinética.

Os resultados apresentados pelo chumbo mostraram-se acima do normal, o que torna necessário uma melhor avaliação das condições

experimentais. Uma possibilidade para a melhora dos resultados é a utilização de bismuto como padrão interno para análise de chumbo<sup>21</sup>.

Ainda é possível observar na Tabela 7.2 a queda de sensibilidade ao utilizarmos o modo KED em relação ao modo padrão. Tendo isso em vista é preciso avaliar o compromisso entre sensibilidade e precisão dos resultados visando escolher o modo de leitura ideal para a determinação analítica.

Tabela 7.3 Porcentagem de recuperação (%) após adição de padrão de concentração 0,5J

	<b>UC01</b>	<b>UC02</b>	<b>UC03</b>	<b>UC04</b>	<b>UC05</b>	<b>UC06</b>	<b>UC07</b>	<b>UC08</b>	<b>UC09</b>	<b>UC10</b>	<b>UC11</b>	<b>UC12</b>
Ag	125	125,9	93,8	128,5	126,3	133,7	127,9	123,1	138,9	125,9	137,5	127,3
Au	139,7	140	108,7	136,5	139,9	141,7	147,4	147,7	143,8	142,6	133,9	148,9
Ba	128,8	134,8	94,8	126,5	129,9	127,8	128,1	127,8	131,8	122,2	123,7	132,1
Cd	120,7	127,1	53,2	115,3	127,7	125,9	129,8	124,7	128	121,5	119,3	128,6
Co	110,9	122,1	84	107,4	108,9	107,8	112,2	109,1	113	102,8	105,9	113,4
Cr	118,5	132,8	89,3	114,5	118,9	119,9	119,6	117,2	122,3	116	115,3	124,8
Cu	108,9	107,9	78,9	105,2	104	107,2	106,1	104,5	107,6	98	96,3	112,8
Fe	113,4	182,4	85,3	109,1	107,9	108,6	113,8	109,6	115	104,2	105,9	115,6
Hg	113,5	113,5	45,6	133,5	122,2	137,3	126,8	122,8	137,1	135,7	170,1	125
Ir	125,9	132,1	93,9	123,6	127	131,2	133,6	127,5	134,3	124,9	125,8	132,1
Li	119,6	118,8	87,9	110,1	111,6	112,7	113,6	114,2	116,2	109	111,3	118,4
Mn	107,1	120,1	79,7	101,5	99,6	106,7	106	104,2	109,9	99,5	96,2	112
Mo	128,5	113,5	59	128,2	126,4	100,6	132,7	124,6	134,6	126	138,1	132,9
Ni	71,6	86,5	51,7	68,6	68,4	69,4	69,9	69,7	72,4	65,7	66,2	74,3
Os	76,5	77,1	57,7	77	24,6	31,3	81,2	78,3	79,5	75	78,2	79,4
Pd	140,2	135,4	101,6	137,5	140,4	142,6	142,8	141,4	143,2	131,3	126,7	142,5
Pt	130	131,4	95,1	131	131,7	132,2	132,2	133,3	134,1	128,8	125,1	138,1

Continuação da Tabela 7.3 Porcentagem de recuperação (%) após adição de padrão de concentração 0,5J

	<b>UC01</b>	<b>UC02</b>	<b>UC03</b>	<b>UC04</b>	<b>UC05</b>	<b>UC06</b>	<b>UC07</b>	<b>UC08</b>	<b>UC09</b>	<b>UC10</b>	<b>UC11</b>	<b>UC12</b>
Rh	121,5	120,6	89,6	119,2	120,1	121,2	123,1	120,2	121,5	115	111,2	122,9
Ru	124,2	127	91,2	120,1	123,8	123	125,8	122,9	125,7	116,4	114,8	125,5
Sb	128,9	113,6	86,7	129,1	131,2	126,2	132,7	127	131,1	124,9	121,3	135
Se	142,2	149	99,1	141,9	135,5	132,6	147,4	139,7	146	134,4	130,4	150,7
Sn	121	123,9	50,8	116,4	124,1	122,1	126,7	121,7	129,4	117,2	119,8	130,9
Tl	109,1	114,2	86,2	108,5	112,6	115,1	120,6	118,7	118,8	114,4	106,3	121,2
Zn	111	107,8	88,8	110,9	111,8	109,5	116,9	114	118,5	107,9	100,5	117,4

Tabela 7.4 Porcentagem de recuperação (%) após adição de padrão de concentração 1,5J

	<b>UC01</b>	<b>UC02</b>	<b>UC03</b>	<b>UC04</b>	<b>UC05</b>	<b>UC06</b>	<b>UC07</b>	<b>UC08</b>	<b>UC09</b>	<b>UC10</b>	<b>UC11</b>	<b>UC12</b>
Ag	125,7	121,4	96,1	133,8	128,7	150,7	131,2	129	120,8	127,8	115,5	126,7
Au	147,5	133	116,1	156,5	143	142,3	147,5	143,7	137,5	150,3	132,8	145,4
Ba	140	136,5	103	146,1	140,7	142,6	146,2	140,5	133,4	140,1	126,9	137
Cd	128,3	122,9	89,6	128	126,1	130,4	127,7	128,1	113,3	126,8	109,3	121,1
Co	117,8	121,4	88	124,4	114,2	120,8	122,6	115,2	113,7	120,4	107,9	116,2
Cr	125,7	126,6	93,9	132,7	123,2	128,2	131,4	126,4	122	126,4	115,3	123,3
Cu	120	116,7	90,7	131,3	123,6	125,2	128,3	120,3	118,2	120,7	107,7	119,2
Fe	115,8	142,1	84,3	120,7	114	118,7	120,2	113,6	108,7	116,9	104,6	111,2
Hg	130,6	131,9	104,8	123,2	145,9	104,8	136,1	131	140,6	136,3	127,8	134,3
Ir	130,8	130,9	95,3	141,8	132,3	135,4	132,5	133	123,6	129,6	124,4	128,8
Li	123,9	118,9	90	125,9	115,4	121,3	119,4	117,4	115,3	118,9	109,8	116,8
Mn	107,7	110,2	82,1	114,4	105,9	107,2	113,8	107,2	104	109,1	98	104,8
Mo	133,9	118,9	90	132,5	131,2	128,6	134	134,5	112,6	130,7	109,5	128,1
Ni	74,3	78,2	55,4	79,3	73,8	76	77,2	74,5	72,9	75,6	67,6	74,1
Os	81,1	75,9	58,6	85,4	22,3	27	79,9	77,2	77,5	81,3	75,2	79
Pd	64,2	113,2	101,7	135,4	116,7	55,2	141,5	140,3	130	134,7	121,4	134,8
Pt	138,9	126,5	102,3	143,5	132,4	137,8	134,6	134,5	128,2	136,7	122,6	135,7

Continuação da Tabela 7.4 Porcentagem de recuperação (%) após adição de padrão de concentração 1,5J

	<b>UC01</b>	<b>UC02</b>	<b>UC03</b>	<b>UC04</b>	<b>UC05</b>	<b>UC06</b>	<b>UC07</b>	<b>UC08</b>	<b>UC09</b>	<b>UC10</b>	<b>UC11</b>	<b>UC12</b>
Rh	124,4	121	95,2	130,4	124,6	127,2	129,5	125,4	121,6	125,8	112,6	123,8
Ru	125,8	128	96,5	131,1	125	131,6	133,4	131,2	121,3	127,6	117,9	126,5
Sb	139,9	121,4	101,5	145,8	143,2	137,2	144	137,6	131,2	141,9	126,3	136,4
Se	143,5	136,4	112,7	146,8	144,5	141,9	148,9	142,6	139,7	146,5	126,6	143,2
Sn	122	118,9	89,9	122,4	118,3	126,9	121,7	122,5	110,1	123	106,9	117,7
Tl	127,1	116,7	82,1	135,3	122,4	129,3	120,9	121,5	117,6	122,6	112,1	120,2
Zn	121,6	107,8	91,3	125,4	119,4	121,9	125,3	119,2	118,1	121,1	105	117,2

As Figuras 7.2 e 7.3 mostram os valores de recuperação e seu comparativo com os valores estabelecidos pela USP. Observa-se que a maioria dos resultados está entre 100 e 150% dos valores esperados.

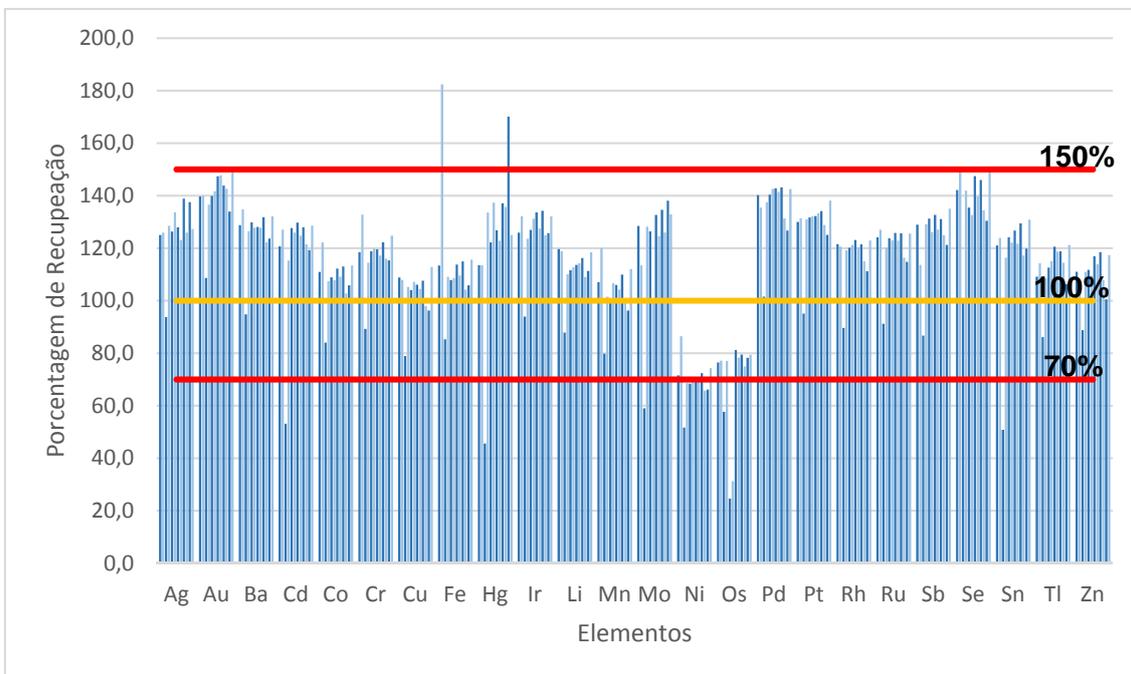


Figura 7.2. Recuperações para adição de 0,5J de cada analito

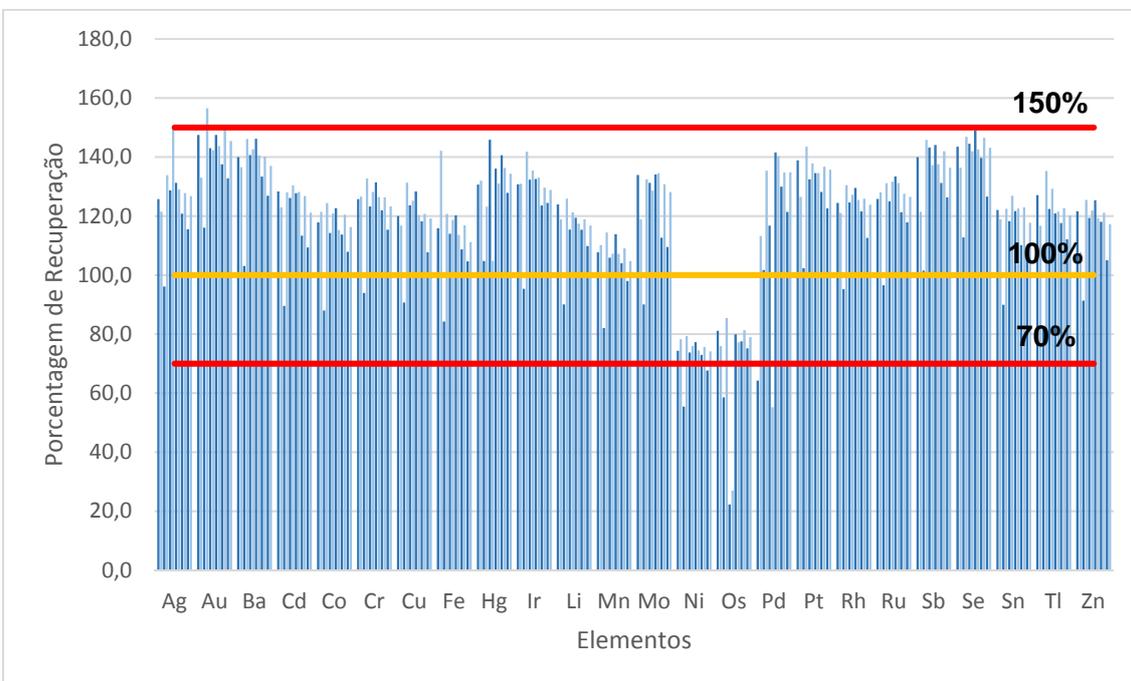


Figura 7.3 Recuperações para adição de 1,5J de cada analito

Apesar de serem resultados aceitáveis de acordo com a norma USP, os mesmos ainda são considerados como preliminares e outros experimentos serão futuramente conduzidos buscando-se uma maior exatidão para os analitos em foco.

# **CAPÍTULO 8**

## **CONCLUSÃO**

## 8. Conclusão

Para uma análise elementar satisfatória é essencial que o preparo da amostra seja adequado de acordo com a composição da mesma e considerando-se a técnica instrumental que será empregada para execução das medidas. Escolheu-se trabalhar com digestão ácida assistida por radiação micro-ondas devido sua alta eficiência e aplicabilidade.

Para a digestão ácida foi utilizada a rampa de temperatura indicada pelo fabricante do sistema de micro-ondas e otimizou-se a mistura ácida com o objetivo de atingir a eficiência desejada da digestão. Tanto as misturas envolvendo ácidos nítrico e clorídrico quanto ácido nítrico e peróxido de hidrogênio mostraram-se capazes de digerir os produtos farmacêuticos selecionados, porém a mistura conhecida como água régia invertida (3 HNO<sub>3</sub>:1 HCl V/V) propiciou amostras com menores teores de carbono orgânico residual. Considerando-se que quanto menor a quantidade de carbono orgânico residual na amostra maior foi a conversão de matéria orgânica em CO<sub>2</sub>, selecionou-se tal mistura como solução digestora para todas as amostras selecionadas no presente trabalho.

Foram utilizados 5 mL de solução de água régia invertida concentrada, uma vez que produtos farmacêuticos e excipientes selecionados possuem constituições químicas distintas e o objetivo do presente trabalho é encontrar uma solução abrangente que pudesse atender ao máximo possível de amostras utilizando uma condição única. Devido suas propriedades oxidantes esse tipo de mistura garante um maior êxito das digestões em termos destas diferenças qualitativas e quantitativas. Vale lembrar que, em outras situações é possível utilizar condições mais brandas, como soluções ácidas diluídas. Há a possibilidade, entretanto, de outras amostras necessitarem de condições mais drásticas, como o caso de compostos tricíclicos, que exigem sistemas de digestão de alta pressão ou métodos de combustão em frasco fechado<sup>24</sup>. A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas mostrou-se altamente eficiente na digestão de produtos farmacêuticos das mais variadas composições.

As condições otimizadas para a determinação elementar estabelecidas para o ICP OES refletem condições operacionais padrão,

conduzindo a uma análise sensível o suficiente sem acarretar em desgaste extra ao instrumento.

O ICP OES mostrou-se capaz de atingir os limites de detecção e quantificação que atendessem aos limites estabelecidos pelas normas. Testes de adição e recuperação geraram resultados adequados, próximos a 100% para a maioria dos elementos, ou seja, dentro do intervalo de variação entre 70 e 150% estabelecido pela USP <233>. Testes adicionais serão necessários para viabilizar a determinação de todos os elementos compreendidos pelos órgãos aqui citados – USP, EMA e ICH.

A análise por ICP-MS, conhecidamente mais sensível que a técnica de ICP OES também se mostrou capaz de atender aos exigentes limites das normas. Porém, os resultados de adição e recuperação obtidos mostraram uma variação maior, o que não conferiu confiabilidade ao método desenvolvido. Assim sendo, será necessário otimizar as condições operacionais para garantir resultados confiáveis. Essa otimização pode ser feita através da adição de padrão interno, melhoria nos parâmetros operacionais do equipamento e ferramentas de eliminação de interferência.

Tanto no presente estudo como naqueles encontrados na literatura<sup>24,25,26,27</sup> é possível constatar que ambas as técnicas atendem aos requisitos estabelecidos pelos órgãos regulatórios e ambas possuem vantagens e desvantagens. A facilidade de operação, condições ambientais e operacionais mais simples e menor custo fazem com que a técnica de ICP OES seja a que apresenta melhor custo benefício na determinação elementar de produtos farmacêuticos de acordo com as novas normas que regerão a análise elementar de produtos farmacêuticos.

# **CAPÍTULO 9**

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. Referências Bibliográficas

- [1] VAN HOECKE, K.; Catry, C.; Vanhaecke, F. Determination of elemental impurities in leachate solutions from syringes using sector field ICP-mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **77**: 139-144, 2013.
- [2] The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, 35ª edição, USP, Rockville, Maryland, 2012 (Heavy Metals pág 145).
- [3] LEWEN, N.; MATHEW, S.; SCHENKENBERG, M.; RAGLIONE, T. A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**: 739-752, 2004.
- [4] European Medicines Agency, Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents EMEA/CHMP/SWP/4446/2000, 2008.
- [5] The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, Chapter 232: Elemental Impurities—Limits, Revision Bulletin, Official February 1, 2013
- [6] The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, Chapter 233: Elemental Impurities—Procedures, Revision Bulletin, Official February 1, 2013
- [7] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Elemental Impurities, Q3D Step 4, December 2014.
- [8] 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*, **43**: 1-13, 2007.
- [9] 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*, **55**: 653–661, 2011.
- [10] THOMAS, R. Determining Elemental Impurities in Pharmaceutical Materials: How to Choose the Right Technique, *Spectroscopy*, **30(3)**: 30-42, Março 2015.
- [11] ORISAKAWA, O.E.; NDUKA, J.K. Lead and Cadmium levels of commonly administered pediatric syrups in Nigera: a public health concern, *Science of Total Environment*, **47**: 5993-5996, 2009.
- [12] SUGISAWA, K.; KANEKO, T.; SAGO, T.; SATO, T.; Rapid quantitative analysis of magnesium stearate in pharmaceutical powders and solid dosage forms by atomic absorption: method development and application in product

manufacturing, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **49**: 858-861, 2009.

[13] ISSA, M.M.; NEJEM, R.M.; AL-KHOLY, M.; EL-ABADLA, N.S.; HELLES, R.S.; SALEH, A.A. An indirect atomic absorption spectrometric determination of ciprofloxacin amoxicillin and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations, *Journal of the Serbian Chemistry Society*, **75**: 569–576, 2008.

[14] ZACHARIADIS, G.; RAIDOU, E.S.; THEMELIS, D.G.; STRATIS, J.A. Determination of mineral content of active dry yeast used in pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **28**: 463–473, 2002.

[15] WANG, T.; WALDEN, S.; EGAN, R. Development and validation of a general nondigestive method for the determination of palladium in bulk pharmaceuticals and their synthetic intermediates by graphite furnace atomic absorption spectroscopy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **15**: 593–599, 1997.

[16] JIA, X.; WANG, T.; WU, J. Determination of palladium by graphite furnace atomic absorption spectroscopy without matrix matching, *Talanta*, **54**: 741–751, 2001.

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

[18] ZUCCARELLO, D.J.; MURPHY, M.P.; MEYER, R.F.; WINSLOW, P.A. A comprehensive approach for the determination of extractable and leachable elements in pharmaceutical products by inductively coupled plasma, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, **63**: 339–352, 2009.

[19] OWEN, J.D.; KIRTON, S.B.; EVANS, S.J.; STAIR, J.L. Elemental fingerprinting of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) herb and preparations using ICP OES and chemometrics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **125**: 15-21, 2016.

[20] WANG, T.; WU, J.; HARTMAN, R.; JIA, X.; EGAN, R.S. A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23**: 867–890, 2000.

[21] KAUFFMAN, J.F.; WESERGER, B.J.; ROBERTSON, J.D.; GUTHRIE, J.; JACOBS, A.; CUMMINS, S.K. Lead in pharmaceutical products and dietary supplements, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **48**: 128–134, 2007.

[22] LEWEN, N. Preparation of pharmaceutical samples for elemental impurities analysis: some potential approaches, *Spectroscopy*, **31**(4), 36-43, 2016.

[23] TU, Q.; WANG, T.; ANTONUCCI, V. High-efficiency sample preparation with dimethylformamide for multi-element determination in pharmaceutical materials by ICP-AES, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **52**: 311–315, 2010.

[24] MULLER, A.L.H.; OLIVEIRA, J.S.S.; MELLO, P.A.; MULLER, E. I.; FLORES, E.M.M. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements, *Talanta*, **136**: 161-169, 2015.

[25] STOVING, C.; JENSEN, H.; GAMMELGAARD, B.; STÜRUP, S. Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **84**: 209-2014, 2013.

[26] 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*, **27**: 1909-1919, 2012.

[27] FISCHER, L.; ZIPFEL, B.; KOELLENSPERGER, G.; KOVAC, J.; BILZ, S.; KUNKEL, A.; VENZAGO, C.; HANN S. Flow injection combined with ICP-MS for accurate high throughput analysis of elemental impurities in pharmaceutical products according to USP <232>/<233>, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **95**: 121–129, 2014.

[28] BALARAM, V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – Status, challenges and moving frontiers, *Trends in Analytical Chemistry*, **80**: 83-95, 2016.

[29] BARIN, J.S.; MELLO, P.A.; MESKO, M.F.; DUARTE, F.A.; FLORES, E.M.M. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016.

[30] BARIN, J.S.; TISCHER B.; PICOLATO 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*, **26**: 352-358, 2014.

[30] [http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/key-issues/m5192.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/key-issues/m5192.pdf), acessado em 12/07/16

[31] The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, Chapter 232: Elemental Impurities—Limits, USP 39 – NF 34, Official May 1, 2016

[32] The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, Chapter 233: Elemental Impurities—Procedures, Second Supplement to USP 38 – NF 33, Official December 1, 2015

[33] LEWEN, N. What's new in testing pharmaceuticals for metals: metals and limits in limbo, *Spectroscopy* **29**(5), March, 2014.

[34] [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Other/2015/03/WC500184920.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2015/03/WC500184920.pdf), acessado em 10/07/16

[35] IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book") (1997). Online corrected version: (2006–) "transition element"

[36] VALKO, M, Metals, Toxicity and Oxidative Stress, *Current Medicinal Chemistry*, **12**: 1161-1208, 2005.

[37] KRUG, F.J. Editor, Métodos de preparo de amostras, 1a edição revisada, Piracicaba, 2008.

[38] DUFFUS, J.H.; "Heavy metals" - a meaningless term?, *Pure and Applied Chemistry*, **74** (5): 793–807, 2002

[39] Catálogo e material de apoio cedido pela Berghof.

[40] TSCHÖPEL, P.; KOTZ, L.; SCHULZ, W.; VEBER, M.; TÖLG, G. Zur Ursache und Vermeidung systematischer Fehler bei Elementbestimmungen in wässrigen Lösungen im ng/ml und pg/ml – Bereich, *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*, 302: 1-14, 1980. Apud KRUG F.J., Editor, Métodos de preparo de amostras, 1a edição revisada, Piracicaba, 2008.

[41] Catálogo e material de apoio cedido pela Thermo Scientific.

[42] Ferreira A.O., Excipientes e Adjuvantes Farmacotécnicos, 2006.

[43] <http://www.ipecc.org/>, acessado em 13/07/16

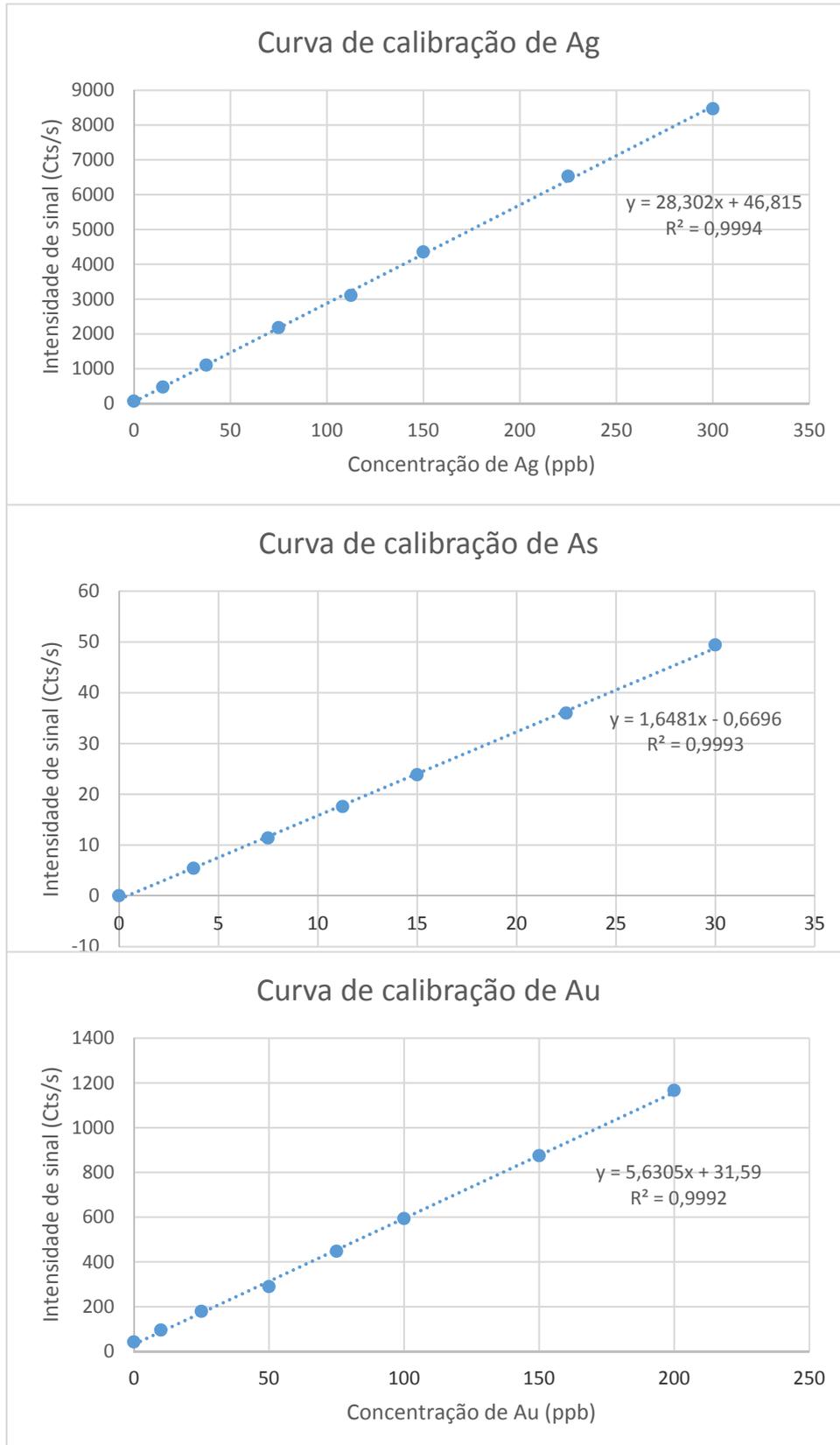
[43] GOUVEIA, S.T. et al., Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations, *Analytica Chimica Acta*, **445**: 269-275, 2001.

[44] The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, Chapter 2232: Elemental Contaminants in Dietary Supplements, PF 38(3), May-June, 2012.

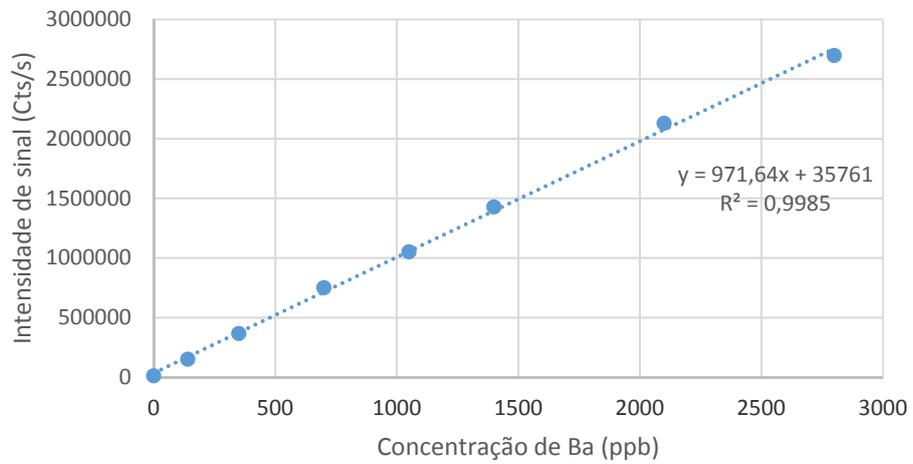
# APÊNDICE

## Apêndice I

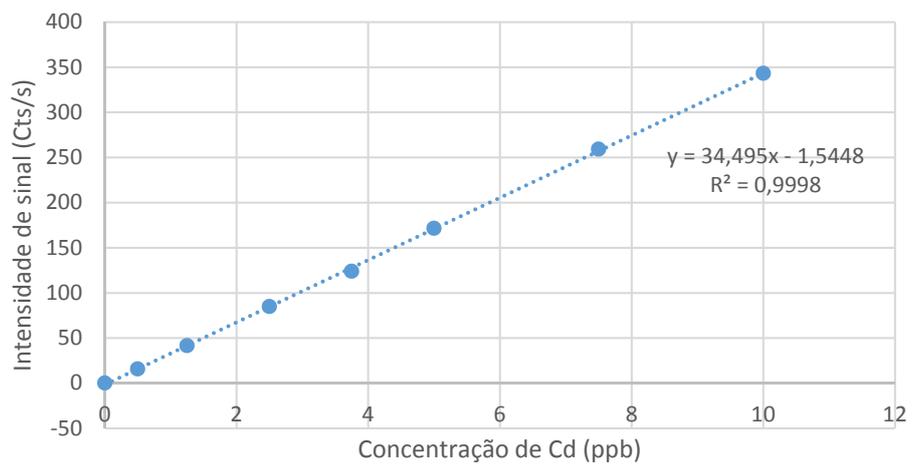
### Curvas analíticas de calibração obtidas por ICP OES



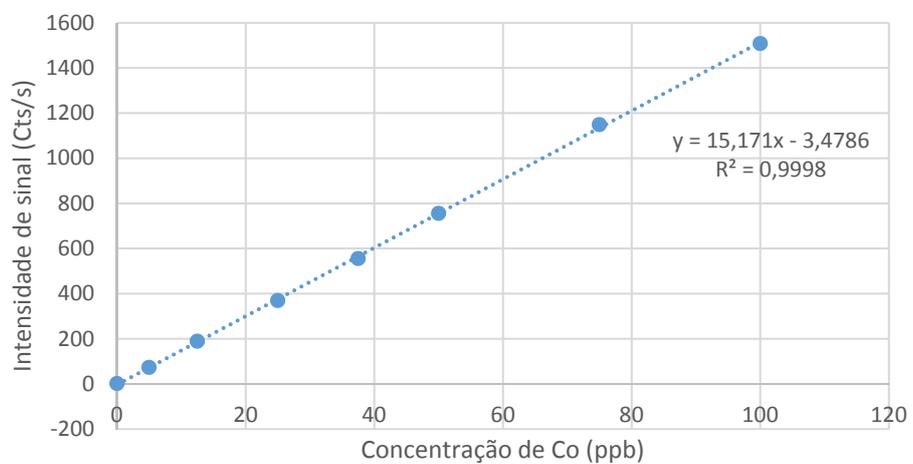
### Curva de calibração de Ba



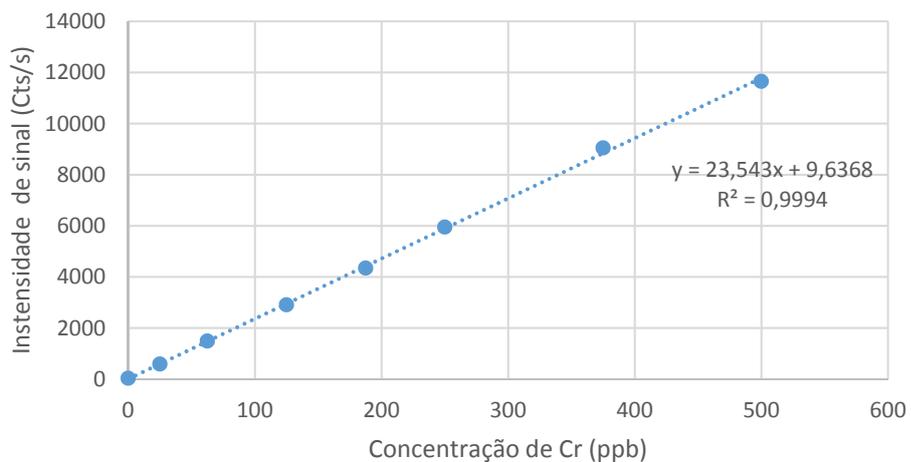
### Curva de calibração de Cd



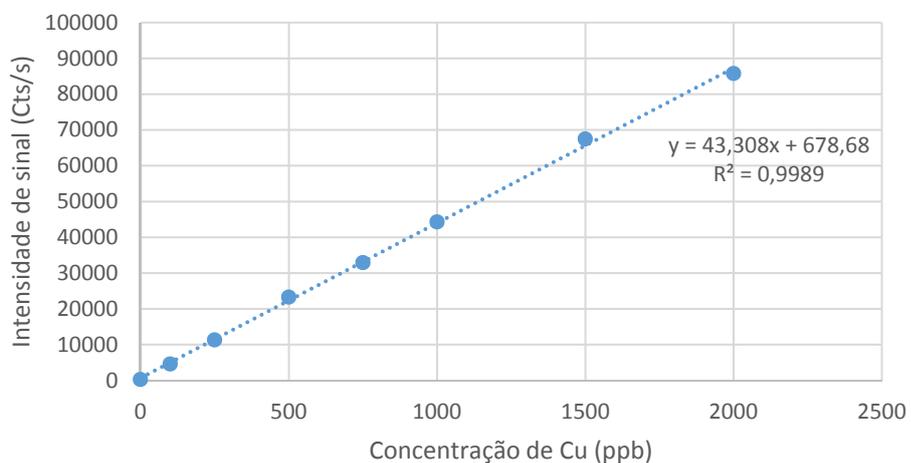
### Curva de calibração de Co



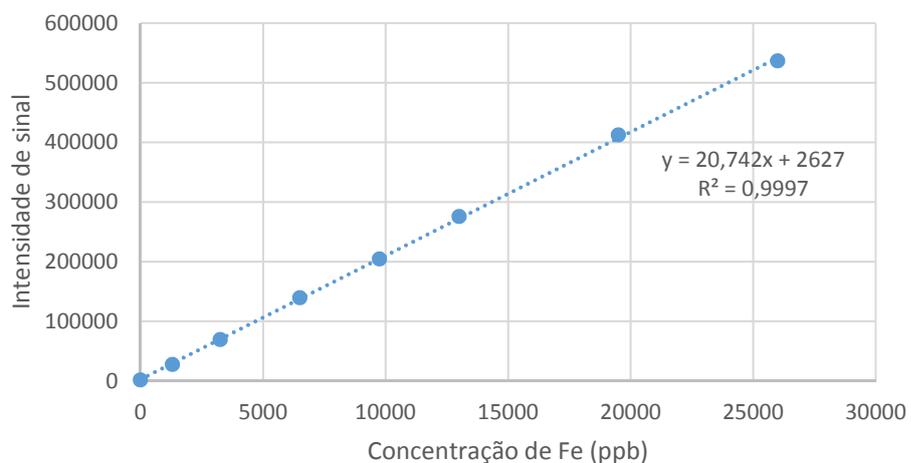
### Curva de calibração de Cr



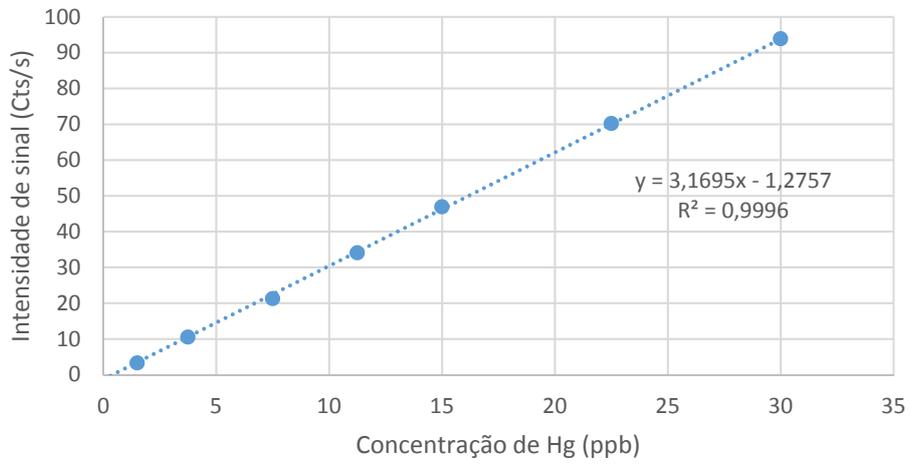
### Curva de calibração de Cu



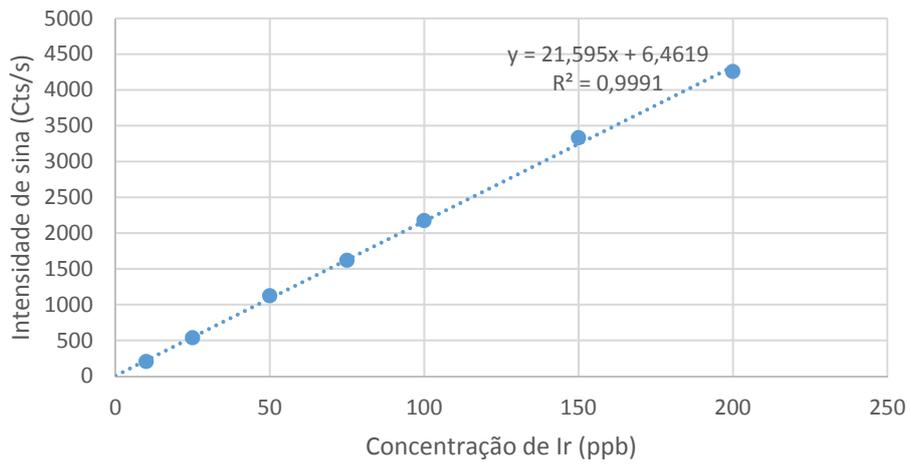
### Curva de calibração de Fe



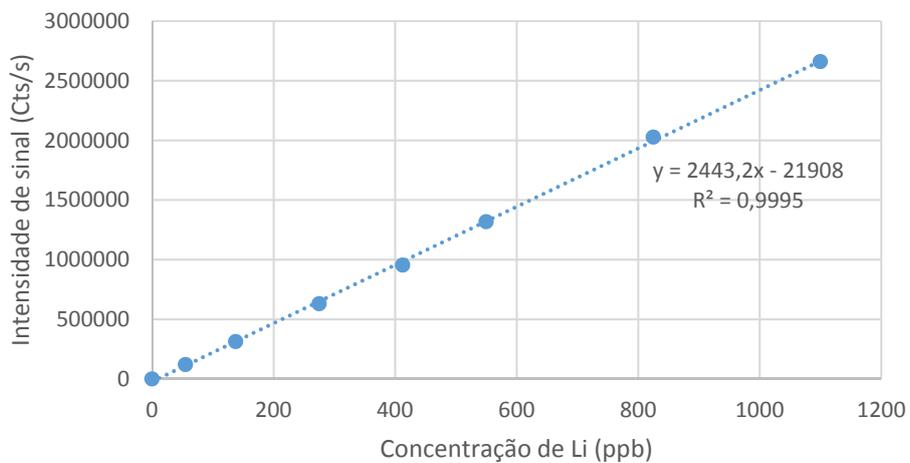
### Curva de calibração de Hg



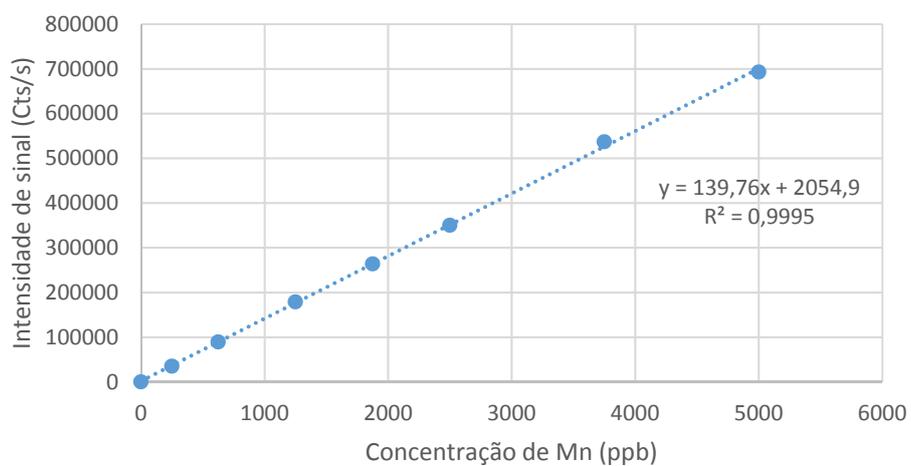
### Curva de calibração de Ir



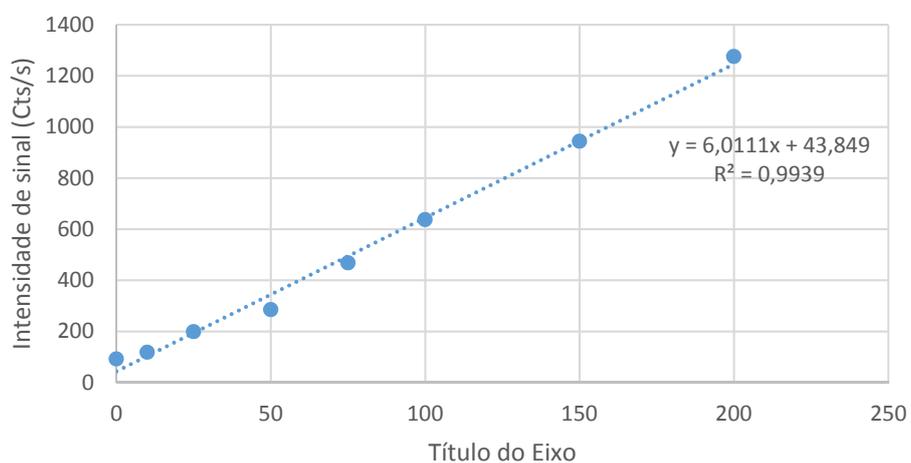
### Curva de calibração de Li



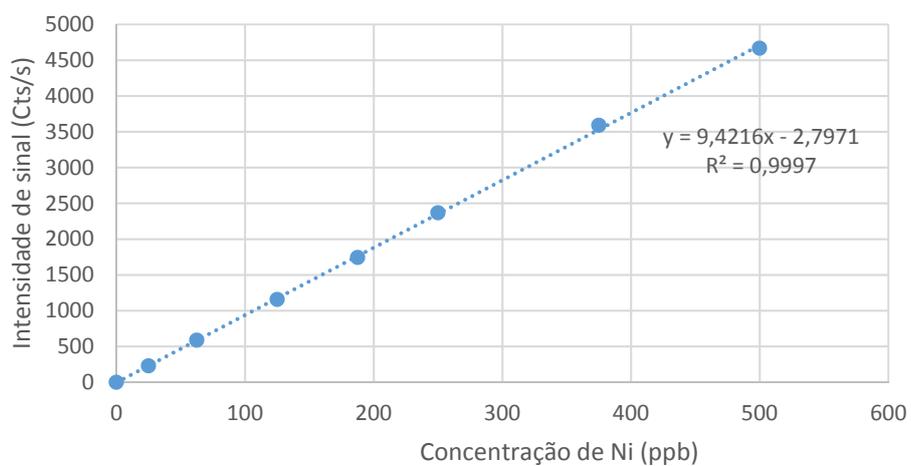
### Curva de calibração de Mn



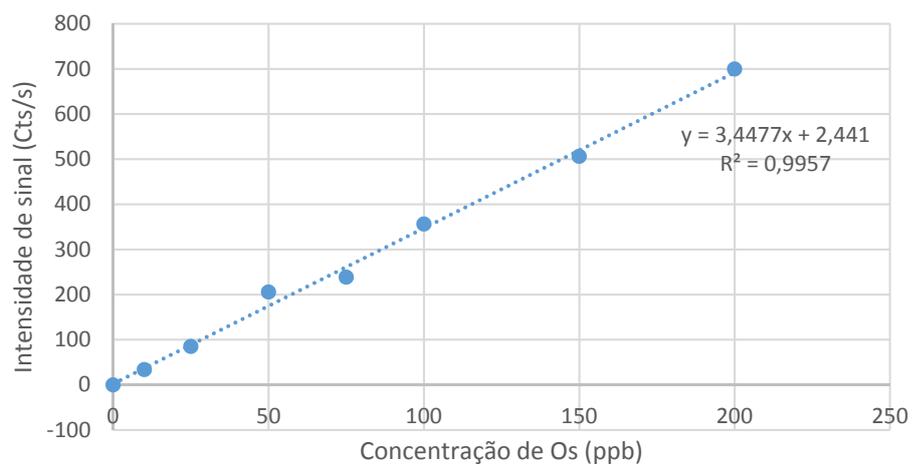
### Curva de calibração de Mo



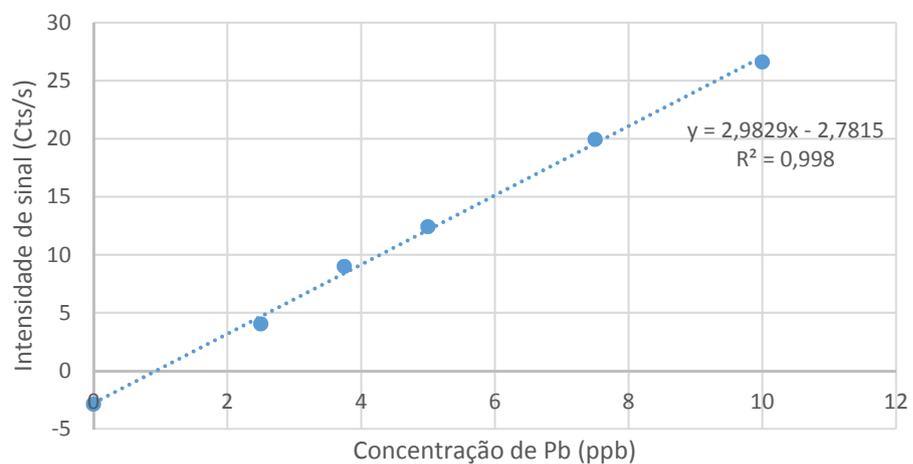
### Curva de calibração de Ni



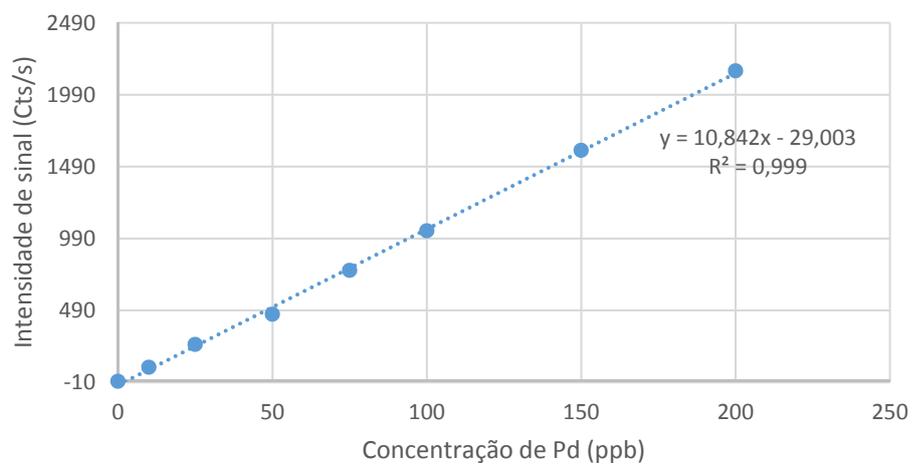
### Curva de calibração de Os



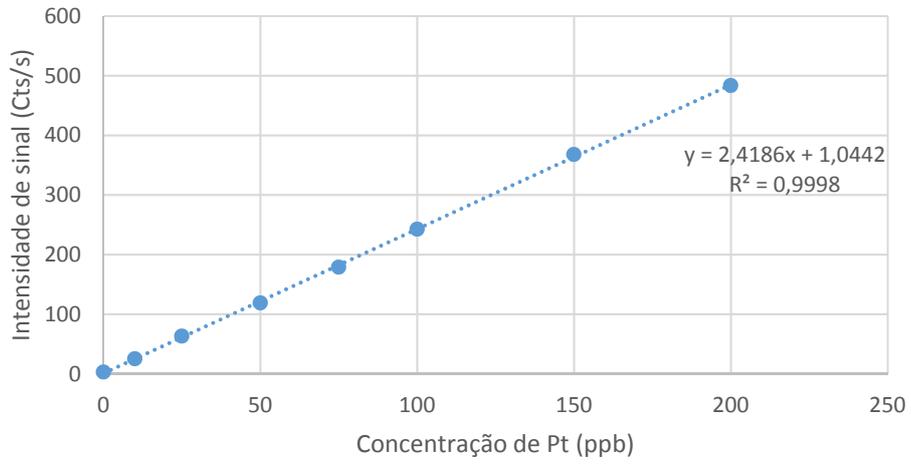
### Curva de calibração Pb



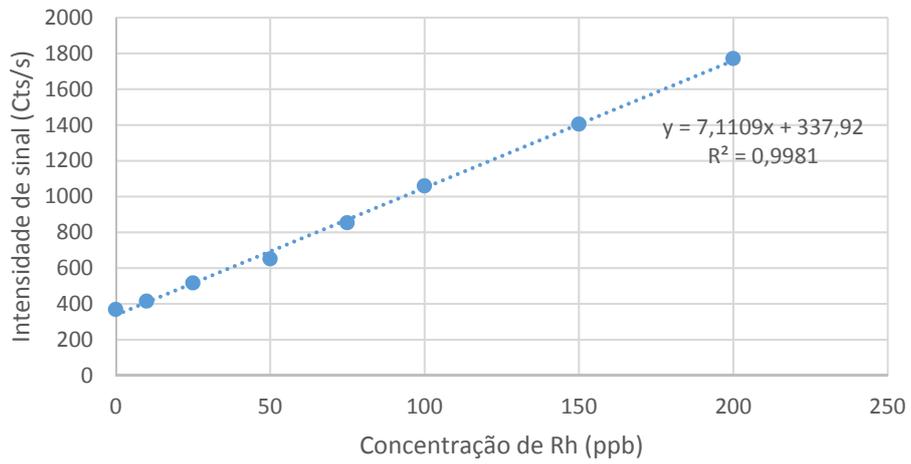
### Curva de calibração de Pd



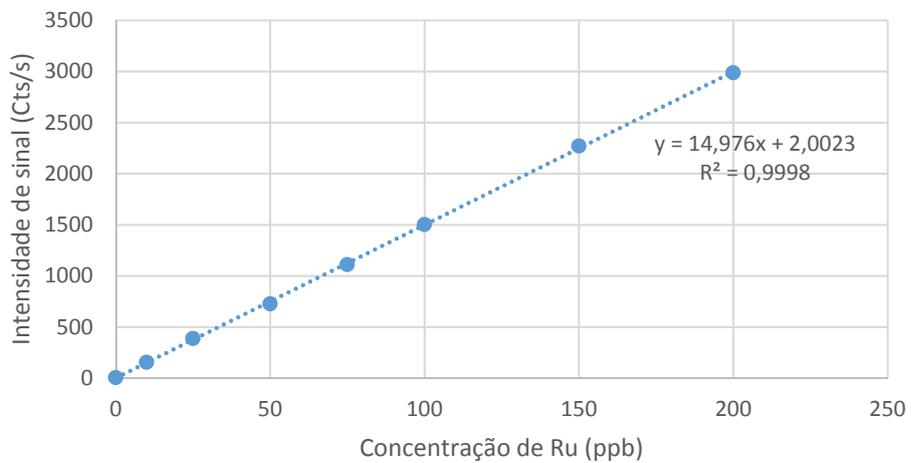
Curva de calibração de Pt



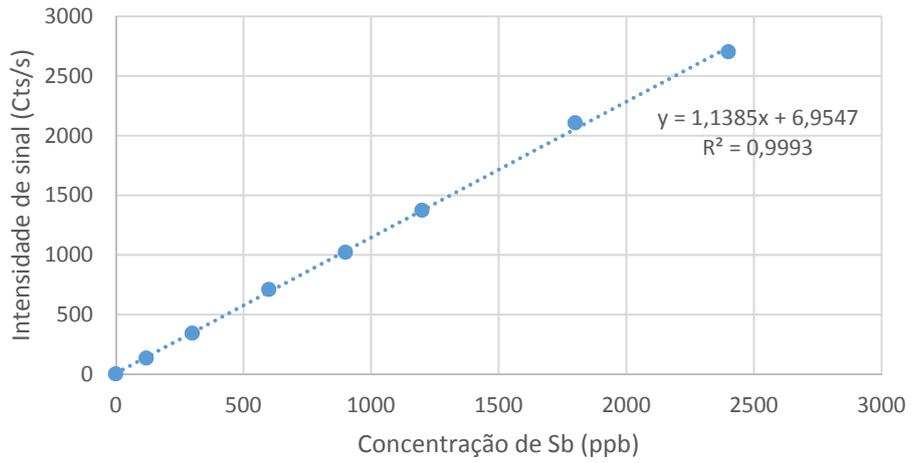
Curva de calibração de Rh



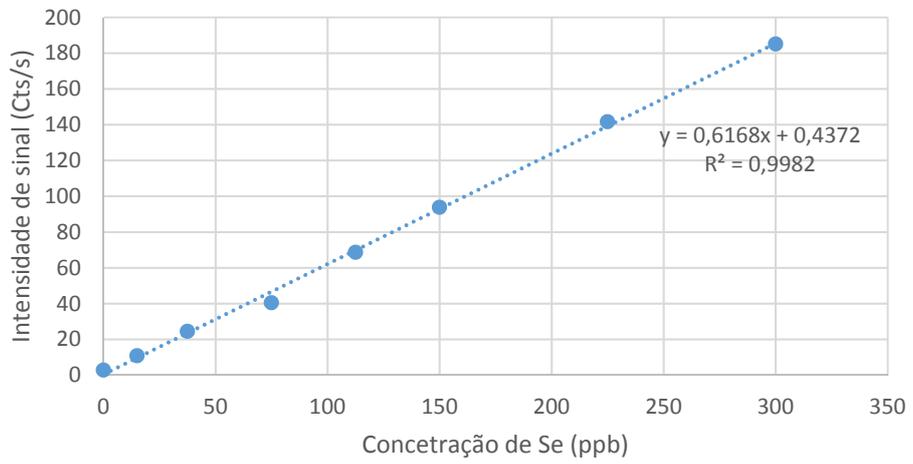
Curva de calibração de Ru



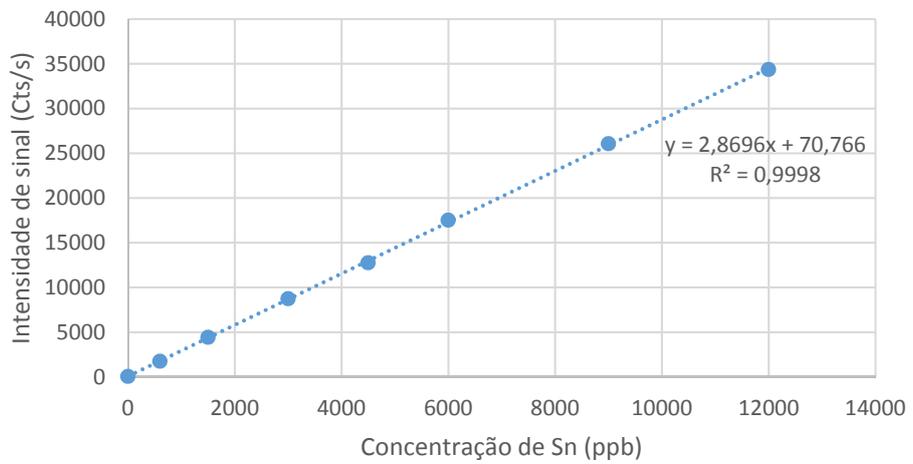
### Curva de calibração de Sb



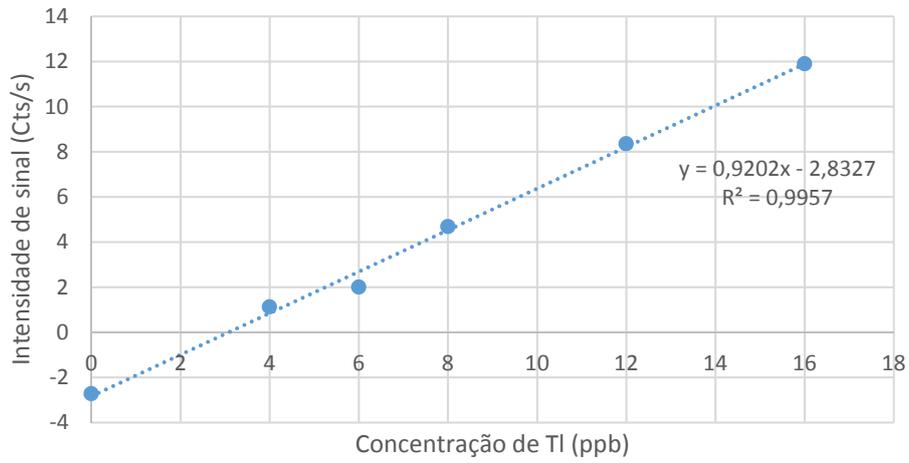
### Curva de calibração de Se



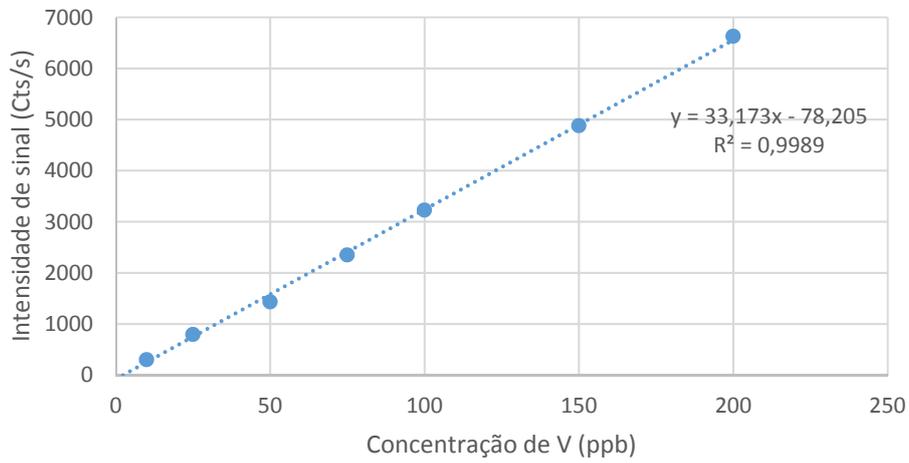
### Curva de calibração de Sn



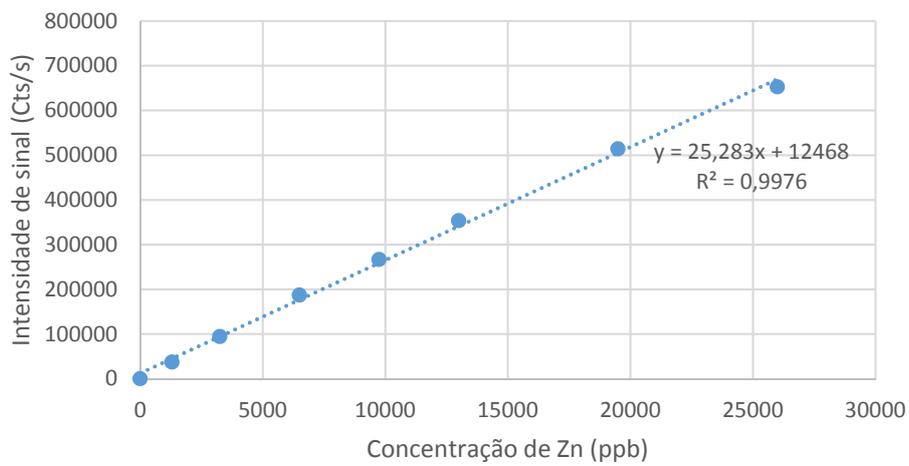
### Curva de calibração de TI



### Curva de calibração de V



### Curva de calibração de Zn



## Apêndice II

### Valores de desvio padrão para os cálculos de concentração de elementos alvo nas amostras de medicamentos de uso contínuo, excipientes e multivitamínicos

Valores de desvio padrão referentes às concentrações (mg/kg) determinadas para as amostras de medicamentos de uso contínuo por ICP OES da Tabela 6.7

Amostra	Au	Cd	Co	Fe	Li	Ni	Pb	Pt	Se	V
UC01			0,010			0,004	0,021	0,040	0,061	0,013
UC02	0,071	0,001	0,015	0,710	0,003	0,009	0,025	0,085		0,012
UC03		0,004	0,008			0,006				0,022
UC04						0,009			0,093	
UC05			0,008			0,014		0,024		0,010
UC06			0,003			0,017		0,036		0,005
UC07						0,015	0,003		0,119	
UC08			0,017			0,009	0,053			0,004
UC09						0,006			0,168	
UC10						0,013				
UC11			0,008			0,012				0,008
UC12						0,009				

Valores de desvio padrão referentes às concentrações (mg/kg) determinadas para as amostras de excipientes por ICP OES da Tabela 6.8

Amostra	Au	Ba	Co	Cr	Fe	Ir	Li	Mn	Mo	Ni	Pb	Pd	Pt	Ru	Sb	Se	V
EX01	0,062	0,011	0,007		0,233		0,001	0,033		0,019			0,033				0,026
EX02			0,011							0,019		0,016					
EX03										0,014							
EX04			0,003	0,009	0,694		0,001	0,026		0,009	0,041		0,040	0,040			0,013
EX05			0,005							0,012							
EX06			0,003	0,036	0,343	0,009		0,166		0,016			0,009		0,067	0,057	0,008
EX07	0,092		0,008		0,136	0,011	0,000	0,023	0,026	0,002			0,047				0,009
EX08										0,009							
EX09		0,070	0,007		0,202	0,001	0,012	0,055		0,006			0,025				0,016
EX10			0,009				0,001			0,020			0,031			0,083	

Valores de desvio padrão referentes às concentrações (mg/kg) determinadas para as amostras de multivitamínicos por ICP OES da Tabela 6.9

Amostras	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Ir	Li	Mn	Mo	Ni	Pb	Pt	Ru	Se	V	Zn
MV01		0,006	0,018	0,056	0,619	0,010	0,001	0,029		0,008		0,034		2,078	0,020	
MV02	0,004	0,022	0,026	0,836	9,550	0,010	0,000	1,395	0,018	0,004		0,014	0,020	0,614	0,012	1,734
MV03	0,008	0,040	0,055	9,820	20,217	0,084	0,003	2,129	0,037	0,037	0,039	0,021	0,036	0,197	0,039	33,114
MV04	0,007	0,027	0,045	1,625	12,389	0,029	0,004	0,973		0,005		0,008	0,043	0,103	0,020	13,310
MV05		0,014	0,159		1,063		0,015	0,016		0,022		0,022	0,058	0,058	0,013	
MV06		0,030			0,294		0,012	0,024		0,014		0,033		0,132	0,033	
MV07	0,003	0,009			10,783	0,004	0,000	0,000		0,013		0,023			0,010	
MV08		0,010			0,768	0,002	0,001	0,077		0,016						
MV09		0,014		0,088	0,731	0,007	0,001	0,053		0,004		0,025			0,016	
MV10	0,008	0,005	0,020	7,449	8,273	0,075	0,002	2,649		0,026	0,028	0,078			0,039	0,728

