

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

**DETERMINAÇÃO DE CÉRIO EM MATRIZES SEMI-SÓLIDAS:
INVESTIGAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRA E
APLICAÇÃO DE MÉTODOS INSTRUMENTAIS**

Natália Bortolucci Simioni*

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

***Analista de Desenvolvimento analítico do Laboratório Cristália**

**São Carlos – SP
2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Natália Bortolucci Simioni, realizada em 18/12/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira (EMBRAPA)

Prof. Dr. Vanderson da Silva Bispo (Ephar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de realizar este Mestrado Profissional, ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Química pelo suporte acadêmico.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Joaquim de Araújo Nóbrega, pela orientação precisa, apoio técnico, incentivo constante, paciência e por sempre estar presente diante de todos os desafios profissionais e pessoais enfrentados ao longo da realização deste trabalho.

Ao Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, pelo suporte técnico, fornecimento de amostras e infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste projeto.

Em especial, agradeço ao Dr. Vanderson Bispo pela coordenação comprometida, pelo apoio técnico contínuo e pelo acolhimento ao longo da minha trajetória. Sua postura profissional, ética e dedicada é uma verdadeira inspiração em minha caminhada profissional e pessoal. Agradeço, ainda, por gentilmente integrar a banca avaliadora desta dissertação.

Ao colega Wellington Rogério Viola, pela prontidão e ajuda dedicada sempre que precisei.

À gerência representada por Marcelo Kamei e Luis Paulo Souza, pelo apoio institucional, pela anuência ao Programa de Mestrado Profissional e pela viabilização da infraestrutura essencial à execução deste trabalho.

Estendo também meus agradecimentos aos demais colegas da equipe NExtl pelo companheirismo, apoio e troca de experiências ao longo desta jornada. Agradeço de maneira especial à Isabella Dantas por ter aceitado o convite para compor a banca examinadora, contribuindo gentilmente com este trabalho.

Aos meus familiares, pelo carinho, compreensão e apoio incondicional durante toda a trajetória.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Lista de Abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ce	Cério
Ce(III)	Cério em estado de oxidação +3
Ce(IV)	Cério em estado de oxidação +4
CRM	Material de Referência Certificado (Certified Reference Material)
ELL	Extração Líquido-Líquido
GLP	Boas Práticas de Laboratório (Good Laboratory Practices)
HNO ₃	Ácido Nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
LLE	Liquid-Liquid Extraction (Extração Líquido-Líquido)
LOQ	Limite de Quantificação (Limit of Quantification)
LOD	Limite de Detecção (Limit of Detection)
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RSD	Desvio Padrão Relativo (Relative Standard Deviation)
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos (United States Pharmacopeia)
u.m.a.	Unidade de massa atômica

Lista de Tabelas

Tabela 1. Comparação entre digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado e extração líquido-líquido para determinação de cério em matrizes farmacêuticas semissólidas.....	13
Tabela 2. Critérios de aceitação de linearidade.....	43
Tabela 3. Condições operacionais do ICP-OES, modelo iCAP 7000 da Thermo Scientific.....	45
Tabela 4. Condições operacionais do ICP-MS, modelo 7850 da Agilent.....	45
Tabela 5. Resultados da repetibilidade e da precisão intermediária por ICP-OES para amostras de creme e gel preparadas pelo método de extração líquido-líquido (LLE)	48
Tabela 6. Resultados de exatidão por ICP-OES para amostras de creme e gel preparadas pelo método de extração líquido-líquido (LLE).....	49
Tabela 7. Programas de aquecimento avaliados durante a etapa de desenvolvimento do preparo de amostras por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado.....	50
Tabela 8. Resultados da avaliação da eficiência da digestão das amostras por radiação micro-ondas em frasco fechado	51
Tabela 9. Resultado da seletividade como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES	54
Tabela 10. Resultado da seletividade como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-MS	54
Tabela 11. Avaliação da linearidade como parâmetro da validação do método por ICP-OES.....	55
Tabela 12. Testes estatísticos para Linearidade do Ce por ICP-OES	56
Tabela 13. Avaliação de outliers dos resíduos por ICP-OES.....	57
Tabela 14. Avaliação da linearidade do método por ICP-MS.....	57
Tabela 15. Testes estatísticos para linearidade do Ce por ICP-MS.....	58
Tabela 16. Avaliação de outliers dos resíduos por ICP-MS.....	59
Tabela 17. Resultado da exatidão como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES	60
Tabela 18. Resultado da exatidão como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-MS	60

Tabela 19. Resultado da repetibilidade como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES	61
Tabela 20. Resultado da precisão intermediária como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES.....	62
Tabela 21. Resultado da repetibilidade como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-MS	62
Tabela 22. Resultado da precisão intermediária como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES.....	63
Tabela 26. Resultado de robustez variando a potência aplicada no ICP-OES	64
Tabela 27. Resultado de robustez leitura radial no ICP-OES	64
Tabela 28. Resultado de robustez variando a potência aplicada no ICP-MS	65
Tabela 29. Resultado de robustez variando a vazão do gás de nebulização no ICP-MS.....	65
Tabela 30. Resultado de robustez variando a profundidade de amostragem no ICP-MS.....	65
Tabela 28. Soluções de calibração utilizadas na construção da curva analítica para determinação por ICP-OES.....	67
Tabela 29. Condições operacionais do forno digestor micro-ondas para o preparo de amostra	67
Tabela 30. Soluções de calibração utilizadas na construção da curva analítica para determinação por ICP-MS	68

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos principais componentes de um instrumento ICP-OES.....	16
Figura 2. Representação esquemática dos principais componentes de um instrumento ICP-MS.....	18
Figura 3. Aspecto visual do digerido.....	52
Figura 4. Regressão linear para a curva analítica de Ce por ICP-OES.....	55
Figura 5. Gráfico da dispersão dos resíduos.....	56
Figura 6. Regressão linear para a curva analítica de Ce por ICP-MS.....	58
Figura 7. Gráfico da dispersão dos resíduos.....	59

Resumo

DETERMINAÇÃO DE CÉRIO EM MATRIZES SEMI-SÓLIDAS: INVESTIGAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRA E APLICAÇÃO DE MÉTODOS INSTRUMENTAIS. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas para a determinação de cério em medicamentos de uso tópico contendo nitrato de cério, nas formas de creme e gel. O estudo envolveu a investigação de estratégias de preparo de amostras, com ênfase na extração líquido-líquido (LLE) e digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. As determinações analíticas foram realizadas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS).

Os métodos foram validados segundo os critérios da Resolução RDC 166/2017 da ANVISA, avaliando parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e robustez. Os resultados demonstraram que a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas apresentou melhor desempenho para ambas as matrizes, permitindo a quantificação exata e precisa de Ce em medicamento de formulação creme e gel. A validação dos métodos por ICP-OES demonstrou desempenho satisfatório, com seletividade adequada (recuperações entre 97,6–100,8 %), linearidade excelente ($r = 1,00$, resíduos homocedásticos), exatidão consistente (96,9–102,2 %), precisão elevada ($DPR \leq 2,0$ %) e robustez aceitável. Para o ICP-MS, os parâmetros também atenderam aos critérios: seletividade dentro de 95,0–105,0%, linearidade adequada ($r = 0,995$; $r^2 = 0,989$, resíduos homocedásticos), exatidão satisfatória (96,0–102,5 %), precisão adequada ($DPR < 4,0\%$) e robustez confirmada frente a variações operacionais. Os dados obtidos confirmam a aplicabilidade das metodologias propostas no controle de qualidade de medicamentos contendo cério, demonstrando sua adequação não apenas para a quantificação do ativo em análises de rotina, mas também para o monitoramento do teor do analito em estudos de estabilidade, em conformidade com os requisitos regulatórios vigentes.

Abstract

DETERMINATION OF CERIUM IN SEMI-SOLID MATRICES: INVESTIGATION OF SAMPLE PREPARATION STRATEGIES AND APPLICATION OF INSTRUMENTAL METHODS. The present work aimed at the development and validation of analytical methodologies for the determination of cerium in topical medications containing cerium nitrate, in cream and gel formulations. The study involved the investigation of sample preparation strategies, with emphasis on liquid-liquid extraction (LLE) and microwave-assisted acid digestion. Analytical determinations were performed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

The methods were validated according to the criteria of ANVISA Resolution RDC 166/2017, evaluating parameters such as selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limits, and robustness. The results demonstrated that microwave-assisted acid digestion presented better performance for both matrices, allowing accurate and precise quantification of Ce in cream and gel pharmaceutical formulations. Method validation by ICP-OES demonstrated satisfactory performance, with adequate selectivity (recoveries between 97.6–100.8 %), excellent linearity ($r = 1.00$, homoscedastic residuals), consistent accuracy (96.9–102.2 %), high precision ($RSD \leq 2.0\%$), and acceptable robustness. For ICP-MS, the parameters also met the criteria: selectivity within 95.0–105.0 %, adequate linearity ($r = 0.995$; $r^2 = 0.989$, homoscedastic residuals), satisfactory accuracy (96.0–102.5 %), adequate precision ($RSD < 4.0\%$), and confirmed robustness against operational variations. The data obtained confirm the applicability of the proposed methodologies for the quality control of cerium-containing pharmaceutical products, demonstrating their suitability not only for routine quantification of the active ingredient but also for monitoring its content in stability studies, in compliance with current regulatory requirements.

Sumário

1.	Introdução	2
2.	Revisão Bibliográfica.....	5
2.1	Química do elemento cério	5
2.1.1	Aplicações Farmacêuticas do Cério.....	6
2.2	Preparo de amostras.....	8
2.2.1	Extração Líquido-Líquido (LLE).....	9
2.2.2	Digestão Ácida Assistida por Radiação Micro-ondas.....	11
2.3	Técnicas Instrumentais	14
2.3.1	ICP-OES	14
2.3.2	ICP-MS.....	17
2.3.3	Aplicações na indústria farmacêutica	21
2.4	Regulamentações	24
2.4.1	Capítulos Gerais USP <730>, <232>, <233>.....	24
2.4.2	RDC nº 166/2017	26
2.4.3	RDC nº 318/2019	28
3.	Objetivos	31
3.1	Objetivo Geral	31
3.2	Objetivos Específicos	31
4.	Materiais e métodos.....	33
4.1	Instrumentação	33
4.2	Reagentes e soluções.....	35
4.3	Procedimento do preparo de amostra para o desenvolvimento da metodologia analítica.....	35
4.4	Preparo da Solução de Padrão Interno Utilizada nas Análises por ICP-MS	37
4.5	Procedimento de validação de método	38
4.5.1	Seletividade.....	38
4.5.2	Linearidade da curva analítica	39

4.5.3	Exatidão	43
4.5.4	Precisão	43
4.5.5	Robustez	44
4.6	Condições operacionais ICP-OES e ICP-MS.....	45
5.	Resultados e discussão	47
5.1	Desenvolvimento da Metodologia Analítica.....	47
5.1.1	Preparo de amostra.....	47
5.1.2	Extração líquido-líquido (LLE)	48
5.1.3	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado.....	50
5.2	Validação da Metodologia Analítica	53
5.2.1	Seletividade.....	53
5.2.2	Linearidade	54
5.2.2.1	ICP-OES	54
5.2.2.2	ICP-MS.....	57
5.2.3	Exatidão	60
5.2.4	Repetibilidade e Precisão intermediária	61
5.2.5	Robustez	63
5.3	Metodologias analíticas desenvolvidas	66
5.3.1	ICP-OES	67
5.3.2	ICP-MS.....	68
6.	Conclusões	71
7.	Referências Bibliográficas.....	74

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A qualidade dos medicamentos é uma exigência essencial da indústria farmacêutica moderna, sendo fortemente regulada por órgãos sanitários nacionais e internacionais. Com o avanço das formulações terapêuticas, tornou-se imprescindível o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais sensíveis, seletivos, rápidos e economicamente viáveis, especialmente para a quantificação de elementos presentes em composições complexas, como as matrizes semi-sólidas (Dias, 2019).

Dentre os elementos de interesse farmacológico, o cério (Ce) destaca-se por suas propriedades redox, atividade antimicrobiana e aplicações biomédicas inovadoras. O cério é um lantanídeo com número atômico 58, amplamente empregado na forma de sais, como nitrato de cério, em formulações tópicas para o tratamento de lesões infecciosas e queimaduras cutâneas (Jakupec et al., 2005). Um exemplo são os medicamentos que têm associação de sulfadiazina de prata com nitrato de cério, indicado tanto pela ação antibacteriana quanto por propriedades imunomoduladoras e cicatrizantes (Qian et al., 2020).

A crescente popularização de medicamentos com cério traz consigo a necessidade de técnicas analíticas robustas para controle de qualidade, garantindo eficácia terapêutica e segurança ao paciente. Apesar de sua ampla aplicabilidade, a análise quantitativa de cério em matrizes farmacêuticas semi-sólidas apresenta desafios específicos, especialmente devido à complexidade dessas formulações, que incluem excipientes lipofílicos, emulsificantes e espessantes. A etapa de preparo da amostra torna-se, portanto, crítica para garantir a disponibilização eficiente do analito, sua estabilização em solução e posterior detecção sem perdas ou interferências (Krug, 2008).

Dentre as metodologias disponíveis, destacam-se os métodos espectrométricos como a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), ambas recomendadas pela Farmacopeia Norte-Americana (USP <730>, 2018) para determinação de elementos em produtos farmacêuticos. Essas técnicas oferecem elevada seletividade, boa precisão e ampla faixa linear de resposta, sendo compatíveis com determinações em amplas faixas de concentrações, como é o caso da composição de medicamentos tópicos contendo nitrato de cério (Bizzi et al., 2017).

Neste trabalho, foram avaliadas diferentes estratégias de preparo de amostra, com foco na extração líquido-líquido (LLE) e na digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. Cada abordagem foi analisada quanto à sua eficiência, praticidade e adequação à determinação de Ce em medicamento de forma farmacêutica em gel e creme. Após o preparo, os ensaios analíticos foram conduzidos por ICP-OES e ICP-MS, seguidos de um processo rigoroso de validação conforme diretrizes da Resolução RDC 166/2017 da ANVISA, assegurando a rastreabilidade e a confiabilidade dos resultados obtidos.

Além da validação analítica, é fundamental que os métodos destinados ao controle de qualidade estejam alinhados às exigências regulatórias aplicáveis aos estudos de estabilidade de medicamentos, conforme estabelecido pela Resolução da Diretoria Colegiada nº 318/2019. Essa normativa determina que os métodos empregados no monitoramento do teor do princípio ativo sejam adequadamente validados e capazes de detectar variações ao longo do tempo, assegurando a manutenção da qualidade, segurança e eficácia do produto durante seu prazo de validade.

Assim, esta dissertação visa não apenas desenvolver e validar metodologias para a quantificação de cério, mas também contribuir com diretrizes práticas para sua aplicação em laboratórios de controle de qualidade, especialmente em ambientes que lidam com formulações tópicas. A relevância científica e tecnológica do presente estudo reside na integração entre conhecimento químico dos lantanídeos, avanços em preparo de amostras e estratégias analíticas validadas, promovendo uma interface entre pesquisa acadêmica e aplicação industrial.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Química do elemento cério

O cério (Ce) é um elemento químico pertencente ao grupo dos lantanídeos, com número atômico 58 e massa atômica de 140,12 u.m.a. Sua configuração eletrônica é [Xe] 4f² 6s², que o posiciona como um dos elementos com características químicas típicas das terras raras. Descoberto em 1803 de forma independente por Berzelius e Hisinger na Suécia, e por Klaproth na Alemanha, seu nome é uma homenagem ao asteroide Ceres, identificado dois anos antes (DAHLE et al., 2015). Apesar de ser classificado como uma terra rara, o cério é relativamente abundante na crosta terrestre, apresentando concentração superior à de muitos metais industriais clássicos, como o cobre e o estanho, o que viabiliza seu uso em larga escala em diversas aplicações tecnológicas e ambientais (MOUTINHO et al., 2014).

Do ponto de vista químico, o cério é um dos elementos mais versáteis entre os lantanídeos, sobretudo devido à sua capacidade de apresentar dois estados de oxidação estáveis: +3 (Ce(III)) e +4 (Ce(IV)). O estado +3 é predominante em soluções aquosas e compartilha propriedades típicas da série, como alto raio iônico, paramagnetismo e tendência à formação de complexos com ligantes oxigenados, como carboxilatos, fosfatos e hidroxilas. Já o estado +4 confere ao cério um comportamento único, sendo diamagnético e altamente oxidante, estável apenas em meio ácido ou em materiais sólidos como o óxido de cério (CeO₂) (MOHAJERI et al., 2025). A reversibilidade redox entre Ce(III) e Ce(IV) é um fator central na química do elemento e tem sido explorada em reações catalíticas, processos de purificação e tecnologias ambientais (MUCCILLO et al., 2001)

A solubilidade dos sais de cério varia conforme o ânion e o estado de oxidação. Os sais de Ce(III) costumam ser mais solúveis em água do que os de Ce(IV), que formam complexos estáveis com ligantes oxigenados, como EDTA e citrato. Esses complexos desempenham papel fundamental na mobilização e biodisponibilidade do cério em sistemas biológicos e ambientais (DAHLE et al., 2015). Sua tendência a formar compostos em estado de oxidação +4 está relacionada à energia de ionização relativamente baixa para remoção do quarto elétron e à estabilização energética oferecida por ligantes fortes. A química de Ce(IV) é, portanto,

de grande interesse em reações de oxidação e como padrão primário em titulometria redox (BUCHANAN et al., 2022; JAKUPEC et al., 2005).

No ambiente biológico, compostos de cério têm sido estudados por sua capacidade de atuar como antioxidantes miméticos da superóxido dismutase, em virtude de sua habilidade de alternar entre Ce(III) e Ce(IV). Essa propriedade tem sido explorada em formulações terapêuticas para promover a cicatrização de tecidos e o controle de processos inflamatórios (QIAN et al., 2020; KURTULDU et al., 2021).

A combinação de propriedades físico-químicas únicas, alta afinidade por ligantes oxigenados, estabilidade térmica e comportamento redox complexo reforça a importância do cério como objeto de estudo em química inorgânica, farmacêutica e ambiental.

2.1.1 Aplicações Farmacêuticas do Cério

Na medicina, o primeiro uso médico do Ce foi feito pelo obstetra James Y. Simpson, em meados do século XX, que utilizou o nitrato de cério para o alívio de náuseas proporcionando um resultado terapêutico satisfatório. A administração por via oral do oxalato de cério (III) foi amplamente usada por décadas para evitar vômitos na gravidez, enjoo, outros distúrbios gastrointestinais como diarreia crônica e até mesmo em distúrbios neurológicos como epilepsia e doença de Huntington. Até o início do século XX, as preparações medicinais continham quantidades substanciais e variadas de outros lantanídeos (JAKUPEC, 2005).

Foi no final do século XX que os efeitos bacteriostáticos do nitrato de cério (III) e outros compostos de cério foram descobertos e logo foram usados como antissépticos tópicos na medicina humana e veterinária. Esses remédios foram benéficos no tratamento de feridas como queimaduras, gangrena da pele entre outros (JAKUPEC, 2005).

A capacidade do cério em alterar o estado de oxidação entre Ce(III) e Ce(IV) durante as reações redox é uma característica que confere a esse elemento um duplo papel em sistemas biológicos e o torna um íon terapêutico com atividade biológica única. Em condições de pH fisiológicos, o Ce(III) pode atuar como antioxidante e “sequestradores” de espécies reativas de oxigênio, mediando o oxigênio dentro do microambiente e, como resultado, o cério induz uma resposta anti-inflamatória e osteogênese. Por outro lado, em condição de baixo pH, o Ce(IV) assume o papel de pró-oxidante, onde gera espécies reativas de oxigênio e o stress

oxidativo produzido causa danos celulares, exercendo assim, atividade antibacteriana (KURTULDU, 2021).

Dessa forma, o interesse pelo cério na área farmacêutica tem crescido de forma significativa nas últimas décadas, impulsionado por suas propriedades únicas de oxidorredução, capacidade antioxidante e ação antimicrobiana. Essas características tornam os compostos de cério particularmente promissores em formulações tópicas voltadas à regeneração de tecidos, controle de infecções e tratamento de queimaduras (QIAN et al., 2020).

Dentre os compostos mais empregados, destaca-se o nitrato de cério, que atua sinergicamente com outros agentes antimicrobianos, como a sulfadiazina de prata. Essa combinação é amplamente utilizada no tratamento de queimaduras de segundo e terceiro grau. O Ce, nesse contexto, exerce papel fundamental na proteção da pele contra infecções bacterianas, promovendo a descolonização de microrganismos patogênicos e facilitando a revitalização da ferida (JAKUPEC et al., 2005; QIAN et al., 2020).

Além de sua eficácia antimicrobiana, o cério também demonstra efeito anti-inflamatório. Estudos demonstram que nanopartículas de CeO_2 mimetizam a ação da enzima superóxido dismutase, reduzindo espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species – ROS) em tecidos lesionados. Essa atividade antioxidante é particularmente útil em tratamentos voltados à regeneração cutânea, controle de estresse oxidativo e prevenção de danos celulares (KURTULDU et al., 2021).

Recentemente, a nanotecnologia tem ampliado as possibilidades de uso do cério na área da biomedicina. Nanopartículas de óxido de cério funcionalizadas com ligantes específicos vêm sendo exploradas como carreadoras de fármacos, sistemas de liberação controlada e componentes de curativos inteligentes. Tais abordagens visam aumentar a eficácia terapêutica, modular a liberação de compostos ativos e potencializar a ação antioxidante do cério *in situ* (KARGOZAR et al., 2018).

Além das formulações tópicas, há estudos experimentais sobre o uso sistêmico de compostos de cério, embora essa aplicação ainda requeira investigações mais aprofundadas sobre metabolismo, biodistribuição e toxicologia. As aplicações tópicas, por outro lado, já apresentam respaldo clínico consolidado, com eficácia reconhecida na literatura e aprovação por agências regulatórias internacionais.

O uso do Ce também tem sido avaliado em biofilmes microbianos, que representam uma barreira fisiológica importante em feridas crônicas e infecções

hospitalares. Estudos demonstram que nanopartículas de CeO_2 inibem significativamente a formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, perturbando sua estrutura e, potencialmente, reduzindo a resistência dos microrganismos a tratamentos tópicos convencionais (YEFIMOVA et al., 2023).

Do ponto de vista farmacotécnico, as formulações contendo Ce exigem atenção especial quanto à estabilidade química do ativo em meio aquoso. O Ce(IV), por exemplo, é suscetível à redução em ambientes biológicos, sendo sua estabilidade influenciada por fatores como o pH, temperatura e tipo de agente redutor ou oxidante presente no meio. A literatura aponta que o equilíbrio entre Ce(III) e Ce(IV), assim como a presença de defeitos estruturais na rede cristalina, determina a eficácia antioxidante e a estabilidade funcional das nanopartículas de óxido de cério, sendo, portanto, fundamental o desenvolvimento de sistemas de entrega farmacêutica bem projetados para garantir sua eficácia e segurança terapêutica (DAS et al., 2013).

Outro enfoque relevante é o estudo da interação dos compostos de Ce com componentes da pele humana. Evidências sugerem que o Ce pode interagir com proteínas estruturais da epiderme, como queratina e colágeno, favorecendo a reparação tecidual. Essas interações são mediadas por forças eletrostáticas e pela capacidade do Ce de modular a atividade de metaloproteinases da matriz, enzimas envolvidas no remodelamento tecidual (CELARDO et al., 2011).

Com a evolução das tecnologias farmacêuticas e biomédicas, espera-se que os compostos de Ce possam ser incorporados a novos dispositivos terapêuticos, como hidrogéis inteligentes, filmes poliméricos bioadesivos e sistemas de liberação por estímulos externos (pH, temperatura e luz). Em resumo, os compostos de Ce apresentam um perfil farmacológico promissor, especialmente para uso tópico, com potencial de ampliar seu espectro terapêutico com o avanço de tecnologias aplicadas à liberação de fármacos e à medicina regenerativa, consolidando seu papel como um agente terapêutico multifuncional

2.2 Preparo de amostras

Para a introdução adequada no instrumento de medida e para minimizar interferências na quantificação dos analitos, o preparo de amostras envolve operações físicas e químicas. Apesar de algumas técnicas que possibilitam a análise direta de sólidos, a maioria das medidas instrumentais envolve a introdução de amostras como

soluções ou suspensões, como em geral adotado para ICP-MS e ICP-OES (KRUG, 2008).

2.2.1 Extração Líquido-Líquido (LLE)

A determinação de elementos em matrizes farmacêuticas semissólidas, como géis e cremes, exige metodologias de preparo de amostras que sejam eficazes na separação do analito da matriz e compatíveis com técnicas analíticas sensíveis. Dentre os métodos de preparo disponíveis, a extração líquido-líquido (LLE, Liquid-Liquid Extraction) destaca-se como uma abordagem clássica, econômica e amplamente empregada no contexto de amostras complexas (ORLANDO et al., 2009).

A LLE é baseada no equilíbrio com o analito se distribuindo entre duas fases imiscíveis sendo que a quantidade total extraída está relacionada com o coeficiente de partição entre essas duas fases. O procedimento é executado pela adição e agitação de um solvente imiscível na matriz e a extração acontece pela passagem do analito para o solvente imiscível. Após a agitação são formadas duas fases líquidas que são então separadas. A fase contendo o analito pode ser evaporada, no caso de solventes orgânicos, ou pode ser, quando aquosa, analisada diretamente dependendo do método instrumental. (CORDEIRO et al, 2009).

No caso do Ce, sua extração eficiente em amostras semissólidas requer a complexação com ligantes seletivos que favoreçam sua solubilização na fase orgânica. Agrawal (2004) desenvolveu um método baseado na complexação de Ce(IV) com o reagente *N*-fenil-(1,2-metanofulereno C₆₀)₆₁-ácido formohidroxâmico (PMFFA), demonstrando a eficácia dessa abordagem para a separação, pré-concentração e determinação simultânea de Ce e La por ICP-OES.

Para a aplicação da LLE em formulações semissólidas, inicialmente é necessário realizar a solubilização da matriz. Essa etapa pode ser conduzida mediante a adição de solventes polares, como etanol, isopropanol ou solução tampão, com posterior agitação vigorosa ou sonicação, promovendo a liberação do analito e sua transferência para a fase aquosa. Em seguida, adiciona-se o agente complexante, neste caso o ácido *N*-fenil-(1,2-metanofullereno C₆₀)₆₁-formohidroxâmico (PMFFA), que reage com o Ce formando um complexo estável e lipofílico, facilitando sua extração para a fase orgânica, geralmente composta por clorofórmio ou diclorometano (AGRAWAL, 2004).

A estratégia metodológica envolve a utilização de massas de amostra variando entre 0,2 e 1,0 g de creme ou gel farmacêutico, dissolvidos em aproximadamente 10 mL de tampão (geralmente borato ou amônia) ajustado para o pH ótimo de extração. Posteriormente, são adicionados 10 mL de uma solução de PMFFA $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em acetona, seguido de agitação com 10 mL de clorofórmio por 2 min. Após a separação das fases, a fase orgânica contendo o complexo Ce–PMFFA é seca com sulfato de sódio anidro e, se necessário, concentrada por evaporação controlada. A redissolução do resíduo em ácido nítrico diluído permite a posterior quantificação instrumental do Ce.

De acordo com Orlando et al. (2009), a repetição do processo de extração com múltiplas alíquotas menores do solvente orgânico (por exemplo, duas alíquotas de 5 mL em vez de uma única de 10 mL) pode aumentar significativamente a recuperação do analito, especialmente em sistemas de partição limitados. Além disso, ajustes como a adição de sal (*efeito salting-out*) e controle da temperatura podem ser empregados para melhorar o coeficiente de partição do Ce.

As principais vantagens da LLE incluem a simplicidade operacional, custo reduzido, aplicabilidade a diferentes tipos de analitos e relativa robustez frente à variação de matriz. No entanto, algumas limitações devem ser consideradas, como a formação de emulsões, consumo de solventes orgânicos tóxicos e dificuldade de automação. A utilização de complexantes seletivos como o PMFFA atenua parte desses desafios, conferindo seletividade, sensibilidade e compatibilidade com análises subsequentes (AGRAWAL, 2004; ORLANDO et al., 2009).

Também, nas técnicas de extração, a introdução de matrizes orgânicas no plasma de argônio pode resultar em efeitos adversos significativos, como interferências de matriz e formação de depósitos de carbono na tocha de plasma e na região da interface. Como alternativa, a microextração em fase líquida (LPME), definida como uma miniaturização da técnica clássica de extração líquido-líquido, apresenta vantagens expressivas. A miniaturização promove maiores fatores de enriquecimento, reduz drasticamente o volume de solvente necessário e, conseqüentemente, a geração de resíduos, tornando o processo mais sustentável e eficiente (PINHEIRO, 2022).

Em termos comparativos, a digestão assistida por radiação micro-ondas é mais indicada quando se busca a decomposição completa da matriz, elevada robustez metodológica e compatibilidade com uma ampla gama de elementos

químicos. Já a LLE se sobressai em aplicações onde se deseja seletividade analítica, menor custo operacional e sensibilidade elevada, especialmente para elementos como o Ce que formam complexos estáveis com ligantes específicos.

2.2.2 Digestão Ácida Assistida por Radiação Micro-ondas

A determinação de elementos terras raras como o Ce em matrizes farmacêuticas semissólidas — incluindo cremes, pomadas e géis — requer estratégias robustas de preparo de amostras, que garantam a completa decomposição da matriz orgânica e a liberação quantitativa do analito. A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, especialmente quando realizada em frascos fechados, tem se consolidado como o método mais eficiente, seguro e compatível com as exigências analíticas e regulatórias atuais para esse tipo de aplicação (KRUG, 2008; BARIN et al., 2016).

Cremes e géis farmacêuticos são constituídos por emulsões e sistemas coloidais contendo espessantes, emolientes, ceras, óleos, polímeros e conservantes, o que resulta em uma matriz de alta complexidade e teor lipídico significativo (OTTO et al. 2018). A decomposição dessa matriz é essencial para evitar interferências na determinação de analitos por técnicas de espectrometria atômica, como ICP-OES e ICP-MS. A digestão em frasco fechado possibilita alcançar altas temperaturas, ao redor de 260 °C, e pressões de até 199 bar, promovendo a completa mineralização da amostra em ambiente controlado e evitando perdas por volatilização (NÓBREGA et al., 2012).

Garcia (2016) demonstrou que a digestão de formas farmacêuticas contendo complexos orgânicos foi mais efetiva com o uso de água régia invertida HNO₃:HCl (3:1 V/V). A autora relatou excelente eficiência de digestão para amostras como cápsulas e comprimidos. O programa de digestão empregado incluiu uma rampa de aquecimento de 10 min até 210 °C, com manutenção da temperatura por 20 min, utilizando 5 mL da mistura ácida para 500 mg de amostra.

A aplicação da digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados, com o uso de misturas de HNO₃ e H₂O₂, representa a estratégia mais adequada para o preparo de amostras semissólidas na determinação de Ce. Essa abordagem assegura:

- Decomposição completa da matriz lipídica;

- Redução de interferências espectrais e não espectrais;
- Elevada recuperação do Ce;
- Compatibilidade com técnicas analíticas de alta sensibilidade, como ICP-MS.

Além da alta eficiência analítica, a digestão assistida por radiação micro-ondas apresenta vantagens operacionais significativas. Entre elas, destaca-se a possibilidade de padronização rigorosa dos parâmetros de digestão, como tempo, temperatura e volume de reagentes, o que contribui para a elevada reprodutibilidade dos resultados entre diferentes lotes analíticos. A adoção de sistemas automatizados com controle simultâneo de temperatura e pressão em cada frasco de digestão assegura a mineralização uniforme, mesmo em amostras com composição complexa ou heterogênea, como é o caso de formas farmacêuticas semissólidas.

Outro aspecto relevante diz respeito à segurança operacional. Os sistemas modernos de digestão por radiação micro-ondas são equipados com diversos dispositivos de proteção, incluindo sensores para monitoramento contínuo da pressão e da temperatura, mecanismos de travamento reforçado, sistemas de exaustão para liberação segura de gases, além de sistemas de detecção de aumento abrupto de pressão, que interrompem automaticamente a emissão da radiação micro-ondas em caso de risco iminente, conforme reportado por fabricantes e descrito na literatura técnica

Adicionalmente, a relação entre a massa da amostra e o volume de reagente é um fator crítico para o sucesso do processo de digestão. No caso de matrizes semissólidas, como géis ou cremes farmacêuticos, recomenda-se o uso de massas entre 250 e 500 mg por frasco reacional, combinadas a volumes de 5 a 8 mL de reagentes oxidantes, geralmente misturas de HNO_3 com H_2O_2 . Também é recomendável realizar testes de brancos analíticos de reagentes e controles de recuperação do analito utilizando materiais de referência certificados (CRMs), quando disponíveis.

A avaliação da eficiência do processo de digestão pode ser realizada por meio da determinação do teor de carbono residual (RCC). Esse parâmetro é definido como a razão entre a quantidade de carbono presente na digestão final e o teor de carbono orgânico total (TOC) originalmente contido na amostra, sendo expresso como a porcentagem de carbono remanescente após a digestão definido pela equação 1. O RCC constitui um indicador direto da eficiência da oxidação da matéria orgânica

durante o preparo de amostras. Valores reduzidos de RCC indicam maior eficiência do processo, uma vez que refletem maior conversão dos compostos orgânicos em espécies voláteis, tais como CO e CO₂. Por exemplo, um RCC de 10% implica que aproximadamente 90% da matéria orgânica foi efetivamente oxidada, permanecendo apenas 10% do carbono total na digestão final. O carbono orgânico dissolvido (DOC) corresponde à fração de carbono que permanece solubilizada na solução após o procedimento de digestão. Esse parâmetro é usualmente expresso como concentração (g.L⁻¹) e representa a quantidade absoluta de carbono presente na digestão final (BIZZI et. al., 2017). A importância desses parâmetros depende diretamente da técnica instrumental aplicada, i.e. em métodos espectroanalíticos, como ICP-OES e ICP-MS (GOUVEIA, 2001).

$$RCC = \frac{DOC}{TOC} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: RCC: teor de carbono residual (%); DOC: carbono orgânico dissolvido (mg/L); TOC: carbono orgânico total (mg/L).

Além disso, recomenda-se a inspeção visual dos digeridos para verificar a ausência de turbidez, coloração atípica ou resíduos sólidos visíveis, o que pode indicar digestão incompleta ou formação de subprodutos insolúveis.

A Tabela 1 apresenta uma síntese comparativa entre essas duas abordagens de preparo de amostras.

Tabela 1. Comparação entre digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado e extração líquido-líquido para determinação de cério em matrizes farmacêuticas semissólidas.

Característica	Digestão Ácida por Micro-ondas	Extração Líquido-Líquido
Tipo de preparo	Destrutivo (mineralização completa)	Não destrutivo (seletivo)
Equipamento necessário	Forno de micro-ondas com frascos fechados	Funis separadores, vidrarias, solventes
Tempo	Médio a longo	Curto a médio
Reagentes	HNO ₃ , H ₂ O ₂	Complexantes orgânicos (ex.: PMFFA)
Custo operacional	Elevado	Médio a baixo
Geração de resíduos	Ácidos e peróxido de hidrogênio (pequeno volume)	Solventes orgânicos (maior volume)
Seletividade	Baixa (não seletivo)	Alta (dependente do complexante)
Compatibilidade com ICP-MS / ICP-OES	Excelente	Excelente (com redissolução ácida) ou dependente do solvente orgânico

2.3 Técnicas Instrumentais

2.3.1 ICP-OES

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) consolidou-se como uma das técnicas analíticas mais versáteis e robustas para a determinação multielementar em ampla faixa de concentrações. Desde o seu desenvolvimento, na década de 1970, representou um marco na evolução da espectrometria atômica, permitindo a análise simultânea de dezenas de elementos com elevada precisão, sensibilidade e maior tolerância às matrizes complexas, quando comparada aos métodos clássicos (BOSS, 2004). Atualmente, sua aplicação abrange diferentes áreas do conhecimento, incluindo o controle de qualidade farmacêutico, análises ambientais, estudos geológicos, pesquisa agrícola e monitoramento de alimentos (KHAN, 2022).

O princípio da ICP-OES baseia-se na emissão de radiação característica por átomos e íons excitados em um plasma de argônio mantido por radiofrequência. Após a introdução da amostra no plasma, ocorrem processos sucessivos de dessolvatação, vaporização, atomização e excitação das espécies químicas. No retorno ao estado fundamental, esses átomos e íons liberam fótons em comprimentos de onda específicos, determinados pela estrutura eletrônica de cada elemento (GHOSH, 2013).

O plasma opera em temperaturas entre 6.000 e 10.000 K, condições suficientes para garantir a atomização eficiente da maioria dos elementos químicos e reduzir interferências químicas. A energia necessária para sustentar o plasma é fornecida por um gerador de radiofrequência (RF), acoplado a uma bobina indutora que transfere energia ao gás, tipicamente argônio de alta pureza, por indução eletromagnética (GHOSH, 2013).

O desempenho da ICP-OES está intimamente relacionado à configuração de seus principais componentes: sistema de introdução de amostra, tocha de plasma, gerador de RF, sistema óptico e detectores.

Sistema de introdução de amostra: as amostras, geralmente em soluções aquosas, são convertidas em aerossóis por nebulizadores acoplados a câmaras de nebulização. Os nebulizadores mais utilizados incluem os modelos concêntrico pneumático, de fluxo cruzado, Babington e ultrassônico, cada qual

apresentando vantagens em termos de eficiência de nebulização, resistência a entupimentos e adequação a amostras com elevados sólidos dissolvidos (TODOLI, 2011; GHOSH, 2013). A câmara de nebulização seleciona gotículas da ordem de 5 μm que seguem para o plasma, descartando o excedente (GHOSH, 2013).

Tocha de plasma e gases: constituída por três tubos concêntricos de quartzo, a tocha direciona fluxos distintos de gás: externo (plasma), intermediário (auxiliar) e interno (aerossol da amostra). Assim, a principal função da tocha é produzir um ambiente adequado para a geração e sustentação do plasma, garantindo estabilidade, refrigeração e correta introdução da amostra. (GHOSH, 2013).

Gerador de radiofrequência: responsável por fornecer a energia ao plasma, opera em frequências regulamentadas de 27 ou 40 MHz, com potências que variam tipicamente de 700 a 1500 W. Sistemas modernos empregam geradores de frequência controlada ou de frequência livre, permitindo ajustes automáticos frente a variações no plasma (GHOSH, 2013).

Em seguida, os fótons emitidos no ICP-OES são coletados por meio de um espelho côncavo ou de uma lente, que focaliza a radiação e forma uma imagem do plasma na fenda de entrada do sistema óptico. Esse feixe é direcionado a um dispositivo de seleção de comprimento de onda, denominado policromador, responsável por isolar e transferir o comprimento de onda característico do elemento de interesse. A radiação selecionada é então detectada por fotodetectores, que a convertem em sinais elétricos. Esses sinais são posteriormente processados, amplificados por integradores e registrados em computador para tratamento dos dados (KHAN, 2022).

O monocromador pode estar acoplado a detectores simples, como tubos fotomultiplicadores (PMT), empregados em análises de elemento único, ou a sistemas mais avançados, como policromadores associados a detectores de estado sólido. Esses permitem a determinação simultânea de múltiplos elementos — em alguns casos, até 70 elementos em uma única medição (KHAN, 2022). A Figura 1 apresenta um esquema ilustrativo do princípio de funcionamento da técnica de ICP-OES.

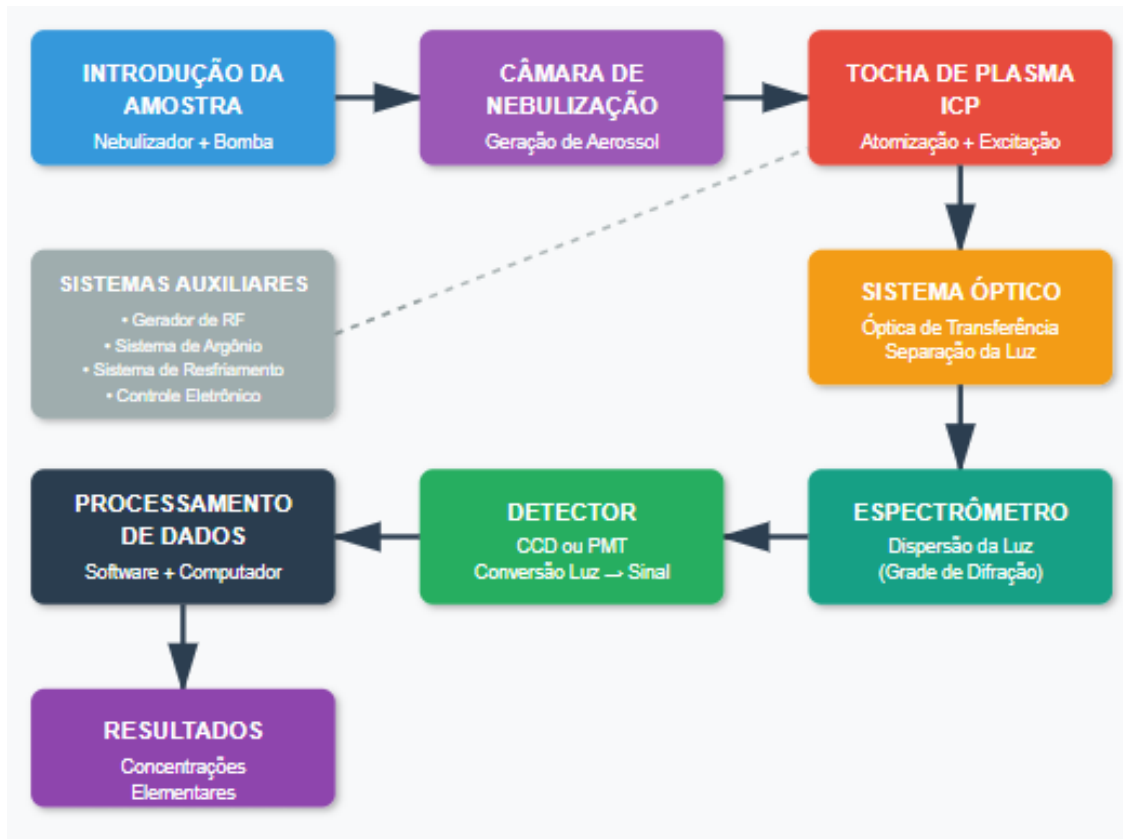


Figura 1. Representação esquemática dos principais componentes de um instrumento ICP-OES.

Assim como outras técnicas espectrométricas baseadas em plasma, o ICP-OES está sujeito a diferentes tipos de interferências que podem comprometer a exatidão, a precisão e os limites de detecção do método analítico.

As interferências espectrais são particularmente numerosas e mais difíceis de eliminar. Existem mais de 50.000 linhas espectrais documentadas para a técnica, o que evidencia a elevada complexidade do espectro de emissão gerado no plasma. A presença de componentes da matriz pode ocasionar problemas consideráveis, tornando obrigatório o uso de espectrômetros de alta resolução para a análise de amostras complexas, como ligas metálicas, materiais biológicos e rochas (TYLER, [s.d.]).

Em sistemas simultâneos de ICP-OES, são amplamente empregadas correções interelementares e procedimentos de correções espectrais. Entretanto, tais estratégias apresentam sucesso limitado, principalmente em função do aumento da incerteza associada aos resultados obtidos. Além disso, o sinal de fundo (background) no ICP-OES pode apresentar-se elevado ou estruturado, exigindo correção realizada fora da linha analítica (off-line). Quando disponível, a correção dinâmica sofisticada

de fundo constitui ferramenta extremamente útil para melhorar a exatidão dos resultados (TYLER, [s.d.]).

Outro fator relevante refere-se à formação de espécies moleculares no plasma, como OH, que podem originar picos ou bandas espectrais adicionais. Essas contribuições tornam-se particularmente críticas na determinação de analitos em baixas concentrações, podendo degradar os limites de detecção em amostras reais (TYLER, [s.d.]).

Assim como na técnica de ICP-MS, o ICP-OES pode utilizar padrão interno como estratégia para compensar efeitos de matriz, incluindo efeitos de transporte no processo de introdução de amostra, geralmente efetuado por nebulização pneumática, e diferenças de viscosidade entre amostras e soluções de calibração (TYLER, [s.d.]).

Adicionalmente, interferências decorrentes de elementos facilmente ionizáveis podem alterar o equilíbrio de ionização no plasma. Esse efeito pode ser minimizado por meio da escolha criteriosa das condições analíticas específicas para cada elemento ou pela adição de um supressor de ionização, obtido pela adição de excesso de um elemento do Grupo I da tabela periódica (TYLER, [s.d.]).

2.3.2 ICP-MS

A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é uma técnica instrumental de alta sensibilidade e seletividade, amplamente utilizada para a determinação multielementar e análise isotópica, particularmente em concentrações de traços e ultratraços (PROFROCK,2012). Desenvolvida comercialmente a partir de 1983, essa técnica consolidou-se como ferramenta essencial em áreas que exigem alta precisão analítica, como geociências, ciências ambientais, indústria farmacêutica e ciências forenses (AMMANN, 2007)

O princípio do ICP-MS baseia-se na combinação de um plasma de argônio, gerado por acoplamento indutivo de radiofrequência, com um analisador de massas. A amostra, geralmente em solução aquosa, é convertida em um aerossol por um sistema de nebulização e introduzida no plasma. Nesse ambiente, com temperaturas da ordem de 6.000 a 10.000 K, ocorre a atomização e posterior ionização das espécies presentes. Os íons formados são então extraídos do plasma através de um sistema de interface composto, geralmente, por dois cones metálicos (cone de amostragem e cone de skimmer), que conduzem os íons para a região de

vácuo do espectrômetro. Em seguida, os íons são separados segundo sua razão massa/carga (m/z) por um analisador de massas e detectados por sistemas eletrônicos de alta sensibilidade (AMMANN, 2007; LINGE, 2009).

A instrumentação básica de um ICP-MS inclui diferentes subsistemas, cada um com função específica. A tocha de plasma, fabricada em quartzo, é composta por três tubos concêntricos por onde circula o gás de argônio. A bobina de indução, conectada a um gerador de radiofrequência (tipicamente de 27 ou 40 MHz), fornece a energia necessária para o acoplamento indutivo e a formação do plasma. O sistema de interface contém o cone de amostragem e o cone de skimmer, que permitem a transição do plasma à pressão atmosférica para a câmara de vácuo, minimizando perdas e preservando a integridade dos íons formados. O sistema de vácuo garante condições adequadas para o transporte e focalização dos íons. O analisador de massas, que pode ser do tipo quadrupolo, setor magnético ou tempo de voo, separa os íons conforme sua razão m/z . Por fim, o detector, geralmente um multiplicador de elétrons, registra os sinais correspondentes aos íons incidentes, permitindo quantificação precisa (LINGE, 2009). A Figura 2 apresenta um esquema ilustrativo do princípio de funcionamento da técnica de ICP-MS.

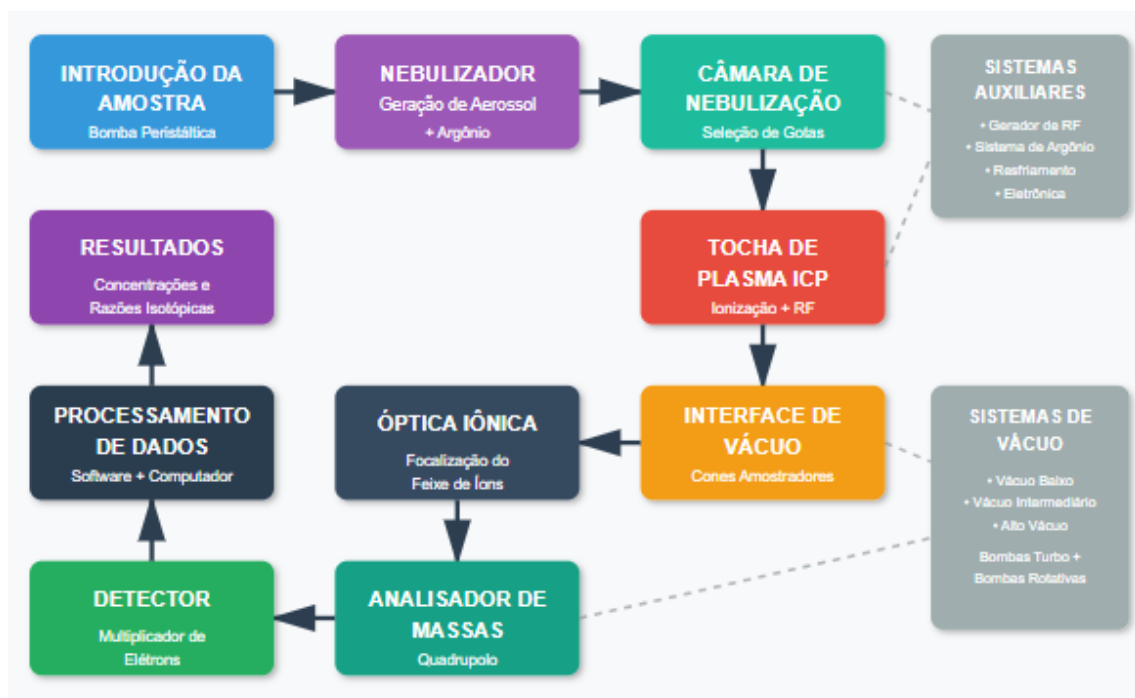


Figura 2. Representação esquemática dos principais componentes de um instrumento ICP-MS.

O desempenho do ICP-MS depende fortemente do sistema de introdução de amostra. A introdução de amostras em ICP é realizada, de forma mais comum e econômica, por meio de soluções líquidas, que exigem digestão e dissolução para obtenção de soluções homogêneas. Como alternativas, destacam-se a ablação a laser (LA-ICP-MS), que permite a análise direta de sólidos, e a vaporização eletrotérmica (ETV), que possibilita a preparação in situ com pré-concentração do analito e redução de interferências de matriz. A eficiência pode ser ainda ampliada pelo uso de nebulizadores de alto desempenho, como os ultrassônicos (USN). Técnicas que operam com baixa ou nenhuma introdução de solvente, como aerossóis secos, LA e ETV, são preferíveis, pois reduzem a formação de íons poliatômicos e o ruído espectral. Estudos comparativos evidenciam que, embora LA e ETV apresentem vantagens específicas, a nebulização em solução se destaca por sua maior reprodutibilidade e limites de detecção mais baixos, configurando-se como a técnica mais sensível para matrizes líquidas (AMMANN, 2007).

A separação dos íons pode ser realizada por diferentes tipos de analisadores de massas, cada um com características específicas. O quadrupolo é o mais utilizado, principalmente devido ao seu menor custo e à robustez operacional, fornecendo resolução unitária e elevada velocidade de varredura. Já o analisador de setor magnético distingue-se por oferecer alta resolução e excelente precisão isotópica, embora apresente maior complexidade operacional e custos significativamente mais elevados (LINGE, 2009).

A técnica ICP-MS está sujeita à ocorrência de diferentes tipos de interferências, as quais devem ser compreendidas e controladas para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos (TYLER, [s.d.]).

As interferências espectrais em ICP-MS são previsíveis e totalizam menos de 300. As principais são as interferências poliatômicas e isobáricas, que ocorrem quando uma espécie apresenta massa semelhante à do analito e não pode ser resolvida pela resolução típica do espectrômetro com arranjo quadrupolar (aproximadamente 1 u.m.a.). Exemplos incluem ^{58}Ni sobre ^{58}Fe , ^{40}Ar sobre ^{40}Ca , $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ sobre ^{56}Fe e ^{40}Ar – ^{40}Ar sobre ^{80}Se . Nesses casos, podem ser empregadas equações elementares, análogas às correções interelementares utilizadas em ICP-OES. Em muitas situações, também é possível selecionar isótopos alternativos de menor abundância natural para corrigir a interferência (TYLER, [s.d.]).

A utilização de gases mistos (pequenas porcentagens de gases como nitrogênio ou amônia adicionadas ao argônio) pode reduzir interferências em determinadas condições. A tecnologia de células de colisão e reação possibilita a determinação de baixas concentrações utilizando massas mais favoráveis, embora ainda existam ressalvas quanto à sua aplicabilidade em análises rotineiras, especialmente quanto à escolha ideal do gás em laboratórios de rotina (TYLER, [s.d.]).

O sinal de fundo no ICP-MS é extremamente baixo, tipicamente inferior a 10 contagens por segundo, não representando, em geral, um problema analítico. Essa característica é uma das principais razões para os limites de detecção superiores da técnica (TYLER, [s.d.]).

Ácidos como HCl, HClO₄, H₃PO₄ e H₂SO₄ também podem causar problemas espectrais significativos em ICP-MS, devido à formação de interferências poliatômicas envolvendo íons como Cl⁺, P⁺ e S⁺ combinados com espécies da matriz, como Ar⁺, O⁺ e H⁺. Exemplos incluem ³⁵Cl⁴⁰Ar sobre ⁷⁵As e ³⁵Cl¹⁶O sobre ⁵¹V. Dessa forma, a utilização desses ácidos deve ser evitada sempre que possível. As soluções para análise por ICP-MS são normalmente preparadas em ácido nítrico, embora cuidados adicionais possam ser necessários (TYLER, [s.d.]).

Íons duplamente carregados podem causar interferências espectrais na metade da razão massa/carga (m/z) do íon monovalente correspondente, como ¹³⁸Ba⁺ sobre ⁶⁹Ga⁺ ou ²⁰⁸Pb⁺ sobre ¹⁰⁴Ru⁺. Essas interferências são pouco frequentes e podem ser minimizadas por meio da otimização das condições instrumentais (TYLER, [s.d.]).

Além das interferências espectrais, a técnica também está sujeita a efeitos de transporte que afetam a eficiência de formação do aerossol. Nesses casos, o ajuste de matriz é geralmente requerido, embora a padronização interna possa ser utilizada como alternativa. A elevada velocidade de varredura do ICP-MS proporciona resultados superiores quando se utiliza padrão interno (TYLER, [s.d.]).

Efeitos de ionização podem ocorrer em amostras contendo altas concentrações de elementos dos Grupos I e II, podendo exigir ajuste de matriz, diluição da amostra, adição de padrão, diluição isotópica, extração ou separação cromatográfica. O uso de supressores de ionização não é recomendado devido ao aumento do teor de sólidos dissolvidos (TYLER, [s.d.]).

Por fim, ocorrem os efeitos de carga espacial, principalmente após o cone skimmer, onde a densidade de carga líquida torna-se diferente de zero. A

elevada densidade de íons promove interações no feixe iônico, resultando na perda preferencial de íons leves na presença de íons pesados, como Pb^+ afetando Li^+ . A compensação pode ser realizada por ajuste de matriz, escolha criteriosa de padrões internos ao longo da faixa de massas dos analitos ou diluição da amostra, sendo essa última considerada o método mais simples e efetivo (TYLER, [s.d.]).

Sendo assim, quando se comparam as duas técnicas, as principais vantagens do ICP-MS incluem limites de detecção ultrabaixos (ng/L – pg/L), ampla faixa linear, alta sensibilidade, capacidade multielementar e possibilidade de determinação de razões isotópicas. Como limitações, destacam-se o custo elevado de aquisição e manutenção, a necessidade de gases de alta pureza e a suscetibilidade a interferências, que exigem estratégias de correção adequadas.

O ICP-OES é uma técnica consolidada para a determinação de elementos traço, mas apresenta diferenças importantes quando comparada ao ICP-MS. Ambas as técnicas utilizam a mesma fonte de plasma indutivamente acoplado, porém divergem no modo como os íons do analito são processados. No ICP-OES, os fótons emitidos pelos átomos excitados no plasma são detectados após seleção espectral, enquanto no ICP-MS os íons formados são introduzidos em um espectrômetro de massas, onde são separados de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). Essa distinção confere ao ICP-MS maior sensibilidade e seletividade, uma vez que a detecção em função de m/z reduz sinais de fundo e possibilita a identificação específica dos elementos (KHAN, 2022).

2.3.3 Aplicações na indústria farmacêutica

A segurança e a eficácia dos produtos farmacêuticos são questões fundamentais na área farmacêutica. O monitoramento das impurezas elementares é indispensável, uma vez que elementos potencialmente tóxicos podem estar presentes como contaminantes oriundos de matérias-primas, processos de fabricação, equipamentos ou embalagens. Em níveis inadequados, essas impurezas podem comprometer a segurança do medicamento e gerar efeitos farmacológico-toxicológicos indesejados (PINHEIRO, 2022).

Conforme observado em vários estudos, na maioria dos casos, os elementos-alvo presentes em amostras farmacêuticas comerciais encontram-se em baixas concentrações, inclusive abaixo dos respectivos limites de quantificação do método analítico. Além disso, um banco de dados com excipientes contendo

impurezas elementares confirma que as concentrações dessas impurezas nos excipientes são geralmente baixas. De modo semelhante, na análise de suplementos alimentares, como produtos botânicos, multivitamínicos, creatina e suplementos esportivos, impurezas elementares que são consideradas críticas (arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo), também ocorrem em baixas concentrações. Portanto, é essencial desenvolver métodos analíticos altamente sensíveis e seletivos para a determinação elementar em substâncias farmacêuticas, garantindo a segurança e a eficácia dos medicamentos destinados ao consumo humano (PINHEIRO, 2022).

Nesse contexto, as técnicas de espectrometria baseadas em plasma indutivamente acoplado, especificamente ICP-MS e ICP-OES, consolidaram-se como ferramentas analíticas essenciais na indústria farmacêutica para determinação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos e ingredientes farmacêuticos ativos, especialmente após a implementação dos capítulos gerais da USP 232 e 233, os quais estabelecem limites rigorosos para elementos tóxicos, tornando-se uma exigência regulatória crítica. Métodos baseados em ICP são particularmente adequados para atender aos requisitos da USP, oferecendo capacidade multi-elementar, alta sensibilidade e ampla faixa dinâmica linear, características que atendem perfeitamente às demandas de detecção e quantificação simultânea desses elementos em concentrações da ordem de traços (BARIN et al., 2016).

O ICP-MS destaca-se pela sua excepcional sensibilidade, possibilitando a detecção de elementos em níveis de partes por trilhão (ppt), fundamental para determinação de elementos altamente tóxicos como arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo. Estudos demonstraram a eficácia do ICP-MS na determinação de impurezas elementares em ingredientes farmacêuticos ativos (IFA), utilizando digestão em câmara de reação única em conformidade com os requisitos da USP 232 e 233. A técnica permite a análise simultânea de múltiplos elementos com mínima quantidade de amostra, que se torna uma vantagem valiosa principalmente quando se trabalha com IFA's de alto custo (MULLER et al., 2015). Estudos também demonstram que as técnicas baseadas em plasma aplicadas à determinação de arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo em diversos medicamentos e excipientes evidenciam a robustez desses métodos para análises rotineiras de controle de qualidade na área farmacêutica, especialmente quando associadas a procedimentos simples de preparo de amostras por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas. (SILVA, 2017).

O ICP-OES, embora apresente limites de detecção na ordem de partes por bilhão (ppb), superiores ao ICP-MS, oferece vantagens significativas em termos de robustez operacional, menor custo de aquisição e manutenção, e menor suscetibilidade a interferências de matriz. Estudos que avaliaram o procedimento de diluição direta para determinação de impurezas inorgânicas em amostras farmacêuticas líquidas por ICP-OES, demonstraram que abordagens simples de preparo de amostra podem ser eficazes quando adequadamente validadas, tornando o ICP-OES uma alternativa atrativa para laboratórios que buscam equilibrar sensibilidade analítica com viabilidade econômica (PINHEIRO, 2019).

Um dos desafios críticos na análise farmacêutica por ICP é o preparo de amostra adequado, especialmente para matrizes complexas. Trabalhos investigaram digestão assistida por radiação micro-ondas para medicamentos em conformidade com a USP, demonstrando que métodos simplificados podem ser eficazes quando otimizados (PINHEIROS, 2019). Abordagens mais complexas também têm sido exploradas, como a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) baseadas em diferentes tipos de solventes. Nesse contexto, técnicas de pré-concentração fundamentadas em microextração, especialmente a DLLME, têm sido amplamente aplicadas devido às suas vantagens, como simplicidade, rapidez, baixo custo, facilidade de operação e elevados fatores de enriquecimento, mesmo utilizando volumes extremamente reduzidos de solvente extrator. Após o procedimento de DLLME, o baixo volume de solvente extrator obtido é geralmente dissolvido em outro solvente orgânico miscível, antes da introdução do extrato por nebulização pneumática, etapa que possibilita a análise instrumental subsequente. (PINHEIRO, 2021).

Um estudo crítico sobre métodos de digestão para determinação de elementos tóxicos em insumos farmacêuticos tricíclicos por ICP-MS foi realizado, evidenciando que a escolha do método de preparo de amostra é crucial para obtenção de resultados precisos e exatos (BARIN et al., 2014). Também foi feita a determinação de impurezas elementares em amostras de omeprazol genérico e de referência, demonstrando a aplicabilidade das técnicas de ICP para estudos comparativos de qualidade farmacêutica (PINHEIRO et al., 2020).

Outra aplicação relevante é a determinação de macro e micronutrientes por meio das técnicas ICP-MS e ICP-OES em suplementos esportivos. Os benefícios desses suplementos estão associados ao seu elevado valor biológico, uma vez que

contêm peptídeos bioativos que participam da síntese proteica, da regeneração e do ganho de massa muscular, além de exercerem funções antimicrobianas e reguladoras do sistema imunológico. Os macronutrientes desempenham papéis fundamentais em diversas funções metabólicas: cálcio, magnésio e fósforo são essenciais para a regeneração óssea e muscular; sódio e potássio são indispensáveis para a manutenção da pressão osmótica celular e o enxofre é necessário para a composição de aminoácidos como metionina e cisteína. Contudo, a ingestão inadequada desses elementos pode causar disfunções metabólicas, tornando indispensável o monitoramento de suas concentrações em suplementos esportivos (BABOS et al., 2021).

Paralelamente, as técnicas de ICP-MS e ICP-OES também são aplicadas na determinação do teor de compostos inorgânicos que possuem função tecnológica ou terapêutica nos medicamentos. Nesse caso, o objetivo não é apenas monitorar contaminantes, mas garantir que a quantidade declarada de sais, minerais ou espécies metálicas ativas esteja dentro das especificações estabelecidas, assegurando eficácia e qualidade farmacêutica. Embora as referências foquem predominantemente em ingredientes farmacêuticos ativos e formulações líquidas ou sólidas, os princípios de preparo de amostra e análise instrumental são extensíveis a matrizes semi-sólidas, como cremes e géis. A combinação adequada de técnicas de digestão, microextração ou diluição direta, seguida de análise por ICP-MS ou ICP-OES, permite abordagens robustas para determinação elementar em diversas matrizes farmacêuticas.

Dessa maneira, a aplicação das técnicas analíticas de ICP-MS e ICP-OES na indústria farmacêutica consolida-se como ferramenta essencial para assegurar a conformidade com as normas vigentes, padronizar a análise elementar e garantir a segurança, a eficácia e a qualidade dos medicamentos destinados ao consumo humano.

2.4 Regulamentações

2.4.1 Capítulos Gerais USP <730>, <232>, <233>

O Capítulo Geral <730> – *Plasma Spectrochemical Analysis*, da *United States Pharmacopeia* (USP), estabelece os critérios técnicos para a análise espectroquímica de elementos utilizando ICP-OES e ICP-MS. Esse capítulo foi

introduzido na USP 29 – NF 24, com vigência a partir de 1º de janeiro de 2006, e permanece como referência técnica relevante para a determinação de metais em produtos farmacêuticos (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2018).

No Brasil, embora não exista uma regulamentação específica que estabeleça parâmetros técnicos detalhados para a quantificação de elementos por ICP-OES ou ICP-MS em medicamentos, a adoção das diretrizes da USP <730> tem sido amplamente aceita como um referencial técnico internacional para garantir a qualidade dos resultados analíticos.

O Capítulo USP <730> descreve os principais parâmetros que devem ser avaliados e controlados durante a execução de análises por técnicas espectroquímicas de plasma. Dentre eles, destacam-se:

- Precisão (repetibilidade e precisão intermediária);
- Exatidão;
- Especificidade/Seletividade;
- Limite de Detecção (LOD);
- Limite de Quantificação (LOQ);
- Linearidade e faixa de trabalho;
- Robustez;
- Preparação e diluição de amostras e padrões de referência;
- Controle de interferências espectrais e de matriz;
- Uso de materiais de referência certificados (CRMs);
- Verificação contínua do desempenho analítico.

Além desses parâmetros, o capítulo enfatiza a importância do uso de instrumentação adequada, controle ambiental, calibração regular, validação dos métodos e adoção de Boas Práticas Laboratoriais (*Good Laboratory Practices – GLP*). Também recomenda a documentação completa dos procedimentos, incluindo registros de condições operacionais, preparo de amostras, padrões, curvas analíticas e relatórios de validação (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2018).

No contexto desta dissertação, o Capítulo USP <730> foi utilizado como base normativa para o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos por ICP-OES e ICP-MS aplicados à quantificação de Ce em formulações farmacêuticas semissólidas. Sua adoção permitiu assegurar conformidade com exigências internacionais de qualidade e garantir a rastreabilidade e confiabilidade dos dados analíticos obtidos.

De forma complementar, os capítulos USP <232> e USP <233> representam marcos regulatórios específicos para o controle de impurezas elementares em medicamentos. O capítulo <232> estabelece limites de exposição diária para elementos potencialmente tóxicos, considerando as diferentes vias de administração e classificando-os de acordo com sua toxicidade e impacto à saúde. Dessa maneira, orienta a indústria farmacêutica quanto aos elementos que devem ser monitorados e aos níveis máximos aceitáveis, assegurando que a presença dessas impurezas permaneça dentro de parâmetros de segurança. Já o capítulo <233> apresenta os critérios metodológicos e parâmetros de validação a serem seguidos para a determinação dessas impurezas, incluindo requisitos de exatidão, precisão, especificidade, robustez e limites de detecção e quantificação. Esse capítulo também padroniza os parâmetros de desempenho que devem ser avaliados para garantir que os métodos empregados sejam confiáveis e reprodutíveis, reforçando a aplicabilidade de técnicas como ICP-MS e ICP-OES no monitoramento regulatório.

Assim, a integração das diretrizes descritas nos capítulos USP <730>, USP <232> e USP <233> possibilita não apenas o cumprimento de exigências regulatórias internacionais, mas também o avanço na padronização e na qualidade das análises. Esses referenciais consolidam-se como diretrizes indispensáveis para o controle de qualidade de medicamentos, assegurando tanto a segurança do paciente quanto a credibilidade dos resultados laboratoriais.

2.4.2 RDC nº 166/2017

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, publicada em 24 de julho de 2017 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece os critérios obrigatórios para a validação de métodos analíticos utilizados na avaliação da qualidade de medicamentos, insumos farmacêuticos e demais produtos sujeitos à vigilância sanitária no Brasil (BRASIL, 2017). Essa resolução constitui o principal marco regulatório nacional no que se refere à validação analítica, sendo amplamente utilizada em processos de registro, pós-registro e monitoramento de qualidade.

A RDC nº 166/2017 define que os métodos analíticos devem ser adequados à finalidade pretendida e devem ser validados total ou parcialmente, a depender do estágio de desenvolvimento do produto e do tipo de estudo a ser

realizado. Para métodos quantitativos, os parâmetros mínimos obrigatórios a serem avaliados incluem:

- **Especificidade/seletividade** – capacidade de medir com precisão o analito na presença de componentes da matriz;
- **Linearidade** – demonstração de que a resposta do método é proporcional à concentração do analito;
- **Faixa de trabalho** – intervalo de concentração no qual o método demonstra precisão, exatidão e linearidade aceitáveis;
- **Exatidão** – medida da proximidade entre o valor experimental e o valor verdadeiro;
- **Precisão** – reprodutibilidade sob condições repetidas (*repetibilidade*) e sob condições intermediárias (precisão intermediária);
- **Limite de detecção (LOD)** – menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada;
- **Limite de quantificação (LOQ)** – menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis;
- **Robustez** – capacidade do método de permanecer insensível a pequenas variações nos parâmetros operacionais;
- **Estabilidade da amostra e do padrão** – verificação da integridade analítica ao longo do tempo e sob diferentes condições de armazenamento (BRASIL, 2017).

Adicionalmente, a resolução exige que a validação seja documentada e que os resultados obtidos sejam passíveis de rastreabilidade, com uso preferencial de materiais de referência certificados e padrões adequados. A aplicação das validações deve obedecer aos princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL), além de considerar requisitos de auditorias, inspeções e regulamentações internacionais compatíveis com o escopo do método.

A utilização simultânea dessas normas permite ao analista não apenas atender aos requisitos legais vigentes no Brasil, conforme preconizado pela ANVISA, mas também alinhar seus procedimentos analíticos às práticas adotadas

internacionalmente. Enquanto a RDC nº 166/2017 foca na validação como um todo — com ênfase na robustez metodológica e na documentação sistemática — a USP <730> orienta especificamente sobre a execução de análises espectroquímicas, detalhando aspectos como preparo de amostras, calibração, controle de interferências espectrais e uso de materiais de referência certificados.

No desenvolvimento metodológico realizado nesta dissertação, a RDC nº 166/2017 foi utilizada como norma primária para a validação dos métodos analíticos, assegurando conformidade com a regulamentação nacional. Por outro lado, o Capítulo USP <730> foi empregado como diretriz técnica especializada, especialmente nos limites estabelecidos para o uso de ICP-MS e ICP-OES na quantificação do Ce em matrizes semissólidas.

Essa integração normativa fortalece a confiabilidade dos dados obtidos, garantindo que os métodos desenvolvidos atendam simultaneamente aos critérios nacionais e às boas práticas analíticas reconhecidas internacionalmente. Tal abordagem é especialmente importante para a indústria farmacêutica, que deve assegurar não apenas a eficácia terapêutica de seus produtos, mas também a rastreabilidade e a segurança analítica durante todo o ciclo de vida do medicamento.

2.4.3 RDC nº 318/2019

A garantia da qualidade, segurança e eficácia de medicamentos está diretamente relacionada ao adequado controle de suas características físico-químicas ao longo do prazo de validade. Nesse contexto, os estudos de estabilidade desempenham papel fundamental na avaliação do comportamento do princípio ativo e da formulação frente a fatores como temperatura, umidade e luz, permitindo a definição de condições de armazenamento e período de validade.

No Brasil, os estudos de estabilidade são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da Resolução da Diretoria Colegiada nº 318/2019, que estabelece critérios técnicos para a condução desses estudos em insumos farmacêuticos ativos e medicamentos. A normativa determina que os métodos analíticos empregados para o acompanhamento do teor do princípio ativo devem ser devidamente validados e possuir capacidade de detectar alterações relevantes ao longo do tempo, sendo, portanto, indicativos de estabilidade.

Um método indicativo de estabilidade deve apresentar especificidade suficiente para distinguir o analito de possíveis produtos de degradação, impurezas ou interferentes provenientes da matriz, além de demonstrar desempenho adequado quanto à linearidade, precisão, exatidão e robustez. A validação analítica, nesse cenário, não constitui apenas uma etapa formal do desenvolvimento metodológico, mas um requisito essencial para assegurar confiabilidade aos resultados obtidos nos estudos de estabilidade.

Considerando a complexidade das matrizes semissólidas, como cremes e géis, e a necessidade de monitoramento preciso do teor de nitrato de cério como princípio ativo, torna-se imprescindível o desenvolvimento de metodologias instrumentais sensíveis e seletivas. Assim, a aplicação das técnicas de ICP-OES e ICP-MS, devidamente validadas conforme os critérios regulatórios vigentes, fundamenta a confiabilidade do método proposto como ferramenta adequada para o acompanhamento da estabilidade do medicamento.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar procedimentos analíticos para a determinação quantitativa de nitrato de cério como princípio ativo em medicamentos de formas farmacêuticas em creme e gel empregando as técnicas de ICP-OES e ICP-MS visando à aplicação no controle de qualidade.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Desenvolver e otimizar procedimentos de preparo de amostras para medicamentos com matrizes semissólidas (creme e gel), empregando estratégias de extração líquido-líquido (LLE) e digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado, considerando a eficiência de decomposição da matriz orgânica e a minimização de interferências analíticas;
- ii. Estabelecer e otimizar as condições instrumentais para a determinação de nitrato de cério por ICP-OES e ICP-MS,
- iii. Validar os procedimentos analíticos desenvolvidos de acordo com as diretrizes regulatórias vigentes, por meio da avaliação dos parâmetros de linearidade, seletividade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e robustez;
- iv. Comparar o desempenho analítico das técnicas ICP-OES e ICP-MS quanto à aplicabilidade, sensibilidade, custo operacional e adequação à rotina laboratorial;
- v. Selecionar a metodologia mais apropriada para internalização na rotina de controle de qualidade, considerando critérios técnicos, regulatórios e operacionais.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e métodos

Os equipamentos, reagentes e amostras empregados neste estudo foram gentilmente disponibilizados pelo Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

4.1 Instrumentação

O processo de digestão das amostras foi realizado em um sistema de digestão assistida por micro-ondas da marca CEM, modelo MARS-6, o qual possibilita o controle preciso de temperatura e pressão, assegurando uma decomposição eficiente e reprodutível das amostras semissólidas. O sistema dispõe de mecanismos de segurança integrados, como sensores de pressão e temperatura, que evitam sobrepressão e garantem a integridade do operador e do equipamento, medidas essas fundamentais para assegurar a confiabilidade dos resultados.

O ácido nítrico (HNO_3) utilizado nas etapas analíticas foi previamente purificado em um destilador de ácidos da marca Milestone e modelo SubCLEAN T480, que opera com base no princípio da destilação por sub-ebulição (sub-boiling). No processo de sub-ebulição (sub-boiling), utilizam-se lâmpadas de infravermelho sem contato para aquecer suavemente a superfície do líquido, mantendo-a geralmente cerca de 20 °C abaixo do ponto de ebulição. Esse aquecimento controlado evita a formação brusca de gotículas, levando a gradual produção do ácido purificado (MILESTONE, PENSE BRANCO). As vantagens desse procedimento é: 90% de economia com custos de ácidos ultra-puros a partir da purificação de ácidos de baixo custo, purificação ácida sob demanda, alta produtividade e re-purificação de ácidos contaminados (MILLESTONE, PENSE BRANCO).

Todas as partes em contato com ácidos do sistema de destilação sub-ebulição SubCLEAN da Milestone é feita de fluorpolímeros de alta pureza (MILLESTONE, PENSE BRANCO). O ácido é transferido automaticamente para o reservatório de destilação, onde é aquecido suavemente em temperatura abaixo de seu ponto de ebulição. Todo o processo de destilação é controlado por microprocessador, permitindo que o usuário defina o tempo e a potência usando um terminal de controle compacto (MILLESTONE, PENSE BRANCO). A tela do terminal é sensível ao toque, e de fácil leitura. O subCLEAN não requer água refrigerada, uma

vez que o vapor ácido rapidamente condensa na garrafa de coleta através de arrefecimento por ar forçado (MILESTONE, PENSE BRANCO).

Para o desenvolvimento do procedimento de extração líquido-líquido (LLE), foram empregados os seguintes equipamentos: balança analítica de precisão, tubos Falcon de 50 mL, agitador tipo vórtex e centrífuga.

A determinação do cério foi realizada utilizando dois sistemas instrumentais:

a) Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) da marca Thermo Scientific, modelo iCAP 7000:

- O modelo iCAP 7000 da Thermo Scientific é um equipamento de alta resolução e sensibilidade, capaz de detectar dezenas de elementos simultaneamente;
- Possui um sistema óptico duplo (axial e radial), permitindo maior flexibilidade entre análise de amostras com teores baixos (modo axial) ou altos (modo radial);
- Apresenta baixo consumo de argônio e tempo de estabilização rápido, tornando-o adequado para análises de rotina e laboratórios de controle de qualidade;
- O software Qtegra ISDS (Integrated Software for Data System) simplifica a calibração, aquisição e tratamento de dados;
- Comprimentos de onda indicados pelo programa de controle do ICP-OES: 380,152 nm; 404,076 nm e 535,353 nm. Dentre as linhas sugeridas pelo programa, foi selecionada a linha 535,353 nm, por apresentar maior intensidade de emissão associada a adequada relação sinal/ruído e menor suscetibilidade a interferências espectrais provenientes de outros elementos da matriz, conforme avaliação espectral realizada no próprio sistema de aquisição.

b) Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) da marca Agilent, modelo 7850:

- O Agilent 7850 é um modelo de última geração, conhecido por sua alta sensibilidade ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ a $\text{pg}\cdot\text{L}^{-1}$) e capacidade de correção de interferências;

- Possui um sistema de célula de colisão/reação (modo He) que reduz interferências poliatômicas comuns no ICP-MS;
- Integra o software MassHunter, que facilita a calibração automática, o controle de qualidade e o tratamento de dados;
- Apresenta modo inteligente de verificação automática da matriz (IntelliQuant), auxiliando na triagem de elementos e ajuste de diluições.

4.2 Reagentes e soluções

As curvas analíticas foram preparadas a partir de uma solução padrão de cério (Ce) 1000 mg L⁻¹ (Specsol), devidamente diluída em solução de HNO₃ 10% v/v. Todas as soluções foram preparadas utilizando água destilada e desionizada, a fim de evitar interferências provenientes de impurezas.

Para a solução de padrão interno, usou-se uma solução comercial contendo 10 mg/L de Bi, Ge, In, Li, Tb, Sc e Y.

Todas as soluções utilizadas foram preparadas a partir de materiais de referência certificados (CRMs), em conformidade com os requisitos estabelecidos pelas normas nacionais e internacionais aplicáveis.

A eficiência da digestão foi avaliada por meio da determinação do teor de carbono solúvel nas amostras digeridas, utilizando-se ICP-OES. As soluções de calibração para essa determinação foram preparadas a partir de hidrogenoftalato de potássio (C₈H₅O₄K) (J.T. Baker), em concentrações variando de 1 a 30 mg L⁻¹.

4.3 Procedimento do preparo de amostra para o desenvolvimento da metodologia analítica

Para o método de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, aproximadamente 200 mg de cada amostra foram pesados diretamente no interior dos frascos de digestão, minimizando perdas por transferência, especialmente em razão da consistência semissólida das matrizes (cremes e géis). A pesagem foi realizada diretamente no tubo do frasco digestor e, para garantir que a amostra atingisse completamente o fundo do recipiente, utilizou-se uma espátula longa, que permitiu inserir o material diretamente na base do frasco. Esse procedimento evitou a deposição de resíduos nas paredes internas, assegurando melhor contato da amostra

com o reagente ácido e prevenindo superaquecimento localizado durante a etapa de digestão.

Em seguida, adicionaram-se 10 mL de ácido nítrico (HNO_3), sendo o ácido cuidadosamente dispensado de forma circular ao longo das paredes internas do frasco, com o objetivo de promover a lavagem das superfícies e arrastar eventuais resíduos aderidos para o fundo do recipiente. Posteriormente, realizou-se uma pré-digestão por 30 min, ainda com os frascos abertos. Essa etapa desempenhou papel fundamental no processo, pois permitiu a reação inicial entre a matriz orgânica e o ácido, promovendo a liberação controlada de gases e a decomposição parcial dos constituintes mais reativos e voláteis. A pré-digestão contribuiu para reduzir a pressão interna no sistema fechado, aumentar a segurança operacional e favorecer maior eficiência na etapa subsequente de aquecimento assistido por micro-ondas.

Decorrido o tempo de pré-digestão, os frascos foram devidamente fechados e inseridos no forno de digestão por radiação micro-ondas, seguindo os parâmetros previamente otimizados de temperatura, rampas de aquecimento e tempo de permanência em cada etapa. Ao término do programa de aquecimento e após resfriamento adequado, o conteúdo de cada frasco foi quantitativamente transferido para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água destilada-desionizada, obtendo-se solução apropriada para a determinação do cério por técnica espectrométrica.

Para o desenvolvimento do procedimento de extração líquido-líquido (LLE), 550 mg das amostras foram pesadas diretamente em tubos Falcon de 50 mL. Em cada tubo, foram adicionados 5 mL de clorofórmio e 5 mL de ácido nítrico. As amostras foram agitadas em vórtex por 2 min e, em seguida, centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min, promovendo a separação das fases. Por fim, 2 mL da fase superior foram diluídos em balões volumétricos de 20 mL para posterior análise.

A definição da estratégia final de preparo de amostras a ser empregada na validação da metodologia analítica fundamentou-se em três critérios principais: (i) assegurar a máxima eficiência de disponibilização do cério, com recuperação quantitativa do analito a partir das diferentes matrizes avaliadas; (ii) garantir plena compatibilidade com o plasma de argônio, de modo que o meio de preparo não ocasionasse interferências nas determinações por ICP-OES e ICP-MS, considerando especialmente o sistema de introdução de amostras por nebulização pneumática e as condições operacionais do plasma; e (iii) atender às exigências regulatórias

aplicáveis, assegurando conformidade com as diretrizes normativas pertinentes e adequação ao controle de qualidade farmacêutico.

Adicionalmente, ainda na etapa de desenvolvimento metodológico, foram realizados ensaios preliminares de exatidão, repetibilidade e precisão intermediária com ambas as estratégias de preparo avaliadas, a fim de auxiliar tecnicamente a escolha da abordagem mais robusta, reprodutível e adequada para prosseguir com a validação formal do método. Todas as amostras utilizadas nesses estudos foram preparadas a partir do placebo do medicamento, ou seja, da matriz inativa contendo todos os excipientes do produto, na ausência do princípio ativo. Posteriormente, essas matrizes foram fortificadas com padrão de cério em níveis correspondentes a 80, 100 e 120% do teor nominal, possibilitando a avaliação dos parâmetros supracitados.

4.4 Preparo da Solução de Padrão Interno Utilizada nas Análises por ICP-MS

Em frasco plástico previamente descontaminado, adicionou-se 200 mL de água ultrapura obtida diretamente do sistema Milli-Q, seguida da adição de 5 mL de ácido nítrico purificado por sub-ebulição. Posteriormente, adicionou-se 4,0 mL de uma solução comercial de padrão interno contendo 10 mg/L de Bi, Ge, In, Li, Tb, Sc e Y.

A solução resultante apresenta concentração final de padrão interno ([PI]) igual a 200 µg/L. Essa concentração foi estabelecida de modo a permitir sua introdução contínua no sistema de análise por meio de diluição in-line, utilizando uma conexão tipo T, recurso compatível e permitido pelo modelo de ICP-MS empregado. Durante a análise, a solução de padrão interno é misturada ao fluxo da amostra, resultando em concentração aproximada de 10 µg/L no plasma.

Frequentemente, a utilização de padrão interno é fundamental em medidas por ICP-MS, pois permite corrigir variações instrumentais, flutuações no sistema de introdução de amostras e possíveis efeitos de matriz, garantindo maior exatidão e precisão aos resultados analíticos. No modo de correção por padrão interno, o sinal processado pelo programa de do equipamento corresponde à razão entre a intensidade do analito e a intensidade do padrão interno ($I_{\text{analito}} / I_{\text{PI}}$), sendo essa intensidade normalizada utilizada para a construção da curva analítica e para o cálculo das concentrações.

4.5 Procedimento de validação de método

A validação do procedimento analítico foi conduzida por meio da avaliação dos parâmetros de linearidade das curvas analíticas, seletividade, precisão (precisão e precisão intermediária), exatidão e robustez.

A especificação do teor para o medicamento em estudo estabelece uma faixa aceitável de 90–110% de nitrato de cério, considerando como valor teórico de referência 100%, equivalente a 4,00 mg·g⁻¹ (0,4%) de nitrato de cério, correspondente a 1,29 mg·g⁻¹ (0,129%) de cério (Ce).

Em todos os preparos de amostra avaliados utilizou-se o placebo do medicamento, ou seja, a formulação isenta do analito de interesse, posteriormente enriquecida com quantidades conhecidas de cério para os estudos de recuperação e avaliação de desempenho.

Cada parâmetro de validação foi investigado individualmente para as duas técnicas instrumentais aplicadas: ICP-MS e ICP-OES.

4.5.1 Seletividade

A seletividade de um procedimento para determinação do teor do ativo cério visa identificar e quantificar inequivocamente o analito na presença de outros componentes potencialmente interferentes na matriz. Para essa avaliação, além das amostras enriquecidas ao nível de 100% da concentração de cério, foi preparado também o branco utilizando o placebo, sem fortificação, submetido aos mesmos procedimentos de preparo de amostra. Embora o capítulo geral USP <730> avalie apenas os critérios de precisão ($DPR \leq 5,0\%$), para assegurar que o método forneça uma determinação precisa e confiável do cério na matriz estudada, também foi avaliada a recuperação do analito, adotando-se como critério de aceitação a faixa de 95,0–105,0%.

$$RECUPERAÇÃO \% = \frac{AM_f - branco}{C_{100\%}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: AM_f é amostra fortificada no nível 100%; $C_{100\%}$ é a concentração de cério presente no medicamento; branco: placebo do medicamento.

$$DPR (\%) = \frac{\text{desvio padrão } (s)}{\text{média } (\bar{x})} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$$\text{A média } (\bar{x}): \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{Desvio padrão } (s): \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 5})$$

4.5.2 Linearidade da curva analítica

Para o estudo da linearidade da curva analítica, foram analisados cinco níveis de concentração (80-120 %) em relação a especificação, cada um em triplicata, e os resultados obtidos foram avaliados por meio de testes estatísticos apropriados. Os principais parâmetros estatísticos comumente considerados nesse tipo de estudo incluem:

- **Homocedasticidade**

O teste de Cochran é utilizado para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos. Com base no resultado desse teste, é possível definir qual modelo de regressão linear será aplicado: o Método dos Mínimos Quadrados Ordinário (MQO), em que todos os pontos da curva possuem o mesmo peso estatístico, ou o Método dos Mínimos Quadrados Ponderado (MQP), em que cada ponto recebe um peso diferente de acordo com sua variância.

O valor de $C_{\text{calculado}}$ é definido como a razão entre a maior variância dos dados e a soma das variâncias, conforme apresentado na Equação 6. Esse valor é comparado com o valor crítico tabelado ($C_{\text{crítico}}$). Para o presente estudo, considerando cinco níveis de concentração e três replicatas por nível, o $C_{\text{crítico}}$ é 0,684. Para que o conjunto de dados seja considerado homocedástico, o $C_{\text{calculado}}$ deve ser menor que o $C_{\text{crítico}}$, indicando que as variâncias podem ser consideradas homogêneas.

$$C = \frac{S_{y_i, \max}^2}{\sum_{i=1}^p S_{y_i}^2} \quad (\text{Equação 6})$$

em que: $S_{yi,max}^2$ é a variância máxima do conjunto de dados, p é o número de observações do conjunto de dados e S_{yi}^2 é a variância das triplicatas de cada nível de concentração.

- **Equação de regressão**

A demonstração matemática da relação entre as concentrações e os sinais analíticos é expressa, no caso de correlações lineares, pela Equação 7. Os coeficientes linear e angular da reta são determinados pelo método dos mínimos quadrados, que busca minimizar a soma dos desvios quadráticos entre os pontos experimentais e a curva ajustada.

$$y = ax + b \quad (\text{Equação 7})$$

- **Coefficientes de correlação e de determinação**

O coeficiente de correlação (r) é calculado a partir da Equação 8 e indica o grau de associação entre as variáveis estudadas. O coeficiente de determinação (r^2) corresponde ao quadrado do coeficiente de correlação e representa a proporção da variabilidade do sinal analítico que pode ser explicada pela concentração. Esses coeficientes permitem avaliar o grau de correlação entre concentração e sinal analítico, sendo essenciais para a interpretação da linearidade do método.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \times (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{Equação 8})$$

em que: n é o número total de observações, x_i é o valor da concentração de um dos pontos, \bar{x} é a concentração média das concentrações, y_i é o valor do sinal analítico de um dos pontos e \bar{y} é o sinal analítico médio.

- **ANOVA – Teste F**

O teste F, parte da análise de variância (ANOVA) aplicada à regressão linear, é utilizado para verificar se a resposta analítica apresenta variação

estatisticamente significativa em função da concentração. Ou seja, o teste avalia a significância do coeficiente angular da curva, confirmando se a relação entre concentração e sinal analítico é efetivamente linear.

Conforme orientam os compêndios, a significância estatística da regressão é um dos critérios fundamentais para a aceitação da linearidade. O valor de F calculado ($F_{\text{calculado}}$) é obtido pela Equação 9 e comparado ao valor crítico tabelado ($F_{\text{crítico}}$). Para cinco pontos de concentração, o $F_{\text{crítico}}$ adotado é 6,414.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{SS_{\text{regr}}/1}{SS_{\text{resid}}/(n-2)} \quad (\text{Equação 9})$$

em que: SS_{regr} é o somatório de $(y_{\text{teórico}_i} - y_{\text{medido}})$ ao quadrado, sendo i cada um dos pontos estudados, SS_{resid} é o somatório de $(y_{\text{estimado}_i} - y_{\text{teórico}_i})$ ao quadrado, sendo i cada um dos pontos estudados e n o número de pontos estudados na regressão.

- **Teste de significância de intercepto**

Avalia-se se o coeficiente linear (b) é significativamente diferente de zero, indicando se há intercepto estatisticamente relevante na equação de calibração. Para essa verificação, aplica-se o teste t de Student, no qual o valor de $t_{\text{calculado}}$ (obtido pela Equação 10) é comparado ao valor de t_{tabelado} , considerando o número de replicatas e o nível de significância adotado. Para três replicatas e nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), o t_{tabelado} é 4,30.

$$t_{\text{calculado}} = (\bar{x} - \mu) \times \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (\text{Equação 10})$$

em que: \bar{x} é a média dos valores de interceptos, μ é o valor conhecido, nesse caso zero, n é o número de replicatas de interceptos e s é o desvio-padrão dos valores de interceptos.

- **Avaliação dos resíduos**

Os resíduos correspondem às diferenças entre os valores experimentais observados e os valores teóricos previstos pela regressão linear. A análise desses

resíduos permite verificar a existência de valores discrepantes (outliers), tanto no conjunto total de dados quanto em cada nível de concentração.

A identificação de possíveis discrepâncias é realizada por meio do teste de Grubbs, no qual se calcula o valor de G (conforme Equação 11) para cada resíduo e o compara com o valor crítico tabelado.

Quando o valor de $G_{\text{calculado}}$ é superior ao $G_{\text{crítico}}$, o ponto é considerado discrepante, devendo ser avaliado quanto à sua exclusão ou justificativa.

$$G = \frac{|valor - \bar{x}|}{s} \quad (\text{Equação 11})$$

em que: $valor$ é o valor que está sendo avaliado; \bar{x} é a média do conjunto de dados; e s é o desvio-padrão do conjunto de dados.

O teste de Shapiro–Wilk é utilizado para verificar se os resíduos seguem uma distribuição normal, condição fundamental para a validade dos testes estatísticos aplicados na avaliação da linearidade. Nesse procedimento, calcula-se o valor de W (de acordo com as Equações 12 e 13), o qual é posteriormente comparado ao valor crítico tabelado.

Para o conjunto de dados analisado, o valor crítico de W é 0,881. Quando o $W_{\text{calculado}}$ é maior que o valor crítico, conclui-se que os resíduos apresentam distribuição normal.

$$W = \frac{b}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Equação 12})$$

$$b = \sum_{i=1}^n \alpha_{n-i+1} (\gamma_{n-i+1} - \gamma_i) \quad (\text{Equação 13})$$

em que: x_i é a concentração em cada ponto estudado, \bar{x} é a média das concentrações, n é o número total de dados e é um valor tabelado.

O teste de Durbin–Watson é aplicado ao conjunto de resíduos com o objetivo de verificar a presença de autocorrelação entre os valores. Assim como nos demais testes, calcula-se um valor, DW (equação 14), o qual é comparado a um valor crítico, 1,5 para o conjunto de dados estudado neste trabalho.

$$DW = \frac{\sum_{t=2}^T (\hat{e}_t - \hat{e}_{t-1})}{\sum_{t=1}^T (\hat{e}_t)^2} \quad (\text{Equação 14})$$

em que: \hat{e} são os resíduos de cada ponto de concentração e τ a quantidade total de resíduos.

Na tabela 2 é apresentado um resumo dos parâmetros de linearidade supracitados.

Tabela 2. Critérios de aceitação de linearidade.

Critérios de aceitação	
Coeficiente de correlação	$\geq 0,990$
Coeficiente de determinação	Informativo
Significância do coeficiente angular (Teste F)	$F_{Cal} > F_{Tab} (6,414)$
Coeficiente linear (Teste T)	$T_{Cal} < T_{Crítico} (4,30)$
Homocedasticidade (Teste de Cochran)	$C_{Cal} < C_{Tab} (0,684)$
Normalidade (Shapiro Wilk)	$W_{Cal} > W_{Crítico} (0,881)$
Independência (Durbin Watson)	$D \geq 1,5$
Avaliação de Outliers dos resíduos (Grubbs)	Resultado de Grubbs $<$ Valor crítico (2,548)

4.5.3 Exatidão

Para avaliar a exatidão do método analítico, que indica o quão próximos os resultados obtidos estão dos valores considerados verdadeiros ou de referência, foram realizadas nove preparações de cada matriz: três no nível de 80%, três no nível de 100% e três no nível de 120% da concentração de referência do Ce ($1,29 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). O critério de aceitação adotado para a exatidão conforme o capítulo geral USP <730>, foi a avaliação da faixa recuperação (95,0–105,0%), a qual está dentro da especificação do produto (90–110%) garantindo que não há risco de os resultados extrapolarem os limites de qualidade estabelecidos. O cálculo é demonstrado pela equação 1.

4.5.4 Precisão

Precisão é a medida de quão próximos entre si estão os resultados obtidos em um conjunto de determinações repetidas sob condições definidas, independentemente de estarem próximos do valor verdadeiro (isso é avaliado pela

exatidão). A avaliação da precisão foi conduzida em duas etapas: repetibilidade e precisão intermediária, conforme os critérios de aceitação orientados capítulo geral USP <730>.

Para a repetibilidade, foram determinadas as concentrações de seis soluções amostras preparadas independentemente no nível de 100% da concentração de Ce. O critério de aceitação adotado foi um desvio padrão relativo (DPR) máximo de 5,0%, garantindo que o método apresente resultados consistentes e reprodutíveis sob condições idênticas de análise.

Para a avaliação da precisão intermediária, o teste de repetibilidade foi realizado novamente, porém em condições distintas, incluindo dia diferente e analista diferente. Nesse ensaio, foram consideradas 12 amostras e o critério de aceitação estabelecido foi $DPR \leq 8,0\%$, garantindo que o método mantenha precisão adequada mesmo sob pequenas variações de execução. Os cálculos de DPR são mostrados pela equação 2.

4.5.5 Robustez

A robustez, segundo o capítulo geral USP <730>, refere-se à capacidade do método de manter resultados confiáveis frente a pequenas variações nos parâmetros experimentais. No presente estudo, a robustez foi avaliada considerando situações em que o analista poderia cometer erros ao ajustar a metodologia ou variações na capacidade instrumental, mesmo que tais condições representem alterações maiores do que as normalmente esperadas.

A RDC 166/17, embora estabeleça diretrizes para validação de métodos analíticos, não abrange especificamente as técnicas instrumentais adotadas neste trabalho. Por esse motivo, os critérios de robustez foram seguidos conforme a USP <730>, que não especifica valores ou parâmetros fixos, recomendando apenas que as variações sejam avaliadas criticamente. Dessa forma, as alterações propostas foram analisadas quanto à sua influência no desempenho do método, e os resultados obtidos foram apresentados de maneira detalhada, garantindo a confiabilidade do procedimento mesmo diante de possíveis desvios operacionais ou instrumentais. O critério de aceitação, segundo o capítulo geral USP <730>, foi definido com base na precisão intermediária previamente estabelecida ($DPR \leq 8,0\%$). Adicionalmente, foi

verificado se os resultados obtidos atendiam à faixa de especificação estabelecida para o produto, compreendida entre 90% e 110% no nível 100% da especificação.

4.6 Condições operacionais ICP-OES e ICP-MS

Os parâmetros operacionais do ICP-OES e ICP-MS que foram aplicados para validação analítica estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Condições operacionais do ICP-OES, modelo iCAP 7000 da Thermo Scientific

Parâmetro	Valor selecionado
Comprimento de onda	535,353 nm
Modo de Leitura	Axial
Câmara de nebulização	Ciclônica
Tempo de exposição UV	15 s
Potência de rádio frequência UV	1350 W
Fluxo do gás de nebulização UV	0,7 L/min
Tempo de exposição VIS	5 s
Potência da rádio frequência VIS	1350 W
Vazão do gás de nebulização VIS	0,7 L/min
Vazão do gás do plasma	10 L/min
Vazão do gás auxiliar	0,2 L/min
Velocidade da bomba peristáltica	50 rpm

Tabela 4. Condições operacionais do ICP-MS, modelo 7850 da Agilent

Parâmetro	Valor selecionado
Potência de rádio frequência aplicada	1550 W
Profundidade de amostragem	10,0 mm
Vazão do gás do plasma	15 L/min
Vazão do gás de nebulização	1,05 L/min
Rotação da bomba peristáltica	0,10 rps durante aquisição (Nebulizer Pump) e 0,5 rps durante a captação da amostra (Uptake Speed - 30 s)
Vazão do gás auxiliar	OFF
Gás de colisão	He
Vazão de He	5,0 mL/min
Padrão Interno monitorado	In (115)
Massa monitorada do Ce	140

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e discussão

5.1 Desenvolvimento da Metodologia Analítica

5.1.1 Preparo de amostra

Com o intuito de estabelecer a estratégia mais adequada para o desenvolvimento de um procedimento analítico que contemplasse meios de preparo de amostras eficazes, rápidos e seguros para as matrizes estudadas, foram conduzidos estudos sistemáticos de desenvolvimento, baseados na avaliação dos parâmetros de exatidão, repetibilidade e precisão intermediária. O objetivo da validação de procedimentos por ICP-OES ou ICP-MS é demonstrar que a medição é adequada à finalidade a que se destina, incluindo a determinação quantitativa do componente principal de uma substância medicamentosa ou de um medicamento.

Embora amostras sólidas e semi-sólidas possam ser analisadas por essas técnicas, geralmente é necessário convertê-las em soluções, conforme indicado na monografia individual, utilizando solventes orgânicos ou meios ácidos/básicos compatíveis com o instrumento. De acordo com a USP <730>, amostras que não apresentam solubilidade adequada requerem etapa prévia de digestão.

Nesse contexto, foram investigadas duas estratégias distintas de preparo de amostras: a extração líquido-líquido (LLE) e a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado. A comparação entre essas abordagens permitiu avaliar o desempenho quanto à eficiência de recuperação, reprodutibilidade e adequação à técnica instrumental selecionada. Os critérios de aceitação adotados para cada parâmetro encontram-se descritos no item 4.4 desta dissertação.

Destaca-se que, na etapa de desenvolvimento e otimização do preparo de amostras, optou-se pela utilização da técnica ICP-OES, por se tratar de uma técnica mais compatível com as concentrações esperadas de analito nas matrizes avaliadas, além de apresentar robustez, ampla faixa linear de trabalho e menor suscetibilidade a interferências em níveis de concentração mais elevados. A escolha do ICP-OES também se mostrou adequada sob o ponto de vista operacional e econômico, favorecendo a condução de múltiplos ensaios durante a etapa de desenvolvimento metodológico.

Adicionalmente, os resultados obtidos foram avaliados quanto à sua conformidade com a especificação do produto acabado, a qual estabelece um teor aceitável de 90 a 110% de nitrato de cério, garantindo, assim, a adequação do método às exigências de controle de qualidade e às diretrizes regulatórias aplicáveis.

5.1.2 Extração líquido-líquido (LLE)

Os resultados obtidos referentes ao método de extração líquido-líquido (LLE) aplicado às matrizes creme e gel são apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente, demonstrando o desempenho do procedimento desenvolvido quanto à sua aplicabilidade e consistência analítica.

Tabela 5. Resultados da repetibilidade e da precisão intermediária por ICP-OES para amostras de creme e gel preparadas pelo método de extração líquido-líquido (LLE)

Preparações	Creme		Gel	
	Repetibilidade	Precisão intermediária	Repetibilidade	Precisão intermediária
	Teor de Cério (%)	Teor de Cério (%)	Teor de Cério (%)	Teor de Cério (%)
1	89,7	94,4	87,1	90,7
2	93,4	92,8	85,8	90,2
3	90,4	92,2	86,5	87,2
4	91,1	93,5	86,6	87,3
5	94,0	94,7	87,2	88,1
6	92,3	96,1	87,6	85,8
Média	91,8	94,0	86,8	88,2
DP	1,7	1,4	0,6	1,9
DPR (%)	1,9	1,5	0,7	2,1
Média – 12 preparações	92,9		87,5	
DP – 12 preparações	1,9		1,5	
DPR (%) – 12 preparações	2,0		1,8	

Tabela 6. Resultados de exatidão por ICP-OES para amostras de creme e gel preparadas pelo método de extração líquido-líquido (LLE)

Preparação	Creme		Gel	
	Recuperação (%)	Média (%)	Recuperação (%)	Média (%)
Nível 80%- Prep. 1	95,7		93,9	
Nível 80%- Prep. 2	96,1	95,7	93,5	89,8
Nível 80%- Prep. 3	95,5		81,9	
Nível 100% - Prep. 1	96,4		87,4	
Nível 100% - Prep. 2	95,7	96,0	93,4	89,8
Nível 100% - Prep. 3	95,7		88,8	
Nível 120% - Prep. 1	96,7		93,8	
Nível 120% - Prep. 2	97,1	96,7	93,1	93,1
Nível 120% - Prep. 3	96,3		92,4	
branco	0,0		0,0	

Conforme observado nas Tabelas 5 e 6, para o medicamento em gel, a determinação de cério apresentou resultados fora da especificação em todos os parâmetros avaliados (exatidão, repetibilidade e precisão intermediária), mesmo que os desvios padrão relativos de 5,0 % para repetibilidade e 8,0 % para precisão intermediária tenham sido atendidos, conforme preconizado pelo capítulo da USP <730>. Esses resultados indicam que o método de preparo de amostra não é adequado para o objetivo do estudo.

No caso do medicamento em creme, os resultados de exatidão foram aprovados, embora as médias estejam próximas ao limite inferior da faixa especificada. Quanto à repetibilidade, observou-se uma preparação fora da especificação, apesar de o DPR ter permanecido dentro dos limites aceitáveis.

Diante dos resultados insatisfatórios obtidos com a estratégia inicialmente avaliada de extração líquido-líquido (LLE), evidenciando limitações quanto à recuperação do analito e à reprodutibilidade do método para o escopo deste projeto, uma estratégia de preparo de amostra mais adequada foi investigada aplicando digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado. Essa abordagem foi empregada com o objetivo de promover a decomposição mais eficiente da matriz, minimizar perdas e contaminações e, conseqüentemente, assegurar

resultados mais confiáveis e reprodutíveis para a determinação de cério nas diferentes matrizes estudadas.

5.1.3 Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado

Para a digestão das amostras, empregou-se o ácido nítrico (HNO_3), selecionado por ser um ácido forte e um agente oxidante eficiente, capaz de decompor completamente a matriz orgânica e solubilizar diversos metais, incluindo o cério, garantindo a formação de soluções adequadas para posterior análise instrumental.

O programa de aquecimento sugerido pelo fabricante do forno de micro-ondas utiliza a tecnologia One Touch. Essa estratégia apresenta sensores de reconhecimento e contagem dos vasos, o qual alimenta o programa de controle com essas informações, que então seleciona as condições de digestão necessárias para a carga da amostra e o tipo de vaso. Assim, a potência aplicada nos vasos é estabelecida automaticamente pelo equipamento dependendo da quantidade e tipo de vasos. Para os demais parâmetros devido ao tipo de matriz da amostra, foi sugerido da seguinte maneira:

- Temperatura: 220 °C;
- Rampa de aquecimento: 30 min;
- Patamar de aquecimento: 15 min.

Portanto, visando aumentar a durabilidade dos vasos (reduzindo a exposição a altas temperaturas) e diminuir o tempo total de análise, procedeu-se à otimização do método, conforme os parâmetros apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Programas de aquecimento avaliados durante a etapa de desenvolvimento do preparo de amostras por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado

Condição	Temperatura (°C)	Rampa de aquecimento* (min)	Duração (min)	Potência** (W)
1	220	25	5	1000
2	220	25	10	1000
3	180	25	5	1000
4	200	25	15	1000

*Rampa de aquecimento: 25 min é fixo no equipamento.

Para verificar a eficiência da digestão, foi determinada a recuperação das amostras enriquecidas no nível de 100 % da concentração de cério.

Adicionalmente, o carbono orgânico dissolvido (DOC) foi determinado por ICP-OES, a partir do qual foi calculado o teor de carbono residual (RCC), possibilitando uma avaliação complementar da eficiência de oxidação da matéria orgânica durante o preparo das amostras. Paralelamente, foi realizada inspeção visual das soluções obtidas após a digestão, considerando aspectos como transparência, ausência de partículas e coloração, a fim de verificar indícios de digestão incompleta ou presença de resíduos não solubilizados. Na Tabela 8, apresentam-se os resultados obtidos, enquanto a Figura 3 possibilita uma observação visual das amostras após a digestão.

Tabela 8. Resultados da avaliação da eficiência da digestão das amostras por radiação micro-ondas em frasco fechado

Condição	Creme			Gel		
	Recuperação Média (%)	DOC (mg/L)	Aspecto visual	Recuperação Média (%)	DOC (mg/L)	Aspecto visual
1	97,6	34,3	Coloração levemente amarelada e livre de sólidos	97,5	14,5	Coloração levemente amarelada e livre de sólidos
2	97,1	22,4	Coloração levemente amarelada e livre de sólidos	96,0	14,7	Coloração levemente amarelada e livre de sólidos
3	100,3	NR	Coloração levemente amarelada e livre de sólidos	97,9	10,9	Coloração levemente amarelada e livre de sólidos
4	105,3	NR	Coloração levemente amarelada e livre de sólidos	102,6	7,5	Coloração levemente amarelada e livre de sólidos

NR: Não realizado



Figura 3. Aspecto visual do digerido.

Como pode ser observado na Tabela 8, as recuperações médias para as condições avaliadas estão de acordo com o critério de aceitação proposto pela USP <730> (faixa de recuperação 95,0-105,0 %), com exceção a condição 4 da matriz creme.

Para verificar a %RCC, primeiramente foi estimado a quantidade de carbono presente na matriz por meio de sua composição (TOC teórico). A composição do gel possui os excipientes: carbopol 980, álcool cetoestearílico + álcool cetoestearílico etoxilado, metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol e aminometilpropanol. Já a matriz creme possui os excipientes: álcool cetoestearílico, álcool cetoestearílico + álcool cetoestearílico etoxilado, álcool oleílico etoxilado, metilparabeno, propilparabeno, vaselina sólida e propilenoglicol. Assim, considerando as condições de preparo da amostra, foi estimado que em 200 mg da matriz do produto possui aproximadamente 14.581 e 50.489 mg/kg de carbono para a matriz gel e creme, respectivamente. Sendo assim, %RCC da matriz creme após a digestão nas condições 1 e 2 é cerca de 0,07 e 0,04 %, respectivamente. Já para a matriz gel, a %RCC após a digestão nas condições 1, 2, 3 e 4 é de 0,1, 0,1, 0,07 e 0,05 %, respectivamente. Os baixos valores de %RCC observados indicam elevada eficiência do processo de digestão em todas as condições avaliadas, evidenciando que praticamente a totalidade da matéria orgânica presente nas matrizes foi oxidada, com conversão predominante em espécies voláteis, como CO e CO₂.

Vale ressaltar que a otimização da temperatura nas condições 3 e 4 foi realizada apenas com a matriz gel, uma vez que as duas matrizes possuem composições semelhantes. Além disso, o gel contém o polímero Carbopol 980, que confere alta viscosidade e estrutura reticulada à matriz, dificultando a decomposição

completa durante a digestão ácida. A presença desse polímero aumenta a resistência da matriz à oxidação, exigindo condições mais rigorosas de digestão para garantir que o cério esteja totalmente solubilizado, além disso o resultado de recuperação das matrizes fortificadas corrobora com a decisão.

Assim, considerando todos os parâmetros avaliados e otimizados ao longo da etapa de desenvolvimento, a condição 3 foi selecionada para dar continuidade à validação da metodologia analítica, por apresentar menor tempo de análise e operar em temperatura mais branda, sem comprometer a eficiência de decomposição da matriz e a recuperação do analito.

Dessa forma, o preparo de amostras proposto demonstrou-se eficaz, rápido e seguro para a determinação do teor de cério (Ce) nos medicamentos estudados. Com a definição dessa condição otimizada, encerra-se a etapa de desenvolvimento metodológico, seguindo-se para a validação da metodologia analítica por ICP-OES e ICP-MS, conforme os parâmetros e critérios previamente estabelecidos.

5.2 Validação da Metodologia Analítica

5.2.1 Seletividade

A seletividade do procedimento analítico foi avaliada conforme descrito no item 4.4.1 desta dissertação, utilizando o branco e amostras enriquecidas com cério no nível 100 % da concentração. Essa abordagem permitiu verificar a capacidade do método de identificar e quantificar o analito na presença de outros componentes potencialmente interferentes. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 12 e 13 para ICP-OES e ICP-MS, respectivamente.

Conforme apresentado nas Tabelas 9 e 10, o método demonstrou ser seletivo para ambas as técnicas avaliadas, uma vez que as recuperações obtidas para as matrizes fortificadas permaneceram dentro da faixa de especificação estabelecida pelo capítulo geral da USP <730> (95,0–105,0 %). Ademais, o branco analítico preparado com o placebo apresentou sinais consideravelmente inferiores em relação às amostras enriquecidas, evidenciando a ausência de interferências significativas da matriz no resultado analítico.

Tabela 9. Resultado da seletividade como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES

	Concentração (mg/L)	Recuperação (%)	Média (%)	DP	DPR (%)
Branco creme	0,00	-0,1			
Amostra creme 100% - Prep. 1	2,58	100,1			
Amostra creme 100% - Prep. 2	2,58	100,2	100,3	0,4	0,4
Amostra creme 100% - Prep. 3	2,60	100,8			
Branco gel	0,03	1,1			
Amostra gel 100% - Prep. 1	2,52	97,6			
Amostra gel 100% - Prep. 2	2,52	97,7	97,9	0,3	0,3
Amostra gel 100% - Prep. 3	2,53	98,2			

Tabela 10. Resultado da seletividade como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-MS

	Concentração (µg/L)	Recuperação (%)	Média (%)	DP	DPR (%)
Branco creme	0	0			
Amostra creme 100% - Prep. 1	25,9	100,4			
Amostra creme 100% - Prep. 2	25,3	98,2	100,4	2,2	2,1
Amostra creme 100% - Prep. 3	26,5	102,5			
Branco gel	0	0			
Amostra gel 100% - Prep. 1	25,4	98,5			
Amostra gel 100% - Prep. 2	25,3	98,0	99,8	2,7	2,7
Amostra gel 100% - Prep. 3	26,5	102,9			

5.2.2 Linearidade

A avaliação da linearidade foi conduzida conforme descrito no item 4.2.2 desta dissertação, onde foi avaliada por meio da construção de três curvas analíticas, cada uma composta por cinco níveis de concentração (80–120 %) em relação à especificação. A seguir, são apresentados os resultados obtidos para as técnicas instrumentais avaliadas.

5.2.2.1 ICP-OES

Na Tabela 11 são apresentados os dados para avaliação da linearidade de cério, a equação da reta formada com os dados além dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2). Na Figura 4 está a representação gráfica da curva analítica plotada a partir dos dados da Tabela 11.

Tabela 11. Avaliação da linearidade como parâmetro da validação do método por ICP-OES

Concentração (%)	Concentração (mg/L)	Intensidade (cps)		
80	2,06	12737,16713	12610,69519	12637,18776
90	2,32	14250,69680	14271,54957	14132,93424
100	2,58	15840,81725	15758,34563	15819,10838
110	2,84	17549,50385	17540,91930	17472,17525
120	3,10	19118,33291	19055,60681	19128,71771
Equação		$y = 6271,7x - 319,29$		
Coeficiente de Correlação (r)		1,000		
Coeficiente de Determinação (r^2)		1,000		

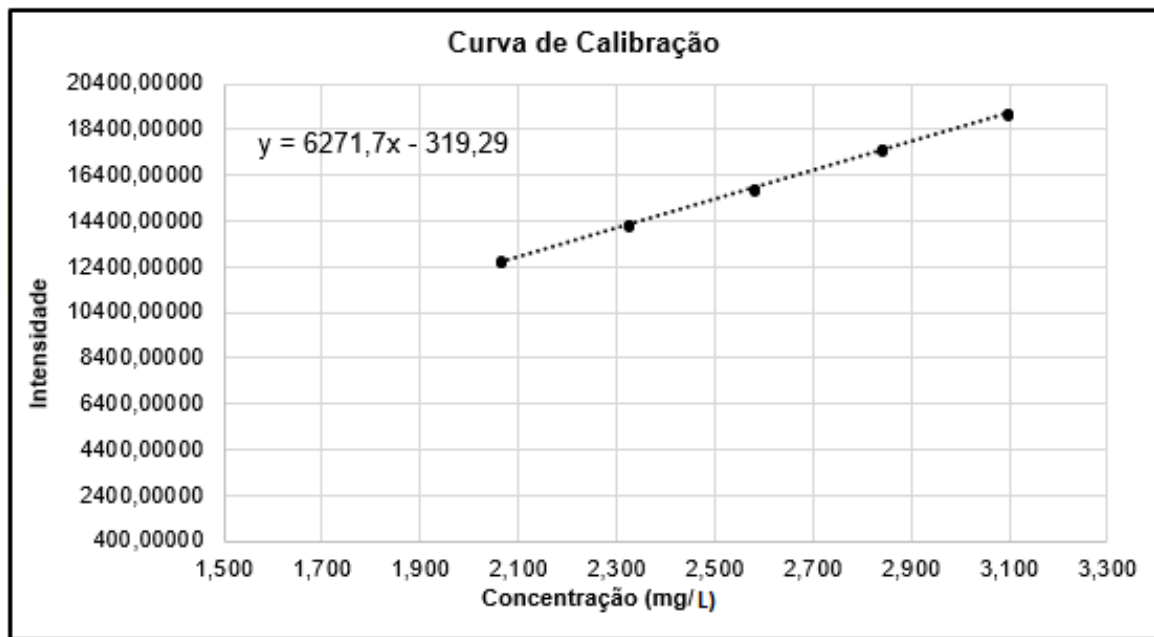


Figura 4. Regressão linear para a curva analítica de Ce por ICP-OES

A regressão foi considerada linear, pois o coeficiente $r \geq 0,995$. O modelo utilizado para obtenção da equação da curva analítica foi o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), pois, segundo o teste de Cochran, o conjunto de dados é homocedástico. Como as variâncias são homogêneas, pode-se dizer que não há necessidade de ponderar cada ponto da curva com um peso diferente baseado na variância do mesmo. O resultado do teste de Cochran, bem como os demais cálculos estatísticos realizados, são apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Testes estatísticos para Linearidade do Ce por ICP-OES

Parâmetro	Critérios de aceitação	Valores tabelados	Valores calculados
Significância do coeficiente angular	$F_{\text{Cal}} > F_{\text{Tab}}$	6,414	20162,282
Avaliação do coeficiente linear (intercepto)	$T_{\text{Cal}} < T_{\text{Crítico}}$	4,30	3,43
Homocedasticidade	$C_{\text{Cal}} < C_{\text{Tab}}$	0,684	0,367
Normalidade dos resíduos	$W_{\text{Cal}} > W_{\text{Crítico}}$	0,881	0,972
Independência dos resíduos	$D \geq 1,5$	-	1,6
Avaliação de outliers	Resultado de Grubbs < Valor crítico	2,548	1,858

Com relação à regressão, o teste ANOVA comprovou que Y varia significativamente em função de X, demonstrando que o método apresenta uma boa resposta linear, com variação de intensidade proporcional à concentração do analito. O teste de significância do intercepto indicou que não há diferença estatisticamente significativa entre o coeficiente linear e o valor zero, confirmando a ausência de tendência sistemática. Por meio do teste de Shapiro–Wilk, verificou-se que os resíduos da regressão seguem distribuição normal, o que evidencia a inexistência de tendências, uma vez que tais tendências poderiam indicar erros sistemáticos (positivos ou negativos) nas medições. Os resíduos podem ser avaliados graficamente na Figura 5. O teste de Grubbs, aplicado aos mesmos valores, não indicou a presença de pontos discrepantes (outliers), conforme mostrado na Tabela 13. Por fim, o teste de Durbin–Watson confirmou a ausência de dependência entre os resíduos, reforçando a adequação do modelo de regressão.

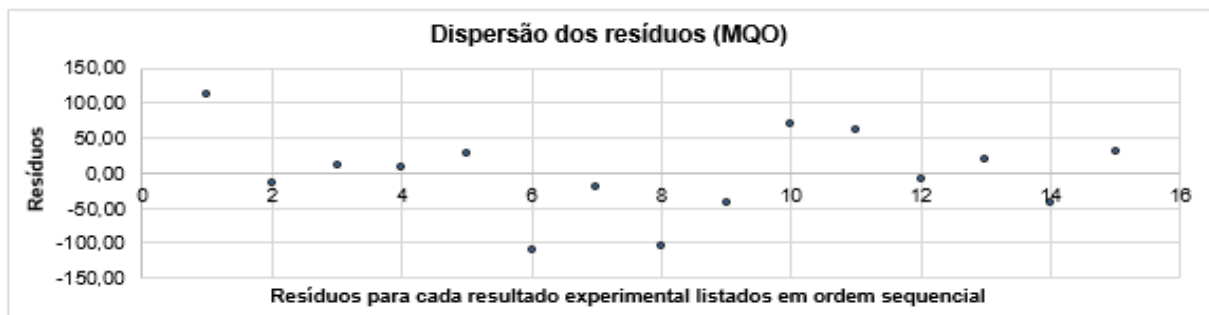
**Figura 5.** Gráfico da dispersão dos resíduos

Tabela 13. Avaliação de outliers dos resíduos por ICP-OES

Número de replicata	Resultado de Grubbs	Valor crítico
Y1	1,858	2,548
Y2	0,245	2,548
Y3	0,196	2,548
Y1	0,120	2,548
Y2	0,466	2,548
Y3	1,838	2,548
Y1	0,345	2,548
Y2	1,716	2,548
Y3	0,706	2,548
Y1	1,161	2,548
Y2	1,018	2,548
Y3	0,125	2,548
Y1	0,342	2,548
Y2	0,701	2,548
Y3	0,515	2,548

Após os testes aplicados terem apresentado resultados estatisticamente satisfatórios, foi possível comprovar a linearidade do elemento Ce determinado nas condições estipuladas pelo procedimento na faixa de 2,06 – 3,1 mg/L.

5.2.2.2 ICP-MS

Na Tabela 14 são apresentados os dados para avaliação da linearidade de cério, a equação da reta formada com os dados além dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2). Na Figura 6 está a representação gráfica da curva analítica plotada a partir dos dados da Tabela 14.

Tabela 14. Avaliação da linearidade do método por ICP-MS

Concentração (%)	Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Razão		
80	20,6	2,38680	2,37150	2,36180
90	23,2	2,66610	2,81410	2,68140
100	25,8	2,99960	3,02640	3,01010
110	28,4	3,28720	3,22830	3,36380
120	31,0	3,68090	3,60470	3,59710
Equação		$y = 0,1185x - 0,0519$		
Coeficiente de Correlação (r)		0,995		
Coeficiente de Determinação (r^2)		0,989		

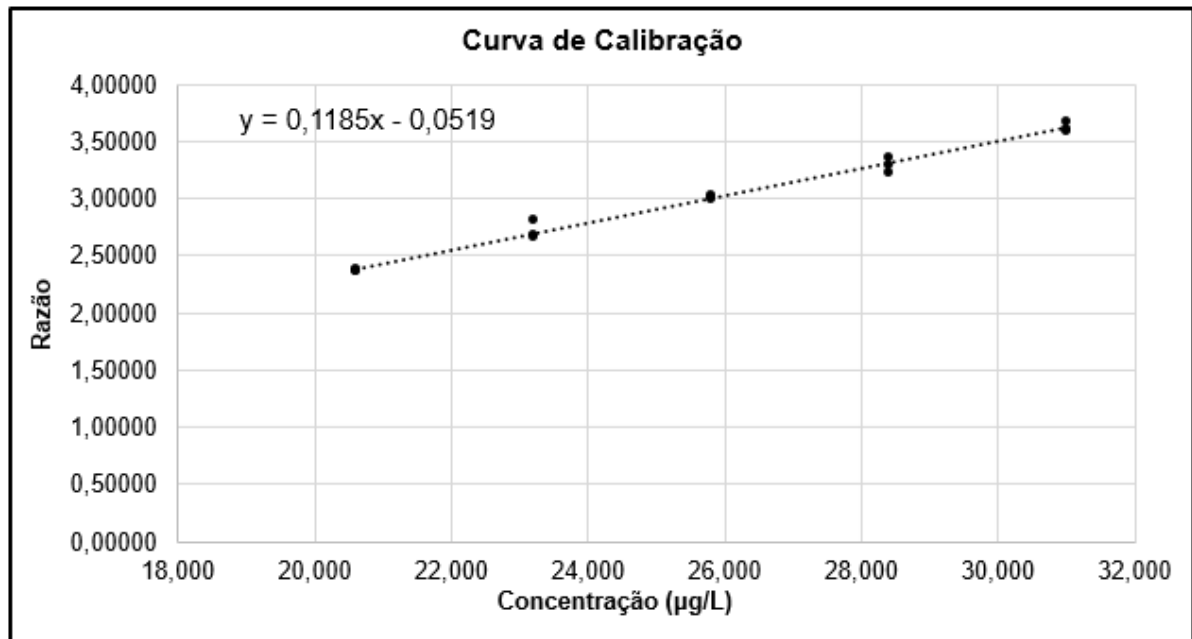


Figura 6. Regressão linear para a curva analítica de Ce por ICP-MS

A regressão foi considerada linear, pois o coeficiente $r \geq 0,995$. O modelo utilizado para obtenção da equação da curva analítica foi o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), pois, segundo o teste de Cochran, o conjunto de dados é homocedástico. Como as variâncias são homogêneas, pode-se dizer que não há necessidade de ponderar cada ponto da curva com um peso diferente baseado na variância do mesmo. O resultado do teste de Cochran, bem como os demais cálculos estatísticos realizados, são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Testes estatísticos para linearidade do Ce por ICP-MS

Parâmetro	Critérios de aceitação	Valores tabelados	Valores calculados
Significância do coeficiente angular	$F_{\text{Cal}} > F_{\text{Tab}}$	6,414	1182,070
Avaliação do coeficiente linear (intercepto)	$T_{\text{Cal}} < T_{\text{Crítico}}$	4,30	0,51
Homocedasticidade	$C_{\text{Cal}} < C_{\text{Tab}}$	0,684	0,482
Normalidade dos resíduos	$W_{\text{Cal}} > W_{\text{Crítico}}$	0,881	0,901
Independência dos resíduos	$D \geq 1,5$	-	2,2
Avaliação de outliers	Resultado de Grubbs < Valor crítico	2,548	2,471

Com relação à regressão, o teste ANOVA comprovou que Y varia significativamente em função de X, demonstrando que o método apresenta uma boa resposta linear, com variação de intensidade proporcional à concentração do analito. O teste de significância do intercepto indicou que não há diferença estatisticamente significativa entre o coeficiente linear e o valor zero, confirmando a ausência de tendência sistemática. Por meio do teste de Shapiro–Wilk, verificou-se que os resíduos da regressão seguem distribuição normal, o que evidencia a inexistência de tendências, uma vez que tais tendências poderiam indicar erros sistemáticos (positivos ou negativos) nas medições. Os resíduos podem ser avaliados graficamente na Figura 7. O teste de Grubbs, aplicado aos mesmos valores, não indicou a presença de pontos discrepantes (outliers), conforme mostrado na Tabela 16. Por fim, o teste de Durbin–Watson confirmou a ausência de dependência entre os resíduos, reforçando a adequação do modelo de regressão

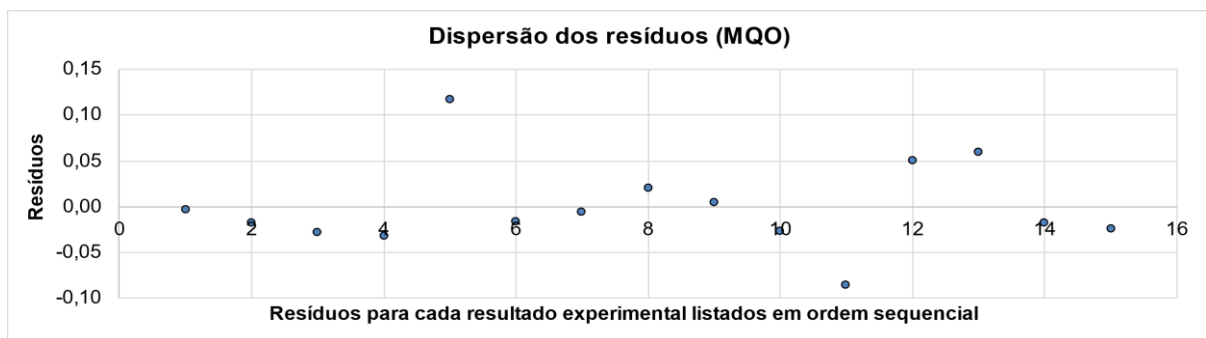


Figura 7. Gráfico da dispersão dos resíduos.

Tabela 16. Avaliação de outliers dos resíduos por ICP-MS

Número de replicata	Resultado de Grubbs	Valor crítico
Y1	0,049	2,548
Y2	0,373	2,548
Y3	0,578	2,548
Y1	0,658	2,548
Y2	2,471	2,548
Y3	0,335	2,548
Y1	0,121	2,548
Y2	0,446	2,548
Y3	0,101	2,548
Y1	0,554	2,548

Y2	1,800	2,548
Y3	1,065	2,548
Y1	1,256	2,548
Y2	0,355	2,548
Y3	0,516	2,548

Após os testes aplicados terem apresentado resultados estatisticamente satisfatórios, foi possível comprovar a linearidade do elemento Ce determinado nas condições estipuladas pelo procedimento na faixa de 20,6 – 31,0 µg/L.

5.2.3 Exatidão

A exatidão foi determinada de acordo com o procedimento descrito no item 4.4.3 desta dissertação, sendo os resultados apresentados nas Tabelas 17 e 18 para ICP-OES e ICP-MS, respectivamente.

Tabela 17. Resultado da exatidão como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES

Nível	Creme		Gel	
	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
80%- Prep. 1	102,2		97,7	
80%- Prep. 2	100,6	101,2	99,0	98,7
80%- Prep. 3	100,7		99,4	
100%- Prep. 1	98,8		98,0	
100%- Prep. 2	98,9	99,0	98,7	98,7
100%- Prep. 3	99,4		99,4	
120%- Prep. 1	96,9		96,9	
120%- Prep. 2	98,0	97,8	99,3	98,1
120%- Prep. 3	98,4		98,1	

Tabela 18. Resultado da exatidão como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-MS

Nível	Creme		Gel	
	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)

80%- Prep. 1	100,2		101,5	
80%- Prep. 2	96,0	97,9	97,4	98,5
80%- Prep. 3	97,7		96,7	
100%- Prep. 1	100,4		98,5	
100%- Prep. 2	98,2	100,4	98,0	99,8
100%- Prep. 3	102,5		102,9	
120%- Prep. 1	97,7		98,6	
120%- Prep. 2	98,0	98,2	97,4	98,1
120%- Prep. 3	98,8		98,2	

Como pode ser observado nas Tabelas 17 e 18, os resultados obtidos estão dentro da faixa esperada, com valores de recuperação entre 95,0 e 105,0 %. Dessa forma, o procedimento desenvolvido pode ser considerado exato para ambas as técnicas instrumentais analíticas empregadas. Vale ressaltar que os resultados também estão em conformidade com a faixa de especificação estabelecida para os medicamentos.

5.2.4 Repetibilidade e Precisão intermediária

A determinação da precisão, abrangendo tanto a repetibilidade quanto a precisão intermediária, foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 4.4.4 desta dissertação. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 19 e 20 para ICP-OES e nas Tabelas 21 e 22 para ICP-MS.

Tabela 19. Resultado da repetibilidade como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES

Preparações	Creme	Gel
	Repetibilidade	Repetibilidade
	Teor de Cério (%)	Teor de Cério (%)
1	94,2	93,8
2	95,0	95,6
3	95,5	92,1
4	95,7	94,3
5	92,2	94,5
6	96,8	92,7

Média	94,9	93,8
DP	1,6	1,3
DPR (%)	1,6	1,3

Tabela 20. Resultado da precisão intermediária como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES

Preparações	Creme	Gel
	Precisão intermediária	Precisão intermediária
	Teor de Cério (%)	Teor de Cério (%)
1	94,2	93,8
2	95,0	95,6
3	95,5	92,1
4	95,7	94,3
5	92,2	94,5
6	96,8	92,7
7	94,5	98,5
8	94,7	98,8
9	96,0	98,0
10	95,3	99,1
11	94,1	98,7
12	94,8	98,5
Média n=12	94,1	98,5
DP n=12	1,6	1,8
DPR (%)	1,7	1,9

Tabela 21. Resultado da repetibilidade como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-MS

Preparações	Creme	Gel
	Repetibilidade	Repetibilidade
	Teor de Cério (%)	Teor de Cério (%)
1	91,0	91,1
2	95,7	92,4
3	97,7	90,9
4	97,4	92,0
5	91,8	94,7
6	99,8	95,5
Média	95,6	92,8

DP	3,5	1,9
DPR (%)	3,7	2,1

Tabela 22. Resultado da precisão intermediária como parâmetro da validação da metodologia analítica por ICP-OES

Preparações	Creme	Gel
	Precisão intermediária Teor de Cério (%)	Precisão intermediária Teor de Cério (%)
1	91,0	91,1
2	95,7	92,4
3	97,7	90,9
4	97,4	92,0
5	91,8	94,7
6	99,8	95,5
7	96,1	102,6
8	103,7	95,0
9	97,0	96,2
10	97,2	99,0
11	103,5	99,8
12	95,9	99,1
Média n=12	97,2	95,7
DP n=12	3,9	3,8
DPR (%)	4,0	4,0

Diante dos resultados apresentados, verifica-se que ambas as técnicas instrumentais, ICP-OES e ICP-MS, foram precisas, conforme os critérios de aceitação estabelecidos no capítulo geral USP <730>, sendo estes DPR $\leq 5,0$ % para repetibilidade e DPR $\leq 8,0$ % para precisão intermediária. Observa-se, ainda, que todas as determinações se mantiveram dentro da faixa de especificação do produto, evidenciando a robustez e a confiabilidade dos métodos propostos.

5.2.5 Robustez

A robustez foi avaliada conforme descrito no item 4.4.5. No presente estudo, essa avaliação considerou situações em que o analista poderia cometer equívocos ao ajustar a metodologia, assim como variações na capacidade instrumental. Essas condições representam alterações distintas daquelas normalmente esperadas durante a execução do método. Cabe ressaltar que a RDC 166/17 não abrange especificamente a técnica instrumental adotada neste trabalho. Portanto, os critérios de avaliação da robustez seguiram as recomendações do capítulo geral USP <730>.

Dessa maneira, alguns parâmetros críticos foram intencionalmente alterados para ambas as técnicas. No caso do ICP-OES, a potência aplicada foi reduzida de 1350 W, que corresponde ao valor máximo do equipamento, para 1150 W, valor padrão do instrumento. Além disso, o modo de leitura foi alterado de axial para radial, a fim de avaliar a robustez frente a variações significativas nos parâmetros instrumentais. Já para o ICP-MS, as alterações testadas foram a potência aplicada para 1600 W (máxima do equipamento), vazão do gás de nebulização para 1,2 L/min e a distância da amostragem para 5,0 mm.

As Tabelas 26 e 27 apresentam os resultados obtidos da robustez por ICP-OES e as Tabelas 28 a 30 apresentam os resultados obtidos para ICP-MS.

Tabela 23. Resultado de robustez variando a potência aplicada no ICP-OES

Preparações	Creme	Gel
	Recuperação (%)	Recuperação (%)
Nível 100% - Prep. 1	98,0	94,8
Nível 100% - Prep. 2	98,2	95,4
Nível 100% - Prep. 3	97,7	95,0
Média	97,9	95,1
DP	0,3	0,3
DPR (%)	0,3	0,3
Aprovado ou Reprovado	Aprovado	Aprovado

Tabela 24. Resultado de robustez leitura radial no ICP-OES

Preparações	Creme	Gel
	Recuperação (%)	Recuperação (%)
Nível 100% - Prep. 1	98,8	93,9
Nível 100% - Prep. 2	100,4	95,9
Nível 100% - Prep. 3	96,6	93,8
Média	98,6	94,6
DP	1,9	1,2
DPR (%)	1,9	1,3
Aprovado ou Reprovado	Aprovado	Aprovado

Tabela 25. Resultado de robustez variando a potência aplicada no ICP-MS

Preparações	Creme	Gel
	Recuperação (%)	Recuperação (%)
Nível 100% - Prep. 1	103,6	103,5
Nível 100% - Prep. 2	98,3	103,7
Nível 100% - Prep. 3	101,7	102,5
Média	101,2	103,2
DP	2,7	0,6
DPR (%)	2,6	0,6
Aprovado ou Reprovado	Aprovado	Aprovado

Tabela 26. Resultado de robustez variando a vazão do gás de nebulização no ICP-MS

Preparações	Creme	Gel
	Recuperação (%)	Recuperação (%)
Nível 100% - Prep. 1	100,3	104,7
Nível 100% - Prep. 2	98,9	101,0
Nível 100% - Prep. 3	100,7	103,9
Média	99,9	103,2
DP	1,0	2,0
DPR (%)	1,0	1,9
Aprovado ou Reprovado	Aprovado	Aprovado

Tabela 27. Resultado de robustez variando a profundidade de amostragem no ICP-MS

Preparações	Creme	Gel
	Recuperação (%)	Recuperação (%)
Nível 100% - Prep. 1	94,8	103,0
Nível 100% - Prep. 2	94,8	99,0
Nível 100% - Prep. 3	94,3	93,5
Média	94,6	98,5
DP	0,2	4,8
DPR (%)	0,3	4,9
Aprovado ou Reprovado	Aprovado	Aprovado

Conforme evidenciado nas Tabelas 26 a 30, a robustez foi considerada satisfatória para todos os parâmetros avaliados em ambas as técnicas, apresentando desvio-padrão relativo (DPR) $\leq 8,0\%$ e resultados consistentemente dentro da faixa de especificação estabelecida para o produto.

Destacamos que a robustez não foi explorada conforme as recomendações da RDC 166/17, pois conforme discutido previamente no item 4.4.5, foram selecionadas com foco em possíveis equívocos operacionais durante a configuração do equipamento, ou seja, desvios que poderiam ser cometidos pelos analistas no momento do preparo e ajuste das condições instrumentais.

Adicionalmente, destaca-se que, para ambos os equipamentos avaliados, as concentrações de trabalho empregadas situam-se em níveis relativamente elevados, o que exige atenção quanto à estabilidade do sistema analítico ao longo das sequências de análise. Nesse contexto, foi monitorada a ocorrência de possíveis efeitos adversos associados à aplicação em rotina, tais como efeitos de memória (carryover), contaminação da interface, instabilidades de sinal e eventual obstrução do sistema de introdução de amostras.

Durante os ensaios, não foram observadas evidências significativas de efeitos de memória ou contaminação persistente que comprometessem a exatidão e a precisão do método. Da mesma forma, não foram verificados episódios recorrentes de entupimento do nebulizador, do tubo central da tocha de quartzo ou de contaminação de componentes da interface que impactassem a continuidade das medidas analíticas. Esses resultados indicam que, nas condições avaliadas, o método apresenta robustez operacional e viabilidade para aplicação em rotina, desde que mantidos procedimentos adequados de lavagem entre amostras e pós análise com solução de ácido nítrico 10%, conforme procedimento interno, monitoramento do sinal e manutenção preventiva dos equipamentos.

5.3 Metodologias analíticas desenvolvidas

Após a conclusão da etapa de validação analítica, as metodologias desenvolvidas e validadas para a determinação de nitrato de cério em matrizes semissólidas, especificamente cremes e géis, utilizando as técnicas ICP-OES e ICP-MS, são apresentadas a seguir.

5.3.1 ICP-OES

Condições operacionais

a) Conforme a Tabela 3

Preparo da solução ácido nítrico 10%

a) Ácido nítrico sub-ebulição: Água ultrapurificada (1 : 9)

Solução padrão check

a) transferir 258 uL da solução padrão contendo 1000 mg/L de Ce para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com solução de ácido nítrico 10 %.

Curva de calibração

a) transferir alíquotas da solução padrão estoque de Ce (1000 mg/L) para balão volumétrico de 100 mL conforme a Tabela 28 e completar o volume com solução de ácido nítrico 10 %:

Tabela 28. Soluções de calibração utilizadas na construção da curva analítica para determinação por ICP-OES

Nível	Alíquota (μL)	Concentração (mg/L)
80%	206	2,06
90%	232	2,32
100%	258	2,58
110%	284	2,84
120%	310	3,10

Solução da amostra

- pesar, com exatidão 200 mg da amostra e transferir para tubo de digestão;
- adicionar 10 mL ácido nítrico sub-ebulição;
- digerir no forno de micro-ondas com programação conforme Tabela 29;
- transferir o digerido para balão volumétrico de 100 mL;
- completar o volume com água destilada e desionizada e homogeneizar.

Tabela 29. Condições operacionais do forno digestor micro-ondas para o preparo de amostra

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	180
Rampa (mm:ss)	25
Duração (mm:ss)	5

5.3.2 ICP-MS

Condições operacionais

a) Conforme a Tabela 4

Preparo da solução de ácido nítrico 10%

a) Ácido nítrico purificado: Água ultrapurificada (1 : 9)

Solução Padrão interno (PI)

- a) Em frasco plástico, adicionar 200 mL de água ultrapura obtida diretamente do sistema Milli-Q;
- b) seguida da adição de 5 mL de ácido nítrico purificado por sub-ebulição;
- c) Posteriormente, adicionar 4,0 mL de uma solução comercial de padrão interno contendo 10 mg/L de Bi, Ge, In, Li, Tb, Sc e Y

Solução padrão check

- d) transferir 258 μ L da solução padrão 1000 mg/L de Ce para balão volumétrico de 100mL e completar o volume com solução de ácido nítrico 10% (Solução P1);
- e) 0,1 mL da Solução P1/ ácido nítrico 10% q.s.p. 10 mL

Curva de calibração

- a) transferir alíquotas da solução padrão estoque Ce (1000 mg/L) para balão volumétrico de 100 mL conforme Tabela 30 e completar o volume com ácido nítrico 10%;
- b) 0,1 mL de cada ponto/ ácido nítrico 10% q.s.p. 10 mL

Tabela 30. Soluções de calibração utilizadas na construção da curva analítica para determinação por ICP-MS

Nível	Alíquota (μ L)	Concentração (μ g/L)
80%	206	20,6
90%	232	23,2
100%	258	25,8
110%	284	28,4
120%	310	31,0

Solução da amostra

a) adicionar 10 mL ácido sub-ebulição;

- b) digerir no forno com programação conforme a Tabela 29;
- c) transferir todo o conteúdo para um balão de 100 mL;
- d) completar o volume com água e homogeneizar. (Solução A1)
- e) 0,1 mL da Solução A1/ ácido nítrico 10% q.s.p. 10 mL

Adequabilidade do sistema

- a) O coeficiente de correlação da regressão linear (R) deve ser $R \geq 0,990$
- b) O coeficiente de variação (CV) deve ser $\leq 10\%$ entre os resultados da solução padrão check determinados antes e depois das análises das amostras.

Procedimento para as metodologias analíticas

- a) ajustar o equipamento;
- b) a concentração do elemento é calculada utilizando-se a equação da reta, obtida pela injeção de cinco padrões e a solução final, de acordo com a equação 14:

$$\text{Concentração de cério (\%)} = \frac{\text{Int ou razão}-b}{a} \times \frac{d}{M_{\text{am}}} \times 100 \times \frac{434,22}{140,12} \quad (\text{Equação 14})$$

Onde:

Int: intensidade ou razão obtido do cério na amostra, dependendo da técnica espectroanalítica

b: coeficiente linear da curva resposta

a: coeficiente angular da curva resposta

d: fator diluição, em L

M_{am} : massa pesada da amostra, em mg

100: fator de conversão de unidades, para %

432,22: massa molecular do nitrato de cério e 140,14: massa molecular do cério

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

6. Conclusões

As metodologias analíticas desenvolvidas e validadas para a quantificação de cério por ICP-MS e ICP-OES, utilizando o preparo de amostra por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em frasco fechado, demonstraram confiabilidade, precisão e exatidão, atendendo plenamente aos critérios estabelecidos pela RDC n.º 166/2017 e pelo capítulo geral USP <730>.

Antes da execução deste estudo, a empresa não dispunha de metodologias internas para a determinação de cério, realizando o ensaio por meio de laboratórios terceirizados. A internalização e a implementação dos métodos desenvolvidos proporcionaram maior segurança, autonomia e agilidade às análises, além de ganhos expressivos em qualidade, rastreabilidade e redução de custos operacionais.

Dentre as técnicas avaliadas, o método por ICP-OES destacou-se como o mais indicado e aplicável à rotina analítica do controle de qualidade da empresa. Essa escolha se deve à sua robustez, estabilidade operacional e melhor compatibilidade com a infraestrutura disponível, além da presença de uma equipe de analistas com ampla experiência e capacitação no uso dessa técnica. Ademais, trata-se de uma análise monoelementar e as concentrações de cério nas amostras são relativamente elevadas e previamente estimadas, condição em que o ICP-OES apresenta excelente desempenho analítico, linearidade adequada, precisão e exatidão sem necessidade de instrumentação de maior sensibilidade ou uso de padrão interno. Em contrapartida, o ICP-MS, embora ofereça limites de detecção mais baixos, mostrou-se mais suscetível a interferências e exigiu maior controle instrumental e especialização técnica, fatores que podem dificultar sua aplicação em análises de rotina. Contudo, é notório que essa técnica instrumental é potencialmente aplicável para a determinação de analitos presentes em baixas concentrações em outros produtos farmacêuticos.

A implementação da metodologia ICP-OES na empresa representa uma contribuição prática e direta deste mestrado profissional, alinhando o desenvolvimento científico à aplicação industrial. Tal resultado reforça o papel do mestrado profissional na integração entre a pesquisa acadêmica e a solução de demandas reais do setor produtivo, promovendo inovação, eficiência e fortalecimento das práticas analíticas internas. Além da inclusão de uma técnica robusta e alinhada as legislações vigentes

ao controle de qualidade de medicamento, uma vez que não foram encontradas literatura nesse sentido.

Adicionalmente, em conformidade com a Resolução da Diretoria Colegiada nº 318/2019, a metodologia desenvolvida apresenta características de método indicativo de estabilidade. A validação comprovou especificidade e desempenho adequado quanto à precisão, exatidão, linearidade e robustez, demonstrando sua aptidão para o monitoramento do teor de cério ao longo do prazo de validade, assegurando a qualidade e a conformidade regulatória do medicamento.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

AGRAWAL, Y. K. Liquid-liquid extraction, separation, preconcentration, and ICP-AES determination of lanthanum and cerium with N-Phenyl-(1,2-methanofullerene C₆₀)61-formohydroxamic acid. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, v. 12, n. 3, p. 545-570, 2004.

AMMANN, A. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 42, p. 419-427, 2007.

BABOS, D. V.; PINHEIRO, F. C.; DIONIZIO, B. S.; PEREIRA-FILHO, E. R. Analysis of sports supplements for proteins by polyacrylamide gel electrophoresis and macronutrients by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). *Analytical Letters*, 2021.

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*, v. 408, n. 17, p. 4547-4566, 2016.

BARIN, J. S.; TISCHER, B.; PICOLOTO, R. S.; ANTES, F. G.; SILVA, F. E. B.; PAULA, F. R.; FLORES, E. M. M. Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: a critical study of digestion methods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 29, n. 2, p. 352-358, 2014.

BIZZI, C. A.; PEDROTTI, M. F.; OLIVEIRA, J. S. S.; BARIN, J. S.; NOBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 32, p. 1448-1466, 2017.

BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. 3. ed. Norwalk: PerkinElmer Instruments, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 25 jul. 2017.*

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização dos estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e de medicamentos e dá outras providências. *Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 7 nov. 2019.*

BUCHANAN, C. A.; HERRERA, D.; BALASUBRAMANIAN, M.; GOLDSMITH, B. R.; SINGH, N. Unveiling the Cerium(III)/(IV) structures and charge-transfer mechanism in sulfuric acid. *JACS Au*, v. 2, p. 2742-2757, 2022.

CELARDO, I.; TRAVERSA, E.; GHIBELLI, L. CeO₂ nanoparticles: a promise for applications in therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 9, n. 1, p. 4, 2011.

CORDEIRO, D. D.; MATHIAS, A. E. B.; REZENDE, K. R.; GIL, E. S. Pré-tratamento de amostras. *Vita et Sanitas, Trindade*, n. 3, p. 122-131, jan./dez. 2009.

DAHLE, J. T.; ARAI, Y. Environmental geochemistry of cerium: applications and toxicology of cerium oxide nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 12, n. 2, p. 1253-1278, 2015.

DAS, S.; DOWDING, J. M.; KLUMP, K. E.; MCGINNIS, J. F.; SELF, W.; SEAL, S. Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 8, n. 9, p. 1483-1508, 2013.

DIAS, F. R. S. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos. 2019. Trabalho Acadêmico - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

GARCIA, M. O. Preparo de amostras e análise elementar de produtos farmacêuticos. 2016. Dissertação (Mestrado Profissional em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

GHOSH, S.; PRASANNA, V. L.; SOWJANYA, B.; SRIVANI, P.; ALAGARAJA, M.; BANJI, D. Inductively coupled plasma - optical emission spectroscopy: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 3, n. 1, p. 24-33, jan./mar. 2013.

GOUVEIA, S. T.; SILVA, F. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. *Analytica Chimica Acta*, v. 445, p. 269-275, 2001.

JAKUPEC, M. A.; UNFRIED, P.; KEPPLER, B. K. Pharmacology and toxicology of lanthanides: benefits and risks of cerium. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 153, p. 101-111, 2005.

KARGOZAR, S.; BAINO, F.; HOSEINI, S. J.; HAMZEHLOU, S.; DARROUDI, M.; VERDI, J.; HASANZADEH, L.; KIM, H. W.; MOZAFARI, M. Biomedical applications of nanocerium: new roles for an old player. *Nanomedicine*, v. 13, n. 23, p. 3051-3069, 2018.

KHAN, S. R.; SHARMA, B.; CHAWLA, P. A.; BHATIA, R. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES): a powerful analytical technique for elemental analysis. *Food Analytical Methods*, v. 15, p. 666-688, 2022.

KRUG, F. J. (Ed.). Métodos de preparo de amostras: fundamentos e aplicações. 1. ed. rev. Piracicaba: Editora da Universidade de São Paulo, 2008.

KURTULDU, F.; KANKOVÁ, H.; BELTRÁN, A. M.; LIVERANI, L.; GALUSEK, D.; BOCCACCINI, A. R. Anti-inflammatory and antibacterial activities of cerium-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for drug-free biomedical applications. *Materials Today Bio*, v. 12, p. 100150, 2021.

LINGE, K. L.; JARVIS, K. E. Quadrupole ICP-MS: introduction to instrumentation, measurement techniques and analytical capabilities. *Geostandards and Geoanalytical Research*, v. 33, n. 4, p. 445-467, 2009.

MILESTONE. Pense branco. Disponível em: <https://brochures.metrohm.es/titles/325/file/Pense%20Branco%20-%20Milestone.pdf>. Acesso em: 20 out. 2025.

MOHAJERI, M.; MOMENAI, R.; MOHAJERI, S. K.; OHDI, M.; ESTABRAGH, M. A. R. Cerium oxide nanoparticles, physical and chemical properties, applications and toxicological implications: a review. *Results in Chemistry*, v. 15, p. 102302, 2025.

MOUTINHO, T. M.; VERA, Y. M. Cério: fontes, propriedades e processos de separação. Rio de Janeiro: CETEM, 2014.

MUCCILLO, E. N. S.; QUEIROZ, C. A. S.; ÁVILA, D. M.; ABRÃO, A. Síntese e caracterização de precursores de cério de alta pureza. *Cerâmica*, v. 47, n. 301, 2001.

MULLER, A. L. H.; OLIVEIRA, J. S. S.; MELLO, P. A.; MULLER, E.; 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*, v. 136, p. 161-169, 2015.

NÓBREGA, J. A.; PIROLA, C.; FIALHO, L. L.; ROTA, G.; CAMPOS JORDÃO, C. E. K. M. A.; POLLO, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: how simple can it become? *Talanta*, v. 98, p. 272-276, 2012.

OTTO, V.; FRANÇA, F.; HOEFLER, R. Formas farmacêuticas semissólidas para tratamento tópico. *Farmacoterapêutica*, v. 22, n. 1, p. 3-9, 2018.

ORLANDO, R. M., CORDEIRO, D. D, MATHIAS, A E. B., REZENDE, K. R., GIL, E. S. Pré-tratamento de amostras. *Vita et Sanitas*, Trindade-GO, n. 3, p. 122-131, jan./dez. 2009.

PINHEIRO, F. C.; AGUIRRE, M. Á.; NÓBREGA, J. A.; CANALS, A. Dispersive liquid-liquid microextraction of Cd, Hg and Pb from medicines prior to ICP OES determination according to the United States Pharmacopeia. *Analytical Methods*, v. 13, n. 46, p. 5670-5678, 2021.

PINHEIRO, F. C.; AGUIRRE, M. A.; NÓBREGA, J. A.; GONZÁLEZ-GALLARDO, N.; RAMÓN, D. J.; CANALS, A. Dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for elemental impurities determination in oral and parenteral drugs by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 1185, p. 339052, 2021.

PINHEIRO, F. C.; BARROS, A. I.; NÓBREGA, J. A. Elemental impurities analysis in name-brand and generic omeprazole drug samples. *Heliyon*, v. 6, n. 2, 2020.

PINHEIRO, F. C.; BARROS, A. I.; NÓBREGA, J. A. Evaluation of dilute-and-shoot procedure for determination of inorganic impurities in liquid pharmaceutical samples by ICP OES. *Microchemical Journal*, v. 146, p. 948-956, 2019.

PINHEIRO, F. C.; BARROS, A. I.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted sample preparation of medicines for determination of elemental impurities in compliance with

United States Pharmacopeia: how simple can it be? *Analytica Chimica Acta*, v. 1065, p. 1-11, 2019.

PINHEIRO, F. C.; NÓBREGA, J. A. An overview of sample preparation procedures for determination of elemental impurities in medicines. *Microchemical Journal*, v. 175, p. 107189, 2022.

PROFROCK, D.; PRANGE, A. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends. *Applied Spectroscopy*, v. 66, n. 8, p. 843-868, 2012.

QIAN, L. W.; FOURCAUDO, A. B.; CHEN, P.; BRANDENBURG, K. S.; JR, A. J. W.; LEUNG, K. P. Cerium nitrate enhances anti-bacterial effects and imparts anti-inflammatory properties to silver dressings in a rat scald burn model. *International Journal of Burns and Trauma*, v. 10, n. 4, p. 91-100, 2020.

SILVA, C. S.; PINHEIRO, F. C.; AMARAL, C. D. B.; NÓBREGA, J. A. Determination of As, Cd, Hg and Pb in continuous use drugs and excipients by plasma-based techniques in compliance with the United States Pharmacopeia requirements. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 138, p. 14-17, 2017.

TYLER, Geoff. ICP-OES, ICP-MS and AAS techniques compared. Longjumeau: Jobin Yvon S.A.S., Horiba Group, [s.d.]. 11 p. (ICP Optical Emission Spectroscopy: Technical Note, 05).

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. General Chapter <232> Elemental Impurities—Limits. In: UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP–NF). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. General Chapter <233> Elemental Impurities—Procedures. In: UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP–NF). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. General Chapter <730> Plasma Spectrochemistry. In: UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP–NF). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.]

YEFIMOVA, S.; KLOCHKOV, V.; KAVOK, N.; TKACHENKO, A.; ONISHCHENKO, A.; CHUMACHENKO, T.; DIZGE, N.; ÖZDEMİR, S.; GONCA, S.; OCAKOGLU, K. Antimicrobial activity and cytotoxicity study of cerium oxide nanoparticles with two different sizes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 111, n. 4, p. 872-880, abr. 2023.