

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

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR ICP-MS UTILIZANDO AQBD
PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM
SOLUÇÕES INJETÁVEIS

Wellington Rogério Viola*

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

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

**São Carlos – SP
2026**

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado Profissional do candidato Wellington Rogério Viola, realizada em 13/03/2026.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro (UFSCar)

Prof. Dr. Ana Beatriz Santos da Silva (UFSCar)

Dr. Marco Aurélio Sperança (SG - Soluções Científicas)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de realizar este Mestrado Profissional e ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Química pelo suporte acadêmico. Sou igualmente grato pela estrutura, pela organização e pela qualidade do ensino oferecido, que permitiram a condução deste percurso formativo com excelência e contribuíram de maneira decisiva para meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço profundamente ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro, cuja competência, rigor científico e dedicação foram fundamentais para a construção deste trabalho. Seu apoio constante, suas orientações precisas e sua confiança foram essenciais para meu crescimento acadêmico e pessoal. Sou imensamente grato por ter contado com sua liderança inspiradora ao longo de toda esta jornada.

Ao Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, pela colaboração por meio de recursos, conhecimento técnico e condições adequadas de trabalho, de forma essencial para assegurar a qualidade metodológica e o rigor científico necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

Em especial, agradeço ao Dr. Vanderson Bispo, cuja confiança e incentivo foram determinantes para que eu desse este passo em busca de meu aperfeiçoamento profissional e acadêmico. Sua orientação segura e motivadora, somada à coordenação comprometida de Alexandre Fernandes Pinto, ao apoio técnico constante e ao acolhimento ao longo de toda a minha trajetória, foram fundamentais para que este caminho se tornasse possível. Suas posturas éticas, profissionais e profundamente dedicadas constituem inspirações que levarei comigo em minha caminhada pessoal e profissional.

Aos meus colegas de trabalho — Natália Bortolucci Simioni Dias, Milena Melim Perini da Silva, João Pedro Bernardes de Souza — agradeço profundamente pelo empenho, pela prontidão e pela colaboração constante que tornaram possível a realização e a conclusão deste mestrado. Cada gesto de apoio, cada troca de conhecimento e cada demonstração de parceria contribuíram de forma decisiva para que esta jornada fosse mais leve e produtiva. Sou sinceramente grato por caminhar ao lado de profissionais tão dedicados e generosos.

À gerência, representada por Luis Paulo Souza, expresso minha sincera gratidão pelo apoio institucional e pela anuência ao Programa de Mestrado Profissional. Sua confiança e incentivo, aliados à viabilização da infraestrutura necessária, foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse.

À minha família, meu mais sincero agradecimento pelo apoio incondicional, pela paciência e pela compreensão em cada etapa desta jornada. O incentivo constante, a força nos momentos de cansaço e a presença afetuosa que nunca me faltou foram fundamentais para que

eu chegasse até aqui. Este trabalho também é fruto do amor, da confiança e do amparo que sempre encontrei em vocês

Lista de Abreviaturas

| | |
|---------|---|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ICP-MS | <i>Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry</i> |
| AQbD | <i>Analytical Quality by Design</i> |
| DoE | <i>Design of Experiments</i> |
| IE | Impurezas elementares |
| ICH | <i>International Council for Harmonisation</i> |
| ICP OES | <i>Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry</i> |
| ATP | <i>Analytical Target Profile</i> |
| USP | <i>United States Pharmacopeia</i> |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| PDE | <i>Permitted Daily Exposure</i> |
| FMEA | <i>Failure Mode and Effects Analysis</i> |
| RPN | <i>Risk Priority Number</i> |
| CCD | <i>Central Composite Design</i> |
| MODR | <i>Method Operable Design Region</i> |
| CMAs | <i>Critical Method Attributes</i> |
| CPPs | <i>Critical Process Parameters</i> |
| AMPC | <i>Analytical Method Performance Characteristics</i> |
| QbD | <i>Quality by Design</i> |
| KED | <i>Kinetic Energy Discrimination</i> |
| DP | Desvio Padrão |
| DPR | Desvio Padrão Relativo |
| DMD | Dose Máxima Diária |
| LQ | Limite de Quantificação |
| LD | Limite de Detecção |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| HMI | <i>High Matrix Introduction</i> |
| STD | Sólidos Totais Dissolvidos |
| PI | Solução de Padrão Interno |
| SPE | Solução Padrão Estoque |
| SPI | Solução Padrão Intermediária |
| CPS | <i>Counts Per Second</i> |
| QTPP | <i>Quality Target Product Profile</i> |
| CQAs | <i>Critical Quality Attributes</i> |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. FMEA (Análise de Modos de Falha e seus Efeitos)..... | 16 |
| Tabela 2. Design do experimento. | 18 |
| Tabela 3. Design do experimento. | 19 |
| Tabela 4. Recuperações da análise combinatória do DoE..... | 23 |
| Tabela 5. Parâmetros instrumentais..... | 41 |
| Tabela 6. Concentração da solução intermediária SPI- 1..... | 42 |
| Tabela 7. Concentração da solução intermediária SPI- 2..... | 42 |
| Tabela 8. Concentração das soluções padrões dos elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V..... | 43 |
| Tabela 9. Concentração das soluções padrão do elemento chumbo..... | 44 |
| Tabela 10. Preparo das soluções amostras fortificadas e não fortificadas dos elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V..... | 45 |
| Tabela 11. Preparo das soluções amostras fortificadas e não fortificadas do elemento Pb..... | 45 |
| Tabela 12. Resumo dos resultados de linearidade..... | 61 |
| Tabela 13. Resumo dos resultados de Exatidão. | 63 |
| Tabela 14. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 0,2J..... | 67 |
| Tabela 15. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 1,0J..... | 67 |
| Tabela 16. Resumo dos resultados de Precisão intermediária no nível 0,2J. | 68 |
| Tabela 17. Resumo dos resultados de Precisão intermediária no nível 1,0J. | 69 |
| Tabela 18. Resumo dos resultados de Exatidão para Suspensão injetável..... | 73 |
| Tabela 19. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 0,2J para Suspensão injetável..... | 75 |
| Tabela 20. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 1,0J para Suspensão injetável..... | 75 |
| Tabela 21. Resumo dos resultados de Exatidão para Solução oftálmica..... | 76 |
| Tabela 22. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 0,2J para Solução oftálmica. .. | 77 |
| Tabela 23. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 1,0J para Solução oftálmica. .. | 78 |
| Tabela 24. Resumo dos resultados de Exatidão para Suspensão oftálmica..... | 78 |
| Tabela 25. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 0,2J para Suspensão oftálmica. | 80 |
| Tabela 26. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 1,0J para Suspensão oftálmica. | 80 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Causas dos possíveis resultados não lineares na quantificação dos elementos por ICP-MS..... | 13 |
| Figura 2. Causas dos possíveis resultados imprecisos na quantificação dos elementos por ICP-MS. | 14 |
| Figura 3. Causas dos possíveis resultados sem exatidão na quantificação dos elementos por ICP-MS..... | 14 |
| Figura 4. Causas dos possíveis resultados sem robustez na quantificação dos elementos por ICP-MS..... | 14 |
| Figura 5. Causas dos possíveis resultados sem seletividade na quantificação dos elementos por ICP-MS..... | 15 |
| Figura 6. Causas dos possíveis resultados de limite de quantificação fora da especificação na quantificação dos elementos por ICP-MS. | 15 |
| Figura 7. Causas dos possíveis resultados de limite de detecção fora da especificação na quantificação dos elementos por ICP-MS. | 15 |
| Figura 8. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Prata (Ag). | 24 |
| Figura 9. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Arsênio (As). | 25 |
| Figura 10. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Ouro (Au). | 25 |
| Figura 11. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Bário (Ba). | 26 |
| Figura 12. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Cádmio (Cd). | 26 |
| Figura 13. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Cobalto (Co). | 27 |
| Figura 14. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Cromo (Cr). | 27 |
| Figura 15. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Cobre (Cu). | 28 |
| Figura 16. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Mercúrio (Hg). | 28 |
| Figura 17. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Irídio (Ir). | 29 |
| Figura 18. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Lítio (Li). | 29 |
| Figura 19. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Molibdênio (Mo). | 30 |
| Figura 20. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Níquel (Ni). | 30 |
| Figura 21. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Ósmio (Os). | 31 |
| Figura 22. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Chumbo (Pb). | 31 |
| Figura 23. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Paládio (Pd). | 32 |
| Figura 24. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Platina (Pt). | 32 |
| Figura 25. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Ródio (Rh). | 33 |
| Figura 26. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Rutênio (Ru). | 33 |
| Figura 27. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Antimônio (Sb). | 34 |
| Figura 28. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Selênio (Se). | 34 |
| Figura 29. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Estanho (Sn). | 35 |
| Figura 30. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Tálho (Tl). | 35 |
| Figura 31. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Vanádio (V). | 36 |
| Figura 32. Gráficos dos elementos (Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl, V) investigados nos experimentos do DoE otimizados. | 38 |
| Figura 33. Gráfico do elemento chumbo investigado no experimento do DoE otimizados. | 39 |
| Figura 34. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Prata (Ag). | 49 |
| Figura 35. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Arsênio (As). | 50 |
| Figura 36. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Ouro (Au). | 50 |
| Figura 37. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Bário (Ba). | 51 |

| | |
|--|----|
| Figura 38. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Cádmio (Cd)..... | 51 |
| Figura 39. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Cobalto (Co)..... | 52 |
| Figura 40. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Cromo (Cr)..... | 52 |
| Figura 41. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Cobre (Cu). | 53 |
| Figura 42. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Mercúrio (Hg). | 53 |
| Figura 43. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Irídio (Ir). | 54 |
| Figura 44. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Lítio (Li)..... | 54 |
| Figura 45. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Molibdênio (Mo)..... | 55 |
| Figura 46. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Níquel (Ni). | 55 |
| Figura 47. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Ósmio (Os)..... | 56 |
| Figura 48. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Chumbo (Pb)..... | 56 |
| Figura 49. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Paládio (Pd)..... | 57 |
| Figura 50. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Platina (Pt). | 57 |
| Figura 51. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Ródio (Rh). | 58 |
| Figura 52. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Rutênio (Ru)..... | 58 |
| Figura 53. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Antimônio (Sb). | 59 |
| Figura 54. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Selênio (Se)..... | 59 |
| Figura 55. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Estanho (Sn)..... | 60 |
| Figura 56. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Tálcio (Tl)..... | 60 |
| Figura 57. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Vanádio (V). | 61 |
| Figura 58. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Prata (Ag). | 82 |
| Figura 59. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Arsênio (As). | 82 |
| Figura 60. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Ouro (Au). | 83 |
| Figura 61. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Bário (Ba)..... | 83 |
| Figura 62. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Cádmio (Cd)..... | 84 |
| Figura 63. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Cobalto (Co)..... | 84 |
| Figura 64. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Cromo (Cr). | 85 |
| Figura 65. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Cobre (Cu)..... | 85 |
| Figura 66. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Mercúrio (Hg). | 86 |
| Figura 67. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Irídio (Ir). | 86 |
| Figura 68. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Lítio (Li)..... | 87 |
| Figura 69. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Molibdênio (Mo)... | 87 |
| Figura 70. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Níquel (Ni). | 88 |
| Figura 71. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Ósmio (Os). | 88 |
| Figura 72. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Chumbo (Pb). | 89 |
| Figura 73. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Paládio (Pd)..... | 89 |
| Figura 74. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Platina (Pt)..... | 90 |
| Figura 75. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Ródio (Rh)..... | 90 |
| Figura 76. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Rutênio (Ru)..... | 91 |
| Figura 77. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Antimônio (Sb). | 91 |
| Figura 78. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Selênio (Se). | 92 |
| Figura 79. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Estanho (Sn). | 92 |
| Figura 80. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Tálcio (Tl). | 93 |
| Figura 81. Gráficos dos perfis de estabilidade das soluções do elemento Vanádio (V)..... | 93 |

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR ICP-MS UTILIZANDO AQBD PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM SOLUÇÕES INJETÁVEIS. A presença de impurezas elementares (IE) em medicamentos, como metais pesados, representa um risco à saúde humana devido à sua alta toxicidade mesmo em baixas concentrações e para garantir a segurança dos pacientes, é essencial realizar uma avaliação rigorosa desses contaminantes. A diretriz internacional ICH Q3D (*International Council for Harmonisation Guideline Q3D: Guideline for Elemental Impurities*) estabelece limites de PDE (*Permitted Daily Exposure*) com base em dados toxicológicos e na via de administração do medicamento. Em complemento, os capítulos da USP (*United States Pharmacopeia*) expressam técnicas analíticas modernos, como ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) e ICP OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*), que permitem detectar e quantificar essas impurezas com alta sensibilidade, constituindo um sistema eficaz de controle de qualidade. Frente a esta necessidade de identificação e controle destes contaminantes inorgânicos provenientes de matérias-primas, processos de fabricação, equipamentos e embalagens no produto final, o seguinte trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um método analítico seguro e validado, utilizando a técnica de ICP-MS, por meio de AQbD (*Analytical Quality by Design*) para a determinação das 24 impurezas elementares controladas pelo guia em fármacos de matriz injetável. Para alcançar este objetivo, foi definido como ATP (*Analytical Target Profile*) método capaz de quantificar as IE em soluções injetáveis, com percentual de recuperação média e individual entre 70 e 150%, DPR (Desvio Padrão Relativo) $\leq 20\%$, coeficiente de correlação da curva de calibração $\geq 0,99$ e limite de detecção superior a $0,2J \mu\text{g/L}$. Se o método for capaz de quantificar o elemento em concentrações iguais ou inferiores a 30% do "J", ele pode em alguns casos, até dispensar a necessidade de monitoramento contínuo. Em seguida, elaborou-se um diagrama de causa e efeito (Ishikawa) com o objetivo de identificar os potenciais parâmetros críticos do método analítico. Esses parâmetros foram posteriormente classificados quanto ao seu risco utilizando a ferramenta FMEA (*Failure Mode and Effects Analysis*), resultando na seleção de quatro fatores experimentais com maior potencial de impacto na resposta analítica: fluxo do gás nebulizador (L/min), potência do plasma (W), acidez da solução diluente (% HNO_3) e fator de diluição da amostra. Esses fatores foram avaliados em três níveis codificados (-1, 0, +1), conforme delineamento experimental baseado em CCD (*Central Composite Design*), implementado por meio do software estatístico Minitab. O estudo gerou um total de 155 experimentos, com o objetivo de modelar e compreender as variações na resposta analítica decorrentes de alterações

intencionais nos parâmetros selecionados. A abordagem visou delimitar a MODR (*Method Operable Design Region*), dentro da qual o desempenho analítico atende aos critérios estabelecidos no ATP, assegurando robustez, precisão e confiabilidade ao longo do ciclo de vida do método. Os resultados obtidos demonstraram valores de recuperação compatíveis com os níveis de fortificação aplicados, situando-se próximos ao limite superior da faixa de especificação (100%). Diante da robustez, consistência e desempenho analítico observados, concluiu-se que os parâmetros definidos no DoE (*Design of Experiments*) são adequados para adoção como método definitivo, tanto para a construção das curvas analíticas quanto para o preparo das amostras, assegurando confiabilidade e reprodutibilidade nos processos subsequentes.

Palavras-chave: Impurezas elementares; ICP-MS; AQBd; ICH Q3D.

Abstract

DEVELOPMENT OF AN ICP-MS METHOD USING AQbD FOR THE DETERMINATION OF ELEMENTAL IMPURITIES IN INJECTABLE SOLUTIONS. The presence of elemental impurities (EI) in medicines, such as heavy metals, represents a risk to human health due to their high toxicity even at low concentrations, and to ensure patient safety, it is essential to carry out a rigorous assessment of these contaminants. The international guideline ICH Q3D (International Council for Harmonisation Guideline Q3D: Guideline for Elemental Impurities) establishes PDE (Permitted Daily Exposure) limits based on toxicological data and the route of drug administration. In addition, chapters of the USP (United States Pharmacopeia) describe modern analytical techniques, such as ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) and ICP OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry), which allow for the detection and quantification of these impurities with high sensitivity, constituting an effective quality control system. In view of the need to identify and control inorganic contaminants originating from raw materials, manufacturing processes, equipment, and packaging in the final product, this work aims to develop a safe and validated analytical method using ICP-MS, through AQbD (Analytical Quality by Design), for the determination of the 24 elemental impurities controlled by the guideline in injectable-matrix pharmaceuticals. To achieve this objective, the ATP (Analytical Target Profile) was defined as a method capable of quantifying IE in injectable solutions, with an average and individual recovery percentage between 70 and 150%, $RSD \leq 20\%$, discovery curve scanning coefficient ≥ 0.99 , and a detection limit greater than $0.2 \text{ J } \mu\text{g/L}$. If the method is capable of quantifying the element at concentrations equal to or lower than 30% of “J”, it may, in some cases, even eliminate the need for continuous monitoring. Next, a cause-and-effect (Ishikawa) diagram was developed with the aim of identifying the potential critical method parameters of the analytical procedure. These parameters were subsequently classified according to their risk using the FMEA (Failure Mode and Effects Analysis) tool, resulting in the selection of four experimental factors with the greatest potential impact on the analytical response: nebulizer gas flow (L/min), plasma power (W), acidity of the diluent solution (% HNO_3), and sample dilution factor. These factors were evaluated at three coded levels (-1, 0, +1), following an experimental design based on a CCD (Central Composite Design), implemented using the statistical software Minitab. The study generated a total of 155 experiments, aiming to model and understand variations in the analytical response resulting from intentional changes in the selected parameters. This approach sought to define the method’s MODR (Method Operable Design Region), within which analytical performance meets the criteria established in the ATP, ensuring robustness,

precision, and reliability throughout the method's lifecycle. The results obtained showed recovery values consistent with the applied spiking levels, falling close to the upper limit of the specification range (100%). Given the robustness, consistency, and analytical performance observed, it was concluded that the parameters defined in the DoE (Design of Experiments) are suitable for adoption as the definitive method, both for constructing analytical calibration curves and for sample preparation, ensuring reliability and reproducibility in subsequent processes.

Keywords: Elemental impurities; ICP-MS; AqBD; ICH Q3D.

Sumário

| | | |
|----------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. | Introdução | 1 |
| 1.2. | Revisão bibliográfica | 3 |
| 1.2.1. | Legislação | 3 |
| 1.2.2. | Caracterização das impurezas..... | 4 |
| 1.2.3. | ICP-MS e ICP OES | 5 |
| 1.2.4. | Padrão interno e isótopos..... | 6 |
| 1.2.5. | AQbD | 8 |
| 1.2.5.1. | ATP (Analytical Target Profile) | 8 |
| 1.2.5.2. | Diagrama de causa e efeito (Ishikawa) | 9 |
| 1.2.5.3. | FMEA (Failure Mode and Effects Analysis)..... | 9 |
| 1.2.5.4. | DoE | 10 |
| 2. | OBJETIVO..... | 11 |
| 2.1. | Objetivos gerais | 11 |
| 2.2. | Objetivos específicos | 11 |
| 3. | METODOLOGIA EXPERIMENTAL..... | 12 |
| 3.1. | Definição do ATP..... | 12 |
| 3.2. | Elaboração do diagrama de Ishikawa..... | 13 |
| 3.3. | Elaboração do FMEA..... | 16 |
| 3.4. | Definição do DoE | 18 |
| 3.5. | Experimentos do DoE | 22 |
| 3.6. | Metodologia | 40 |
| 3.6.1. | Informações complementares | 40 |
| 3.6.2. | Metodologia instrumental | 41 |
| 3.6.3. | Preparo das soluções | 41 |
| 3.6.3.1. | Preparo amostras fortificadas e não fortificadas | 45 |
| 3.6.4. | Adequabilidade do sistema..... | 45 |
| 3.6.5. | Procedimento | 45 |
| 3.6.6. | Cálculo | 46 |
| 3.7. | Parâmetros de validação | 47 |
| 3.7.1. | Especificidade | 47 |
| 3.7.2. | Linearidade | 47 |
| 3.7.2.1. | Resultados da linearidade..... | 48 |

| | | |
|------------|---|----|
| 3.7.3. | Exatidão | 62 |
| 3.7.3.1. | Resultados da exatidão | 63 |
| 3.7.4. | Precisão | 65 |
| 3.7.4.1. | Resultados da Repetibilidade..... | 66 |
| 3.7.4.2. | Resultados da Precisão intermediária..... | 68 |
| 3.7.5. | Limite de quantificação..... | 70 |
| 3.7.5.1. | Resultados do limite de quantificação | 71 |
| 3.7.6. | Robustez | 71 |
| 3.7.6.1. | Resultados da robustez..... | 72 |
| 3.7.6.1.1. | Suspensão injetável | 73 |
| 3.7.6.1.2. | Solução oftálmica | 76 |
| 3.7.6.1.3. | Suspensão oftálmica | 78 |
| 3.7.7. | Estabilidade da solução | 81 |
| 3.7.7.1. | Resultados da estabilidade das soluções | 82 |
| 4. | CONCLUSÃO | 95 |
| 5. | REFERÊNCIAS..... | 96 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução

As impurezas elementares são contaminantes inorgânicos — metais e semimetais — que podem ingressar nos medicamentos por múltiplas vias, incluindo matérias-primas, processos produtivos, equipamentos, ambiente fabril e materiais de embalagem. Devido ao seu potencial tóxico, exigem avaliação e controle rigorosos. A diretriz ICH Q3D estabelece a estrutura de gerenciamento de risco para essas impurezas, definindo limites de PDE com base em dados toxicológicos e na via de administração, de modo a garantir que a exposição do paciente permaneça dentro de níveis seguros. Em conjunto, a USP orienta a indústria na identificação, avaliação e controle dessas impurezas por meio de três etapas principais: 1) identificação das possíveis fontes de contaminação; 2) comparação entre o PDE e a dose máxima diária (DMD) do produto; 3) análise dos resultados analíticos dos componentes e do produto acabado, dispensando controle rotineiro quando a soma das contribuições for inferior a 30% do PDE. A USP complementa esse arcabouço ao descrever procedimentos analíticos validados para quantificação de impurezas elementares, recomendando técnicas modernas como ICP-MS e ICP OES, devido à alta sensibilidade e capacidade multielementar.

O DoE é uma ferramenta estatística essencial para o desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas e farmacêuticas, pois permite compreender de forma estruturada como variáveis críticas influenciam as figuras de mérito de um método e, assim, otimizar seu desempenho. Na indústria farmacêutica, o DoE é amplamente aplicado tanto no desenvolvimento de formulações, visando aprimorar eficácia e estabilidade, quanto na validação de métodos analíticos, assegurando precisão, exatidão e robustez na determinação de impurezas e outros componentes.

Estudos como o de Lanot et al. demonstram a eficácia do DoE na otimização da calibração interna em ICP-MS para 26 elementos. Utilizando um planejamento fatorial completo, os autores avaliaram sistematicamente combinações de fatores — como fluxo de gás de nebulização, voltagem do defletor, potência de RF, parâmetros da célula de colisão/reação, concentração do padrão interno e matriz — em três níveis, cobrindo faixas de concentração de 10–8000 µg/L para os analitos e 1–2000 µg/L para os padrões internos. O estudo evidenciou que a escolha adequada do padrão interno e a otimização simultânea de múltiplos parâmetros aumentam significativamente a precisão e a confiabilidade das medições multielementares. De

forma complementar, a dissertação de Kilpeläinen reforça que o DoE é particularmente valioso para otimizar métodos de ICP-MS, permitindo avaliar de maneira eficiente variáveis como seleção de padrões internos, controle de interferências e ajustes de fluxo de gás. O autor destaca que abordagens tradicionais de otimização, baseadas em tentativa e erro, são lentas e pouco eficazes, enquanto técnicas como planejamento fatorial e superfícies de resposta possibilitam identificar rapidamente condições experimentais ideais e compreender interações entre fatores.

Em síntese, os estudos convergem ao demonstrar que o DoE é uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de métodos robustos em ICP-MS, promovendo maior sensibilidade, precisão e exatidão, além de contribuir para a conformidade regulatória e para a eficiência no desenvolvimento analítico.

Na prática, o AQbD utiliza o DoE para identificar e ajustar os CMAs e CPPs (*Critical Method Attributes*; e *Critical Process Parameters*, respectivamente), e segundo Fukuda et al., o AQbD segue etapas estruturadas, sendo elas: Definição do ATP, onde especifica o desempenho esperado do método, guiando todas as decisões subsequentes; Identificação dos AMPC (*Analytical Method Performance Characteristics*), os atributos críticos que impactam seletividade, sensibilidade e robustez; Análise de riscos, utilizando de ferramentas como FMEA para identificar fatores que podem comprometer o desempenho; Aplicação do DoE para a avaliação sistemática de variáveis e suas interações para estabelecer condições ótimas; Construção do Design Space analítico, definido como MODR, encontrando a faixa operacional segura na qual o método mantém desempenho adequado; por fim, o monitoramento contínuo ao longo do ciclo de vida do método.

Reviews de Reid, Peraman e Ameen reforçam que o AQbD integra ferramentas estatísticas, análise de risco e definição clara de ATP para reduzir variabilidade, aumentar a consistência analítica e garantir conformidade regulatória, além de promover inovação e eficiência.

No contexto deste trabalho, o AQbD — com ênfase no DoE — será aplicado ao desenvolvimento e validação de um método ICP-MS para determinação de impurezas elementares em soluções e suspensões injetáveis, incluindo formulações oftálmicas, assegurando desempenho robusto e adequado às exigências regulatórias.

1.2. Revisão bibliográfica

1.2.1. Legislação

O presente projeto de mestrado fundamenta-se em um conjunto de legislações e diretrizes nacionais e internacionais que estabelecem padrões de qualidade, segurança e confiabilidade para métodos analíticos e processos farmacêuticos. Entre elas, destacam-se a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 166/2017 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os capítulos da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP <232>, <233>, <730> e <1225>), além das diretrizes do International Council for Harmonisation (ICH Q2 (R2), Q3D, Q8, Q9 e Q14).

A RDC 166/2017 constitui o marco regulatório brasileiro para validação de métodos analíticos, definindo parâmetros como especificidade, precisão, exatidão, linearidade, limites de detecção e quantificação, e robustez. Essa norma garante que os métodos empregados sejam adequados ao uso pretendido e alinhados às exigências internacionais.

No âmbito da USP, o capítulo <232> estabelece os limites de impurezas elementares em medicamentos, enquanto o <233> descreve os procedimentos analíticos recomendados para sua determinação, com destaque para técnicas modernas como ICP OES e ICP-MS. O USP <730> complementa esse conjunto ao detalhar os fundamentos das metodologias espectroquímicas de plasma, essenciais para a quantificação de metais em níveis traço. Já o USP <1225> apresenta os princípios de validação de métodos compendiais, reforçando a necessidade de comprovar a confiabilidade e adequação dos procedimentos analíticos.

As diretrizes do ICH ampliam essa base normativa. O ICH Q2 (R2) trata da validação de métodos analíticos, em estreita correlação com a RDC 166 e o USP <1225>, estabelecendo parâmetros universais de desempenho. O ICH Q3D aborda especificamente as impurezas elementares, definindo limites de exposição diária e estratégias de controle, em consonância com os capítulos USP <232> e <233>. O ICH Q8 introduz o conceito de QbD (*Quality by Design*), incentivando uma abordagem científica e preventiva no desenvolvimento farmacêutico. O ICH Q9 complementa essa visão ao estabelecer princípios de gestão de risco da qualidade, integrando ferramentas para identificar e mitigar potenciais falhas nos processos. Por fim, o ICH Q14 traz diretrizes para o desenvolvimento de métodos analíticos, conectando-se diretamente ao Q2 ao fornecer a base científica para validação, e reforçando a importância da robustez e da compreensão do design space analítico.

Em conjunto, essas legislações e guias formam um arcabouço regulatório sólido e harmonizado, que assegura a qualidade dos medicamentos e a confiabilidade dos métodos

analíticos. A correlação entre normas nacionais (RDC 166), capítulos da USP e diretrizes do ICH demonstra a convergência internacional em torno de práticas científicas e regulatórias, constituindo o alicerce teórico e metodológico deste projeto de mestrado.

1.2.2. Caracterização das impurezas

De acordo com o capítulo USP <232>, as impurezas elementares são classificadas em duas grandes categorias: como catalisadores residuais ou como contaminantes ambientais. Essas impurezas podem estar presentes em substâncias ativas, excipientes ou produtos farmacêuticos acabados, sendo introduzidas de maneira natural, intencional ou até mesmo inadvertida, por exemplo, através de equipamentos de processamento ou sistemas de embalagem.

Os catalisadores residuais correspondem a metais utilizados em processos de síntese química que podem permanecer no produto final. Já os contaminantes ambientais são elementos tóxicos que entram em contato com o medicamento por meio da água, do ar, do solo ou dos equipamentos de fabricação. Entre os elementos, os considerados mais críticos devido ao seu potencial tóxico pela USP, são:

- **Arsênio (As):** metaloide encontrado em minerais, água e alimentos. É bioacumulativo e praticamente todos os seus compostos são tóxicos. Ele atua como inibidor da respiração celular, acumulando-se nas mitocôndrias e comprometendo a síntese proteica. A exposição pode ocorrer por via oral ou respiratória. Os efeitos incluem lesões cutâneas, problemas gastrointestinais, neuropatias e risco aumentado de câncer. A dose letal é relativamente baixa, cerca de 0,07 g/kg (ANTÔNIO, 2014);

- **Cádmio (Cd):** O cádmio é obtido como subproduto da fundição de zinco e chumbo. É muito estável no ambiente e tem meia-vida biológica de até 30 anos, acumulando-se principalmente nos rins e fígado. A principal fonte de exposição é a dieta e o tabaco. Seus efeitos tóxicos incluem disfunção renal, problemas respiratórios, osteoporose e risco de câncer. Por ser eliminado lentamente, mesmo pequenas exposições crônicas podem gerar danos graves (ROCHA, 2008/2009);

- **Chumbo (Pb):** O chumbo é amplamente distribuído no ambiente devido a atividades industriais e uso histórico em tintas e combustíveis. Ele se acumula nos ossos e tecidos moles. A intoxicação por chumbo, chamada plumbismo, pode causar anemia, hipertensão, encefalopatia, danos renais e déficits cognitivos, especialmente em crianças. Mesmo níveis baixos de exposição estão associados a prejuízos no desenvolvimento neurológico. O

tratamento envolve cessar a exposição e, em casos graves, usar agentes quelantes (ROCHA, 2008/2009);

- Mercúrio (Hg): O mercúrio existe em três formas principais — metálico, inorgânico e orgânico (como o metilmercúrio). Todas são tóxicas, mas o metilmercúrio é o mais perigoso, acumulando-se na cadeia alimentar, especialmente em peixes. Os efeitos incluem danos neurológicos, tremores, perda de memória, alterações cognitivas e problemas renais. A Organização Mundial da Saúde considera o mercúrio um dos dez produtos químicos de maior preocupação para a saúde pública (ROCHA, 2008/2009).

O capítulo estabelece que o controle das impurezas elementares deve ser fundamentado nos limites de PDE, definidos em função da toxicidade intrínseca de cada elemento e da via de administração do medicamento, seja oral, parenteral, inalatória ou cutânea. A abordagem adotada é baseada em avaliação de risco, impondo ao fabricante a obrigação de identificar e analisar o potencial de introdução dessas impurezas em todas as etapas do processo produtivo, assegurando que as concentrações permaneçam abaixo dos limites considerados seguros para o paciente. Além disso, o capítulo prevê que outras impurezas relevantes (Classe 2A, 2B, 3) também sejam contempladas na avaliação de risco, de acordo com a estratégia de controle estabelecida e o tipo de análise empregada, garantindo uma gestão abrangente e sistemática da qualidade.

1.2.3. ICP-MS e ICP OES

A técnica de ICP-MS e a de ICP OES são métodos analíticos amplamente utilizados para a determinação de impurezas elementares em diferentes matrizes, como medicamentos, alimentos e amostras ambientais. Ambas se baseiam na utilização de um plasma indutivamente acoplado como fonte de excitação ou ionização, mas diferem no princípio de detecção e na sensibilidade alcançada.

No ICP-MS, os átomos presentes na amostra são ionizados no plasma e posteriormente separados e detectados de acordo com sua relação massa/carga (m/z). Essa técnica apresenta altíssima sensibilidade, capaz de detectar concentrações na faixa de partes por trilhão (ppt), sendo especialmente indicada para elementos tóxicos que precisam ser monitorados em níveis ultratraço, como arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio. Além disso, o ICP-MS permite a análise multielementar simultânea e a identificação de isótopos, o que amplia suas aplicações em estudos de rastreabilidade. Entretanto, trata-se de um método de maior custo e complexidade

operacional, exigindo maior qualificação técnica e cuidados adicionais para evitar interferências espectrais e de matriz.

Já o ICP OES baseia-se na emissão óptica característica dos átomos excitados no plasma, que liberam radiação ao retornarem ao estado fundamental. Essa radiação é medida em comprimentos de onda específicos, permitindo a quantificação dos elementos presentes. O ICP OES apresenta boa sensibilidade, geralmente na faixa de partes por bilhão (ppb), suficiente para muitas aplicações regulatórias e industriais. É uma técnica mais acessível em termos de custo e operação, sendo bastante utilizada em análises de rotina. Contudo, possui limites de detecção mais altos em comparação ao ICP-MS e não permite a diferenciação isotópica, o que restringe seu uso em situações que exigem maior sensibilidade ou rastreabilidade.

Em síntese, ambas as técnicas se complementam: o ICP OES é indicado para análises de rotina e concentrações moderadas de metais, enquanto o ICP-MS é indispensável quando se exige maior sensibilidade e rastreabilidade isotópica. A escolha entre uma ou outra depende dos objetivos da análise, dos limites regulatórios aplicáveis e dos recursos disponíveis no laboratório.

1.2.4. Padrão interno e isótopos

Na técnica de ICP-MS, a definição dos padrões internos é uma etapa essencial para garantir que os resultados não sejam distorcidos por variações instrumentais, efeitos de matriz, e interferências não espectrais. Os padrões internos são elementos adicionados em concentração conhecida às amostras, aos brancos e às soluções de calibração, com a função de corrigir variações que podem ocorrer durante o processo analítico, como flutuações no plasma, instabilidades no sistema de nebulização, interferências de matriz ou deriva instrumental.

A escolha adequada desses padrões deve seguir alguns critérios fundamentais. Em primeiro lugar, o elemento selecionado não deve estar presente naturalmente na amostra ou nos reagentes utilizados, evitando contaminações e sobreposição de sinais. Além disso, é importante que o padrão interno possua propriedades físico-químicas semelhantes às dos analitos de interesse, como massa atômica e energia de ionização próximas, de modo que ambos sofram efeitos semelhantes no plasma e no sistema de detecção.

Outro ponto relevante é a distribuição dos padrões internos ao longo da faixa de massas analisadas. Em geral, utiliza-se um conjunto de padrões que “cercam” os analitos em diferentes regiões do espectro, garantindo correção adequada para elementos leves, médios e pesados. Por exemplo, o escândio (Sc) ou o germânio (Ge) podem ser usados para elementos leves; o ítrio

(Y) ou o índio (In) para elementos de massa intermediária; e o bismuto (Bi), irídio (Ir) ou a platina (Pt) para elementos pesados.

Na prática, os padrões internos são adicionados (quando constatada necessidade) em concentrações baixas, geralmente na faixa de microgramas por litro, suficientes para gerar resposta instrumental estável sem saturar o detector. Eles devem ser preparados na mesma matriz química das amostras e soluções de calibração, assegurando que os efeitos de acidez e sais sejam igualmente corrigidos.

A escolha do isótopo de cada elemento deve equilibrar três critérios principais: abundância natural suficiente para gerar bom sinal; mínima suscetibilidade a interferências espectrais (poliatômicas, isobáricas, óxidos metálicos (MO^+) e íons duplamente carregados); e compatibilidade com o modo de operação (sem célula, com hélio como gás de colisão, ou com gases reativos como H_2/O_2). A decisão é sempre contextual: depende da matriz, dos reagentes (especialmente HCl e HNO_3), da faixa de concentração esperada e do desempenho do instrumento (limite de detecção, resolução de massa e comportamento do detector).

A abundância natural orienta a preferência por isótopos majoritários para maximizar sensibilidade, desde que não sejam dominados por interferências. Quando o isótopo mais abundante sofre interferência significativa, migra-se para um isótopo secundário com menor interferência, aceitando uma perda controlada de sensibilidade.

As interferências poliatômicas comuns em ICP-MS derivam do argônio do plasma e de espécies formadas na matriz ácida: ArO^+ , ArH^+ , $ArCl^+$, NO^+ , ClO^+ , além de óxidos/hidretos do próprio analito ($M^{+1}H$, MO^+). Exemplos práticos que guiam a seleção: para cromo, ^{52}Cr pode sofrer interferência do $^{40}Ar^{12}C^+$, assim sendo viável usar o ^{53}Cr quando necessário; para arsênio, ^{75}As sofre $^{40}Ar^{35}Cl^+$, sendo comum operar com gás reativo (H_2) ou selecionar condições que reduzam Cl; para selênio, $^{78}Se/^{80}Se/^{82}Se$ apresentam diferentes perfis de interferência (Ar_2 , Kr), escolhendo-se o isótopo de melhor compromisso conforme a matriz; para cádmio, ^{114}Cd pode ser afetado por SnO^+ , preferindo-se ^{111}Cd ou ^{112}Cd ; para chumbo, $^{206/207/208}Pb$ são viáveis, com ^{208}Pb frequentemente escolhido pela abundância, desde que não haja sobreposição de óxidos de elementos da matriz; para mercúrio, ^{202}Hg e ^{200}Hg são escolhas comuns, com estabilização química (por exemplo, adição de Au) para reduzir memória e perdas.

O modo da célula de colisão/reação influencia a seleção: com hélio (KED - *Kinetic Energy Discrimination*), a separação por energia cinética reduz poliatômicos de forma ampla, permitindo usar isótopos mais abundantes mesmo em matrizes desafiadoras; com H_2 ou O_2 , interferências específicas (como $ArCl^+$ para As/Se) podem ser suprimidas, habilitando o

monitoramento do isótopo monoisotópico principal com boa sensibilidade. Ademais, as estratégias de mitigação de interferências podem seguir duas rotas distintas: *on mass*, em que o analito é monitorado em seu próprio número de massa após a remoção ou discriminação das espécies interferentes, e *mass shift*, em que o analito reage com o gás da célula formando um íon de produto em uma massa diferente daquela da interferência. No modo *on mass*, a eficiência depende da capacidade do gás de colisão ou reação em reduzir seletivamente os íons poliatômicos sem afetar significativamente o sinal do analito. Já no modo *mass shift*, a escolha do gás reativo é crítica, pois deve promover uma reação previsível e quantitativa, deslocando o analito para uma massa livre de interferências. Essa abordagem amplia a flexibilidade analítica do ICP-MS, permitindo tanto a supressão direta de interferências quanto a exploração de canais alternativos de detecção com elevada seletividade e sensibilidade.

A escolha também deve considerar o comportamento do detector: evitar faixas onde o detector sature (em elementos majoritários) e ajustar tempos de permanência (*dwell time*) para manter precisão estatística sem comprometer o tempo total de varredura.

Em termos práticos, esse processo garante que a escolha de isótopos sustente resultados robustos e rastreáveis, adequados às exigências regulatórias para impurezas elementares.

1.2.5. AQBd

1.2.5.1. ATP (Analytical Target Profile)

O ATP, conforme estabelecido pelo guia ICH Q14, é um conceito central no desenvolvimento moderno de métodos analíticos. Ele consiste em uma declaração clara e objetiva que define o propósito do método, o analito ou parâmetro a ser medido e os requisitos mínimos de desempenho que devem ser atendidos para que o procedimento seja considerado adequado, comumente sendo o primeiro passo no desenvolvimento da metodologia analítica.

Na prática, o ATP funciona como um direcionador estratégico: descreve o que o método precisa alcançar em termos de precisão, exatidão, especificidade, limites de detecção e quantificação, além de robustez. Assim, o desenvolvimento analítico deixa de ser apenas uma busca por condições instrumentais e passa a ser guiado por objetivos científicos e regulatórios bem definidos.

Esse conceito traz benefícios importantes. Ele garante que diferentes abordagens metodológicas possam ser aceitas pelas autoridades regulatórias, desde que cumpram os requisitos estabelecidos no ATP, promovendo flexibilidade e inovação, garantindo que os

resultados obtidos sejam confiáveis e sustentem a qualidade e a segurança dos medicamentos, reforçando o papel da ciência aplicada na construção de processos analíticos modernos e consistentes.

1.2.5.2. Diagrama de causa e efeito (Ishikawa)

O diagrama de causa e efeito, também chamado de diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe, é uma ferramenta utilizada para identificar e organizar de maneira sistemática os fatores que podem influenciar um resultado ou problema específico. No contexto do ICH Q14, esse diagrama é aplicado ao desenvolvimento de métodos analíticos, permitindo uma visão ampla e estruturada das variáveis que podem impactar o desempenho do procedimento.

De acordo com o ICH Q14, o uso do diagrama de Ishikawa auxilia na compreensão das possíveis fontes de variação que afetam atributos críticos de desempenho do método, como precisão, exatidão, especificidade, limites de detecção e robustez. O “efeito” representado no diagrama corresponde ao resultado analítico desejado ou ao problema identificado, enquanto as “causas” são distribuídas em categorias que abrangem diferentes aspectos do processo. Entre essas categorias, podem ser incluídos fatores relacionados aos equipamentos, aos materiais e reagentes, às condições do método, aos operadores e ao ambiente de trabalho.

Ao organizar essas causas de forma visual, o diagrama facilita a análise de riscos e a tomada de decisão, permitindo que o desenvolvimento do método seja conduzido com base em ciência e gestão da qualidade. Essa prática se conecta diretamente ao ICH Q9, reforçando a importância de identificar e mitigar riscos desde as etapas iniciais do desenvolvimento analítico, contribuindo para que o procedimento seja desenvolvido de forma robusta, atendendo ao ATP e garantindo resultados confiáveis, em conformidade com os padrões regulatórios internacionais.

1.2.5.3. FMEA (Failure Mode and Effects Analysis)

A FMEA, ou Análise de Modos de Falha e seus Efeitos, é uma ferramenta de qualidade utilizada para identificar, avaliar e priorizar riscos em processos, produtos ou métodos analíticos. Sua aplicação é especialmente relevante na indústria farmacêutica, pois permite antecipar falhas potenciais e implementar medidas preventivas que aumentem a confiabilidade dos resultados e a segurança dos pacientes.

O método consiste em listar os possíveis modos de falha de um processo ou procedimento, analisar os efeitos que essas falhas podem causar e identificar suas causas prováveis. Cada falha é então avaliada segundo três critérios: severidade, que mede o impacto da falha; ocorrência, que indica a probabilidade de ela acontecer; e detecção, que avalia a capacidade de identificar a falha antes que gere consequências. A multiplicação desses três fatores resulta no RPN (*Risk Priority Number*), que permite classificar e priorizar as falhas mais críticas.

Ao aplicar a FMEA em métodos analíticos, é possível identificar vulnerabilidades e priorizar ações corretivas, o que contribui para o desenvolvimento de métodos analíticos mais robustos e confiáveis, garantindo conformidade regulatória e sustentando a qualidade dos medicamentos.

1.2.5.4. DoE

O DoE é uma ferramenta estatística fundamental dentro da abordagem de AQbD, aplicada ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos. No contexto do AQbD, o DoE permite planejar e conduzir experimentos de forma estruturada, possibilitando avaliar simultaneamente múltiplos fatores que influenciam o desempenho de um método e compreender suas interações.

Ao contrário de abordagens tradicionais, que frequentemente testam uma variável por vez, o DoE promove uma visão mais abrangente e eficiente. Ele possibilita identificar quais parâmetros são críticos para a qualidade analítica, definir o *design space* do método e estabelecer condições operacionais robustas. Dessa forma, o desenvolvimento analítico deixa de ser empírico e passa a ser guiado por ciência e estatística, em consonância com os princípios do ICH Q14 e do ICH Q8.

Durante a etapa de validação de métodos, o DoE desempenha papel fundamental na verificação da consistência do desempenho dentro do espaço de operação estabelecido. Essa abordagem permite confirmar que o método atende ao ATP em diferentes condições experimentais, assegurando que pequenas variações não comprometam a confiabilidade dos resultados. Como consequência, é possível definir o MODR, que incorpora os intervalos dos parâmetros avaliados, desde que todos permaneçam dentro da região validada, comprovando assim a robustez e a aplicabilidade do método analítico.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivos gerais

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por ICP-MS, com o auxílio da ferramenta AQbD, para determinação de impurezas elementares em soluções injetáveis com DMD \leq 20 gramas para os elementos: Prata (Ag), Arsênio (As), Ouro (Au), Bário (Ba), Cádmi (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercúrio (Hg), Irídio (Ir), Lítio (Li), Molibdênio (Mo), Níquel (Ni), Ósmio (Os), Paládio (Pd), Platina (Pt), Ródio (Rh), Rutênio (Ru), Antimônio (Sb), Selênio (Se), Estanho (Sn), Tál (Tl), Vanádio (V), e DMD \leq 10 gramas para o elemento chumbo (Pb), considerando os limites da via parenteral, de acordo com o Guia ICH Q3D, para abranger a maior gama de fármacos do portfólio da empresa com finalidade de internalização da análise de risco.

2.2. Objetivos específicos

- Aplicar a abordagem AQbD na definição do QTPP (*Quality Target Product Profile*), identificação dos CQAs (*Critical Quality Attributes*) e seleção dos CPPs relevantes para a análise de impurezas elementares.
- Estabelecer e validar metodologia por ICP-MS para quantificação dos elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl, V e Pb em soluções injetáveis, considerando os limites de DMD (\leq 20 g para os elementos listados e \leq 10 g para Pb).
- Implementar estratégias de supressão de interferências espectrais (via modos de célula de colisão/reação, rotas *on mass* e *mass shift*) para garantir seletividade e sensibilidade adequadas na determinação dos analitos.
- Avaliar e mitigar efeitos de matriz por meio da utilização de padrões internos e otimização das condições instrumentais, assegurando precisão e exatidão dos resultados.
- Validar o método analítico segundo critérios de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, robustez e especificidade, em conformidade com guias internacionais (ICH Q3D, ICH Q2(R1)).

- Documentar e consolidar a metodologia para uso interno, ampliando a capacidade da empresa em realizar análises de risco de impurezas elementares em seu portfólio de fármacos injetáveis.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Definição do ATP

Este projeto tem como prioridade determinar a recuperação das 24 impurezas elementares listadas no guia ICH Q3D em matriz injetável, com limite de quantificação adequado para garantir conformidade com os PDE estabelecidos e, para alcançar este objetivo, foi definido como ATP método capaz de quantificar as IE em soluções injetáveis, atendendo as especificações conforme USP <730>.

Entre os critérios estabelecidos para o desempenho do método estão: percentual de recuperação média e individual entre 70 e 150%, DPR menor ou igual a 20%, coeficiente de correlação da curva de calibração igual ou superior a 0,99, além de limite de detecção superior a 0,2J* (USP <730>).

Dessa forma, o projeto busca garantir que o método analítico desenvolvido seja robusto, confiável e em conformidade com as exigências regulatórias internacionais, assegurando a qualidade e a segurança das soluções injetáveis avaliadas.

*Cálculo do **J** conforme USP <233>

$$\frac{PDE}{DMD} \times \frac{m}{V} = \text{Conc. } (\mu\text{g/L})$$

Onde:

PDE é o limite máximo de exposição diária permitida a uma IE, expresso em $\mu\text{g/Dia}$, que pode ser ingerido ou administrado a um paciente sem causar risco significativo à saúde;

DMD corresponde à quantidade total de medicamento que pode ser administrada a um paciente em um período de 24 horas, conforme indicado na bula ou no regime terapêutico estabelecido, expresso em g/Dia ;

m é a massa de amostra pesada em grama (g);

V é o volume final de diluição da amostra em litros (L);

Conc. ($\mu\text{g/L}$) é comumente adotada como o valor de especificação do método analítico, sendo considerada o ponto de referência correspondente a 100% da resposta analítica. Esse valor é definido como equivalente a 1J da curva de calibração, representando o nível de quantificação estabelecido para assegurar a conformidade do método com os critérios de desempenho e a rastreabilidade dos resultados obtidos.

3.2. Elaboração do diagrama de Ishikawa

As principais causas associadas à invalidação dos testes do método foram identificadas e organizadas nas diferentes categorias do diagrama de causa e efeito (Ishikawa). Nesse modelo, as caixas externas representam as fontes primárias de problemas, enquanto as linhas conectoras indicam os fatores contribuintes detectados em cada categoria.

Na sequência (figuras 1 a 7), são apresentados os diagramas que ilustram os possíveis problemas encontrados nos testes de linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez, limite de quantificação e limite de detecção, evidenciando de forma sistemática os pontos críticos que podem comprometer a confiabilidade dos resultados e a conformidade regulatória.

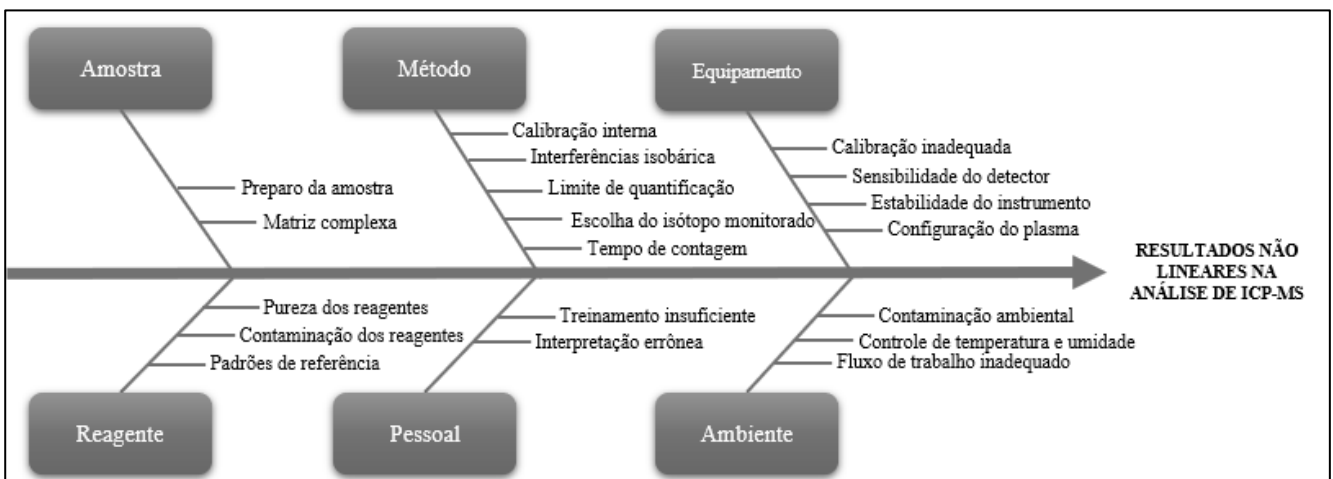


Figura 1. Causas dos possíveis resultados não lineares na quantificação dos elementos por ICP-MS.

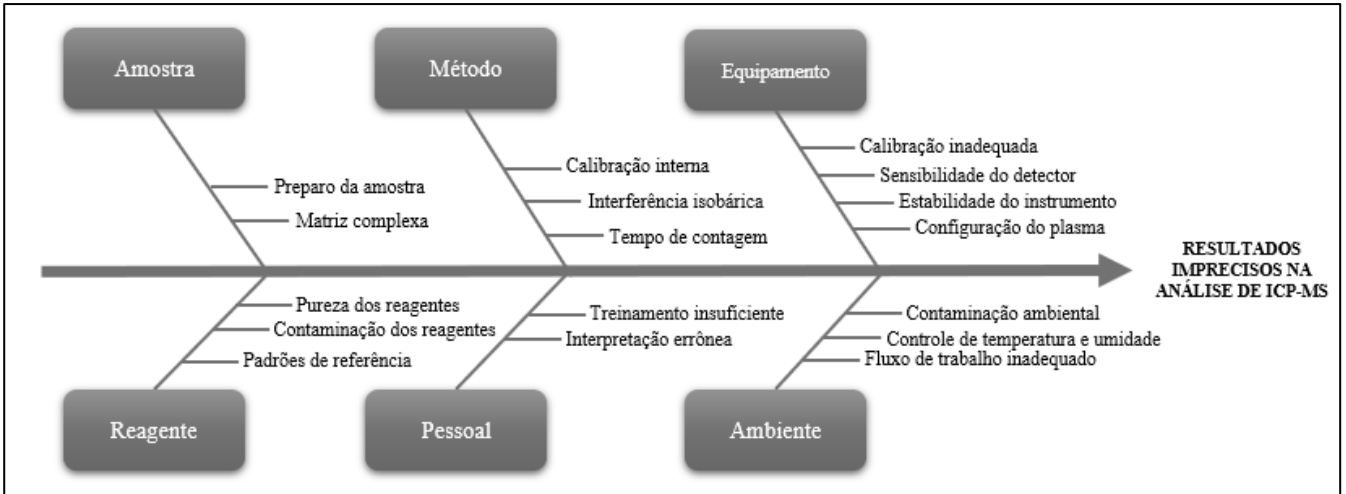


Figura 2. Causas dos possíveis resultados imprecisos na quantificação dos elementos por ICP-MS.



Figura 3. Causas dos possíveis resultados sem exatidão na quantificação dos elementos por ICP-MS.

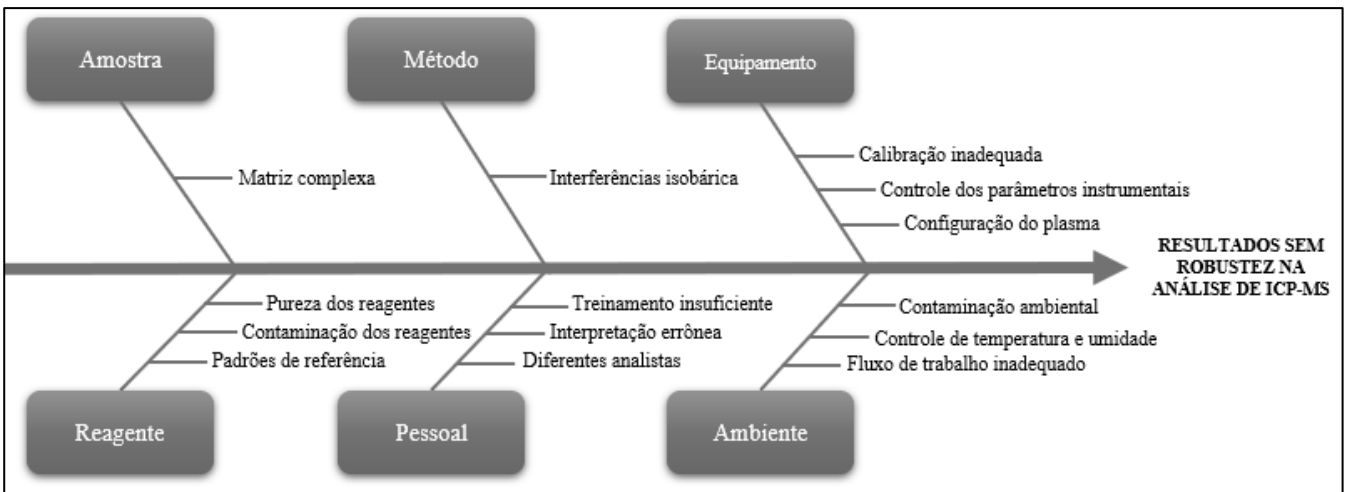


Figura 4. Causas dos possíveis resultados sem robustez na quantificação dos elementos por ICP-MS.

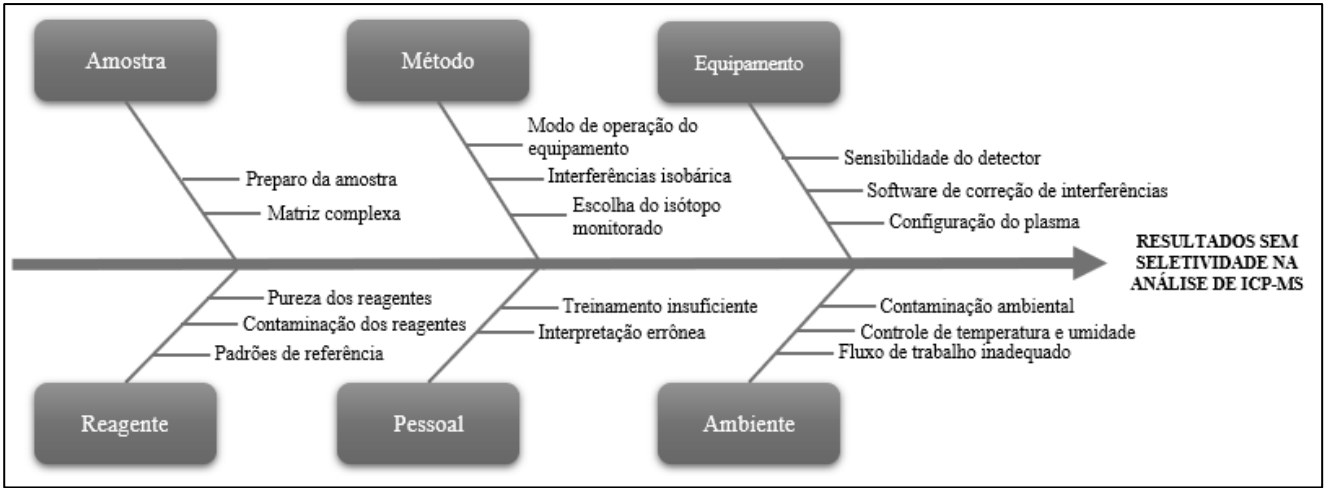


Figura 5. Causas dos possíveis resultados sem seletividade na quantificação dos elementos por ICP-MS.

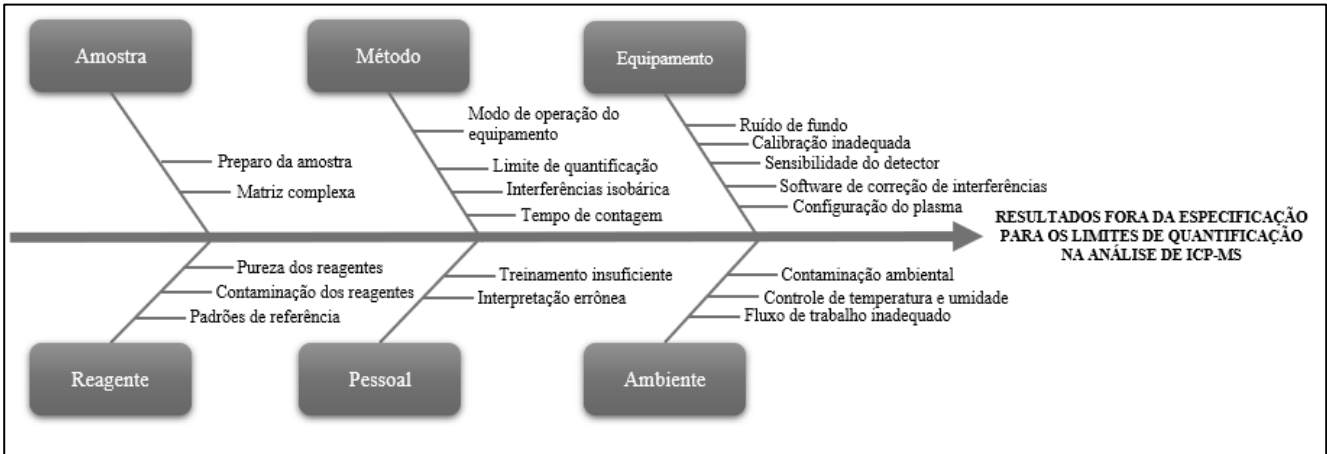


Figura 6. Causas dos possíveis resultados de limite de quantificação fora da especificação na quantificação dos elementos por ICP-MS.

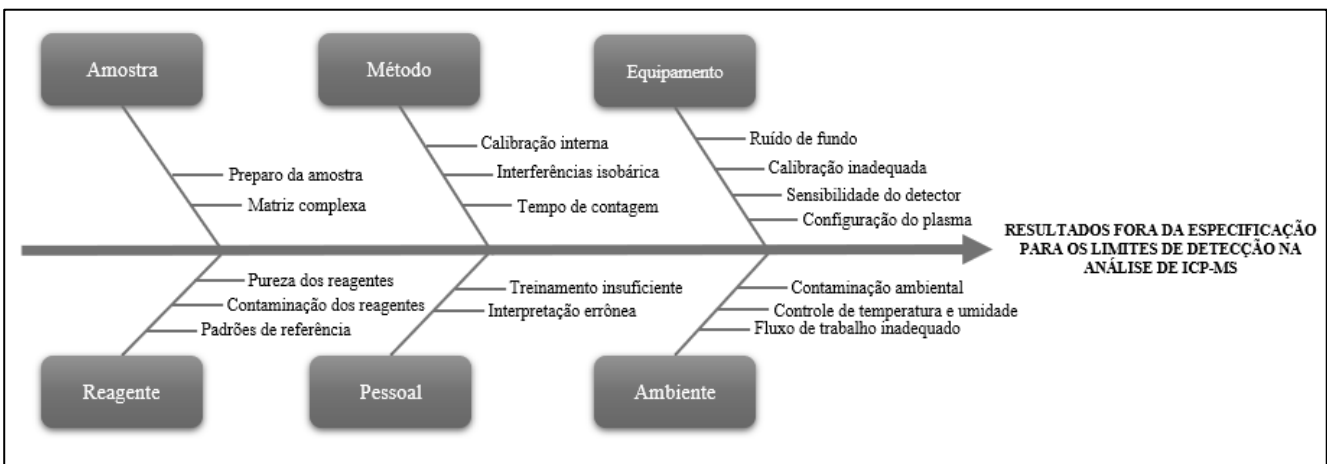


Figura 7. Causas dos possíveis resultados de limite de detecção fora da especificação na quantificação dos elementos por ICP-MS.

3.3. Elaboração do FMEA

Em sequência, após a identificação das principais causas de invalidação dos testes por meio do diagrama de Ishikawa, foi conduzida uma análise sistemática utilizando a ferramenta FMEA. Essa abordagem permitiu transformar os potenciais problemas levantados nos diagramas do item 3.2. em modos de falha específicos, avaliando seus efeitos, causas e mecanismos associados.

A aplicação da FMEA possibilitou a atribuição de valores de severidade, ocorrência e detecção a cada modo de falha, resultando no cálculo do RPN. Com isso, foi possível priorizar os riscos mais críticos e direcionar ações corretivas e preventivas de forma estruturada.

A Tabela a seguir apresenta os resultados dessa análise, consolidando os modos de falha identificados, seus impactos potenciais no desempenho do método e as medidas propostas para mitigação, garantindo maior robustez e confiabilidade ao processo analítico.

Tabela 1. Tabela FMEA (Failure Mode and Effects Analysis).

| Informações da falha | | | Classe de risco | | | NPR | Ações planejadas |
|--|--|---|-----------------|------------|----------|--|---|
| Modo de falha | Efeito da falha | Causa da falha | Severidade | Ocorrência | Detecção | | |
| Falha nos critérios de validação analítica. | Calibração inadequada | Falta de calibração regular. | 10 | 3 | 2 | 60 | Utilizar padrões certificados para ajustar as condições experimentais para a matriz da amostra e utilizar brancos adequados para confirmar a calibração adequada. |
| | Configuração do plasma | Ajuste incorreto da energia do plasma e fluxos de gás. | 10 | 4 | 2 | 80 | Desenvolver condições otimizadas do plasma (fluxo de gás, potência de RF etc.) garantem que os analitos sejam eficientemente ionizados, reduzindo a formação de espécies interferentes. |
| | Controle de parâmetros instrumentais | Variações no fluxo de gases, potência de RF ou alinhamento da tocha. | 9 | 3 | 2 | 54 | A otimização e a manutenção regular do equipamento ajudam a reduzir as instabilidades destes parâmetros. |
| | Correção da deriva instrumental | Sem correção, a deriva causa erros sistemáticos nos resultados. | 7 | 1 | 3 | 21 | O uso de padrões internos e verificações periódicas da calibração ajudam a minimizar este efeito. |
| | Estabilidade do instrumento | Oscilações no fluxo do plasma, potência de RF ou fluxo de gás de nebulização, assim como sujeira nos cones, desgaste da tocha ou problemas com o detector podem causar respostas inconsistentes, prejudicando o resultado da análise. | 9 | 3 | 2 | 54 | A manutenção/limpeza regular do instrumento garante maior estabilidade e precisão dos resultados. |
| | Ruído de fundo | Um alto nível de ruído de fundo afeta o limite de quantificação e limite de detecção do método. | 8 | 2 | 1 | 16 | Trabalhar em ambientes livres de contaminação e usar reagentes ultrapuros ajuda a minimizar o ruído de fundo. |
| | Sensibilidade do detector | Detectores que atingem saturação (nível máximo de resposta) podem causar limitações e desvios na sensibilidade ou resolução do instrumento. | 8 | 2 | 1 | 16 | A calibração do detector deve ser ajustada para evitar perdas de linearidade em faixas elevadas de concentração. |
| | Software de correção de interferências | Tratamento errôneo dos dados. | 6 | 1 | 3 | 18 | Utilizar softwares especializados para aplicar correções matemáticas para resolver interferências e aumentar a seletividade do método. |
| | Padronização interna | A ausência de padrões internos pode levar a desvios causados por variações instrumentais ou efeitos de matriz. | 6 | 1 | 1 | 6 | Padrões internos podem ajudar a melhorar a precisão e reduzir o limite de detecção, corrigindo flutuações no desempenho do ICP-MS. |
| | Escolha do isótopo monitorado | Isótopos sujeitos a interferências espectrais apresentam maior probabilidade de comprometer o resultado da análise. | 6 | 1 | 1 | 6 | Escolha o isótopo mais livre de interferências essencialmente para garantir a resposta proporcional à concentração do elemento investigado. |
| Interferências isobáricas | Interferências não corrigidas podem alterar a resposta do analito em diferentes concentrações. | 7 | 1 | 1 | 7 | O uso de células de colisão/reação ou correções matemáticas ajuda a minimizar esses efeitos. Gases como He, H ₂ ou O ₂ reagem com espécies interferentes ou reduzem sua energia cinética, melhorando a seletividade. | |

Tabela 1. Continuação...

| Informações da falha | | | Classe de risco | | | NPR | Ações planejadas |
|---|-----------------------------------|--|-----------------|------------|---------|-----|--|
| Modo de falha | Efeito da falha | Causa da falha | Severidade | Ocorrência | Deteção | | |
| Falha nos critérios de validação analítica. | Limite de quantificação | Faixas muito amplas podem levar a perda de linearidade nas extremidades (concentrações muito baixas ou muito altas) e erros consideráveis na exatidão. | 6 | 2 | 1 | 12 | Definir uma faixa dinâmica adequada ajuda a quantificar tanto analitos em baixos níveis quanto em concentrações mais altas. |
| | Modo de operação do instrumento | A escolha entre o tipo de célula de colisão/reação pode afetar diretamente a seletividade e o limite de quantificação do método. | 9 | 2 | 1 | 18 | Investigar qual a melhor células de colisão a ser utilizada para aumentar a seletividade minimizando interferentes. |
| | Tempo de contagem | Tempos curtos podem gerar sinais ruidosos e imprecisos, especialmente em concentrações baixas e tempos longos em altas concentrações podem saturar o detector, causando desvios. | 8 | 1 | 3 | 24 | Ajustar o tempo de integração para cada analito pode melhorar a precisão. |
| | Matriz complexa | Matrizes complexas podem causar efeitos de supressão ou realce, desviando a resposta da curva de calibração. | 10 | 4 | 2 | 80 | A diluição da amostra ou a compatibilização de matriz ajudam a minimizar esses efeitos. |
| | Preparo da amostra | Diluições mal realizadas ou erros na pesagem podem gerar variações entre as réplicas, desvios na relação concentração-resposta podendo comprometer os resultados. | 9 | 4 | 3 | 108 | O uso de reagentes ultrapuros e equipamentos limpos reduz as chances de contaminação e o preparo correto conforme método, garante veracidade nos resultados obtidos. |
| | Contaminação dos reagentes | Contaminações geram respostas artificiais que podem desviar a curva de calibração e aumenta a variabilidade dos resultados, prejudicando a precisão. | 8 | 3 | 2 | 48 | Uso de brancos e reagentes ultrapuros ajudam a prevenir esse problema. |
| | Padrões de referência | Desvio nos resultados. | 7 | 3 | 3 | 63 | Utilizar padrões com alto grau de pureza é crucial para uma boa resposta analítica. |
| | Pureza dos reagentes | Padrões contaminados ou degradados causam desvios nos resultados. | 8 | 3 | 1 | 24 | Utilizar materiais de referência certificados (CRMs). Ou purificar internamente com o equipamento de destilação de ácido adequado. |
| | Treinamento insuficiente | Falta de capacitação dos operadores para operar o ICP-MS ou preparar amostras. | 6 | 1 | 1 | 6 | Capacite a equipe para operação do equipamento e devido preparo das amostras. |
| | Interpretação errônea | Má compreensão dos resultados ou dos requisitos do ICH Q3D. | 6 | 1 | 1 | 6 | Capacite a equipe para compreender interferências isotópicas e poliatómicas e interpretar os resultados. |
| | Diferentes analistas | Método sem reprodutibilidade. | 9 | 3 | 1 | 27 | A comunicação clara e o registro detalhado dos resultados são cruciais para identificar e corrigir inconsistências de forma eficaz. |
| | Contaminação ambiental | Presença de elementos traço no ar ou nas superfícies do laboratório. | 8 | 1 | 5 | 40 | Utilize cabines de fluxo laminar ao preparar soluções ou amostras. Mantenha o ambiente livre de poeira e fontes de vapores ácidos. Usar reagentes de pureza elevada. |
| | Controle de temperatura e umidade | Alterações que podem afetar a estabilidade do equipamento ou das amostras. | 7 | 3 | 3 | 63 | Manter a sala do equipamento climatizada assegurando a temperatura otimizada do equipamento, preservando a integridade da amostra. Preparar a amostra em laboratório com temperatura controlada para evitar possível degradação. |
| | Fluxo de trabalho inadequado | Processos do laboratório que aumentam a exposição a contaminantes. | 8 | 1 | 5 | 40 | A amostra deve ser preparada em ambiente limpo e sujeito a pouca exposição a possíveis contaminantes externos como cabines de fluxo laminar. |

Para a classificação dos valores de Número de Prioridade de Risco (NPR), foi estabelecido um critério de limiar (threshold) que orienta a tomada de decisão conforme o grau de criticidade identificado. Neste projeto, conforme as diretrizes do guia ICH Q14 que estabelece flexibilidade metodológica necessária para a estipulação dos valores de NPR, definiu-se que NPR superiores a 80 caracterizam situações de alto risco, demandando ações corretivas imediatas; valores entre 40 e 80 indicam risco moderado, exigindo a elaboração e implementação de planos de ação voltados à mitigação; e valores inferiores a 40 são

considerados de baixo impacto, requerendo apenas monitoramento contínuo para assegurar que não evoluam para níveis críticos.

Esse critério garante uma abordagem sistemática e proporcional na gestão de riscos, priorizando recursos e esforços de acordo com a gravidade e a probabilidade das falhas detectadas.

3.4. Definição do DoE

A partir da análise do FMEA, foi possível avaliar e priorizar os fatores críticos com potencial impacto sobre a resposta analítica do método. Como resultado, dois elementos foram identificados como de influência direta na otimização: configuração do plasma e preparo da amostra. Esses, por sua vez, desdobram-se em quatro variáveis experimentais que serão investigadas: fluxo do gás nebulizador (L/min), potência do plasma (W), percentual de ácido do diluente e grau de diluição da amostra. O impacto da falha associada à matriz complexa foi avaliado de forma estratégica no estudo de robustez, com o objetivo de verificar a capacidade do método em manter desempenho consistente sob diferentes condições experimentais. Essa abordagem permitiu analisar a influência de variáveis inerentes à composição da matriz sobre os parâmetros críticos de qualidade, assegurando maior confiabilidade e ampliando a aplicabilidade do método analítico proposto em cenários reais de uso.

As faixas de variação atribuídas a cada fator investigado estão detalhadas na Tabela 2 na sequência dos seus respectivos valores normalizados.

Tabela 2. Design do experimento.

| | Fluxo gás Neb. (L/min) | Potência do Plasma (W) | Acidez Diluente (%) | Diluição Amostra |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| -1,5 | 0,735 | 1300 | 3,5 | 0,7 x (Nominal) |
| -1 | 0,848 | 1350 | 4 | 0,8 x (Nominal) |
| 0 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 (Nominal) |
| 1 | 1,3 | 1550 | 6 | 1,2 x (Nominal) |
| 1,5 | 1,1413 | 1600 | 6,5 | 1,3 x (Nominal) |
| Média | 1,074 | 1450 | 5 | 1 |
| Delta | 0,226 | 100 | 1 | 0,2 |

O delineamento experimental foi estruturado segundo o modelo de CCD, utilizado em estudos de superfície de resposta para a construção de modelos quadráticos e otimização de processos, no software estatístico Minitab. Nesse planejamento, foram considerados quatro fatores independentes, cada um avaliado em dois níveis codificados (-1 e +1), representando as condições mínima e máxima de variação. O parâmetro α (alfa) foi definido em 1,5, valor que

determina a distância dos pontos axiais em relação ao centro do planejamento, garantindo a capacidade de detectar curvaturas na resposta.

A matriz experimental resultante foi composta por diferentes tipos de pontos: os ensaios fatoriais (31 combinações básicas), realizados em quintuplicata, totalizando 80 pontos do cubo; os pontos centrais, que permitem avaliar a variabilidade experimental e a presença de curvatura, somando 35 repetições no centro do cubo; e os pontos axiais, posicionados fora do cubo fatorial para estimar os termos quadráticos, contabilizando 40 experimentos sem replicação nos pontos centrais axiais.

No conjunto, o delineamento gerou 155 experimentos, assegurando robustez estatística para a modelagem da superfície de resposta e permitindo a avaliação simultânea dos efeitos lineares, das interações entre fatores e das contribuições quadráticas, com vistas à otimização do método analítico proposto.

Os detalhes do planejamento e das análises estão apresentados na Tabela abaixo.

Tabela 3. Design do experimento.

| Ordem dos ensaios | Fluxo gás Neb. (L/min) | Potência do Plasma (W) | % ácido do diluente | Diluição da amostra | Fluxo gás Neb. (L/min) | Potência do Plasma (W) | % ácido do diluente | Diluição da amostra |
|-------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| 20 | 1,074 | 1450 | 5 | 0,7 | 0 | 0 | 0 | -1,5 |
| 50 | 1,074 | 1450 | 5 | 0,7 | 0 | 0 | 0 | -1,5 |
| 67 | 1,074 | 1450 | 5 | 0,7 | 0 | 0 | 0 | -1,5 |
| 108 | 1,074 | 1450 | 5 | 0,7 | 0 | 0 | 0 | -1,5 |
| 144 | 1,074 | 1450 | 5 | 0,7 | 0 | 0 | 0 | -1,5 |
| 9 | 0,848 | 1350 | 4 | 0,8 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 47 | 0,848 | 1350 | 4 | 0,8 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 85 | 0,848 | 1350 | 4 | 0,8 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 99 | 0,848 | 1350 | 4 | 0,8 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 133 | 0,848 | 1350 | 4 | 0,8 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 3 | 1,3 | 1350 | 4 | 0,8 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 35 | 1,3 | 1350 | 4 | 0,8 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 84 | 1,3 | 1350 | 4 | 0,8 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 110 | 1,3 | 1350 | 4 | 0,8 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 151 | 1,3 | 1350 | 4 | 0,8 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 0,848 | 1550 | 4 | 0,8 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 53 | 0,848 | 1550 | 4 | 0,8 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 66 | 0,848 | 1550 | 4 | 0,8 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 106 | 0,848 | 1550 | 4 | 0,8 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 139 | 0,848 | 1550 | 4 | 0,8 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 17 | 1,3 | 1550 | 4 | 0,8 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 36 | 1,3 | 1550 | 4 | 0,8 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 78 | 1,3 | 1550 | 4 | 0,8 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 105 | 1,3 | 1550 | 4 | 0,8 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 152 | 1,3 | 1550 | 4 | 0,8 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 12 | 0,848 | 1350 | 6 | 0,8 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 45 | 0,848 | 1350 | 6 | 0,8 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 73 | 0,848 | 1350 | 6 | 0,8 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 96 | 0,848 | 1350 | 6 | 0,8 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 148 | 0,848 | 1350 | 6 | 0,8 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 31 | 1,3 | 1350 | 6 | 0,8 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 34 | 1,3 | 1350 | 6 | 0,8 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 81 | 1,3 | 1350 | 6 | 0,8 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 121 | 1,3 | 1350 | 6 | 0,8 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 154 | 1,3 | 1350 | 6 | 0,8 | 1 | -1 | 1 | -1 |

Tabela 3. Continuação...

| Ordem dos ensaios | Fluxo gás Neb. (L/min) | Potência do Plasma (W) | % ácido do diluente | Diluição da amostra | Fluxo gás Neb. (L/min) | Potência do Plasma (W) | % ácido do diluente | Diluição da amostra |
|-------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| 25 | 0,848 | 1550 | 6 | 0,8 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 58 | 0,848 | 1550 | 6 | 0,8 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 80 | 0,848 | 1550 | 6 | 0,8 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 102 | 0,848 | 1550 | 6 | 0,8 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 155 | 0,848 | 1550 | 6 | 0,8 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 29 | 1,3 | 1550 | 6 | 0,8 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 48 | 1,3 | 1550 | 6 | 0,8 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 89 | 1,3 | 1550 | 6 | 0,8 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 116 | 1,3 | 1550 | 6 | 0,8 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 129 | 1,3 | 1550 | 6 | 0,8 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 16 | 1,074 | 1450 | 3,5 | 1 | 0 | 0 | -1,5 | 0 |
| 62 | 1,074 | 1450 | 3,5 | 1 | 0 | 0 | -1,5 | 0 |
| 82 | 1,074 | 1450 | 3,5 | 1 | 0 | 0 | -1,5 | 0 |
| 95 | 1,074 | 1450 | 3,5 | 1 | 0 | 0 | -1,5 | 0 |
| 153 | 1,074 | 1450 | 3,5 | 1 | 0 | 0 | -1,5 | 0 |
| 27 | 1,074 | 1300 | 5 | 1 | 0 | -1,5 | 0 | 0 |
| 44 | 1,074 | 1300 | 5 | 1 | 0 | -1,5 | 0 | 0 |
| 63 | 1,074 | 1300 | 5 | 1 | 0 | -1,5 | 0 | 0 |
| 100 | 1,074 | 1300 | 5 | 1 | 0 | -1,5 | 0 | 0 |
| 136 | 1,074 | 1300 | 5 | 1 | 0 | -1,5 | 0 | 0 |
| 14 | 0,735 | 1450 | 5 | 1 | -1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 42 | 0,735 | 1450 | 5 | 1 | -1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 86 | 0,735 | 1450 | 5 | 1 | -1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 114 | 0,735 | 1450 | 5 | 1 | -1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 126 | 0,735 | 1450 | 5 | 1 | -1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 49 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 54 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 56 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 64 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 65 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 71 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 75 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 79 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 87 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 90 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 103 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 104 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 107 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 111 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 112 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 118 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 123 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 125 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 130 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 135 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 137 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 145 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 147 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 149 | 1,074 | 1450 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 1,413 | 1450 | 5 | 1 | 1,5 | 0 | 0 | 0 |

Tabela 3. Continuação...

| Ordem dos ensaios | Fluxo gás Neb. (L/min) | Potência do Plasma (W) | % ácido do diluente | Diluição da amostra | Fluxo gás Neb. (L/min) | Potência do Plasma (W) | % ácido do diluente | Diluição da amostra |
|-------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| 38 | 1,413 | 1450 | 5 | 1 | 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 70 | 1,413 | 1450 | 5 | 1 | 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 117 | 1,413 | 1450 | 5 | 1 | 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 132 | 1,413 | 1450 | 5 | 1 | 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 1,074 | 1600 | 5 | 1 | 0 | 1,5 | 0 | 0 |
| 59 | 1,074 | 1600 | 5 | 1 | 0 | 1,5 | 0 | 0 |
| 92 | 1,074 | 1600 | 5 | 1 | 0 | 1,5 | 0 | 0 |
| 122 | 1,074 | 1600 | 5 | 1 | 0 | 1,5 | 0 | 0 |
| 131 | 1,074 | 1600 | 5 | 1 | 0 | 1,5 | 0 | 0 |
| 1 | 1,074 | 1450 | 6,5 | 1 | 0 | 0 | 1,5 | 0 |
| 43 | 1,074 | 1450 | 6,5 | 1 | 0 | 0 | 1,5 | 0 |
| 72 | 1,074 | 1450 | 6,5 | 1 | 0 | 0 | 1,5 | 0 |
| 115 | 1,074 | 1450 | 6,5 | 1 | 0 | 0 | 1,5 | 0 |
| 127 | 1,074 | 1450 | 6,5 | 1 | 0 | 0 | 1,5 | 0 |
| 5 | 0,848 | 1350 | 4 | 1,2 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 51 | 0,848 | 1350 | 4 | 1,2 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 93 | 0,848 | 1350 | 4 | 1,2 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 97 | 0,848 | 1350 | 4 | 1,2 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 146 | 0,848 | 1350 | 4 | 1,2 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 13 | 1,3 | 1350 | 4 | 1,2 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 61 | 1,3 | 1350 | 4 | 1,2 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 74 | 1,3 | 1350 | 4 | 1,2 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 124 | 1,3 | 1350 | 4 | 1,2 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 141 | 1,3 | 1350 | 4 | 1,2 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 15 | 0,848 | 1550 | 4 | 1,2 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 55 | 0,848 | 1550 | 4 | 1,2 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 91 | 0,848 | 1550 | 4 | 1,2 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 94 | 0,848 | 1550 | 4 | 1,2 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 138 | 0,848 | 1550 | 4 | 1,2 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 23 | 1,3 | 1550 | 4 | 1,2 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 52 | 1,3 | 1550 | 4 | 1,2 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 77 | 1,3 | 1550 | 4 | 1,2 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 109 | 1,3 | 1550 | 4 | 1,2 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 150 | 1,3 | 1550 | 4 | 1,2 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 4 | 0,848 | 1350 | 6 | 1,2 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 46 | 0,848 | 1350 | 6 | 1,2 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 68 | 0,848 | 1350 | 6 | 1,2 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 119 | 0,848 | 1350 | 6 | 1,2 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 134 | 0,848 | 1350 | 6 | 1,2 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 30 | 1,3 | 1350 | 6 | 1,2 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 40 | 1,3 | 1350 | 6 | 1,2 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 76 | 1,3 | 1350 | 6 | 1,2 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 120 | 1,3 | 1350 | 6 | 1,2 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 128 | 1,3 | 1350 | 6 | 1,2 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 24 | 0,848 | 1550 | 6 | 1,2 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 41 | 0,848 | 1550 | 6 | 1,2 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 83 | 0,848 | 1550 | 6 | 1,2 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 98 | 0,848 | 1550 | 6 | 1,2 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 140 | 0,848 | 1550 | 6 | 1,2 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 18 | 1,3 | 1550 | 6 | 1,2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 33 | 1,3 | 1550 | 6 | 1,2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 88 | 1,3 | 1550 | 6 | 1,2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 101 | 1,3 | 1550 | 6 | 1,2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 143 | 1,3 | 1550 | 6 | 1,2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | 1,074 | 1450 | 5 | 1,3 | 0 | 0 | 0 | 1,5 |
| 57 | 1,074 | 1450 | 5 | 1,3 | 0 | 0 | 0 | 1,5 |
| 69 | 1,074 | 1450 | 5 | 1,3 | 0 | 0 | 0 | 1,5 |
| 113 | 1,074 | 1450 | 5 | 1,3 | 0 | 0 | 0 | 1,5 |
| 142 | 1,074 | 1450 | 5 | 1,3 | 0 | 0 | 0 | 1,5 |

3.5. Experimentos do DoE

Previamente à execução dos experimentos de DoE, foi necessária a elaboração da curva de calibração para o ICP-MS, etapa fundamental para assegurar a confiabilidade dos resultados. Foram conduzidos 18 experimentos, utilizando entre 5 e 7 pontos de concentração crescente, distribuídos nos níveis de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24 e 30 $\mu\text{g/L}$.

A avaliação concentrou-se especificamente no chumbo (Pb), devido à observação de perda de sensibilidade e baixa recuperação quando preparado em solução multielementar. O objetivo foi identificar a faixa de concentração em que o coeficiente de correlação (r) da curva de calibração se mantivesse superior a 0,99, conforme definido no ATP.

Os resultados demonstraram que todas as faixas testadas apresentaram linearidade adequada e coeficiente de correlação compatível com o critério estabelecido. Dessa forma, foi definida uma curva de calibração específica para o chumbo, abrangendo o intervalo de 7 a 53 $\mu\text{g/L}$, uma vez que este elemento não reproduziu satisfatoriamente quando analisado em conjunto com as demais impurezas elementares controladas pelo guia ICH Q3D, exigindo, portanto, a elaboração de duas curvas distintas: uma exclusiva para o chumbo e outra para os demais elementos.

Com a curva estabelecida, procedeu-se à determinação do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ), conforme o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). De acordo com esse guia, o LD teórico é obtido multiplicando-se o DP (Desvio padrão) de 10 brancos por 3 e dividindo pelo coeficiente angular da reta de calibração, enquanto o LQ teórico é calculado multiplicando-se o mesmo DP por 10 e dividindo pelo coeficiente angular. Aplicando-se esses critérios, foram determinados os valores de LD = 0,0087 $\mu\text{g/L}$ e LQ = 0,029 $\mu\text{g/L}$, confirmando a sensibilidade e a adequação do método para a quantificação do chumbo em matriz injetável.

Os isótopos foram avaliados considerando sua abundância natural e o potencial de geração de interferências espectrais. Para os elementos Ba, Cd, Cr, Cu, Mo, Ni, Pd, Ru, Se e Sn, optou-se pela utilização de isótopos alternativos em detrimento dos mais abundantes, devido à elevada suscetibilidade a interferências poliatômicas, isobáricas e/ou provenientes de íons duplamente carregados no plasma. Essa estratégia visou minimizar sobreposição de sinais e garantir maior seletividade na quantificação.

Para os demais elementos, manteve-se a escolha do isótopo de maior abundância, uma vez que o risco de interação iônica no plasma ou de interferências decorrentes das matrizes

avaliadas foi considerado baixo, assegurando a robustez e a confiabilidade dos resultados analíticos.

Com a definição das curvas de calibração, os isótopos, e a determinação do LD e LQ, realizou-se os 155 experimentos e suas recuperações são expostas na Tabela abaixo, referente a cada um dos elementos investigados.

Tabela 4. Recuperações da análise combinatória do DoE.

| Elemento | Isótopo | Padrão interno | Faixa de trabalho ($\mu\text{g/L}$) | | Faixa de recuperação (%) | | Rec. Média (%) |
|----------|---------|-------------------|---------------------------------------|------|--------------------------|--------|----------------|
| | | | Mín. | Máx. | Mín. | Máx. | |
| Li | 7 | ^{45}Sc | 100 | 750 | 70,46 | 102,66 | 86,8 |
| V | 51 | ^{45}Sc | 4,00 | 30,0 | 84,36 | 105,44 | 93,01 |
| Cr | 53 | ^{45}Sc | 440 | 3300 | 84,02 | 99,93 | 88,03 |
| Co | 59 | ^{45}Sc | 2,00 | 15,0 | 82,47 | 98,91 | 86,02 |
| Ni | 60 | ^{72}Ge | 8,00 | 60,0 | 76,69 | 100,31 | 85,26 |
| Cu | 65 | ^{72}Ge | 120 | 900 | 84,21 | 109,87 | 88,97 |
| As | 75 | ^{72}Ge | 6,00 | 45,0 | 91,04 | 125,57 | 104,89 |
| Se | 78 | ^{72}Ge | 32,0 | 240 | 95,87 | 111,45 | 101,86 |
| Mo | 95 | ^{89}Y | 600 | 4500 | 91,96 | 102,11 | 97,3 |
| Ru | 101 | ^{115}In | 4,00 | 30,0 | 92,94 | 115,6 | 95,92 |
| Rh | 103 | ^{115}In | 4,00 | 30,0 | 86,72 | 104,39 | 93,54 |
| Pd | 105 | ^{115}In | 4,00 | 30,0 | 70,97 | 148,35 | 101,26 |
| Ag | 107 | ^{115}In | 4,00 | 30,0 | 89,04 | 147,71 | 104,63 |
| Cd | 111 | ^{115}In | 0,800 | 6,00 | 85,57 | 141,95 | 100,54 |
| Sn | 118 | ^{115}In | 240 | 1800 | 92,89 | 115,19 | 98,68 |
| Sb | 121 | ^{115}In | 36,0 | 270 | 92,77 | 118,95 | 95,66 |
| Ba | 137 | ^{115}In | 280 | 2100 | 88,02 | 116,68 | 98,15 |
| Os | 192 | ^{209}Bi | 4,00 | 30,0 | 96,83 | 142,76 | 110,31 |
| Ir | 193 | ^{209}Bi | 4,00 | 30,0 | 93,57 | 146,59 | 108,74 |
| Pt | 195 | ^{209}Bi | 4,00 | 30,0 | 96,25 | 149,26 | 110,29 |
| Au | 197 | ^{209}Bi | 40,0 | 300 | 88,37 | 138,44 | 101,27 |
| Hg | 202 | ^{209}Bi | 1,20 | 9,00 | 98,73 | 148,23 | 114,29 |
| Tl | 205 | ^{209}Bi | 3,20 | 24,0 | 92,56 | 113,67 | 99,02 |
| Pb | 208 | NA* | 7,00 | 35,0 | 72,52 | 99,58 | 84,64 |

*NA: Não se aplica a utilização de padrão interno ao elemento chumbo.

3.5.1. Resultados da análise combinatória DoE

Após a execução dos 155 experimentos planejados, foi possível realizar uma investigação sistemática das interações e dos efeitos principais associados aos quatro fatores estudados, avaliados em diferentes níveis (-1,5; -1,0; 0; 1,0; 1,5). O delineamento experimental contemplou a análise de **24 elementos**, em conformidade com as exigências regulatórias e as diretrizes estabelecidas para o controle de impurezas elementares.

A estratégia combinatória adotada permitiu a construção de um conjunto de dados robusto e abrangente, capaz de subsidiar a interpretação estatística dos resultados e fornecer evidências consistentes sobre a variabilidade e a estabilidade das respostas observadas. Essa abordagem

assegura maior confiabilidade na identificação dos fatores críticos e na definição de condições experimentais que garantam a conformidade analítica e regulatória.

Os resultados provenientes desse delineamento experimental são apresentados por meio de ferramentas estatísticas e gráficas de ampla aplicação em análises multivariadas, sendo elas:

- Gráficos de Pareto, para evidenciar a magnitude relativa dos efeitos dos fatores;
- Resíduos ajustados, para avaliar a adequação dos modelos e identificar possíveis desvios;
- Histogramas, para caracterizar a distribuição dos dados e verificar padrões de comportamento.

Essa abordagem integrada assegura uma avaliação abrangente da influência dos fatores estudados, permitindo estabelecer conclusões fundamentadas sobre a estabilidade e o perfil dos elementos analisados, além de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

➤ Elemento: Prata (Ag)

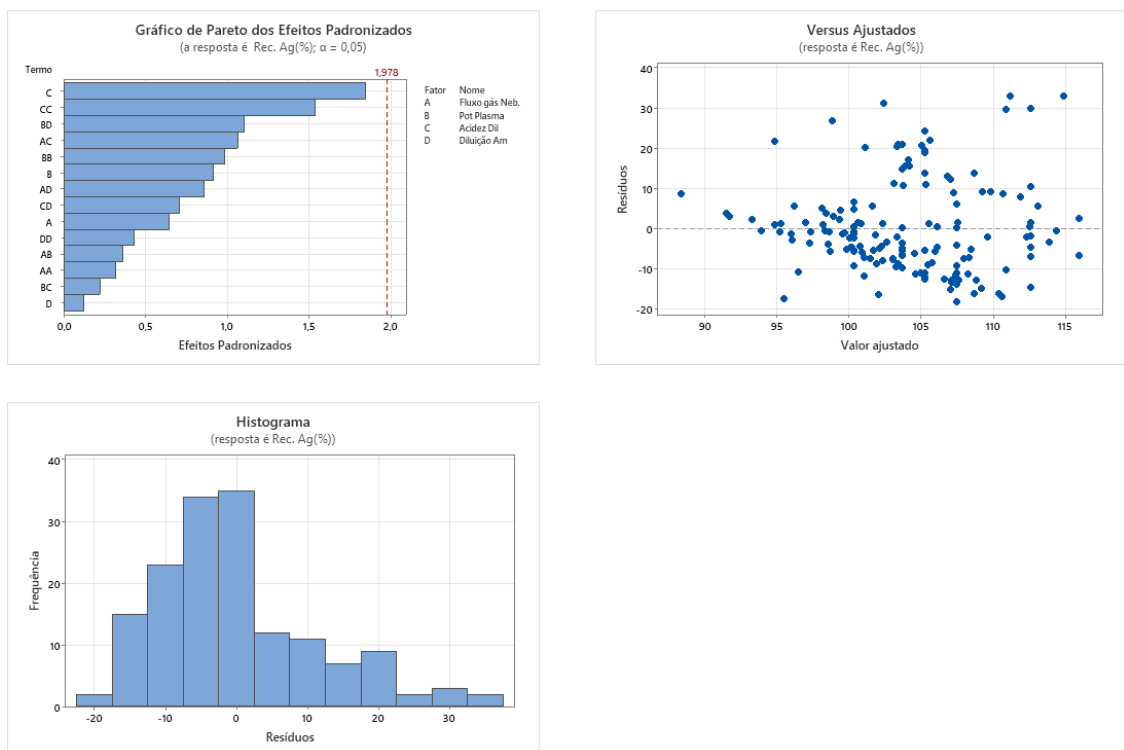


Figura 8. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Prata (Ag).

➤ **Elemento: Arsênio (As)**

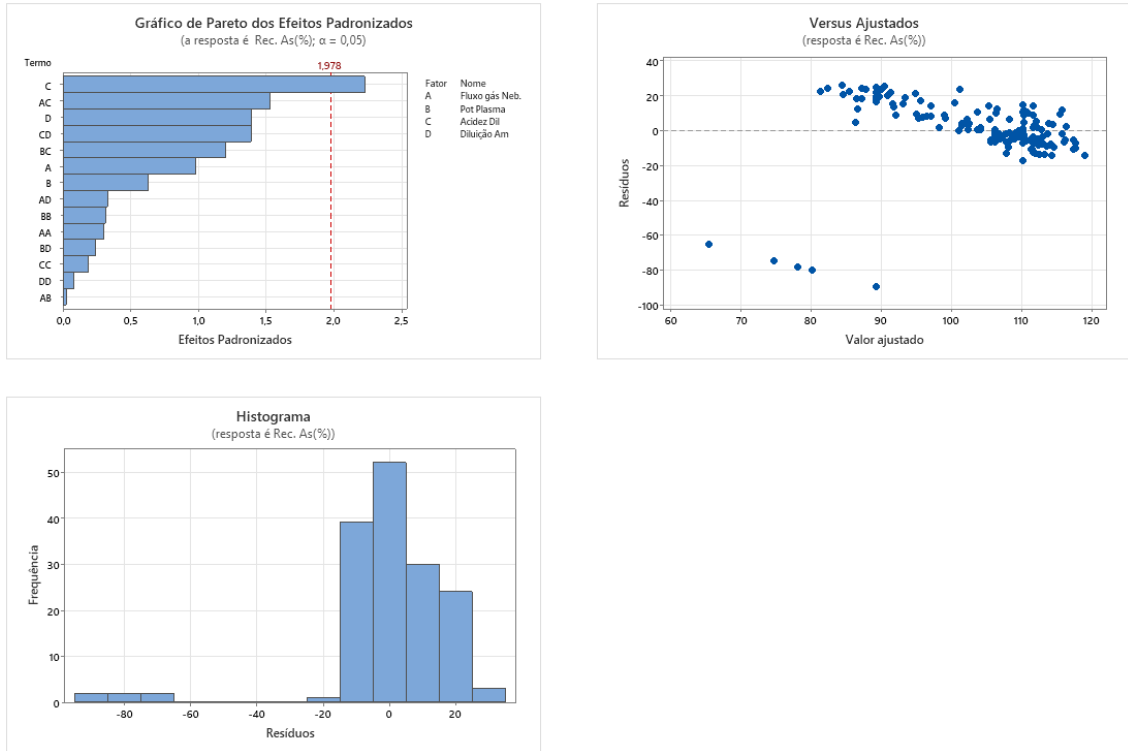


Figura 9. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Arsênio (As).

➤ **Elemento: Ouro (Au)**

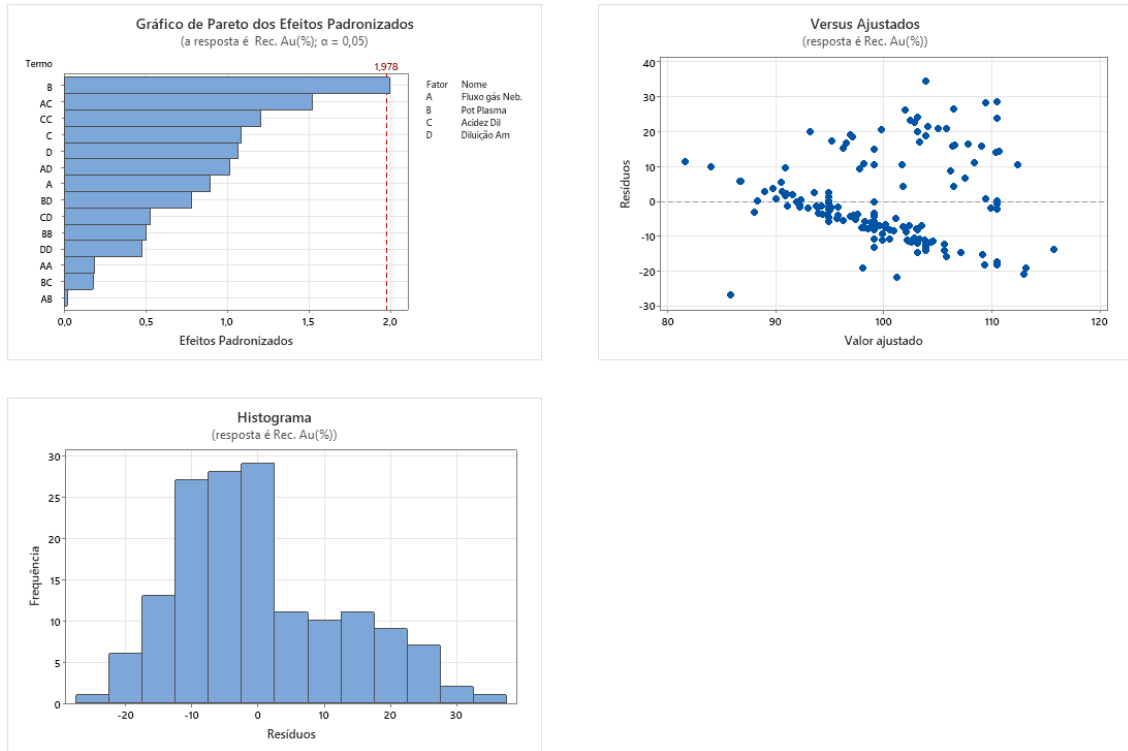


Figura 10. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Ouro (Au).

➤ **Elemento: Bário (Ba)**

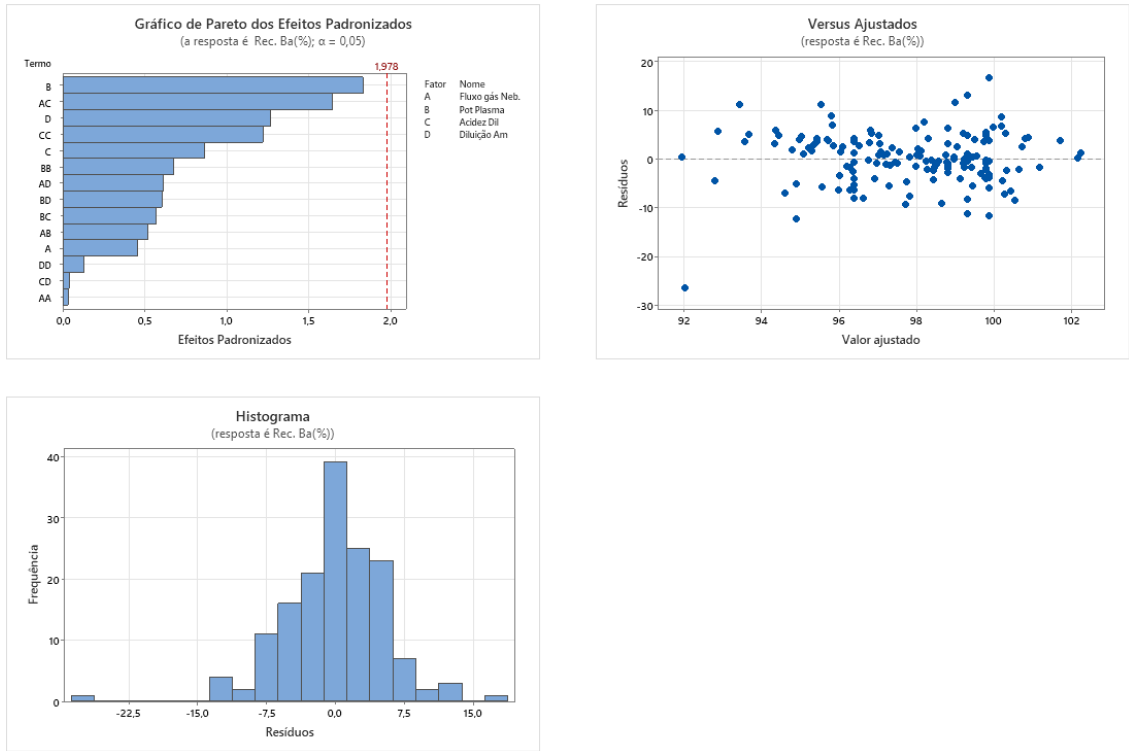


Figura 11. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Bário (Ba).

➤ **Elemento: Cádmi (Cd)**

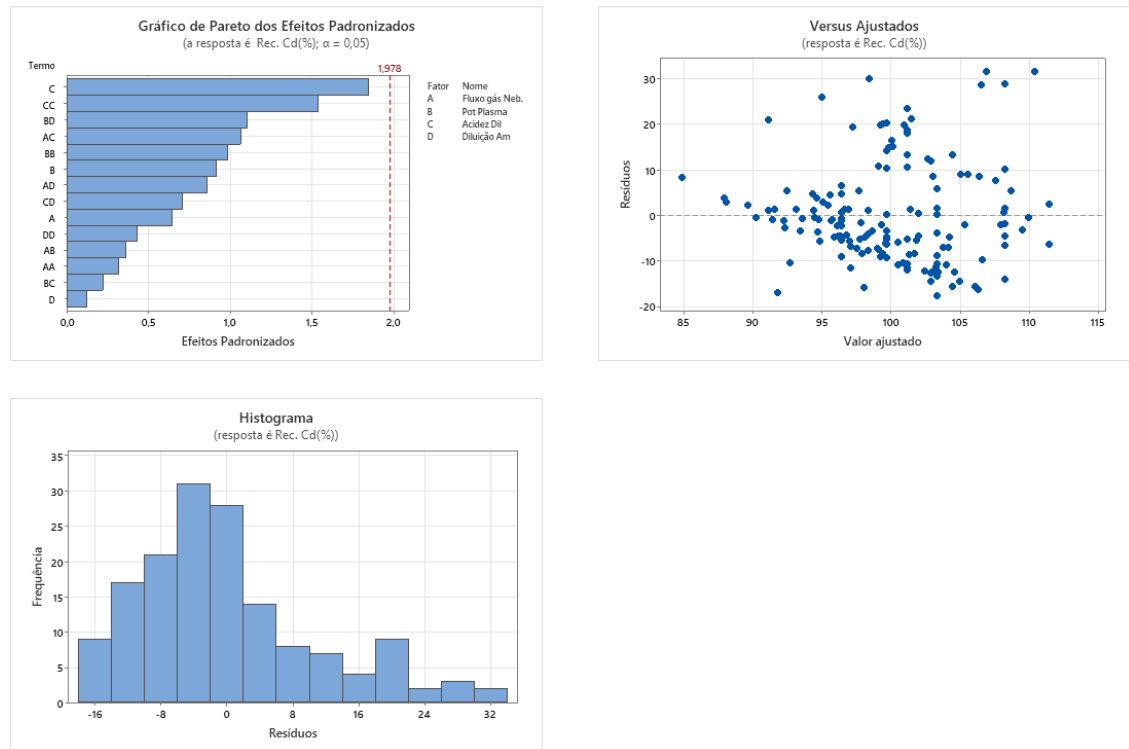


Figura 12. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Cádmi (Cd).

➤ **Elemento: Cobalto (Co)**

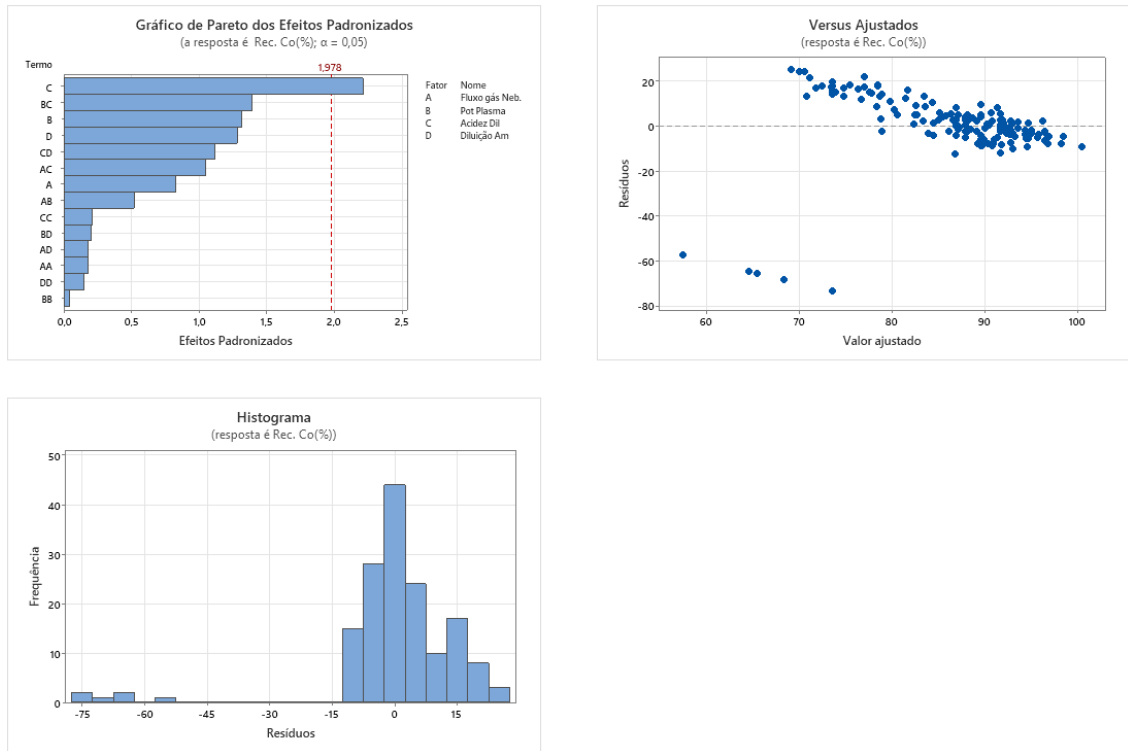


Figura 13. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Cobalto (Co).

➤ **Elemento: Cromo (Cr)**

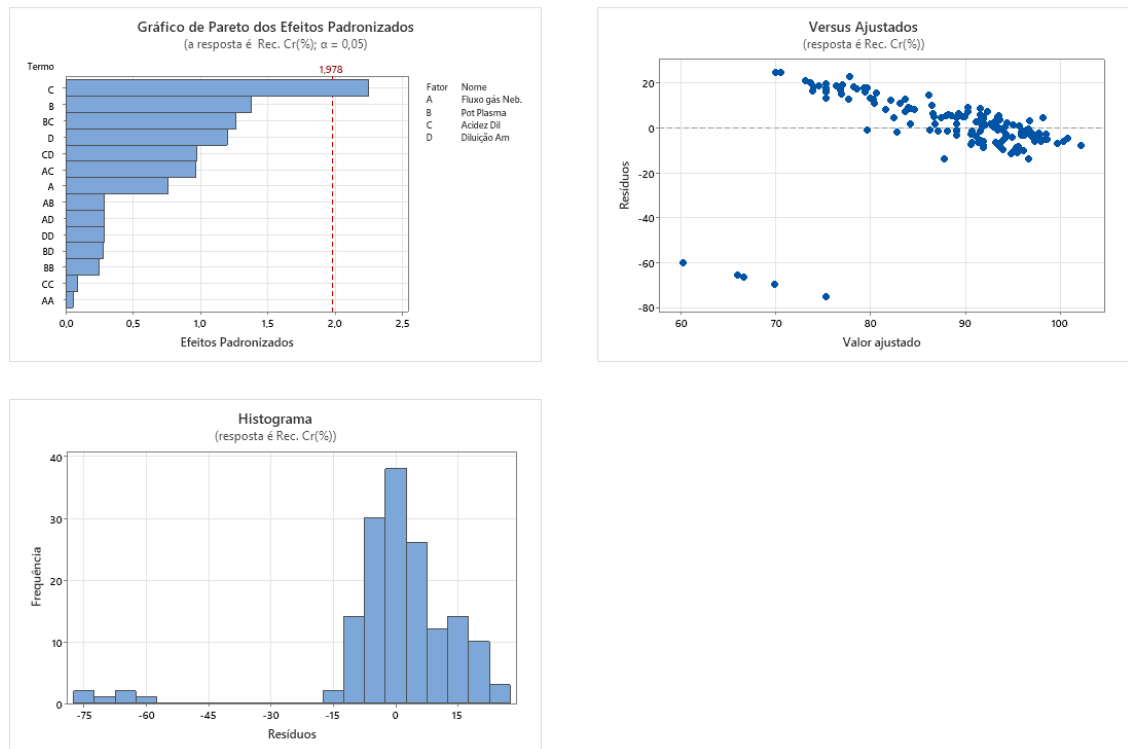


Figura 14. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Cromo (Cr).

➤ **Elemento: Cobre (Cu)**

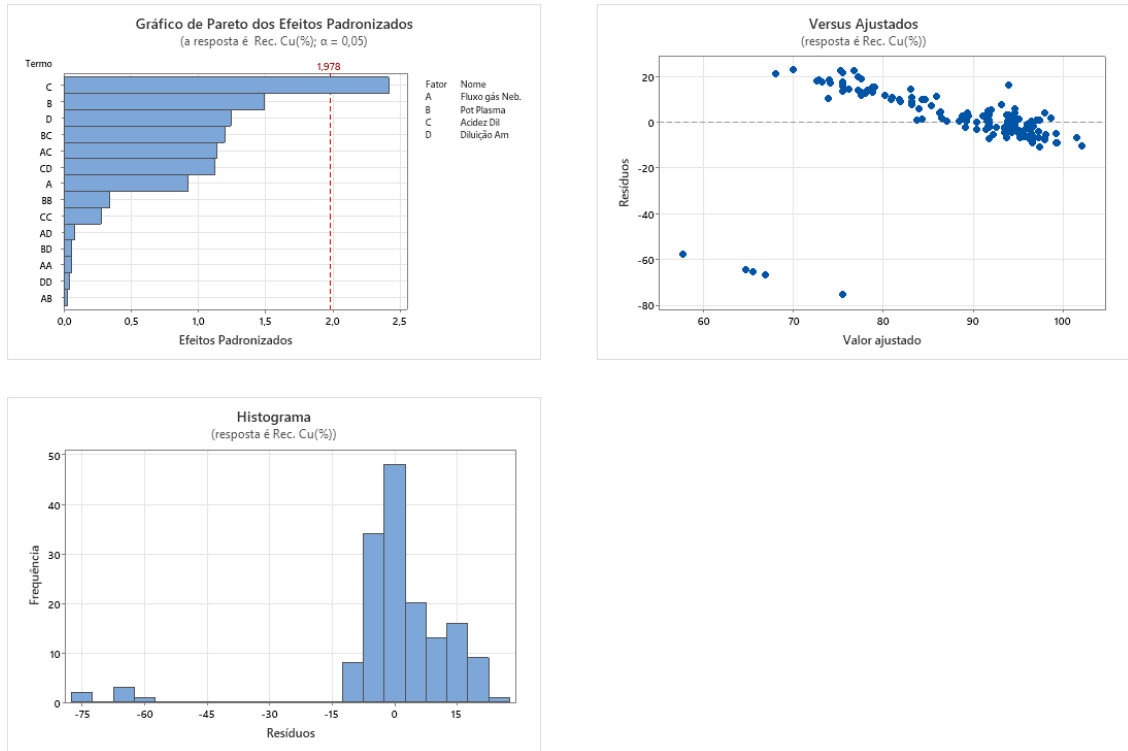


Figura 15. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Cobre (Cu).

➤ **Elemento: Mercúrio (Hg)**

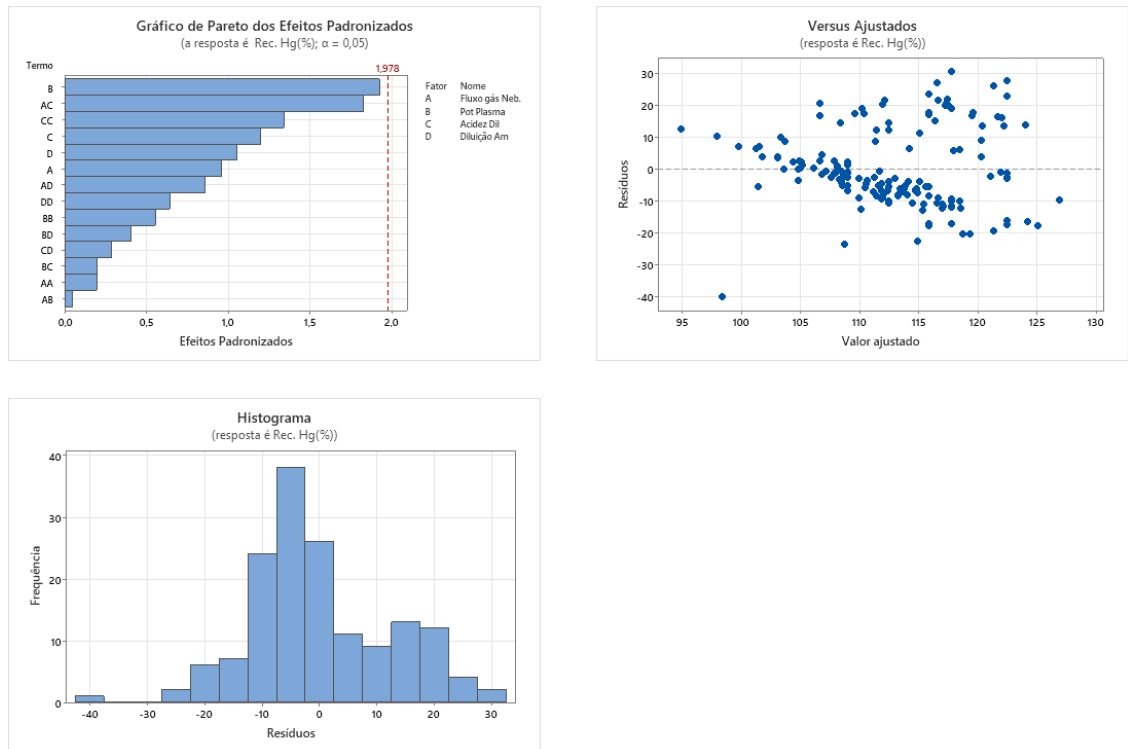


Figura 16. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Mercúrio (Hg).

➤ **Elemento: Irídio (Ir)**

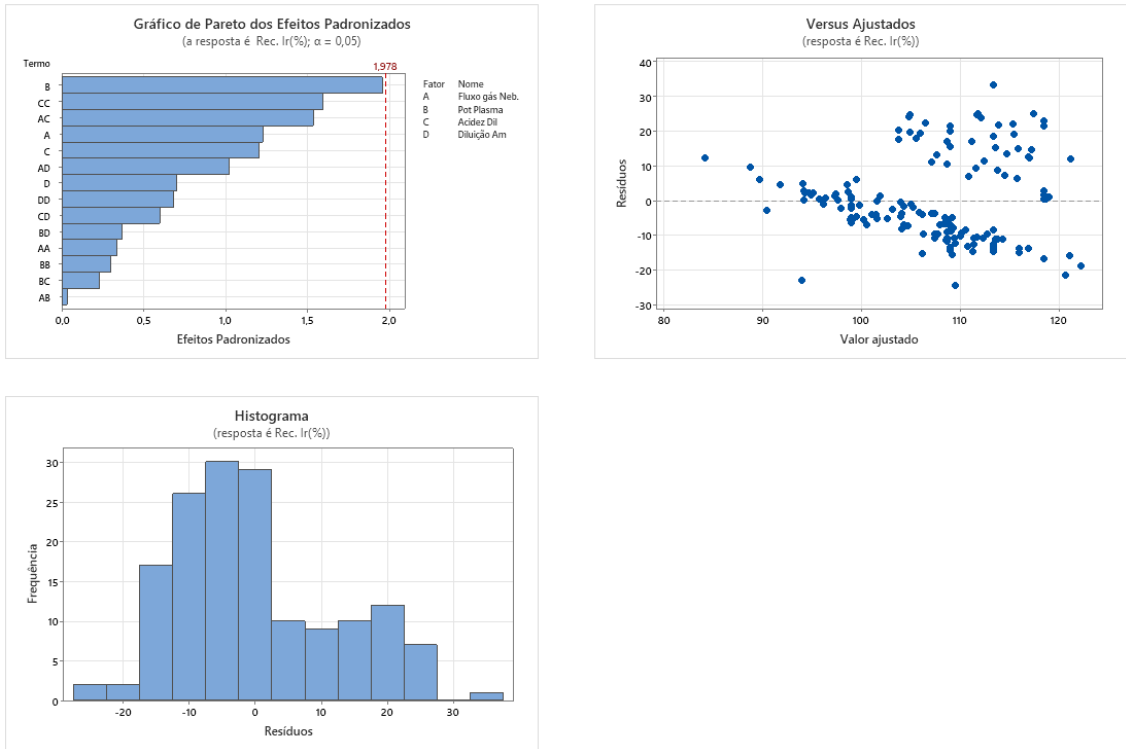


Figura 17. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Irídio (Ir).

➤ **Elemento: Lítio (Li)**

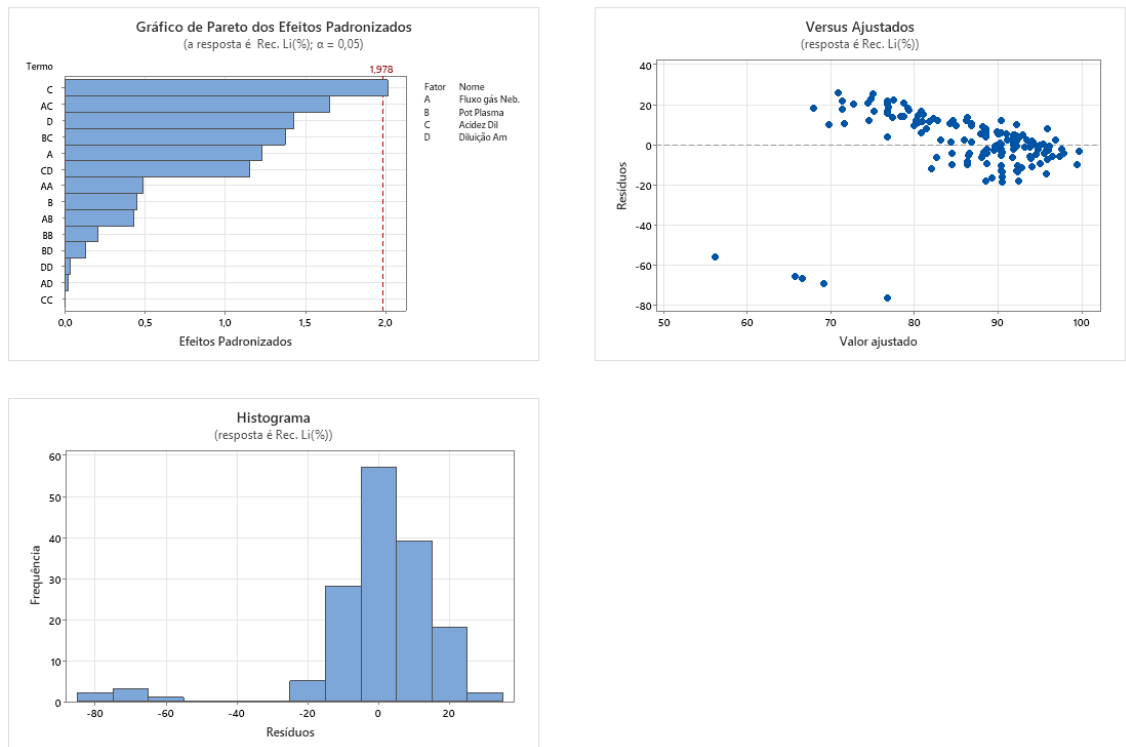


Figura 18. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Lítio (Li).

➤ **Elemento: Molibdênio (Mo)**

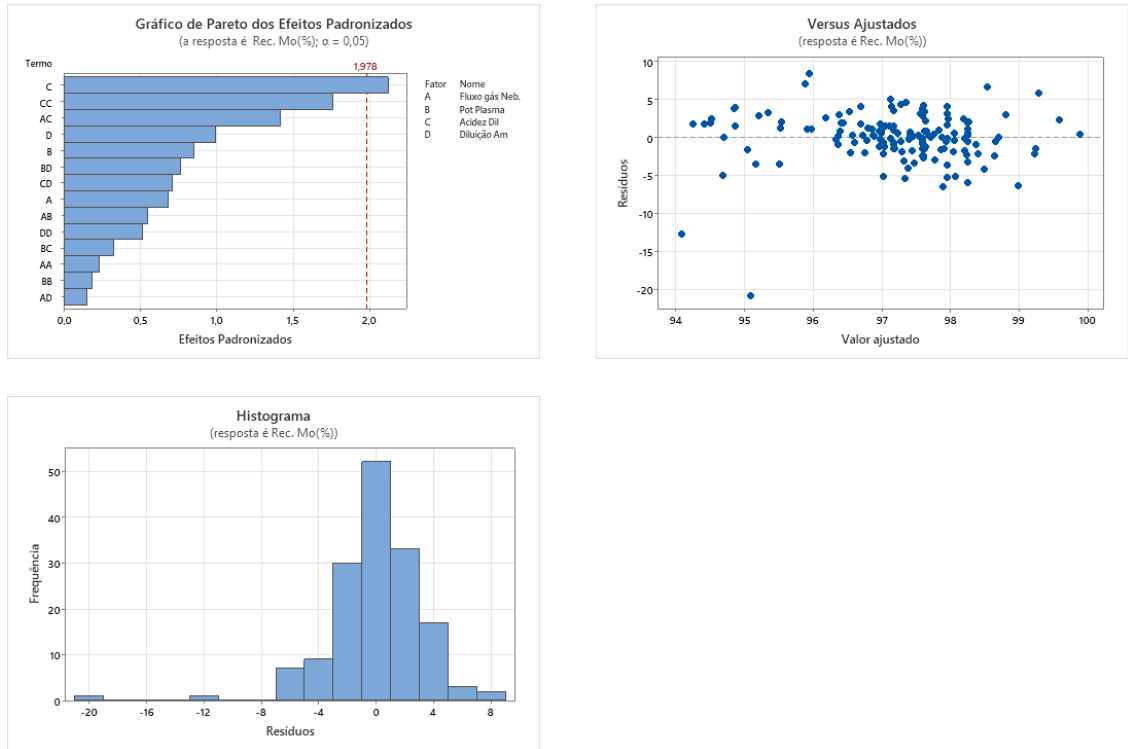


Figura 19. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Molibdênio (Mo).

➤ **Elemento: Níquel (Ni)**

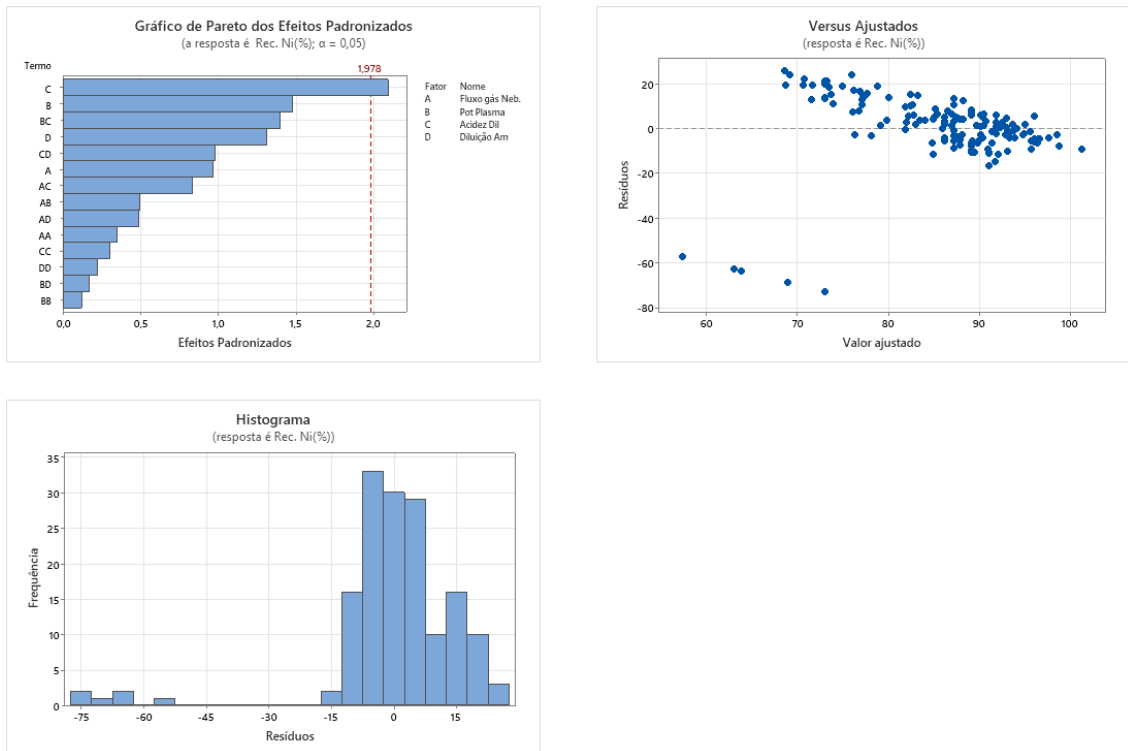


Figura 20. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Níquel (Ni).

➤ **Elemento: Ósmio (Os)**

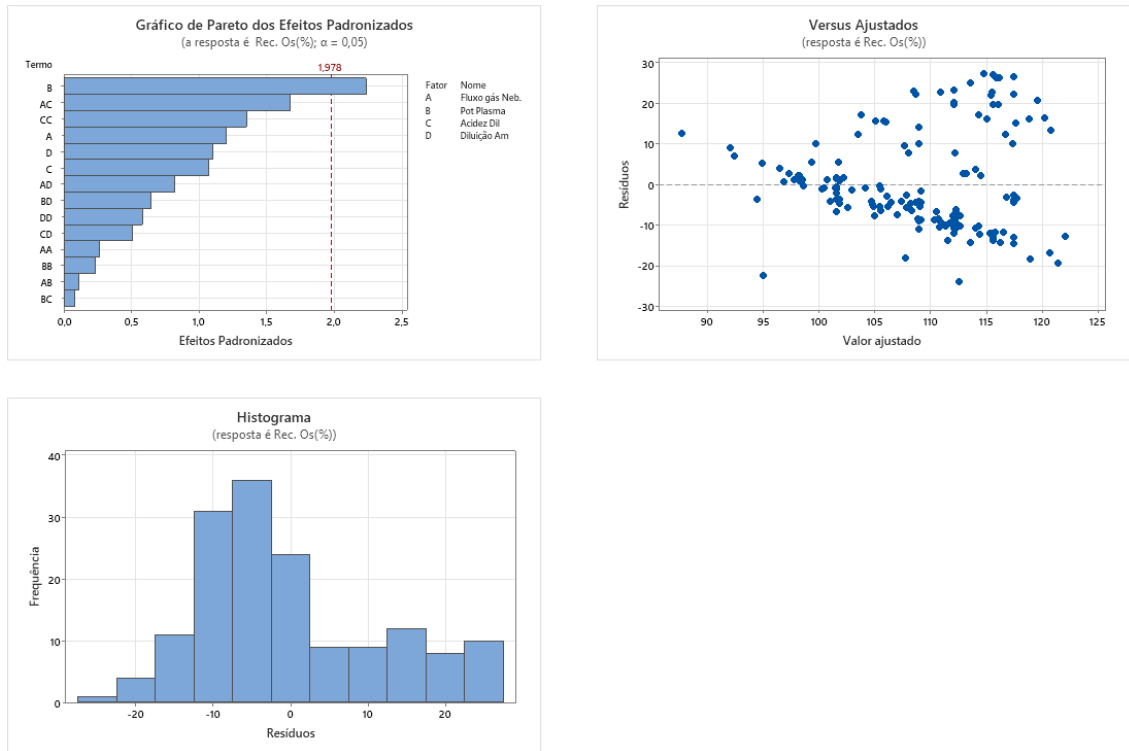


Figura 21. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Ósmio (Os).

➤ **Elemento: Chumbo (Pb)**

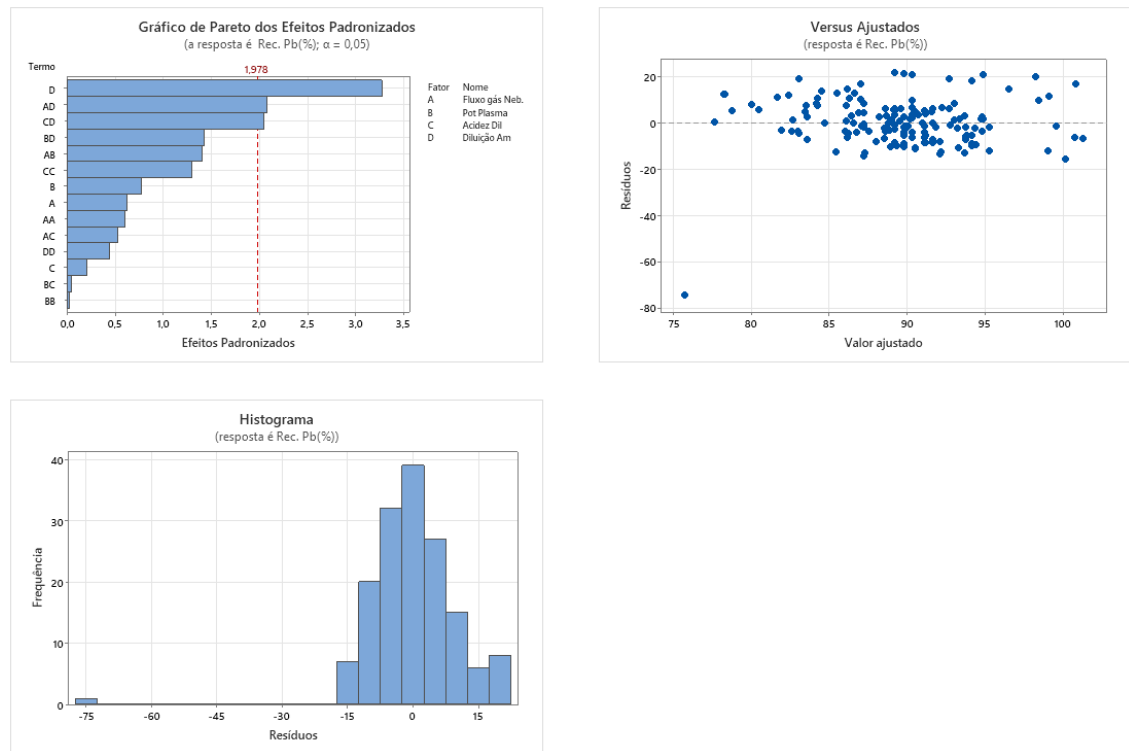


Figura 22. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Chumbo (Pb).

➤ **Elemento: Paládio (Pd)**

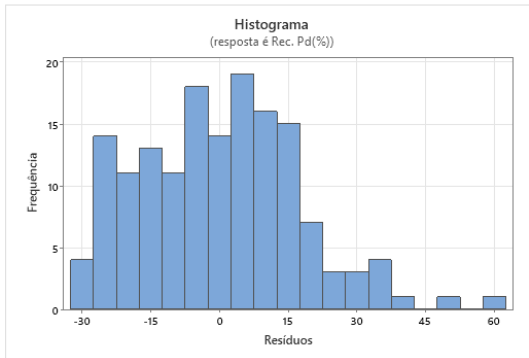
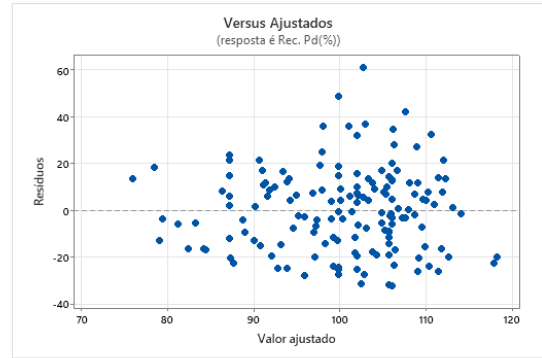


Figura 23. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Paládio (Pd).

➤ **Elemento: Platina (Pt)**

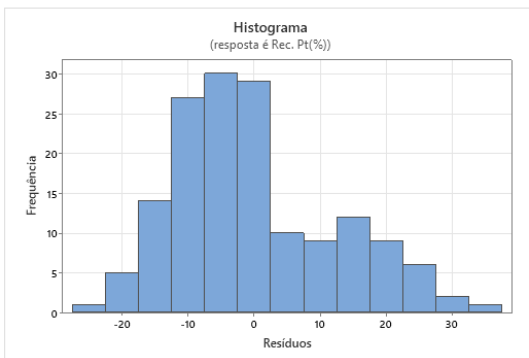
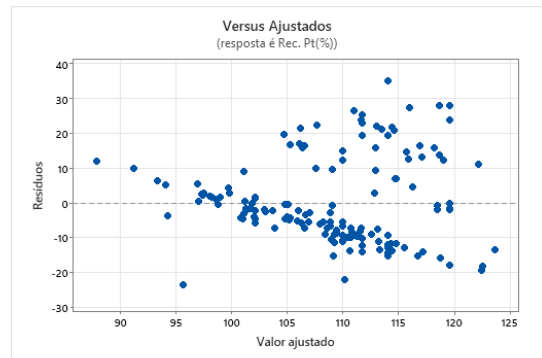
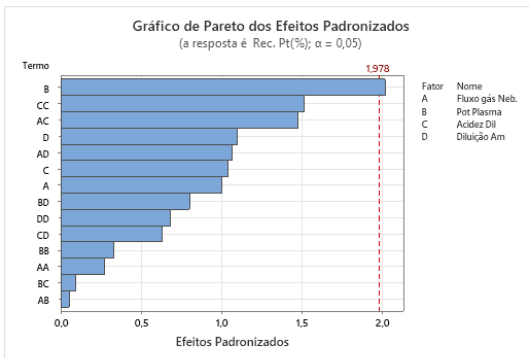


Figura 24. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Platina (Pt).

➤ **Elemento: Ródio (Rh)**

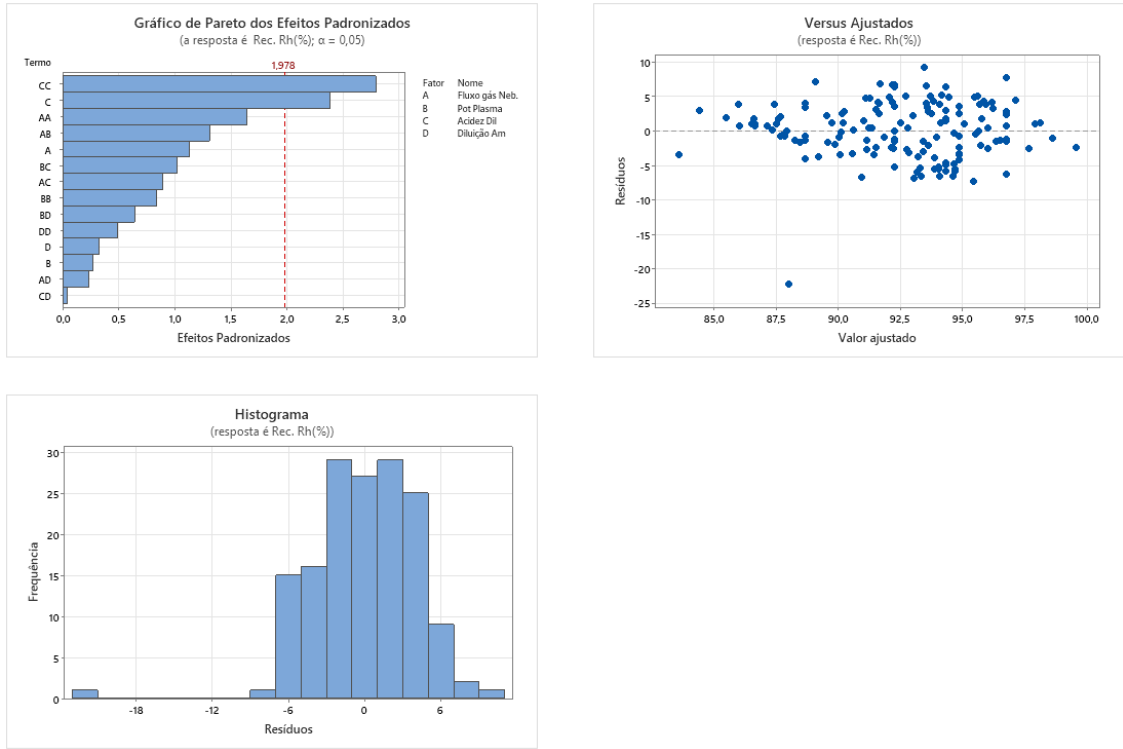


Figura 25. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Ródio (Rh).

➤ **Elemento: Rutênio (Ru)**

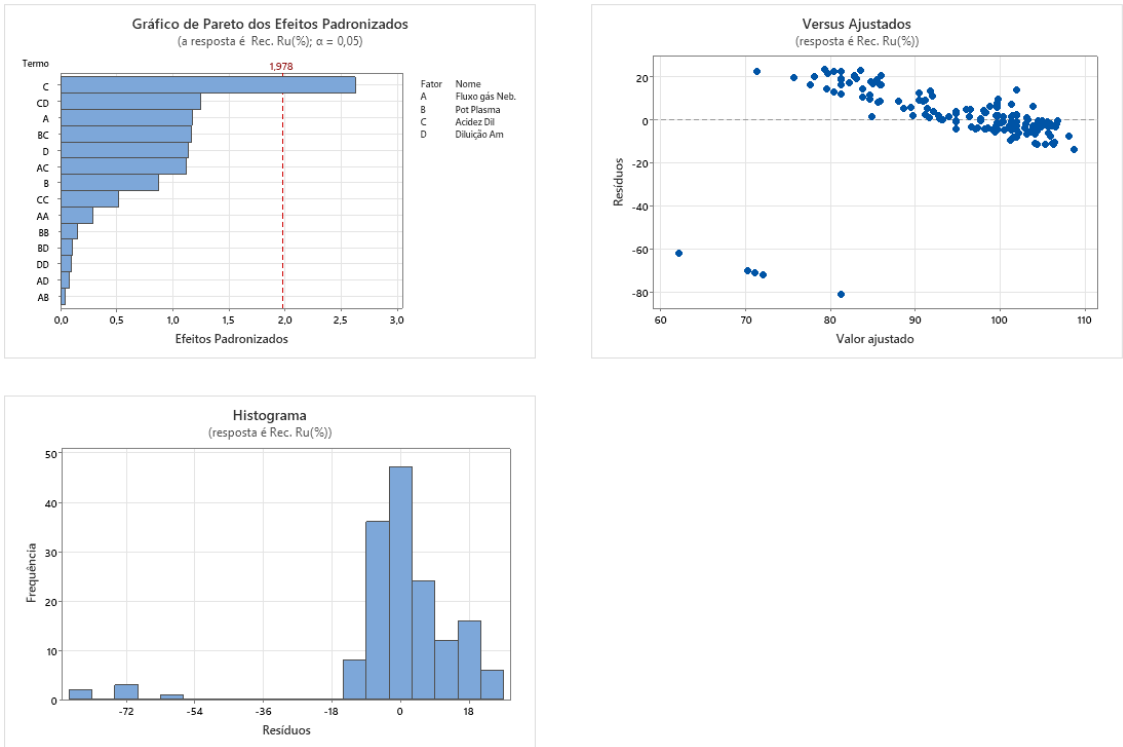


Figura 26. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Rutênio (Ru).

➤ **Elemento: Antimônio (Sb)**

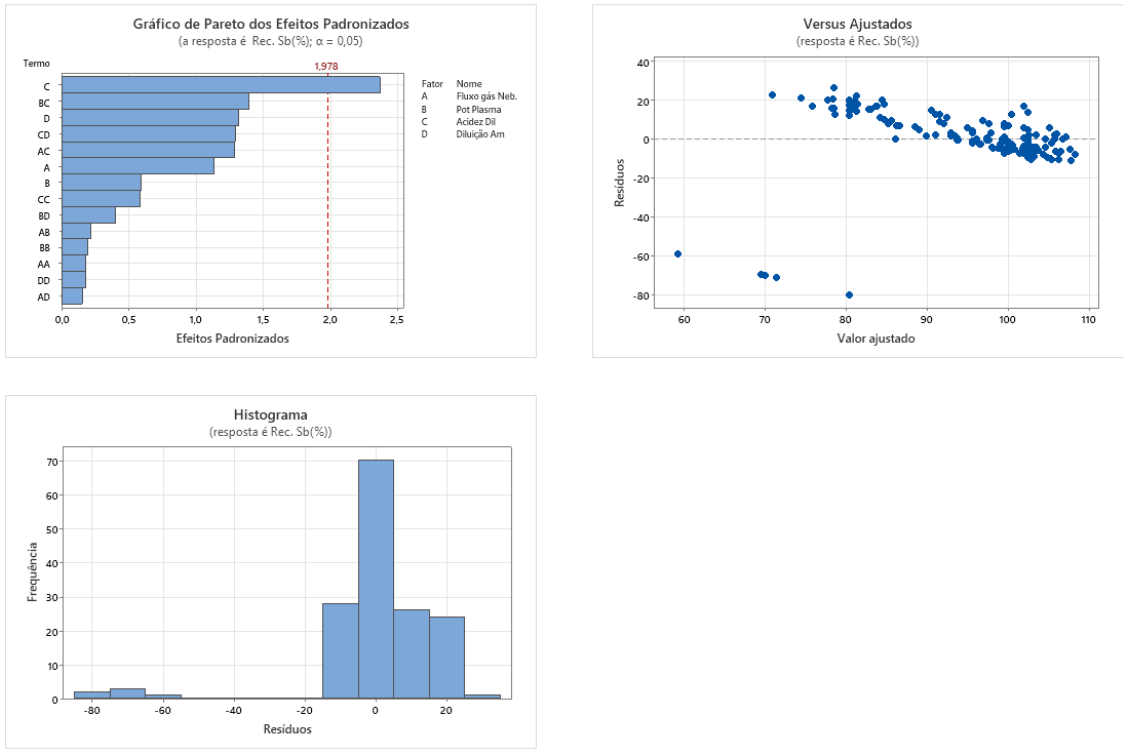


Figura 27. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Antimônio (Sb).

➤ **Elemento: Selênio (Se)**

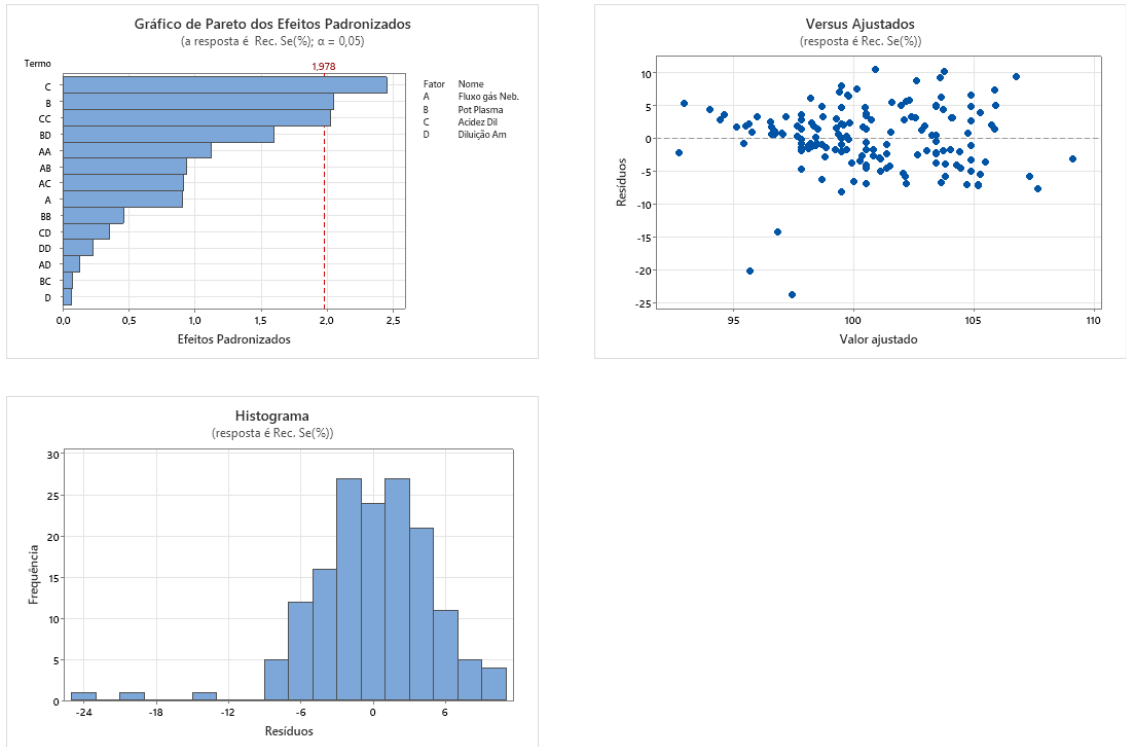


Figura 28. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Selênio (Se).

➤ **Elemento: Estanho (Sn)**

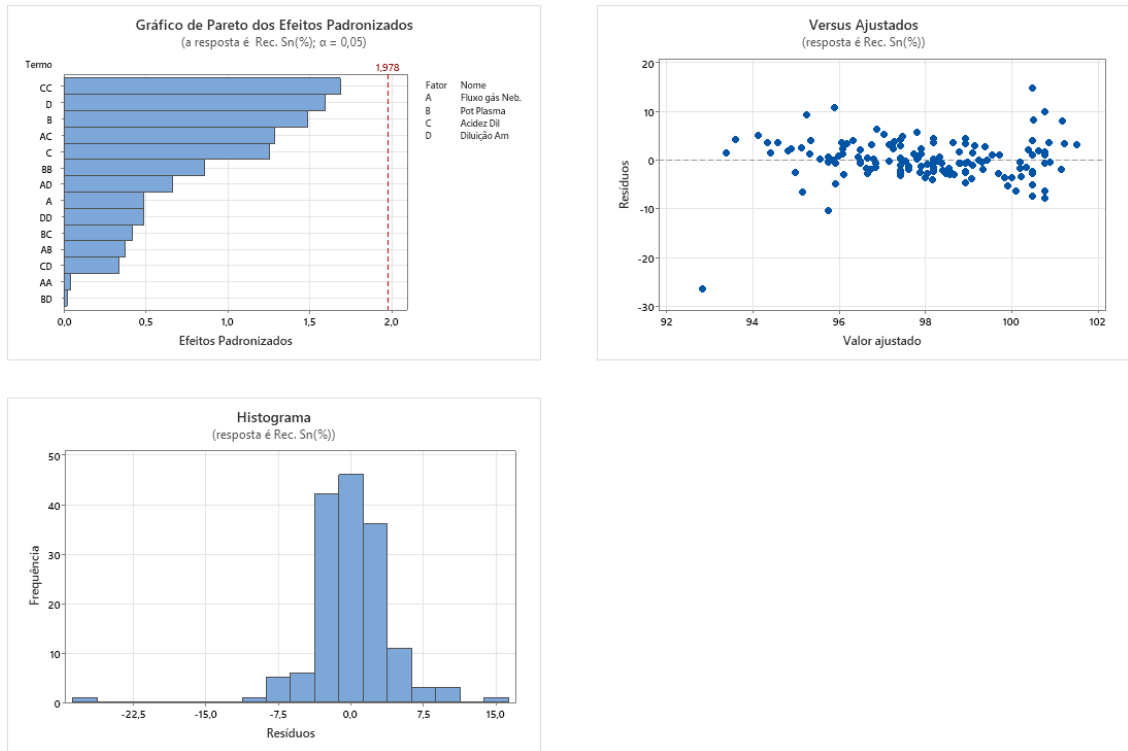


Figura 29. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Estanho (Sn).

➤ **Elemento: Tálcio (Tl)**

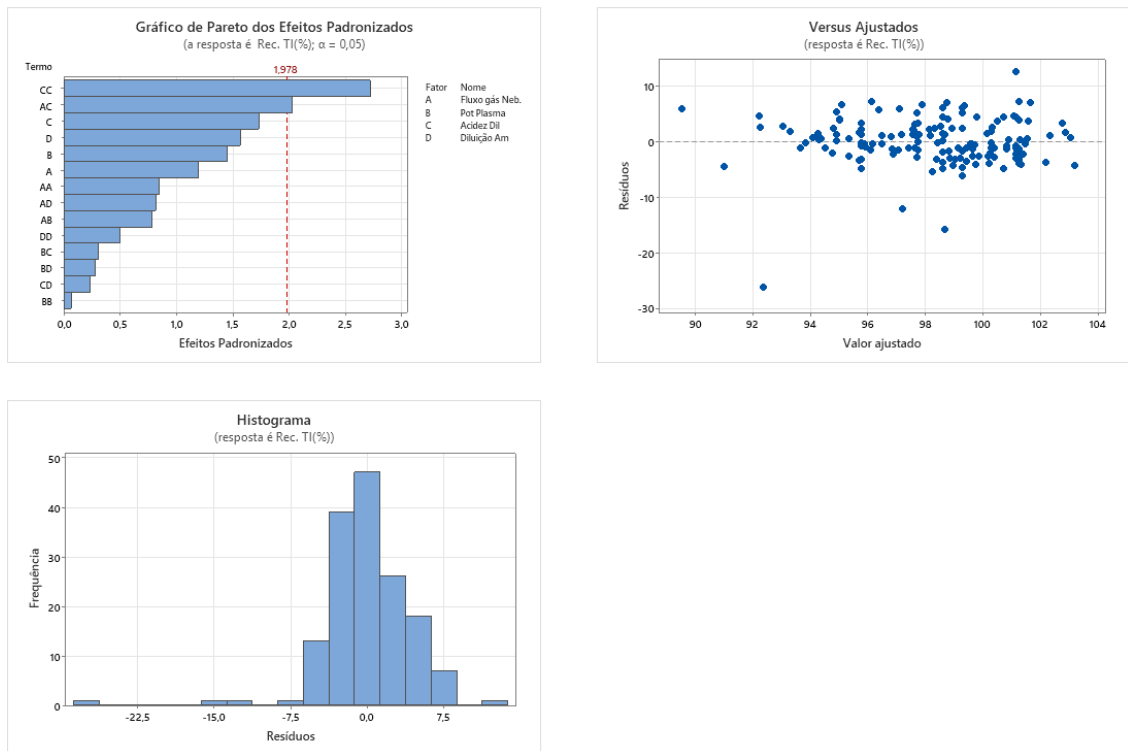


Figura 30. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Tálcio (Tl).

➤ Elemento: Vanádio (V)

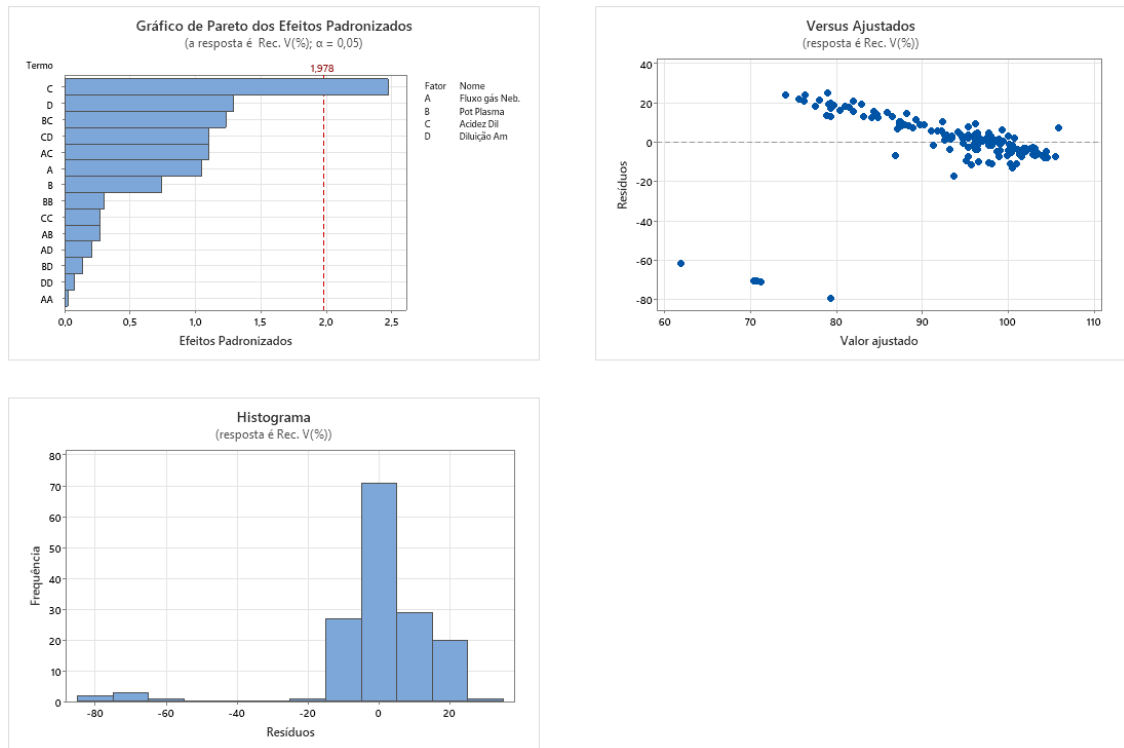


Figura 31. Gráficos dos experimentos do DoE para o elemento Vanádio (V).

Analisando os gráficos de Pareto gerado para os 24 elementos avaliados, evidenciam que a maioria dos efeitos estimados se encontra abaixo do limiar de significância estatística previamente estabelecido. Esse resultado indica que, para grande parte dos elementos, os fatores investigados não exercem influência relevante sobre a resposta medida, sugerindo que o sistema apresenta comportamento estável e pouco sensível às variações impostas pelo delineamento experimental.

A predominância de efeitos não significativos reforça a robustez do modelo e a adequação do delineamento adotado, uma vez que reduz a probabilidade de ocorrência de falsos positivos e concentra a atenção nos poucos fatores que efetivamente demonstraram impacto mensurável. Além disso, a distribuição observada no gráfico de Pareto contribui para a priorização dos elementos críticos, permitindo que os esforços de controle e otimização sejam direcionados apenas às variáveis que ultrapassaram o limite de significância.

A análise dos gráficos de resíduo versus valor ajustado gerados, demonstra que, de forma geral, a distribuição dos pontos apresenta comportamento adequado ao modelo estatístico aplicado. Observa-se que a maioria das representações exibe uma nuvem de dados com tendência linear ou pontos dispersos de maneira aleatória, característica que indica ausência de

padrões sistemáticos e confirma a validade das premissas de homoscedasticidade e independência dos resíduos.

Esse resultado reforça a consistência do modelo, sugerindo que os fatores avaliados não introduzem vieses significativos na resposta e que a variabilidade observada pode ser atribuída ao comportamento natural dos elementos dentro das condições experimentais.

Entretanto, em alguns casos foram identificados outliers, que se destacam da distribuição geral dos resíduos. Esses pontos isolados podem estar associados a variabilidade experimental, erros pontuais de medição ou condições específicas que afetaram determinados elementos. Embora não comprometam a robustez global do modelo, sua presença deve ser considerada na interpretação dos resultados, podendo indicar a necessidade de análises complementares ou ajustes pontuais para garantir maior precisão.

A avaliação dos histogramas demonstrou que, em todos os casos, os resultados apresentaram uma distribuição normal dos valores. Esse comportamento estatístico é indicativo de que os dados seguem um padrão esperado de variabilidade, sem ocorrência de assimetrias relevantes ou concentrações anômalas que pudessem comprometer a interpretação.

A conformidade com a distribuição normal reforça a adequação do modelo experimental e valida as premissas utilizadas na análise estatística, permitindo maior confiabilidade na aplicação de testes paramétricos e na comparação entre os fatores estudados. Além disso, a normalidade observada assegura que os efeitos identificados podem ser interpretados de forma consistente, reduzindo o risco de vieses e aumentando a robustez das conclusões.

Procedeu-se à otimização do modelo experimental, resultando na elaboração dos gráficos específicos para cada elemento avaliado. Nestes gráficos, foi estabelecido como meta de desempenho a recuperação de 100%, representada pela linha vertical vermelha; a linha tracejada horizontal azul indica o ponto de referência $x = 0$, enquanto a linha preta descreve o perfil de recuperação de cada elemento.

O processo de otimização forneceu os valores dos níveis experimentais e sugeriu os parâmetros que, teoricamente, conduzem as respostas ao alvo definido. A decisão é validada pelo índice de desirability (D), métrica estatística utilizada em análises de otimização de respostas. Esse índice varia de 0 a 1, refletindo o grau de atendimento às metas estabelecidas:

- **Para uma única resposta (caso do chumbo), a desirability individual indica a proximidade do resultado em relação ao objetivo, sendo que valores próximos de 1 representam condições ideais e valores próximos de 0 indicam inadequação.**

- Para múltiplas respostas, o Minitab calcula a desirability composta, que combina todas as desirabilities individuais em um único índice global, expressando o quão bem a combinação de fatores atende simultaneamente aos diferentes objetivos do estudo.

Dessa forma, o valor de desirability constitui uma medida quantitativa da adequação do modelo às metas analíticas ou de processo, orientando de maneira objetiva a seleção das melhores condições experimentais.

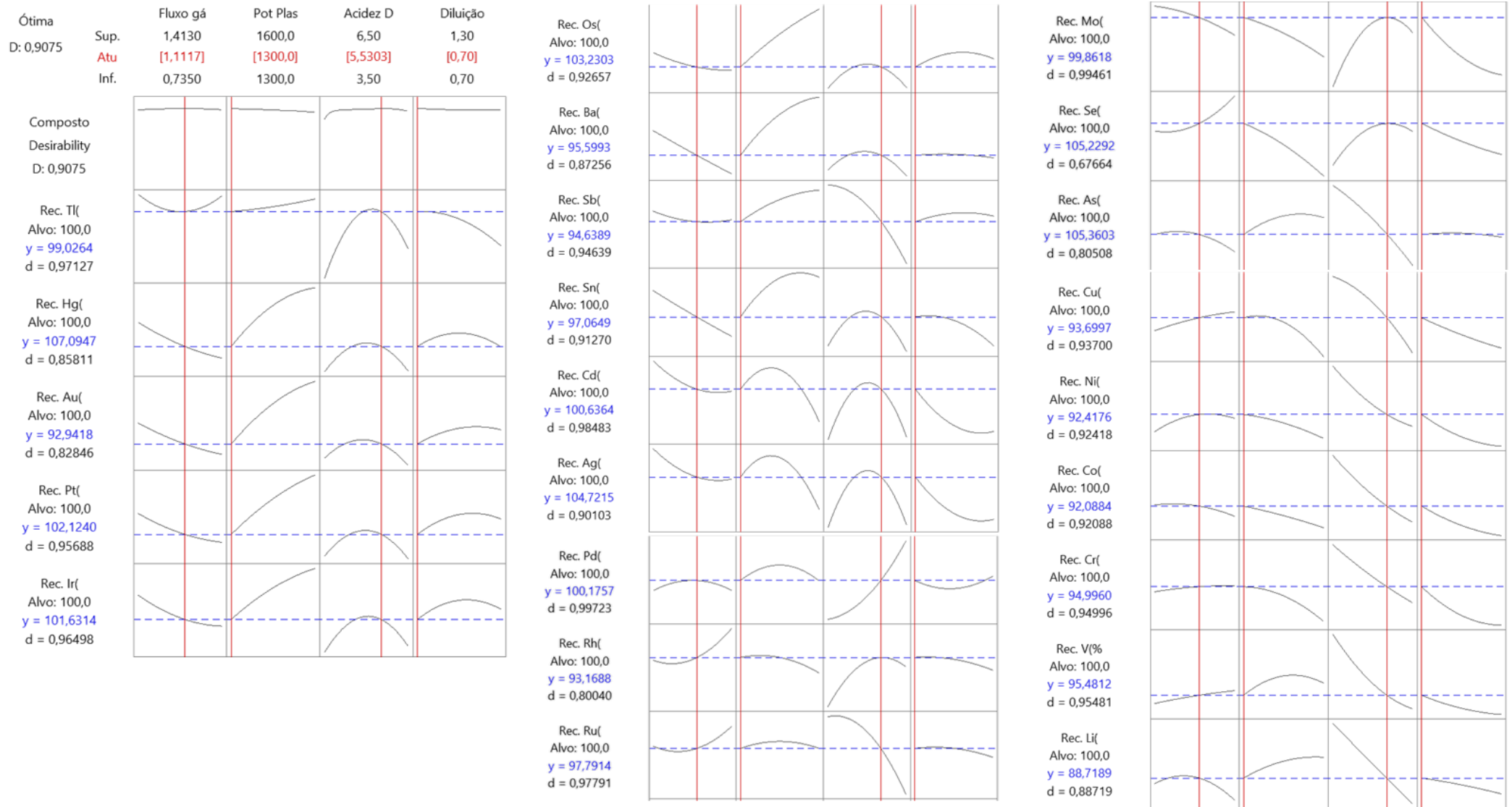


Figura 32. Gráficos dos elementos (Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl, V) investigados nos experimentos do DoE otimizados.

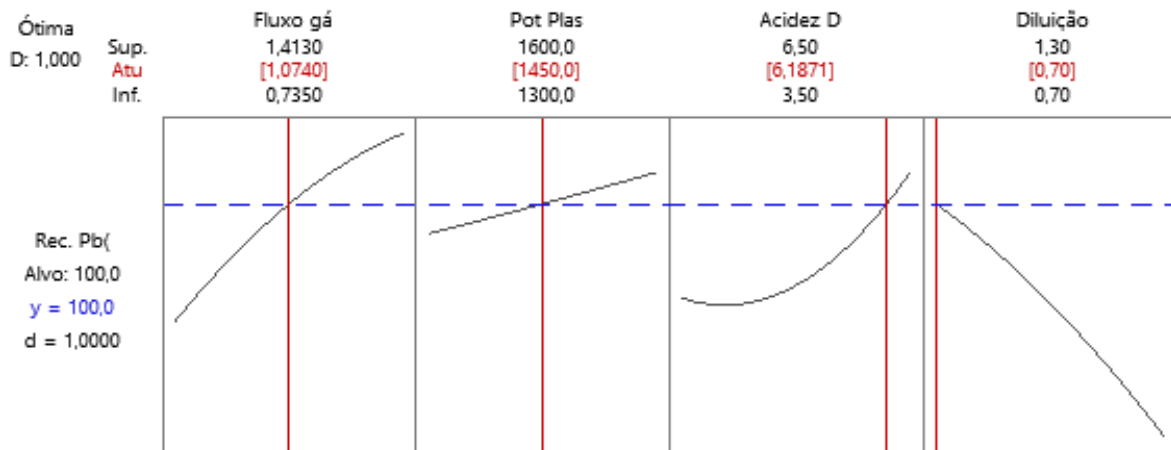


Figura 33. Gráfico do elemento chumbo investigado no experimento do DoE otimizados.

A análise dos gráficos permitiu identificar que, entre os níveis avaliados para os fatores críticos, o software sugeriu como condições ótimas teóricas os seguintes parâmetros para os elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V: fluxo do gás nebulizador de 1,1117 L/min, potência do plasma de 1300 W, percentual de ácido no diluente de 5,5303 % e grau de diluição da amostra de 0,7 vezes o valor nominal testado. Para o chumbo o software sugeriu como condições ótimas teóricas os seguintes parâmetros: fluxo do gás nebulizador de 1,0740 L/min, potência do plasma de 1450 W, percentual de ácido no diluente de 6,1871 % e grau de diluição da amostra de 0,7 vezes o valor nominal testado. Contudo, quando aplicadas experimentalmente, essas condições para ambas as curvas, não apresentaram concordância com as previsões do modelo estatístico.

Diante disso, foram estabelecidos e fixados parâmetros alternativos, compatíveis com a região operacional validada (MODR), assegurando maior confiabilidade e consistência do método. As condições finais empregadas para os elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V, foram: fluxo do gás nebulizador de 1,07 L/min, potência do plasma de 1550 W, percentual de ácido no diluente de 5,0% e grau de diluição da amostra equivalente a 1,0 vez o valor nominal testado. Já para o elemento chumbo foi estabelecido os seguintes parâmetros: fluxo do gás nebulizador de 1,41 L/min, potência do plasma de 1450 W, percentual de ácido no diluente de 6,0% e grau de diluição da amostra equivalente a 0,7 vezes o valor nominal testado. Esses ajustes garantiram a robustez necessária para a aplicação prática do método analítico.

3.6. Metodologia

3.6.1. Informações complementares

O método analítico foi desenvolvido e validado utilizando o ICP-MS Agilent 7850 como equipamento principal, configurado com analisador de massas do tipo quadrupolo (SQ), nebulizador *Micromist*, câmara de nebulização, tocha de quartzo, além de *sampling cone* e *skimmer cone* em níquel, compondo o sistema de interface e detecção. O processo analítico foi automatizado por meio do autoamostrador Agilent SPS4, assegurando precisão no manuseio das amostras.

Para garantir condições adequadas às análises em níveis de traço, foram empregados o destilador de ácido SubClean, responsável pela purificação de reagentes, e o sistema de deionização de água Millipore, assegurando elevada pureza da água utilizada. Adicionalmente, utilizou-se ácido nítrico sub-boiling de alta pureza, minimizando riscos de contaminação e assegurando a confiabilidade dos resultados.

Essa configuração instrumental e o rigor no preparo dos reagentes e solventes proporcionaram um ambiente analítico robusto e controlado, adequado para a determinação de elementos em concentrações ultratraço, atendendo aos requisitos de validação e conformidade regulatória.

Foram utilizados padrões analíticos certificados, preparados em concentrações compatíveis com os limites PDE para a via parenteral, conforme estabelecido pelo guia ICH Q3D, sendo elas: SPE (Solução Padrão Estoque)-1 (As, Cd, Co, Pb, Hg, Ni, Se, Ag, Tl, V) - Supelco; SPE-2 (Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru) - Supelco; SPE-3 (Sb, Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sn) - Supelco; SPE-4 (Pb) - Supelco; e o padrão interno mix (Bi, Ge, In, Sc, Y) - Agilent Technologies.

Adicionalmente, foram empregadas vidrarias volumétricas de precisão (balões volumétricos de diferentes capacidades), submetidas a um rigoroso processo de limpeza e descontaminação: lavagem inicial com água e sabão neutro, seguida de imersão em solução de ácido nítrico 10% (v/v) por 24 horas, enxágue com água deionizada e secagem à temperatura ambiente.

Essa preparação criteriosa de equipamentos, padrões e materiais assegurou a robustez, confiabilidade e rastreabilidade do método desenvolvido, em conformidade com as exigências regulatórias internacionais.

Para a solução multielementar, contemplando 23 elementos (Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V), foi estabelecido que o método analítico terá aplicabilidade para fármacos com DMD de até 20 g/dia, em conformidade com os limites de exposição definidos pelo guia ICH Q3D.

Entretanto, para o chumbo (Pb), devido a particularidades nos cálculos de exposição e sensibilidade analítica, definiu-se uma curva de calibração específica, restringindo sua aplicabilidade a fármacos com DMD de até 10 g/dia. Essa diferenciação assegura maior precisão na quantificação do Pb e garante que os resultados obtidos estejam em conformidade com os parâmetros toxicológicos e regulatórios estabelecidos.

3.6.2. Metodologia instrumental

Tabela 5. Parâmetros instrumentais.

| Parâmetro | Valor |
|-------------------------------|---|
| Acq Mode | Spectrum |
| Peak Pattern | 3 points |
| Replicates | 3 |
| Sweeps/Replicate | 100 |
| Plasma Mode | General Purpose |
| RF Power | 1450W (Para a curva do Pb); 1550W (Para as curvas dos demais elementos) |
| RF Matching | 1,80 V |
| Smpl Depth | 8,0 mm |
| Nebulizer Gas | 1,41 (Para a curva do Pb); 1,07 (Para a curva dos demais elementos) |
| Nebulizer Pump | 0,10 rps |
| S/C Temp | 2 °C |
| Gas Switch | Makeup Gas (0 L/min) |
| Use Gas | YES |
| He Flow | ON |
| He Flow Rate | 5,0 mL/min |
| OctP RF | 200 V |
| Energy discrimination | 5,0 V |
| Uptake Speed (Nebulizer Pump) | 0,5 rps |
| Uptake Time (Nebulizer Pump) | 30 s |
| Stabilize | 40 s |

NOTA: Não foi utilizado o acessório HMI (*High Matrix Introduction*), uma vez que as condições das amostras avaliadas não apresentaram elevada carga de sólidos totais dissolvidos (STD) ou complexidade de matriz que justificassem sua aplicação.

3.6.3. Preparo das soluções

Solução diluente (branco ou limpeza) ácido nítrico 5% (v/v): Em um frasco volumétrico de 1 L, adicionar aproximadamente 950 mL de água ultrapura. Em seguida, acrescentar 50,0 mL de ácido nítrico sub-boiling concentrado. Homogeneizar cuidadosamente a solução.

Solução diluente (branco ou limpeza) ácido nítrico 6% (v/v): Em um frasco volumétrico de 1 L, adicionar aproximadamente 940 mL de água ultrapura. Em seguida, acrescentar 60,0 mL de ácido nítrico sub-boiling concentrado. Homogeneizar cuidadosamente a solução.

Solução de Padrão Interno (PI): Em balão volumétrico de 200mL adicionar 100mL de água ultrapura. Em seguida adicionar 5 mL de ácido nítrico sub-boiling e 4 mL da Internal Standard Mix. Completar o balão com água q.s.p. 200mL e homogeneizar cuidadosamente a solução.

Nota: Concentração teórica: Esta solução ([PI] = 200 µg/L) é preparada nesta concentração para ser introduzida e diluída na amostra para cerca de 10 µg/L através de um sistema in-line utilizando uma conexão união tipo T.

Solução Padrão Intermediário 1 (SPI-1): Preparar a SPI-1 em balão volumétrico de 10mL, conforme Tabela abaixo.

Tabela 6. Concentração da solução intermediária SPI- 1.

| | Elemento | Conc. (mg/L) | Alíquota | q.s.p. | Conc. final (mg/L) |
|-------|----------|--------------|----------|---------------------------------|--------------------|
| SPE-1 | Cd | 2,00 | 2000 µL | 10 mL HNO ₃ 5% (v/v) | 0,400 |
| | As | 15,0 | | | 3,0 |
| | Hg | 3,00 | | | 0,600 |
| | Co | 5,00 | | | 1,00 |
| | V | 10,0 | | | 2,00 |
| | Ni | 20,0 | | | 4,00 |
| | Tl | 8,00 | | | 1,60 |
| | Ag | 10,0 | | | 2,00 |
| | Se | 80,0 | | | 16,00 |
| SPE-2 | Au | 100,0 | 2000 µL | 10 mL HNO ₃ 5% (v/v) | 20,0 |
| | Pd | 10,0 | | | 2,00 |
| | Ir | 10,0 | | | 2,00 |
| | Os | 10,0 | | | 2,00 |
| | Rh | 10,0 | | | 2,00 |
| | Ru | 10,0 | | | 2,00 |
| | Pt | 10,0 | | | 2,00 |

Solução Padrão Intermediário 2 (SPI-2): Preparar a SPI-2 em balão volumétrico de 50mL, conforme Tabela abaixo.

Tabela 7. Concentração da solução intermediária SPI- 2.

| | Elemento | Conc. (mg/L) | Alíquota | q.s.p. | Conc. final (mg/L) |
|-------|----------|--------------|----------|--------------------------------|--------------------|
| SPE-4 | Pb | 1000 | 100 µL | 50mL HNO ₃ 6% (v/v) | 2,00 |

Curva de calibração dos elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V:

- Solução branco: Em um balão de 40 mL, completar com diluente 5%;
- Solução padrão 0,2J: Em um balão de 40 mL, adicionar 80 µL da SPI-1 e 160 µL SPE-3 e completar com diluente 5%;

- Solução padrão 0,4J: Em um balão de 40 mL, adicionar 160 µL da SPI-1 e 320 µL SPE-3 e completar com diluente 5%;
- Solução padrão 0,6J: Em um balão de 40 mL, adicionar 240 µL da SPI-1 e 480 µL SPE-3 e completar com diluente 5%;
- Solução padrão 0,8J: Em um balão de 40 mL, adicionar 320 µL da SPI-1 e 640 µL SPE-3 e completar com diluente 5%;
- Solução padrão 1,0J: Em um balão de 40 mL, adicionar 400 µL da SPI-1 e 800 µL SPE-3 e completar com diluente 5%;
- Solução padrão 1,2J: Em um balão de 40 mL, adicionar 480 µL da SPI-1 e 960 µL SPE-3 e completar com diluente 5%;
- Solução padrão 1,5J: Em um balão de 40 mL, adicionar 600 µL da SPI-1 e 1200 µL SPE-3 e completar com diluente 5%.

Tabela 8. Concentração das soluções padrões dos elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V.

| Elementos | LOQ | 0,2J | 0,4J | 0,6J | 0,8J | 1,0J | 1,2J | 1,5J |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Li | 100 (µg/L) | 100 (µg/L) | 200 (µg/L) | 300 (µg/L) | 400 (µg/L) | 500 (µg/L) | 600 (µg/L) | 750 (µg/L) |
| | 2,5 (µg/g) | 2,5 (µg/g) | 5 (µg/g) | 7,5 (µg/g) | 10 (µg/g) | 12,5 (µg/g) | 15 (µg/g) | 18,75 (µg/g) |
| V | 4 (µg/L) | 4 (µg/L) | 8 (µg/L) | 12 (µg/L) | 16 (µg/L) | 20 (µg/L) | 24 (µg/L) | 30 (µg/L) |
| | 0,1 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,5 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,75 (µg/g) |
| Cr | 440 (µg/L) | 440 (µg/L) | 880 (µg/L) | 1320 (µg/L) | 1760 (µg/L) | 2200 (µg/L) | 2640 (µg/L) | 3300 (µg/L) |
| | 11 (µg/g) | 11 (µg/g) | 22 (µg/g) | 33 (µg/g) | 44 (µg/g) | 55 (µg/g) | 66 (µg/g) | 82,5 (µg/g) |
| Co | 2 (µg/L) | 2 (µg/L) | 4 (µg/L) | 6 (µg/L) | 8 (µg/L) | 10 (µg/L) | 12 (µg/L) | 15 (µg/L) |
| | 0,05 (µg/g) | 0,05 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,15 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,25 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,38 (µg/g) |
| Ni | 8 (µg/L) | 8 (µg/L) | 16 (µg/L) | 24 (µg/L) | 32 (µg/L) | 40 (µg/L) | 48 (µg/L) | 60 (µg/L) |
| | 0,2 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,8 (µg/g) | 1 (µg/g) | 1,2 (µg/g) | 1,5 (µg/g) |
| Cu | 120 (µg/L) | 120 (µg/L) | 240 (µg/L) | 360 (µg/L) | 480 (µg/L) | 600 (µg/L) | 720 (µg/L) | 900 (µg/L) |
| | 3 (µg/g) | 3 (µg/g) | 6 (µg/g) | 9 (µg/g) | 12 (µg/g) | 15 (µg/g) | 18 (µg/g) | 22,5 (µg/g) |
| As | 6 (µg/L) | 6 (µg/L) | 12 (µg/L) | 18 (µg/L) | 24 (µg/L) | 30 (µg/L) | 36 (µg/L) | 45 (µg/L) |
| | 0,15 (µg/g) | 0,15 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,45 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,75 (µg/g) | 0,9 (µg/g) | 1,13 (µg/g) |
| Se | 32 (µg/L) | 32 (µg/L) | 64 (µg/L) | 96 (µg/L) | 128 (µg/L) | 160 (µg/L) | 192 (µg/L) | 240 (µg/L) |
| | 0,8 (µg/g) | 0,8 (µg/g) | 1,6 (µg/g) | 2,4 (µg/g) | 3,2 (µg/g) | 4 (µg/g) | 4,8 (µg/g) | 6 (µg/g) |
| Mo | 600 (µg/L) | 600 (µg/L) | 1200 (µg/L) | 1800 (µg/L) | 2400 (µg/L) | 3000 (µg/L) | 3600 (µg/L) | 4500 (µg/L) |
| | 15 (µg/g) | 15 (µg/g) | 30 (µg/g) | 45 (µg/g) | 60 (µg/g) | 75 (µg/g) | 90 (µg/g) | 112,5 (µg/g) |
| Ru | 4 (µg/L) | 4 (µg/L) | 8 (µg/L) | 12 (µg/L) | 16 (µg/L) | 20 (µg/L) | 24 (µg/L) | 30 (µg/L) |
| | 0,1 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,5 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,75 (µg/g) |
| Rh | 4 (µg/L) | 4 (µg/L) | 8 (µg/L) | 12 (µg/L) | 16 (µg/L) | 20 (µg/L) | 24 (µg/L) | 30 (µg/L) |
| | 0,1 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,5 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,75 (µg/g) |
| Pd | 4 (µg/L) | 4 (µg/L) | 8 (µg/L) | 12 (µg/L) | 16 (µg/L) | 20 (µg/L) | 24 (µg/L) | 30 (µg/L) |
| | 0,1 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,5 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,75 (µg/g) |
| Ag* | 4 (µg/L) | 4 (µg/L) | 8 (µg/L) | 12 (µg/L) | 16 (µg/L) | 20 (µg/L) | 24 (µg/L) | 30 (µg/L) |
| | 0,1 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,5 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,75 (µg/g) |
| Cd | 0,8 (µg/L) | 0,8 (µg/L) | 1,6 (µg/L) | 2,4 (µg/L) | 3,2 (µg/L) | 4 (µg/L) | 4,8 (µg/L) | 6 (µg/L) |
| | 0,02 (µg/g) | 0,02 (µg/g) | 0,04 (µg/g) | 0,06 (µg/g) | 0,08 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,12 (µg/g) | 0,15 (µg/g) |
| Sn | 240 (µg/L) | 240 (µg/L) | 480 (µg/L) | 720 (µg/L) | 960 (µg/L) | 1200 (µg/L) | 1440 (µg/L) | 1800 (µg/L) |
| | 6 (µg/g) | 6 (µg/g) | 12 (µg/g) | 18 (µg/g) | 24 (µg/g) | 30 (µg/g) | 36 (µg/g) | 45 (µg/g) |
| Sb | 36 (µg/L) | 36 (µg/L) | 72 (µg/L) | 108 (µg/L) | 144 (µg/L) | 180 (µg/L) | 216 (µg/L) | 270 (µg/L) |
| | 0,9 (µg/g) | 0,9 (µg/g) | 1,8 (µg/g) | 2,7 (µg/g) | 3,6 (µg/g) | 4,5 (µg/g) | 5,4 (µg/g) | 6,75 (µg/g) |
| Ba | 280 (µg/L) | 280 (µg/L) | 560 (µg/L) | 840 (µg/L) | 1120 (µg/L) | 1400 (µg/L) | 1680 (µg/L) | 2100 (µg/L) |
| | 7 (µg/g) | 7 (µg/g) | 14 (µg/g) | 21 (µg/g) | 28 (µg/g) | 35 (µg/g) | 42 (µg/g) | 52,5 (µg/g) |
| Os | 4 (µg/L) | 4 (µg/L) | 8 (µg/L) | 12 (µg/L) | 16 (µg/L) | 20 (µg/L) | 24 (µg/L) | 30 (µg/L) |
| | 0,1 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,5 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,75 (µg/g) |

Tabela 8. Continuação...

| Elementos | LOQ | 0,2J | 0,4J | 0,6J | 0,8J | 1,0J | 1,2J | 1,5J |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Ir | 4 (µg/L) | 4 (µg/L) | 8 (µg/L) | 12 (µg/L) | 16 (µg/L) | 20 (µg/L) | 24 (µg/L) | 30 (µg/L) |
| | 0,1 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,5 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,75 (µg/g) |
| Pt | 4 (µg/L) | 4 (µg/L) | 8 (µg/L) | 12 (µg/L) | 16 (µg/L) | 20 (µg/L) | 24 (µg/L) | 30 (µg/L) |
| | 0,1 (µg/g) | 0,1 (µg/g) | 0,2 (µg/g) | 0,3 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,5 (µg/g) | 0,6 (µg/g) | 0,75 (µg/g) |
| Au* | 40 (µg/L) | 40 (µg/L) | 80 (µg/L) | 120 (µg/L) | 160 (µg/L) | 200 (µg/L) | 240 (µg/L) | 300 (µg/L) |
| | 1 (µg/g) | 1 (µg/g) | 2 (µg/g) | 3 (µg/g) | 4 (µg/g) | 5 (µg/g) | 6 (µg/g) | 7,5 (µg/g) |
| Hg | 1,2 (µg/L) | 1,2 (µg/L) | 2,4 (µg/L) | 3,6 (µg/L) | 4,8 (µg/L) | 6 (µg/L) | 7,2 (µg/L) | 9 (µg/L) |
| | 0,03 (µg/g) | 0,03 (µg/g) | 0,06 (µg/g) | 0,09 (µg/g) | 0,12 (µg/g) | 0,15 (µg/g) | 0,18 (µg/g) | 0,23 (µg/g) |
| Tl | 3,2 (µg/L) | 3,2 (µg/L) | 6,4 (µg/L) | 9,6 (µg/L) | 12,8 (µg/L) | 16 (µg/L) | 19,2 (µg/L) | 24 (µg/L) |
| | 0,08 (µg/g) | 0,08 (µg/g) | 0,16 (µg/g) | 0,24 (µg/g) | 0,32 (µg/g) | 0,4 (µg/g) | 0,48 (µg/g) | 0,6 (µg/g) |

*Para ouro e prata foi utilizado o PDE de acordo com as USP <232> 01/12/2020.

NOTA: Considerando a alíquota e volume de diluição default do método (1mL/25mL) e densidade 1 g/cm³.

Curva de calibração do elemento chumbo:

- Solução branco: Em um balão de 40 mL, completar com diluente 6%;
- Solução padrão 0,2J: Em um balão de 40 mL, adicionar 140 µL da SPI-2 e completar com diluente 6%;
- Solução padrão 0,4J: Em um balão de 40 mL, adicionar 280 µL da SPI-2 e completar com diluente 6%;
- Solução padrão 0,6J: Em um balão de 40 mL, adicionar 420 µL da SPI-2 e completar com diluente 6%;
- Solução padrão 0,8J: Em um balão de 40 mL, adicionar 560 µL da SPI-2 e completar com diluente 6%;
- Solução padrão 1,0J: Em um balão de 40 mL, adicionar 700 µL da SPI-2 e completar com diluente 6%;
- Solução padrão 1,2J: Em um balão de 40 mL, adicionar 840 µL da SPI-2 e completar com diluente 6%;
- Solução padrão 1,5J: Em um balão de 40 mL, adicionar 1050 µL da SPI-2 e completar com diluente 6%.

Tabela 9. Concentração das soluções padrão do elemento chumbo.

| Elemento Pb | LOQ | 0,2J | 0,4J | 0,6J | 0,8J | 1,0J | 1,2J | 1,5J | Padrão check Q3D |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| µg/L | 7,00 | 7,00 | 14,0 | 21,0 | 28,0 | 35,0 | 42,0 | 53,0 | 35,0 |
| µg/g | 0,100 | 0,100 | 0,200 | 0,300 | 0,400 | 0,500 | 0,600 | 0,750 | 0,500 |

NOTA: Considerando a alíquota e volume de diluição default do método (1,4mL/20mL) e densidade 1 g/cm³.

3.6.3.1. Preparo amostras fortificadas e não fortificadas

Tabela 10. Preparo das soluções amostras fortificadas e não fortificadas dos elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V.

| Solução | Procedimento de preparo das amostras |
|-------------------------------------|---|
| Branco | Solução diluente tal qual (Preparar pelo menos 1 replicata). |
| Amostra | Transferir 1mL da amostra para balão volumétrico de 25mL, completar o volume com diluente HNO ₃ 5% (Preparar pelo menos 3 replicatas). |
| Amostra + 0,2J (Ponto Baixo) | Transferir 1mL da amostra para balão volumétrico de 25mL e adicionar 50 µL da SPI-1 e 100 µL da SPE-3, completar o volume com diluente HNO ₃ 5% (Preparar pelo menos 6 replicatas). |
| Amostra + 1,0J (Ponto Médio) | Transferir 1mL da amostra para balão volumétrico de 25mL e adicionar 250 µL da SPI-1 e 500 µL da SPE-3, completar o volume com diluente HNO ₃ 5% (Preparar pelo menos 6 replicatas). |
| Amostra + 1,5J (Ponto Alto) | Transferir 1mL da amostra para balão volumétrico de 25mL e adicionar 375 µL da SPI-1 e 750 µL da SPE-3, completar o volume com diluente HNO ₃ 5% (Preparar pelo menos 3 replicatas). |

Tabela 11. Preparo das soluções amostras fortificadas e não fortificadas do elemento Pb.

| Solução | Procedimento de preparo das amostras |
|-------------------------------------|---|
| Branco | Solução diluente tal qual (Preparar pelo menos 1 replicata). |
| Amostra | Transferir 1,4mL da amostra para balão volumétrico de 20mL, completar o volume com diluente HNO ₃ 6% (Preparar pelo menos 3 replicatas). |
| Amostra + 0,2J (Ponto Baixo) | Transferir 1,4mL da amostra para balão volumétrico de 20mL e adicionar 70 µL da SPI-2, completar o volume com diluente HNO ₃ 6% (Preparar pelo menos 6 replicatas). |
| Amostra + 1,0J (Ponto Médio) | Transferir 1,4mL da amostra para balão volumétrico de 20mL e adicionar 350 µL da SPI-2, completar o volume com diluente HNO ₃ 6% (Preparar pelo menos 6 replicatas). |
| Amostra + 1,5J (Ponto Alto) | Transferir 1,4mL da amostra para balão volumétrico de 20mL e adicionar 525 µL da SPI-2, completar o volume com diluente HNO ₃ 6% (Preparar pelo menos 3 replicatas). |

3.6.4. Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema deverá atender os requisitos abaixo:

- O coeficiente de correlação da regressão linear (R) deve ser $R \geq 0,990$ para as determinações por ICP-MS;
- A recuperação das três leituras da solução padrão check deve ser de 80-120%, sendo elas medidas antes e depois da análise da solução amostra;
- O DPR das 3 leituras do padrão check no início e final da corrida deve ser $\leq 20\%$.

3.6.5. Procedimento

Realizar a leitura da solução branco, solução padrão 0,2J, 0,4J, 0,6J, 0,8J, 1,0J, 1,2J e 1,5J e solução padrão check. Se todas as soluções padrão estiverem dentro do critério de aceitação e a recuperação da média das 3 leituras do padrão check estar entre 80 e 120%, iniciar a leitura da solução amostra.

3.6.6. Cálculo

A quantificação, em $\mu\text{g/L}$, dos compostos inorgânicos extraídos será realizada a partir da equação da reta da curva de calibração utilizando a resposta em CPS (*Counts Per Second*) do analito:

$$C (\mu\text{g/L}) = \frac{y - b}{a}$$

Onde:

$C (\mu\text{g/L})$, é a concentração em $\mu\text{g/L}$ do analito na solução amostra;

y (em casos que não seja utilizado padrão interno, o valor de y é apenas o CPS do padrão) é a razão CPS padrão pelo CPS do padrão interno;

b é o coeficiente linear da reta;

a é o coeficiente angular da reta.

A concentração do elemento na amostra, em $\mu\text{g/g}$, dos compostos inorgânicos extraídos será realizada conforme equação abaixo:

$$C (\mu\text{g/g}) = \frac{(C(\mu\text{g/L}) - Br) \times V}{m}$$

Onde:

$C (\mu\text{g/g})$, é a concentração do elemento na amostra expresso em $\mu\text{g/g}$;

Br é a concentração em $\mu\text{g/L}$ do analito na solução branco;

V é o volume de diluição da amostra (em L);

m é a massa da amostra (em g) utilizada no preparo da solução amostra, considerar a densidade igual a 1g/cm^3 .

3.7. Parâmetros de validação

3.7.1. Especificidade

No capítulo <730> da USP, a especificidade é caracterizada como a capacidade de um método analítico em identificar e quantificar de forma inequívoca o analito de interesse, mesmo na presença de componentes que possam atuar como interferentes, tais como impurezas, produtos de degradação, excipientes ou demais constituintes da matriz. Esse parâmetro assegura que o método seja seletivo, distinguindo o analito alvo de substâncias estruturalmente semelhantes ou de potenciais interferentes, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos.

Do ponto de vista prático, a especificidade é demonstrada por meio de estudos que evidenciem a ausência de interferência significativa nos sinais analíticos, atendendo aos critérios estabelecidos para o parâmetro de exatidão. Dessa forma, confirma-se que a resposta obtida é atribuída exclusivamente ao analito, assegurando a adequação do método para aplicações em controle de qualidade e validação analítica.

3.7.2. Linearidade

De acordo com o capítulo da USP <730>, o parâmetro de validação linearidade é descrito como a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa específica. Esse requisito é fundamental para métodos quantitativos, pois assegura que a resposta instrumental seja adequada para a quantificação confiável e reprodutível.

A avaliação da linearidade, conforme estabelecido pela USP, deve ser realizada por meio da construção de uma curva de calibração, utilizando soluções padrão em diferentes níveis de concentração que cubram toda a faixa de aplicação do método. Recomenda-se o uso de, no mínimo, cinco pontos de calibração, distribuídos de forma representativa, e a análise estatística dos resultados obtidos.

O estudo de linearidade foi conduzido utilizando sete diferentes níveis de concentração, distribuídos uniformemente na faixa de 0,2J a 1,5J da concentração-alvo, com cinco réplicas por nível. A avaliação foi conduzida distintamente para as duas curvas desenvolvidas.

O preparo das soluções ácido nítrico 5 e 6% (v/v), solução PI, SPI-1 e SPI-2, e a diluição da curva de calibração dos elementos segue conforme descrito no item 3.6.3.

As soluções amostra para a linearidade seguiu o mesmo preparo das curvas de calibração descritas no item 3.6.3.

O preparo foi realizado de forma aleatória para evitar influências de possíveis cofatores, e o ensaio foi realizado com uma leitura do branco e da curva de calibração, uma leitura da solução padrão check e posteriormente de cada solução amostra para linearidade, finalizando com uma leitura da solução padrão check novamente.

Foi avaliado o coeficiente de correlação da curva de calibração ($\geq 0,99$), o intercepto, o coeficiente angular, a normalidade dos resíduos, a homoscedasticidade da variância, pontos extremos na resposta e dependência nas observações.

3.7.2.1. Resultados da linearidade

Todos os elementos foram avaliados por meio do método dos mínimos quadrados, técnica estatística amplamente utilizada para a estimação dos parâmetros da regressão, cuja aplicação não se restringe a relações estritamente lineares, mas se estende a diferentes modelos de ajuste.

A significância do modelo foi verificada pelo teste F da ANOVA, no qual se avaliaram as hipóteses: (1) H_0 , coeficiente angular igual a zero; (2) H_1 , coeficiente angular diferente de zero. De acordo com o critério adotado, quando o p-valor $< 0,05$, rejeita-se a hipótese nula ao nível de significância de 5%, confirmando que o coeficiente angular é estatisticamente diferente de zero e, portanto, que existe relação significativa entre concentração e resposta.

Para o intercepto (coeficiente linear), aplicou-se o teste t de Student, considerando as hipóteses: (1) H_0 , intercepto igual a zero; (2) H_1 , intercepto diferente de zero. Assim, quando o p-valor $< 0,05$, rejeita-se a hipótese nula ao nível de significância de 5%, indicando que o intercepto difere estatisticamente de zero.

O coeficiente de correlação de Pearson (R) foi utilizado para mensurar o grau de proporcionalidade entre a variável explicativa (concentração) e a variável resposta (sinal instrumental). Conforme o critério estabelecido, valores de $R < 0,990$ indicam ausência de relação linear adequada. Nesses casos, deve-se reavaliar a adequação do procedimento analítico e/ou da faixa de calibração utilizada, o que implicaria na reprovação do estudo de linearidade.

Dessa forma, a combinação dos testes estatísticos (ANOVA, t de Student e correlação de Pearson) assegura uma avaliação robusta da linearidade, garantindo que o modelo seja estatisticamente válido e adequado para a quantificação dos elementos na faixa de trabalho definida.

Abaixo segue quatro gráficos para cada elemento avaliado, sendo eles:

- Gráfico de Resíduos padronizados vs Valores ajustados: é usado para detectar se os resíduos se distribuem aleatoriamente e para detectar a presença de valores extremos (outliers) nos dados. Geralmente, consideram-se outliers os pontos que excedem o limite de 3 desvios padrão;
- Gráfico de Resíduos da Normal: representado pelo QQ-Plot (*Quantile-Quantile Plot*) é usado para verificar a pressuposição de que os resíduos são distribuídos normalmente. Quando essa condição é atendida, os pontos do gráfico tendem a se alinhar aproximadamente sobre uma linha reta, indicando aderência à normalidade;
- Gráfico de Resíduos vs Valores ajustados: é usado para verificar a pressuposição de que os resíduos se distribuem aleatoriamente e que têm variância constante;
- Gráfico de Resíduos vs Ordem de coleta: este gráfico mostra os resíduos na ordem em que foram coletados e é usado para verificar a pressuposição de independência. Em geral, para que se cumpra tal requisito, os dados devem se dispor aleatoriamente em torno da linha central.

➤ **Elemento: Prata (Ag)**

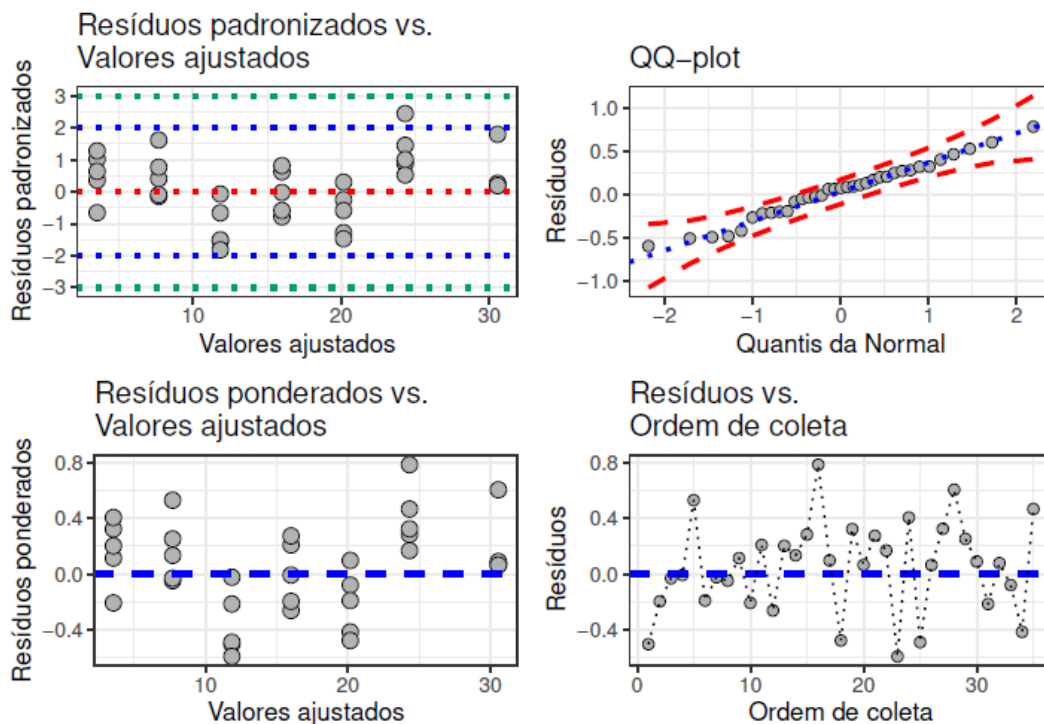


Figura 34. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Prata (Ag).

➤ **Elemento: Arsênio (As)**

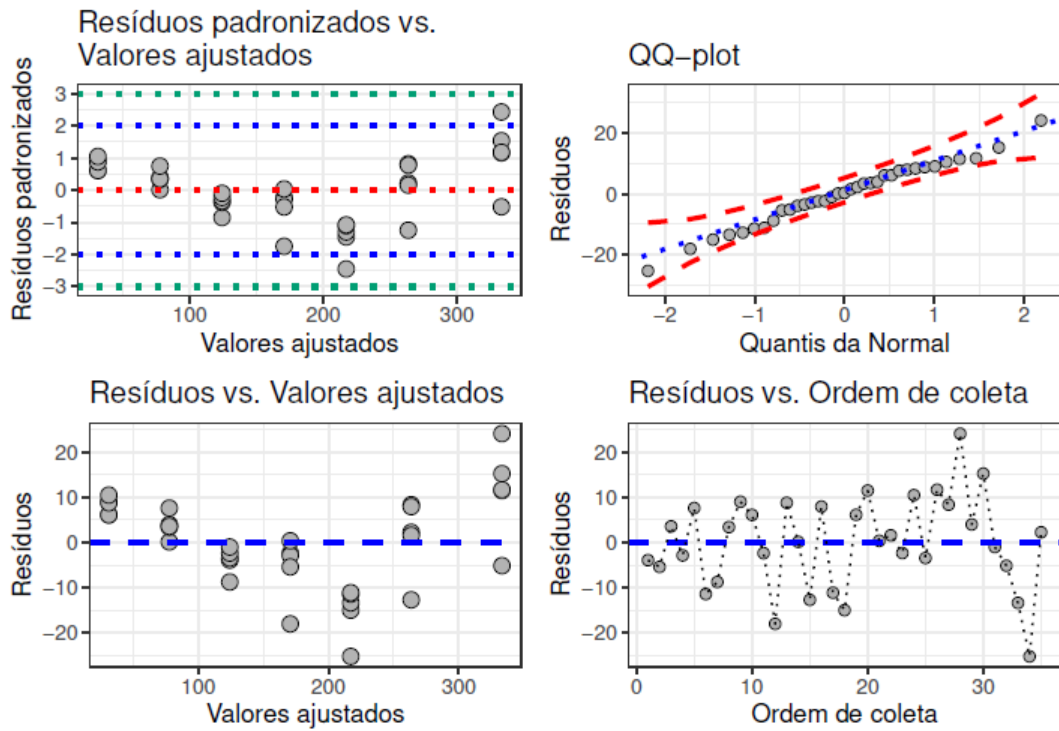


Figura 35. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Arsênio (As).

➤ **Elemento: Ouro (Au)**

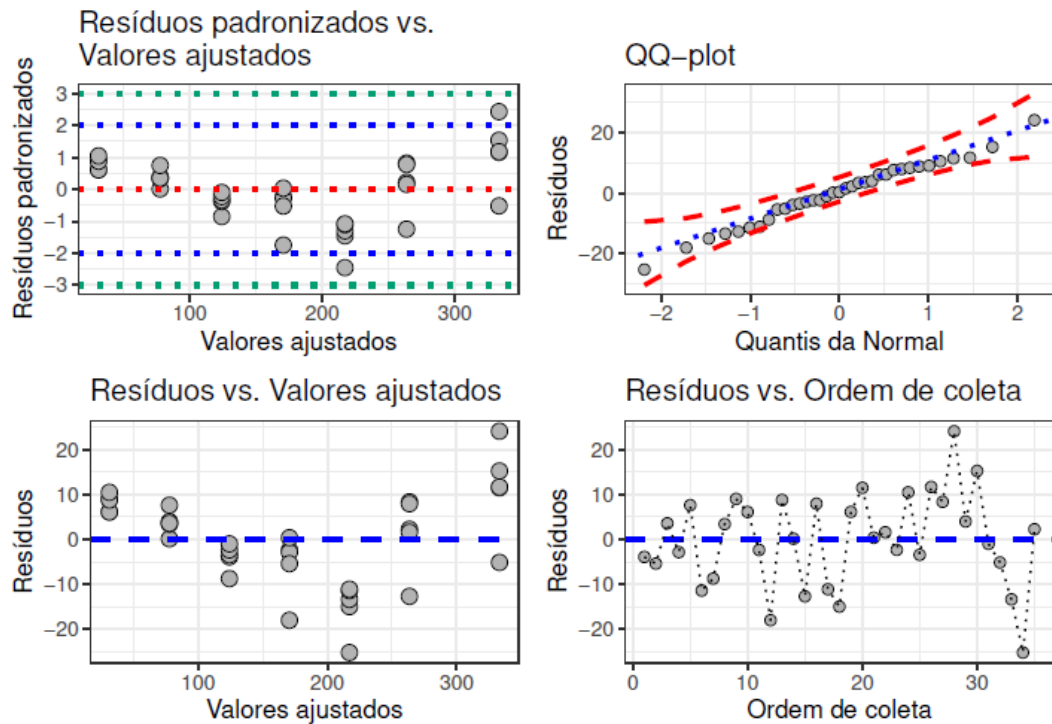


Figura 36. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Ouro (Au).

➤ **Elemento: Bário (Ba)**

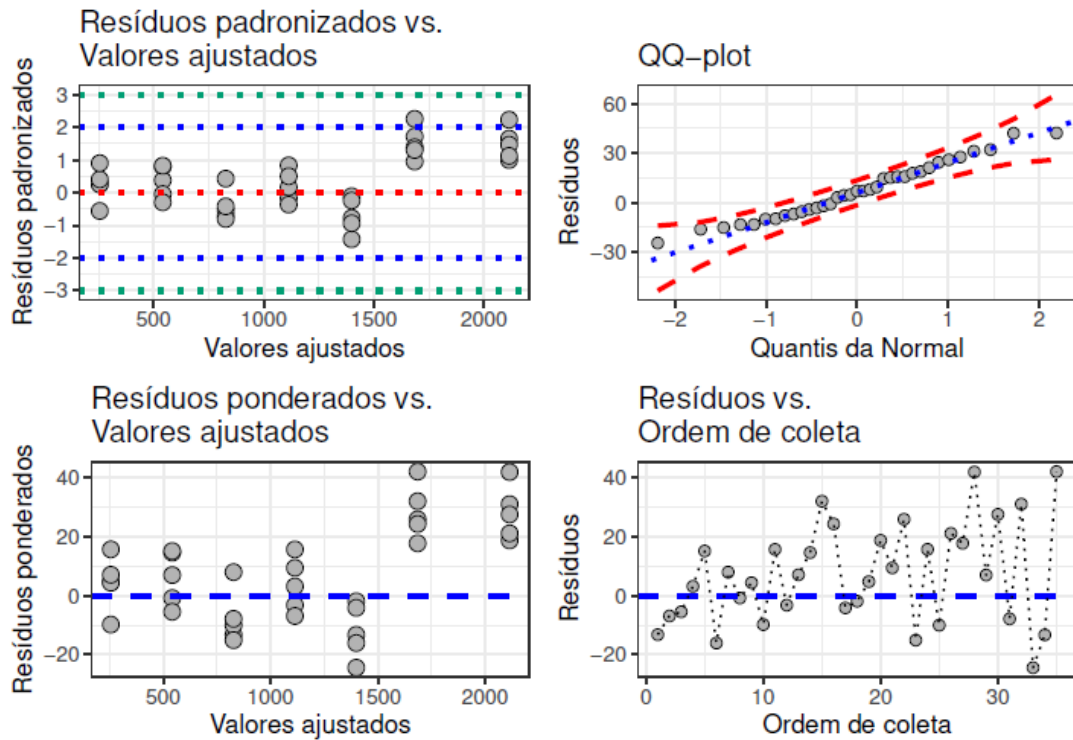


Figura 37. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Bário (Ba).

➤ **Elemento: Cádmio (Cd)**

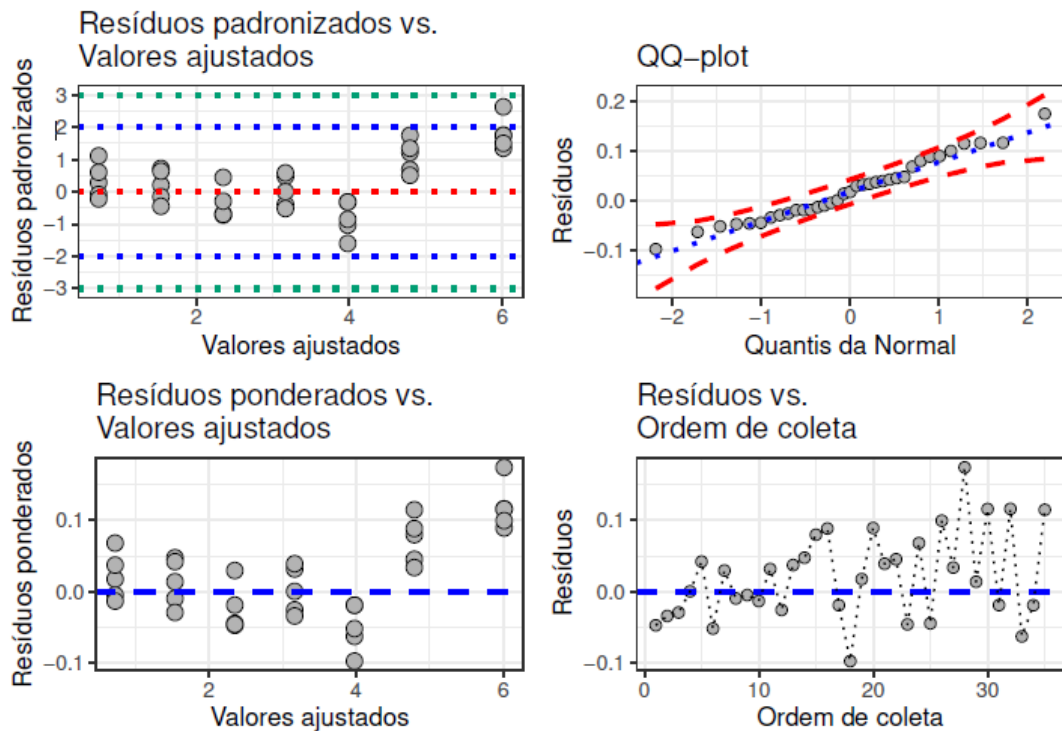


Figura 38. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Cádmio (Cd).

➤ **Elemento: Cobalto (Co)**

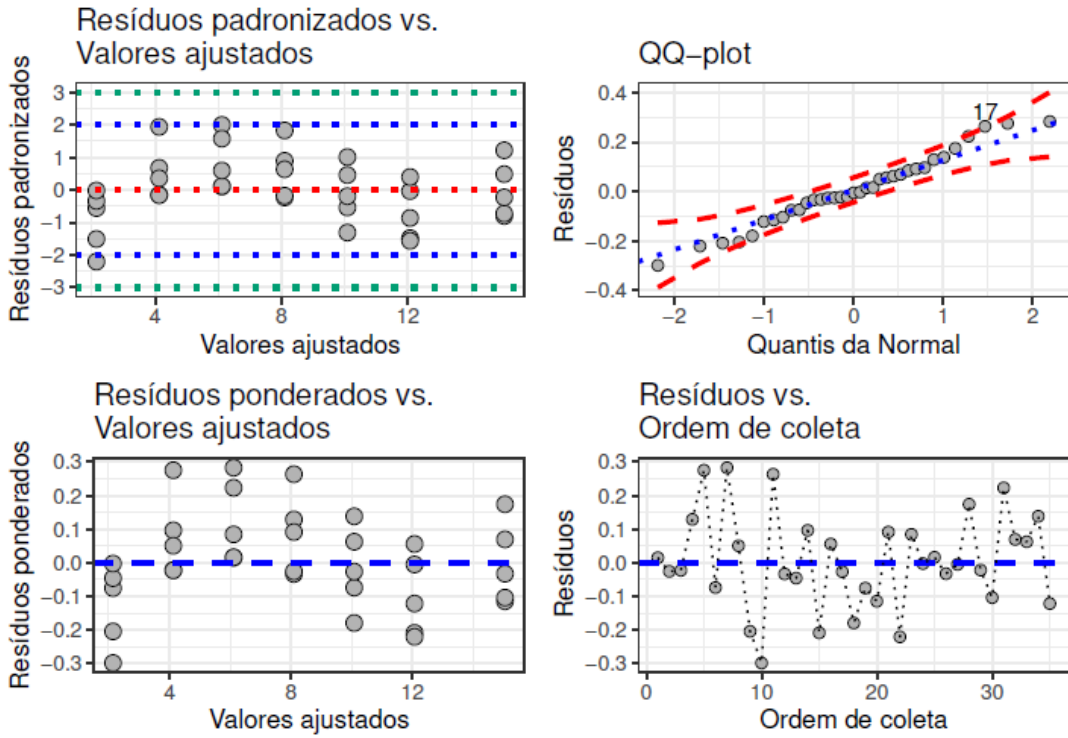


Figura 39. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Cobalto (Co).

➤ **Elemento: Cromo (Cr)**

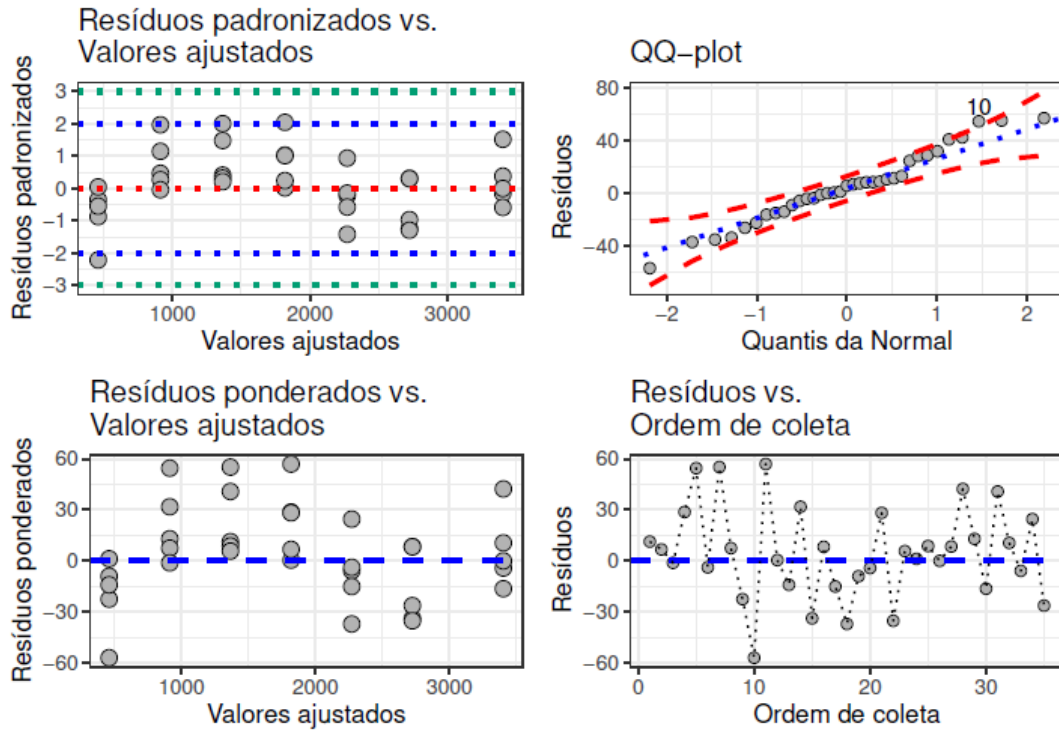


Figura 40. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Cromo (Cr).

➤ **Elemento: Cobre (Cu)**

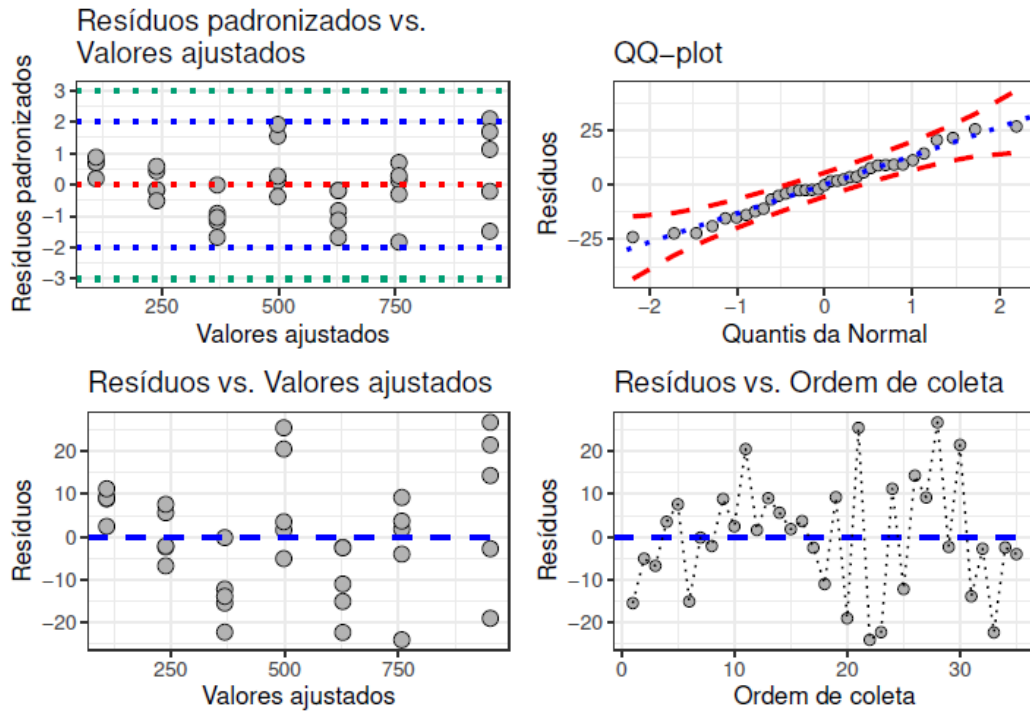


Figura 41. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Cobre (Cu).

➤ **Elemento: Mercúrio (Hg)**

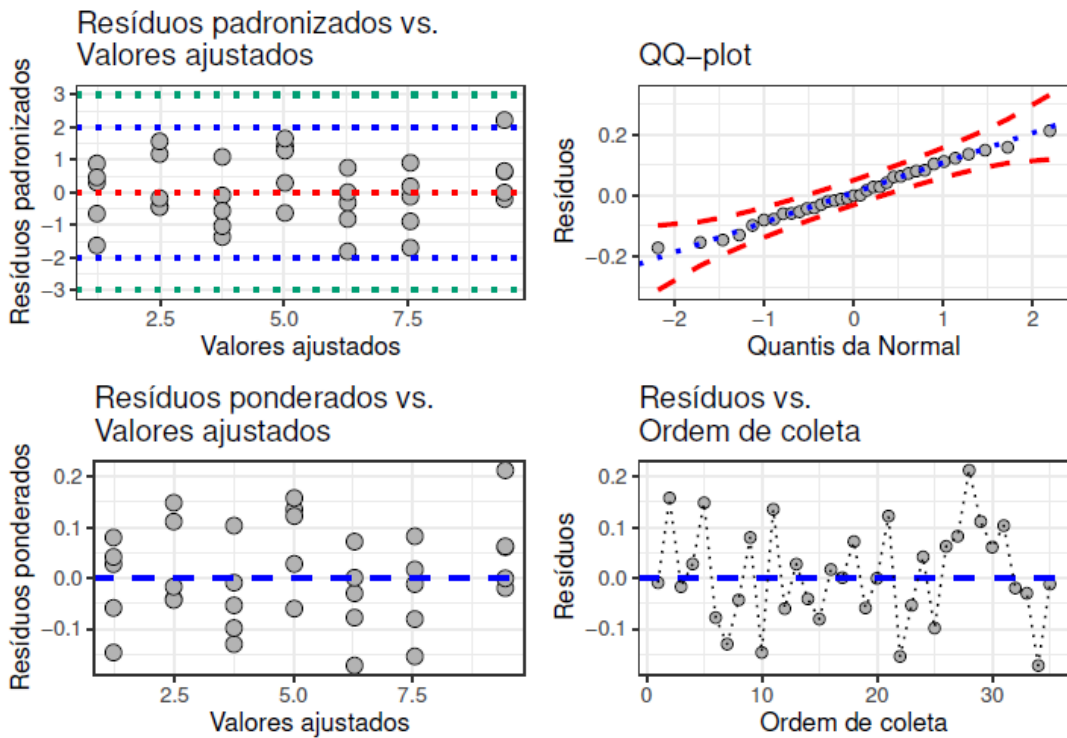


Figura 42. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Mercúrio (Hg).

➤ **Elemento: Irídio (Ir)**

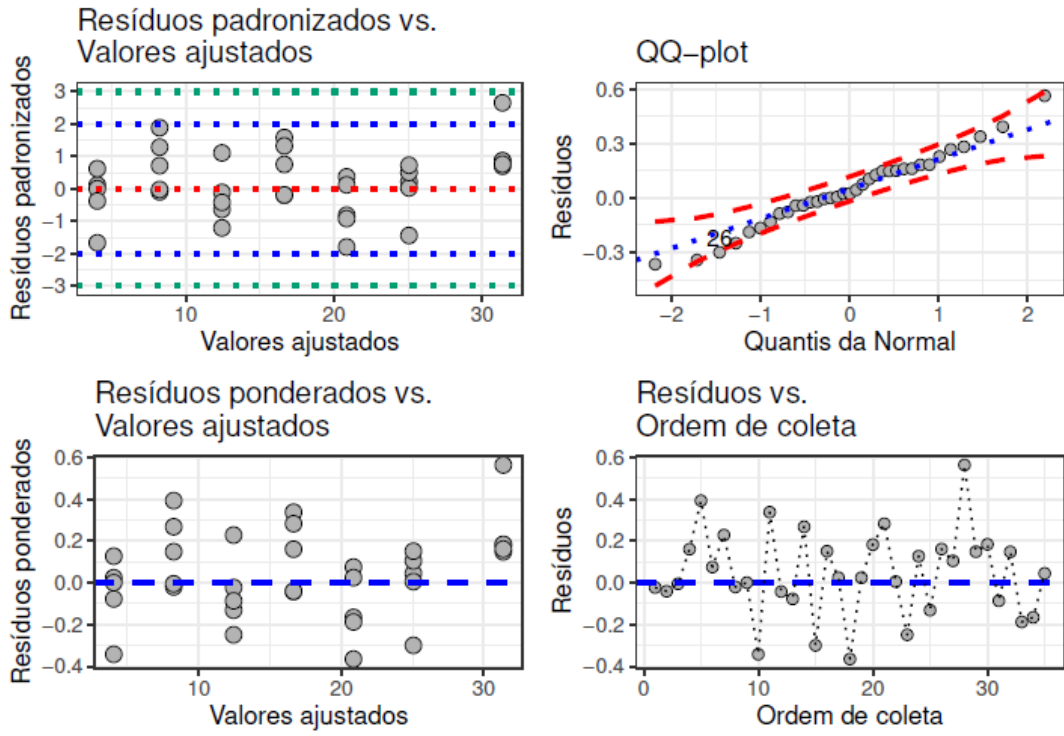


Figura 43. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Irídio (Ir).

➤ **Elemento: Lítio (Li)**

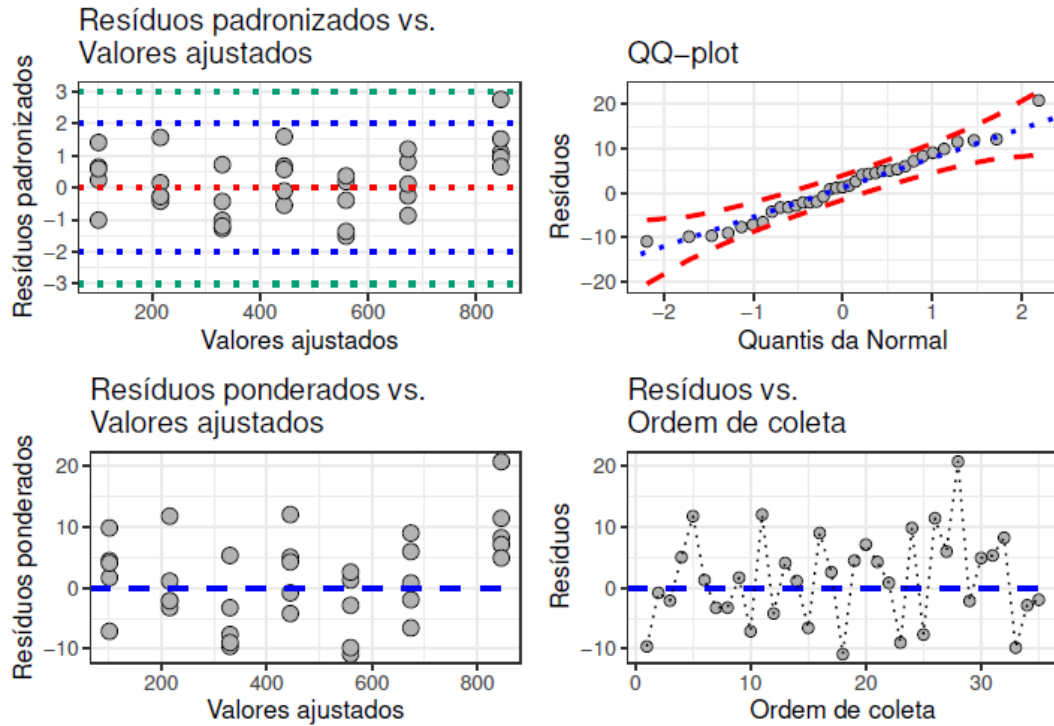


Figura 44. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Lítio (Li).

➤ **Elemento: Molibdênio (Mo)**

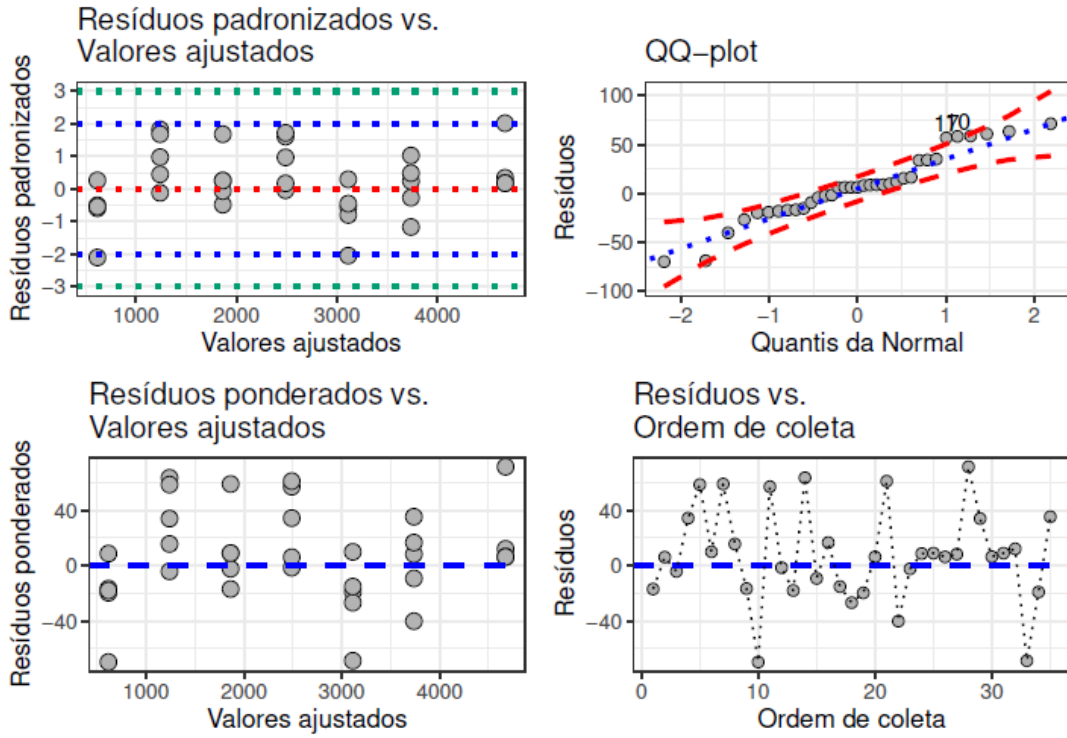


Figura 45. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Molibdênio (Mo).

➤ **Elemento: Níquel (Ni)**

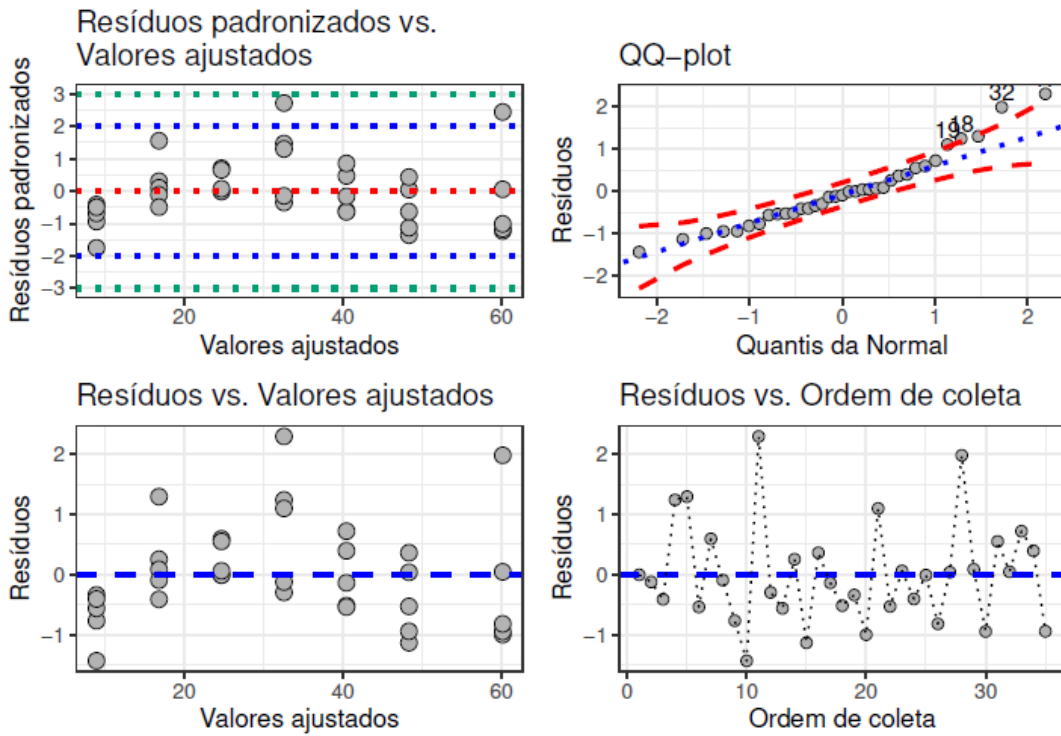


Figura 46. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Níquel (Ni).

➤ **Elemento: Ósmio (Os)**

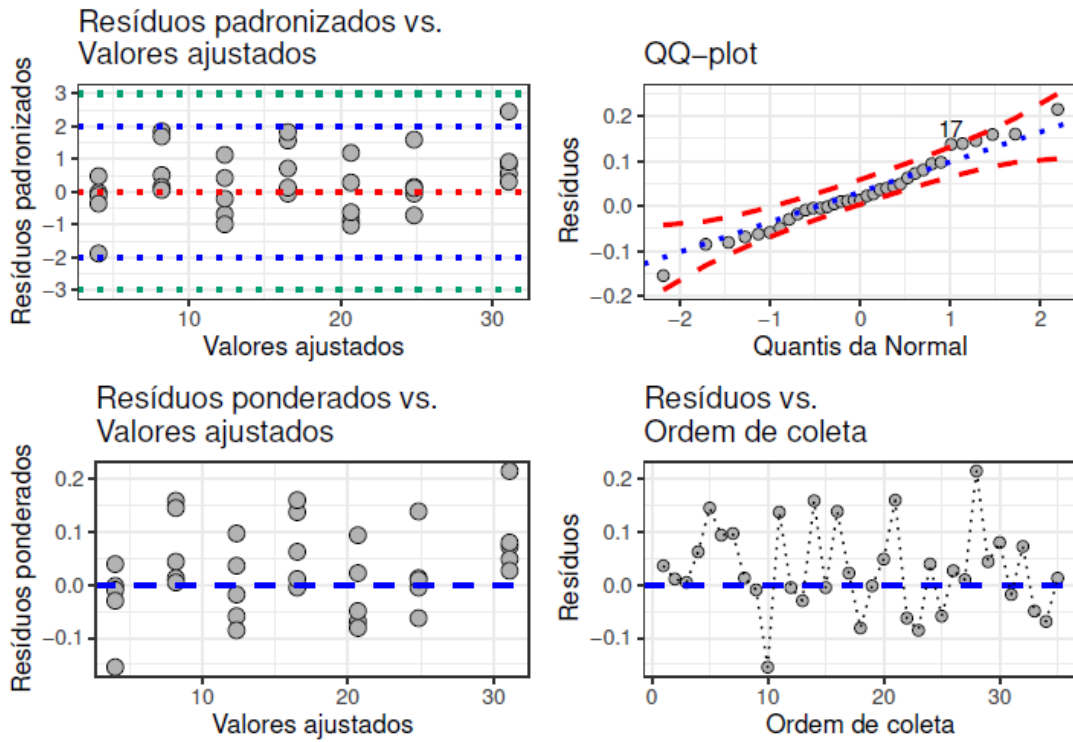


Figura 47. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Ósmio (Os).

➤ **Elemento: Chumbo (Pb)**

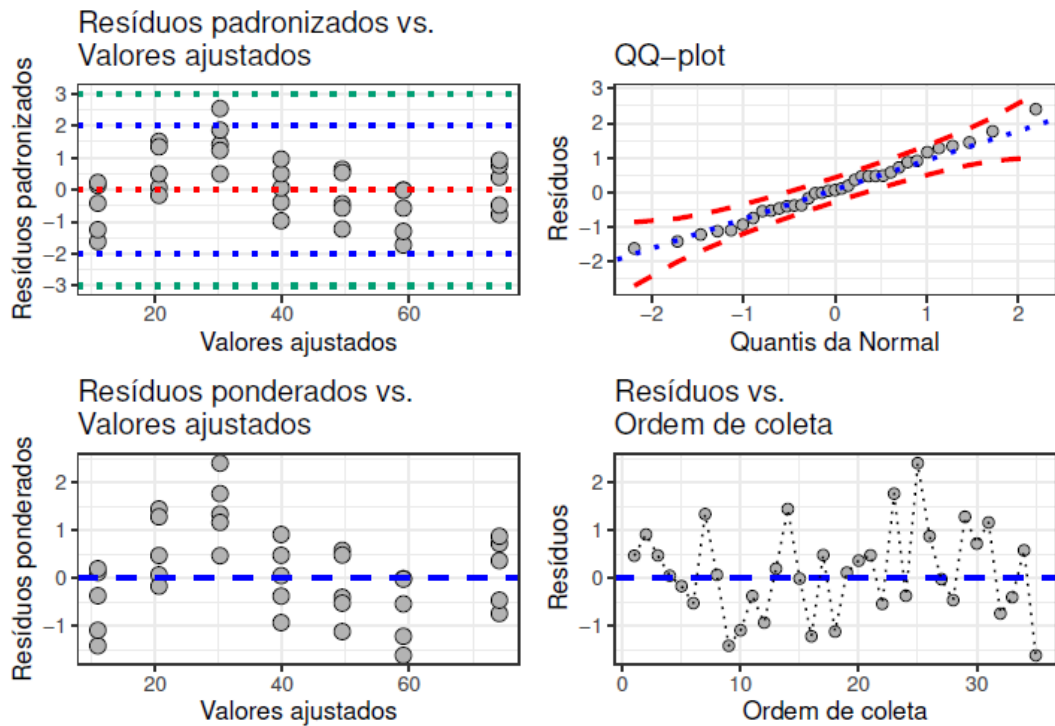


Figura 48. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Chumbo (Pb).

➤ **Elemento: Paládio (Pd)**

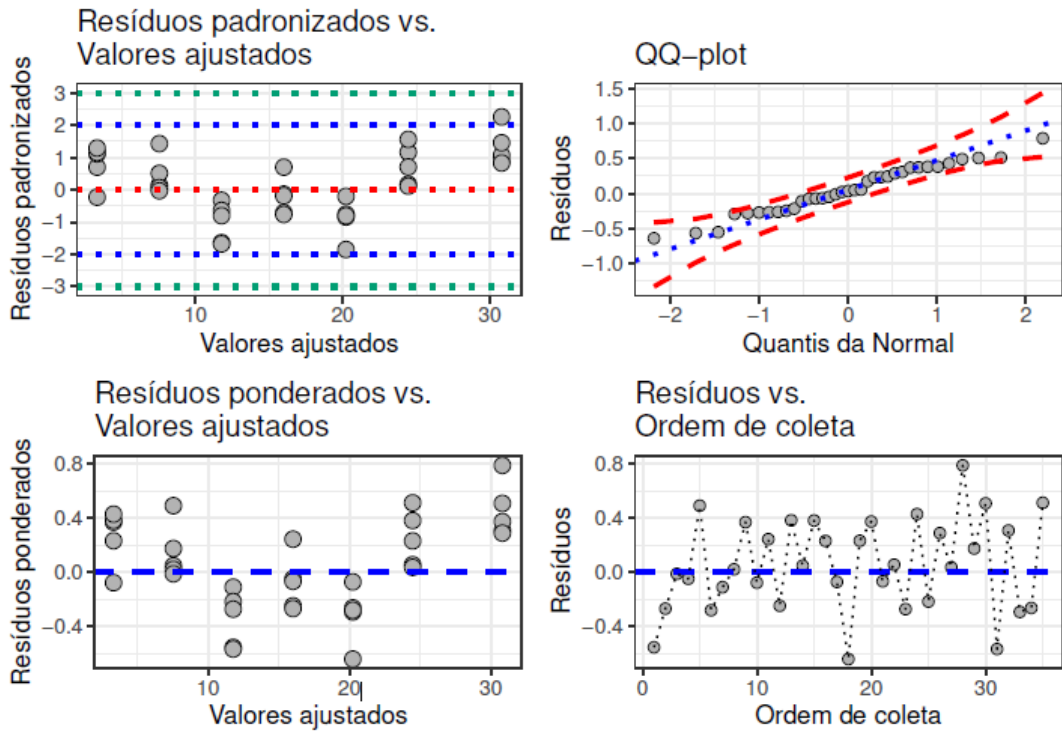


Figura 49. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Paládio (Pd).

➤ **Elemento: Platina (Pt)**

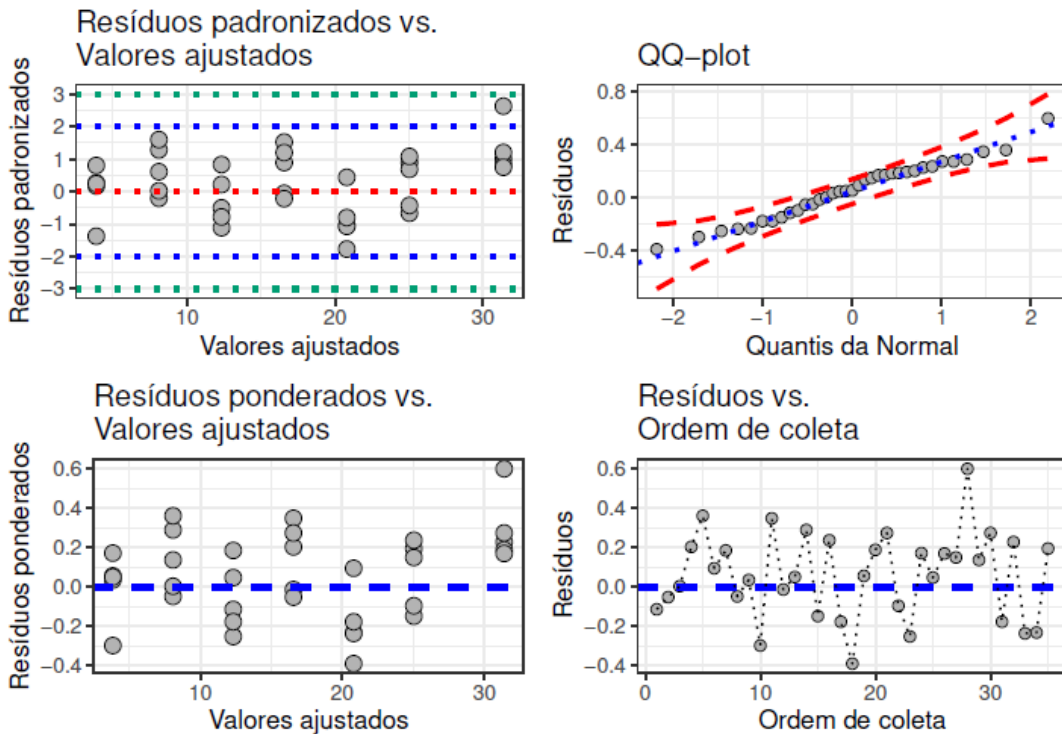


Figura 50. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Platina (Pt).

➤ **Elemento: Ródio (Rh)**

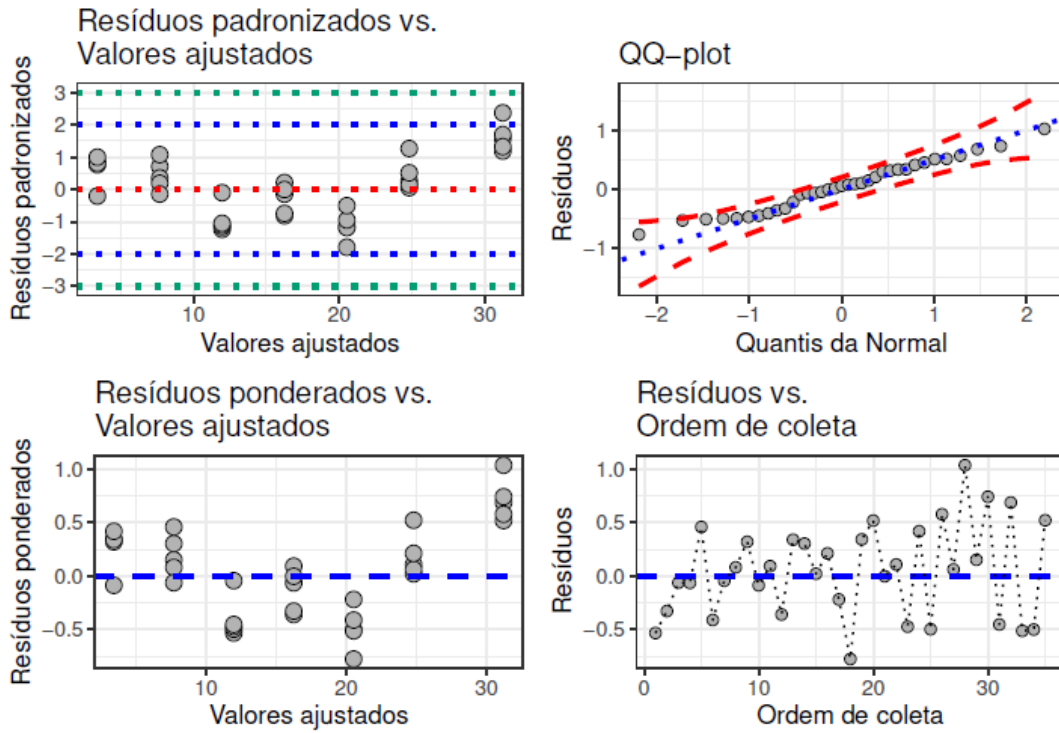


Figura 51. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Ródio (Rh).

➤ **Elemento: Rutênio (Ru)**

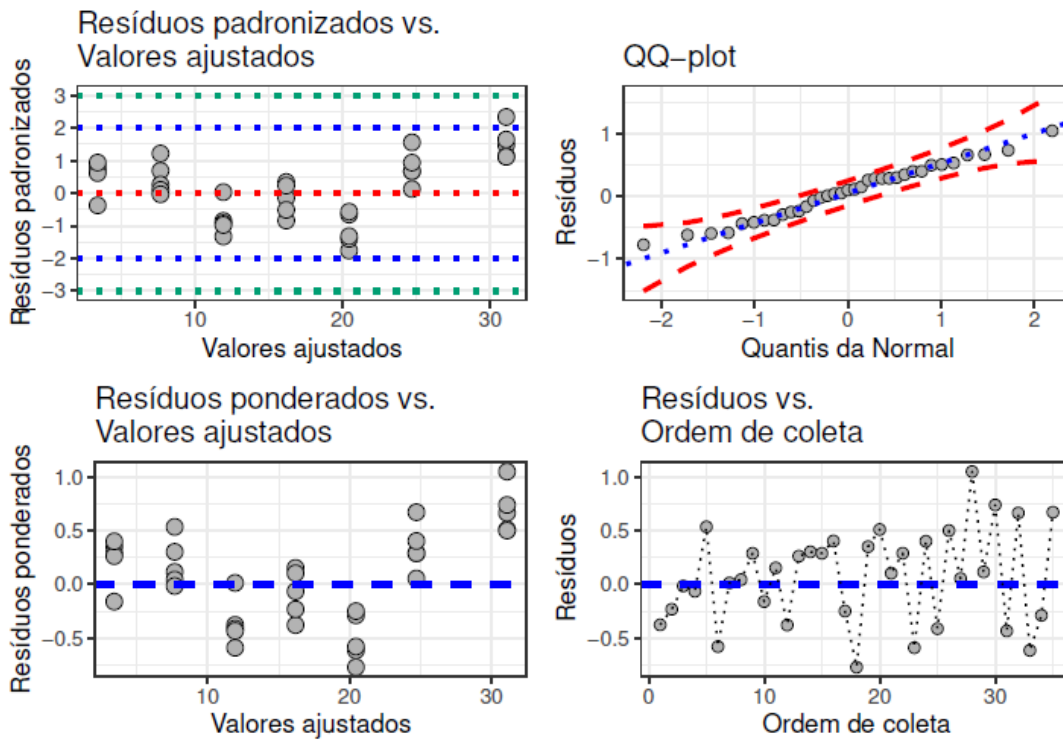


Figura 52. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Rutênio (Ru).

➤ **Elemento: Antimônio (Sb)**

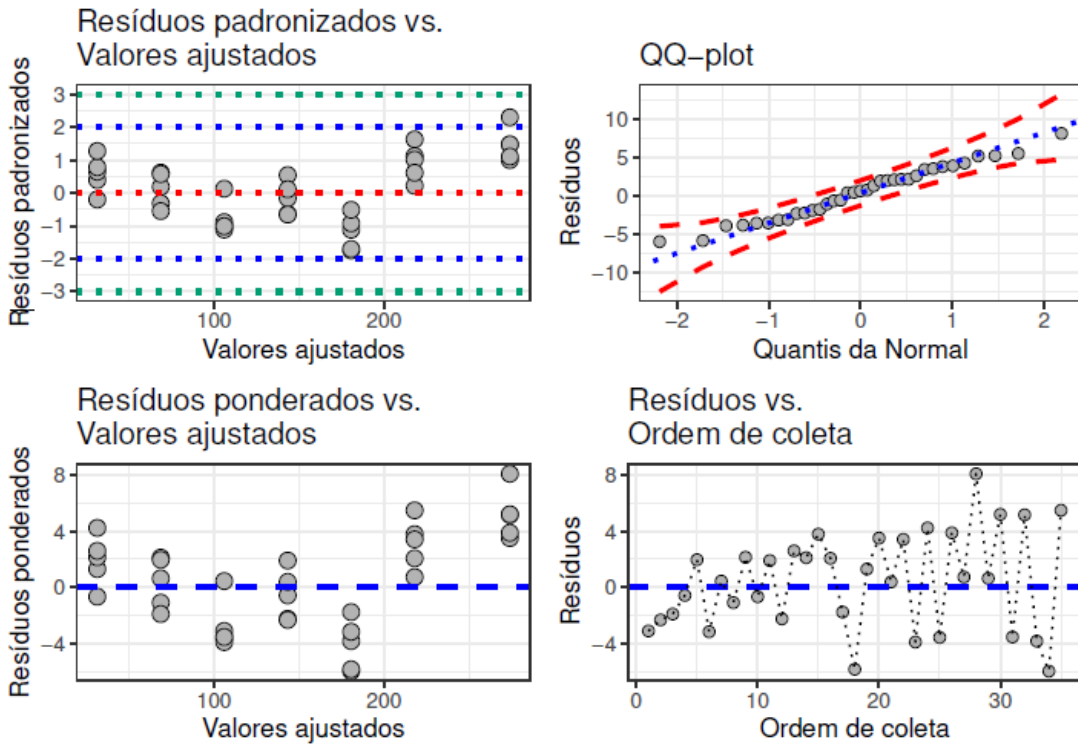


Figura 53. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Antimônio (Sb).

➤ **Elemento: Selênio (Se)**

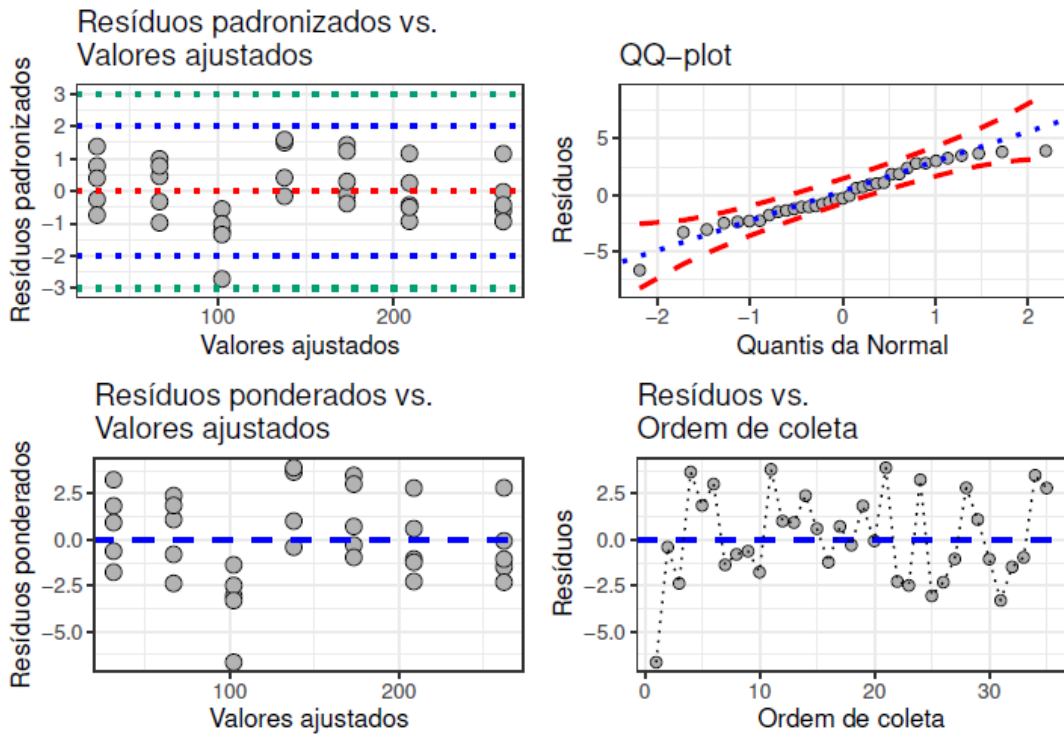


Figura 54. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Selênio (Se).

➤ **Elemento: Estanho (Sn)**

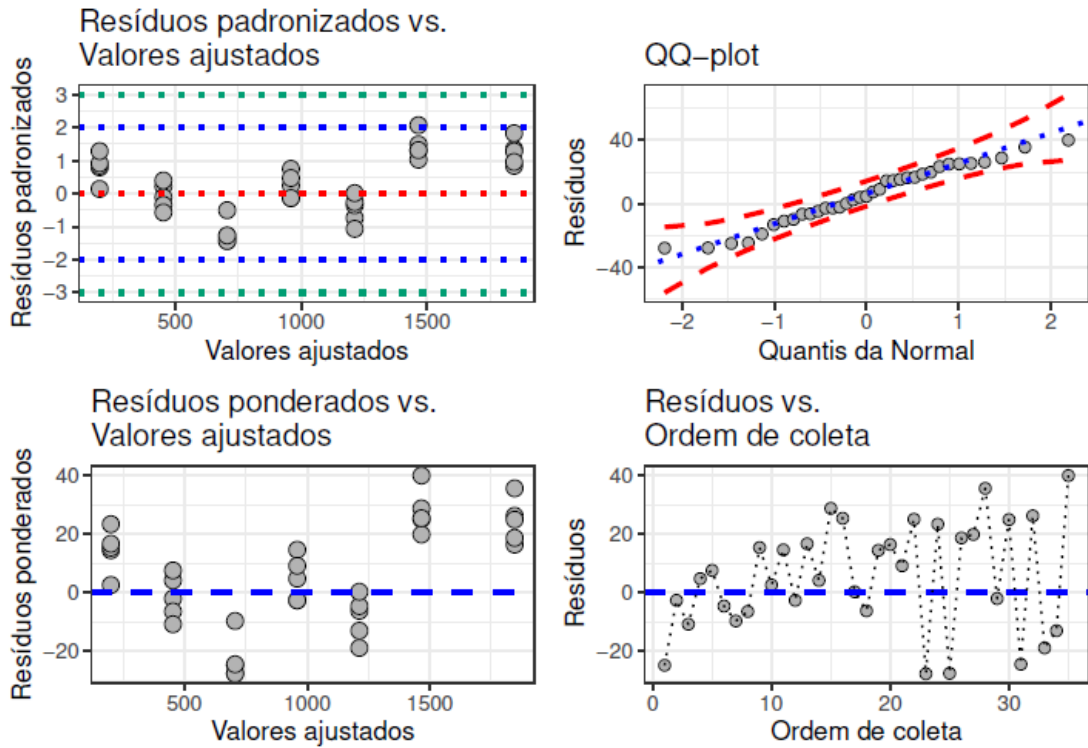


Figura 55. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Estanho (Sn).

➤ **Elemento: Tálcio (Tl)**

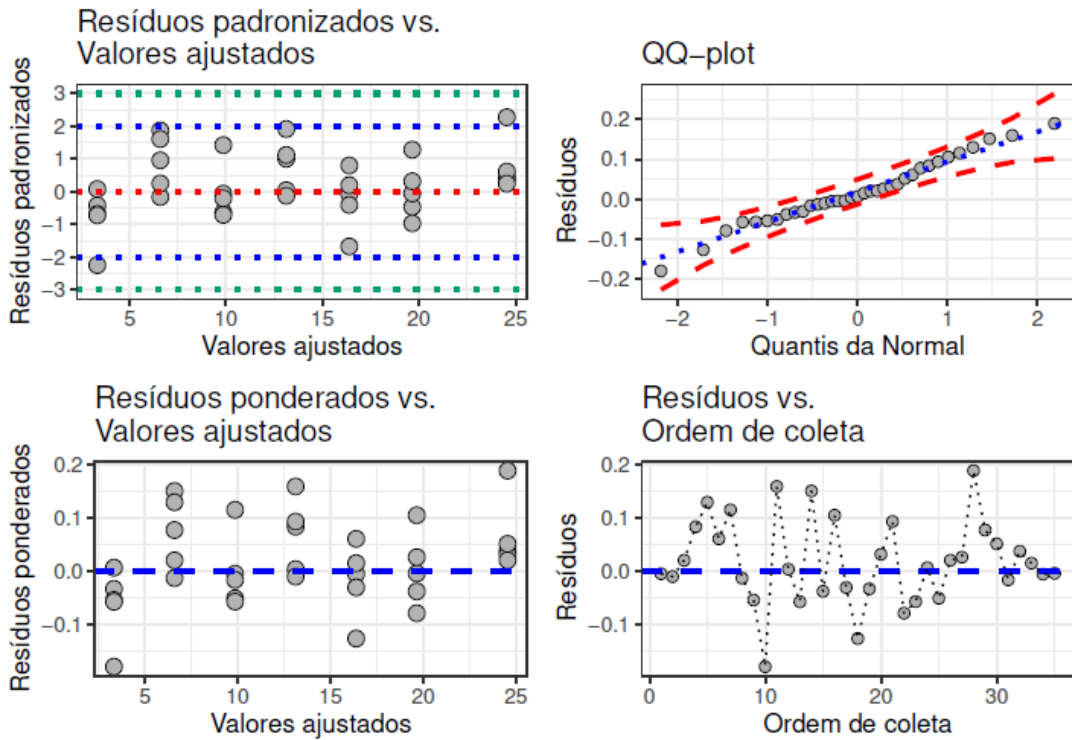


Figura 56. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Tálcio (Tl).

➤ **Elemento: Vanádio (V)**

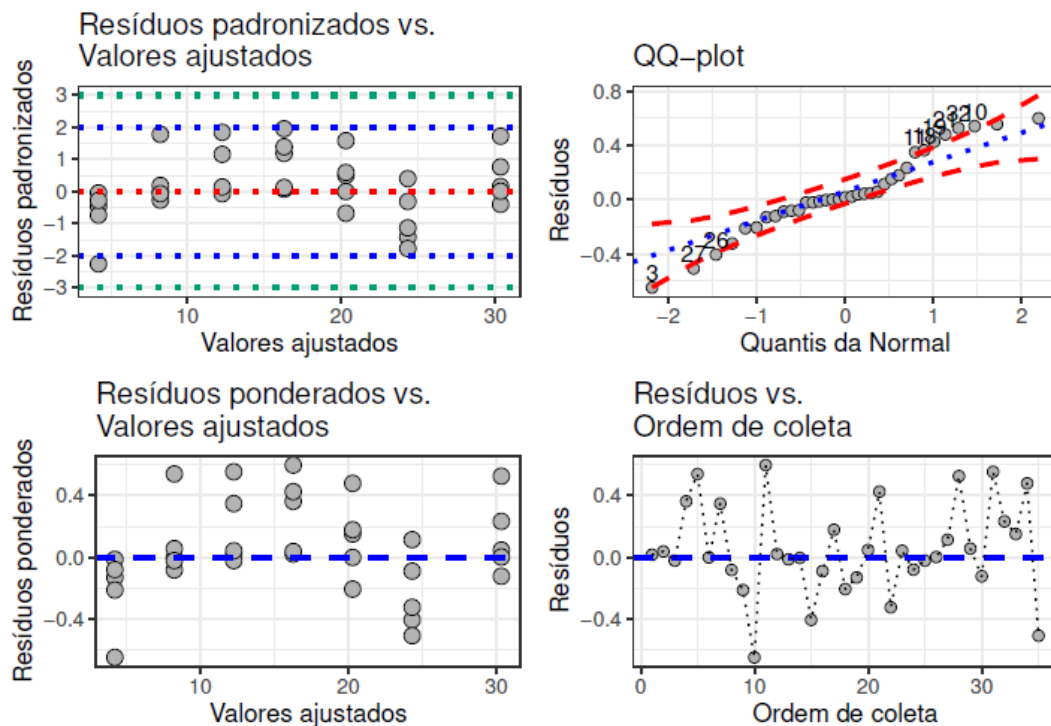


Figura 57. Gráficos dos resíduos do modelo para o elemento Vanádio (V).

Os resultados da linearidade para todos os elementos são resumidos na tabela abaixo:

Tabela 12. Resumo dos resultados de linearidade.

| Teste | Conclusão | |
|---|--|---|
| Elementos | Ag (R = 0,9988); As (R = 0,9995); Au (R = 0,9947); Ba (R = 0,9992); Cd (R = 0,9991); Co (R = 0,9992); Cu (R = 0,9989); Li (R = 0,9994); Ni (R = 0,9987); Pb (R = 0,9987); Pd (R = 0,9989); Pt (R = 0,9996); Rh (R = 0,9986); Ru (R = 0,9984); Sb (R = 0,9987); Se (R = 0,9991); Sn (R = 0,9989); Tl (R = 0,9998) | Cr (R = 0,9995); Hg (R = 0,9993); Ir (R = 0,9995); Mo (R = 0,9996); Os (R = 0,9998); V (R = 0,9993) |
| Teste do intercepto | Intercepto é estatisticamente diferente de zero | Intercepto igual a zero |
| Teste F da ANOVA | Coeficiente angular é estatisticamente diferente de zero | |
| Teste de normalidade dos resíduos | Não se rejeitou a hipótese de normalidade dos resíduos | |
| Teste de homocedasticidade | Não se rejeitou a homoscedasticidade da variância | |
| Valores extremos na resposta | Não foram detectados pontos extremos | |
| Teste de independência das observações | Não foi detectada dependência das observações | |

Avaliando os resultados descritos na Tabela acima os coeficientes de correlação (R) de todos os elementos avaliados apresentaram valores de $R \geq 0,99$, indicando excelente ajuste linear entre concentração e resposta instrumental. Isso confirma que o método é capaz de quantificar os analitos de forma proporcional dentro da faixa estudada.

Para os elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cu, Li, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl, o intercepto foi estatisticamente diferente de zero, enquanto para os demais foi igual a zero. Esse comportamento é esperado em sistemas analíticos reais, pois pode refletir ruído de fundo ou resposta residual da matriz. Importante destacar que, mesmo com intercepto distinto de zero, a linearidade foi validada positivamente, já que os demais parâmetros (precisão, exatidão e correlação) se mantiveram dentro dos critérios de aceitação.

Com o resultado do Teste F da ANOVA, obteve-se o coeficiente angular estatisticamente diferente de zero, para todos os elementos, confirmando que existe relação significativa entre concentração e resposta, validando a regressão linear utilizada, assim como não houve rejeição da hipótese de normalidade, indicando que os resíduos da regressão seguem distribuição normal, requisito essencial para a validade dos testes estatísticos aplicados.

A homogeneidade da variância foi confirmada, demonstrando que os erros se distribuem de forma uniforme ao longo da faixa de concentração, sem tendência sistemática.

Não foram identificados pontos extremos (outliers), o que reforça a consistência dos dados experimentais e nem dependência entre as observações, garantindo que cada medida seja estatisticamente independente, condição necessária para a validade dos modelos de regressão.

Conclui-se que os resultados da linearidade demonstram que o método apresenta robustez e é estatisticamente validada para todos os elementos avaliados. A presença de intercepto diferente de zero em alguns casos não compromete a confiabilidade do modelo, pois os critérios de correlação, normalidade, homocedasticidade e ausência de valores extremos foram atendidos. Dessa forma, o método é considerado adequado para quantificação de traços em diferentes matrizes, atendendo às exigências de validação analítica segundo guias internacionais como o ICH Q2 (R2) e capítulos da USP.

3.7.3. Exatidão

De acordo com o capítulo da USP <730>, o parâmetro de validação exatidão é definido como a capacidade de um método analítico em fornecer resultados que estejam em estreita concordância com o valor verdadeiro ou aceito como referência. Em outras palavras, a exatidão avalia o quanto o método é capaz de medir corretamente a concentração do analito, sem apresentar viés sistemático que comprometa a confiabilidade dos resultados.

A verificação da exatidão, segundo a USP, deve ser realizada por meio da análise de amostras preparadas com concentrações conhecidas do analito, geralmente obtidas a partir de padrões de referência certificados ou soluções de concentração previamente estabelecida. Os

resultados obtidos são comparados com os valores teóricos e expressos em termos de percentual de recuperação ou erro relativo.

A norma recomenda que a exatidão seja avaliada em múltiplos níveis de concentração, abrangendo toda a faixa de aplicação do método, incluindo valores próximos ao limite inferior e superior da curva de calibração. Cada nível deve ser analisado em replicata, de modo a garantir robustez estatística e confiabilidade dos dados.

O preparo das soluções ácido nítrico 5 e 6% (v/v), solução PI, SPI-1 e SPI-2, e a diluição da curva de calibração dos elementos segue conforme descrito no item 3.6.3.

As soluções amostra para a exatidão seguiu o mesmo preparo das amostras descritas nas Tabelas 9 e 10.

O preparo foi realizado em triplicata de cada nível fortificado (0,2J, 1,0J, 1,5J), e o ensaio realizado com uma leitura do branco, da curva de calibração, da solução padrão check e uma vez cada solução amostra de cada nível totalizando nove determinações, finalizando com uma nova leitura da solução padrão check. A análise foi conduzida distintamente para as duas curvas desenvolvidas e suas **devidas amostras contaminadas**.

A exatidão foi avaliada de acordo com a recuperação das fortificações feitas na amostra a 0,2J, 1,0J e 1,5J da especificação, sendo satisfatórias quando dentro da faixa de 70 – 150% para cada replicata das fortificações com DPR (%) 5,0%. Além disso, os dados obtidos permitiram validar simultaneamente o parâmetro de especificidade, demonstrando que o método é capaz de quantificar o analito de forma inequívoca mesmo na presença de potenciais interferentes da matriz, como citado no item 3.6.8.1.

3.7.3.1. Resultados da exatidão

A exatidão do método analítico foi definida como grau de concordância entre os resultados individuais, obtidos pelo método em estudo, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro.

Os resultados da exatidão são apresentados na tabela abaixo:

Tabela 13. Resumo dos resultados de Exatidão.

| Elemento | Níveis | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|-------|------|---------|
| Ag | 20 | 99,73 | 0,87 | 0,87 |
| | 100 | 99,37 | 0,30 | 0,30 |
| | 150 | 99,30 | 0,78 | 0,79 |
| As | 20 | 94,30 | 2,55 | 2,71 |
| | 100 | 97,73 | 1,20 | 1,23 |
| | 150 | 97,74 | 2,59 | 2,65 |
| Au | 20 | 81,95 | 1,70 | 2,07 |
| | 100 | 89,57 | 3,20 | 3,57 |
| | 150 | 99,28 | 3,52 | 3,55 |

Tabela 13. Continuação...

| Elemento | Níveis | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|--------|------|---------|
| Ba | 20 | 98,98 | 0,72 | 0,72 |
| | 100 | 105,36 | 1,02 | 0,97 |
| | 150 | 107,91 | 1,00 | 0,92 |
| Cd | 20 | 95,50 | 1,86 | 1,94 |
| | 100 | 102,79 | 1,84 | 1,79 |
| | 150 | 106,74 | 1,25 | 1,17 |
| Co | 20 | 95,42 | 2,42 | 2,54 |
| | 100 | 93,55 | 1,12 | 1,20 |
| | 150 | 92,42 | 2,16 | 2,34 |
| Cr | 20 | 98,67 | 1,32 | 1,34 |
| | 100 | 98,13 | 1,09 | 1,11 |
| | 150 | 96,65 | 2,49 | 2,58 |
| Cu | 20 | 88,76 | 1,46 | 1,64 |
| | 100 | 91,85 | 0,95 | 1,03 |
| | 150 | 90,30 | 1,79 | 1,98 |
| Hg | 20 | 88,19 | 0,77 | 0,88 |
| | 100 | 94,97 | 3,16 | 3,33 |
| | 150 | 96,58 | 3,92 | 4,06 |
| Ir | 20 | 96,38 | 2,46 | 2,56 |
| | 100 | 97,06 | 1,30 | 1,34 |
| | 150 | 99,08 | 2,17 | 2,19 |
| Li | 20 | 77,72 | 3,03 | 3,90 |
| | 100 | 79,42 | 1,19 | 1,50 |
| | 150 | 80,27 | 1,99 | 2,48 |
| Mo | 20 | 97,69 | 1,49 | 1,52 |
| | 100 | 97,72 | 1,66 | 1,70 |
| | 150 | 97,02 | 1,48 | 1,53 |
| Ni | 20 | 92,60 | 4,41 | 4,85 |
| | 100 | 90,78 | 0,91 | 1,00 |
| | 150 | 90,49 | 2,99 | 3,31 |
| Os | 20 | 99,44 | 2,68 | 2,69 |
| | 100 | 100,59 | 1,06 | 1,05 |
| | 150 | 102,73 | 2,08 | 2,03 |
| Pb | 20 | 82,03 | 1,21 | 1,47 |
| | 100 | 101,65 | 2,42 | 2,38 |
| | 150 | 101,18 | 3,22 | 3,19 |
| Pd | 20 | 71,65 | 1,17 | 1,64 |
| | 100 | 82,03 | 1,23 | 1,50 |
| | 150 | 85,51 | 2,00 | 2,34 |
| Pt | 20 | 95,14 | 2,59 | 2,73 |
| | 100 | 95,40 | 0,69 | 0,73 |
| | 150 | 97,33 | 1,73 | 1,78 |
| Rh | 20 | 83,70 | 2,44 | 2,92 |
| | 100 | 90,29 | 0,84 | 0,93 |
| | 150 | 94,43 | 1,30 | 1,38 |
| Ru | 20 | 85,38 | 1,77 | 2,07 |
| | 100 | 91,66 | 1,43 | 1,55 |
| | 150 | 97,00 | 1,00 | 1,03 |
| Sb | 20 | 95,99 | 0,62 | 0,64 |
| | 100 | 105,02 | 1,47 | 1,40 |
| | 150 | 108,56 | 1,59 | 1,46 |
| Se | 20 | 103,38 | 4,24 | 4,10 |
| | 100 | 103,65 | 2,19 | 2,11 |
| | 150 | 105,03 | 1,92 | 1,83 |
| Sn | 20 | 93,83 | 0,47 | 0,51 |
| | 100 | 104,30 | 0,91 | 0,87 |
| | 150 | 108,16 | 1,38 | 1,28 |
| Tl | 20 | 97,94 | 0,93 | 0,95 |
| | 100 | 99,26 | 1,13 | 1,13 |
| | 150 | 100,38 | 1,83 | 1,82 |
| V | 20 | 97,72 | 0,34 | 0,34 |
| | 100 | 98,31 | 1,56 | 1,59 |
| | 150 | 98,64 | 1,82 | 1,85 |

A tabela acima reúne os resultados de exatidão obtidos para diferentes impurezas elementares avaliadas em três níveis de concentração (20%, 100% e 150% da especificação).

Para todos os elementos e níveis avaliados, os valores de recuperação encontram-se dentro da faixa de aceitação de 70–150%, conforme estipulado pela USP <730>. Isso demonstra que o método é capaz de quantificar as impurezas elementares com confiabilidade em diferentes concentrações.

Os desvios padrão e coeficientes de variação observados são baixos, em geral inferiores a 5%, indicando boa precisão dos resultados. Essa consistência reforça a robustez do método e a ausência de variabilidade significativa entre replicatas.

Mesmo para elementos que apresentaram valores médios mais próximos ao limite inferior da faixa (ex.: Pd, Li, Pb, Ru), os resultados ainda se mantêm dentro dos critérios de aceitação, confirmando que o método é adequado para a determinação de todos os analitos avaliados.

Os resultados demonstram que todas as impurezas elementares foram validadas pela exatidão, uma vez que os valores de recuperação estão em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela USP <730> (70–150%). Além disso, os baixos desvios padrão e coeficientes de variação confirmam a precisão e confiabilidade do método analítico, assegurando sua aplicabilidade para o controle de qualidade em diferentes matrizes farmacêuticas.

Em síntese, a análise comprova que o método atende plenamente às exigências regulatórias, validando a quantificação de todas as impurezas elementares com desempenho estatisticamente satisfatório.

3.7.4. Precisão

Conforme o capítulo USP <730>, o parâmetro de validação precisão é definido como o grau de concordância entre resultados obtidos em análises repetidas de uma mesma amostra, sob condições estabelecidas. Esse parâmetro avalia a reprodutibilidade do método, ou seja, sua capacidade de gerar resultados consistentes e próximos entre si, sem considerar necessariamente a proximidade em relação ao valor verdadeiro (que é avaliado pela exatidão).

A USP estabelece que a precisão deve ser verificada em diferentes níveis:

- Repetibilidade: avaliada em condições de curto prazo, utilizando o mesmo analista, o mesmo equipamento e o mesmo laboratório, em um intervalo reduzido de tempo. Mede a variabilidade intra-ensaio.

- Precisão intermediária: considera variações dentro de um mesmo laboratório, como diferentes dias de análise, diferentes analistas ou diferentes equipamentos. Avalia a robustez do método frente a pequenas mudanças operacionais.

O preparo das soluções ácido nítrico 5 e 6% (v/v), solução PI, SPI-1 e SPI-2, e a diluição da curva de calibração dos elementos segue conforme descrito no item 3.6.3.

Os ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária foram conduzidos utilizando amostras preparadas na concentração correspondente ao ponto baixo da curva de calibração (LQ equivalente ao 0,2J, n = 6), médio (especificação equivalente ao 1,0J, n = 6), preparadas conforme Tabelas 9 e 10, em dias diferentes por analistas distintos. Para as análises, realizou-se uma leitura do branco, da curva de calibração, solução padrão check e uma vez de cada solução amostra (0,2J e 1,0J), total doze leituras, finalizando com uma leitura da solução padrão check.

A avaliação da repetibilidade foi conduzida por meio da análise de seis replicatas da amostra fortificada, preparadas na concentração de 1,0J, apresentando $DP \leq 5,0\%$ e $DPR \leq 20\%$, em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos. Já a precisão intermediária foi avaliada a partir de 12 resultados ($N = 12$), obtidos em condições distintas de execução, contemplando variação de dias de análise e de analistas responsáveis pelo preparo e leitura das amostras. Os valores calculados apresentaram $DP \leq 8,0\%$ e $DPR \leq 25\%$, confirmando a robustez e a consistência do método frente a variações operacionais controladas.

3.7.4.1. Resultados da Repetibilidade

A repetibilidade avaliou a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados calculando-se o DP e o DPR da série de medições.

A determinação da repetibilidade obedeceu aos seguintes critérios:

- Avaliou-se as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica.
- Utilizou-se 6 (seis) réplicas a 20% (0,2J) e 100% (1,0J) da concentração do teste individualmente preparadas.

Tabela 14. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 0,2J.

| Elemento | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|------|---------|
| Ag | 79,09 | 1,83 | 2,31 |
| As | 94,37 | 3,00 | 3,18 |
| Au | 82,91 | 1,57 | 1,90 |
| Ba | 98,85 | 1,32 | 1,33 |
| Cd | 95,35 | 2,07 | 2,17 |
| Co | 94,15 | 2,19 | 2,32 |
| Cr | 98,48 | 0,91 | 0,93 |
| Cu | 88,25 | 1,72 | 1,94 |
| Hg | 89,51 | 2,34 | 2,62 |
| Ir | 95,53 | 1,97 | 2,06 |
| Li | 75,89 | 2,82 | 3,71 |
| Mo | 97,08 | 1,60 | 1,65 |
| Ni | 90,46 | 4,30 | 4,76 |
| Os | 98,94 | 1,94 | 1,96 |
| Pb | 82,47 | 4,57 | 5,54 |
| Pd | 72,02 | 2,17 | 3,01 |
| Pt | 93,75 | 2,34 | 2,49 |
| Rh | 83,07 | 2,06 | 2,49 |
| Ru | 84,78 | 1,79 | 2,11 |
| Sb | 95,43 | 1,59 | 1,66 |
| Se | 102,35 | 3,51 | 3,43 |
| Sn | 93,77 | 1,21 | 1,29 |
| Tl | 97,48 | 0,84 | 0,86 |
| V | 97,38 | 1,11 | 1,14 |

Tabela 15. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 1,0J.

| Elemento | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|------|---------|
| Ag | 89,46 | 4,35 | 4,87 |
| As | 100,11 | 4,07 | 4,07 |
| Au | 93,36 | 4,12 | 6,56 |
| Ba | 106,59 | 4,50 | 5,16 |
| Cd | 104,16 | 4,36 | 5,15 |
| Co | 95,22 | 4,33 | 4,55 |
| Cr | 98,91 | 4,79 | 4,84 |
| Cu | 92,74 | 3,22 | 3,47 |
| Hg | 98,77 | 4,70 | 6,78 |
| Ir | 99,60 | 4,70 | 4,72 |
| Li | 79,76 | 3,48 | 4,36 |
| Mo | 98,74 | 4,64 | 4,70 |
| Ni | 92,32 | 3,83 | 4,15 |
| Os | 102,78 | 4,40 | 4,28 |
| Pb | 101,13 | 2,20 | 2,18 |
| Pd | 82,25 | 3,88 | 4,71 |
| Pt | 97,48 | 4,50 | 4,61 |
| Rh | 91,87 | 4,64 | 5,05 |
| Ru | 93,65 | 4,11 | 5,46 |
| Sb | 106,34 | 4,70 | 5,36 |
| Se | 105,93 | 4,43 | 5,13 |
| Sn | 105,54 | 4,46 | 5,18 |
| Tl | 101,65 | 4,92 | 4,84 |
| V | 100,34 | 4,81 | 4,79 |

As tabelas apresentadas acima reúnem os resultados da análise de repetibilidade para os elementos controlados pelo guia ICH Q3D, considerando os níveis de 20% (0,2J) e 100% (1,0J) da especificação. Os parâmetros avaliados foram o DP absoluto e o DPR, que permitem verificar a precisão do método analítico.

Primeiramente, todos os elementos apresentaram valores dentro da faixa de aceitação estipulada pelo ICH Q3D e pela USP <730> (70–150%), confirmando que o método é capaz de quantificar adequadamente as impurezas elementares em diferentes níveis da faixa de trabalho.

Os valores de DP foram baixos para todos os elementos, indicando baixa dispersão dos resultados e reforçando a consistência das medições e a maioria dos elementos apresentou DPR inferior a 5,0%, o que é considerado satisfatório para estudos de repetibilidade. Alguns elementos próximos ao limite inferior da faixa de aceitação (Pd = 72,0%; Li = 75,9%; Ag = 79,0%; Pb = 82,4%), no entanto, permanecem conformes com os critérios da USP <730>, validando a aplicabilidade do método para esses analitos.

Os resultados das tabelas demonstram que o método analítico apresenta repetibilidade adequada para todos os elementos avaliados, atendendo aos critérios de precisão e exatidão estabelecidos pelo ICH Q3D e pela USP <730>. As médias de recuperação estão dentro da faixa de aceitação, os desvios padrão são baixos e os coeficientes de variação confirmam a consistência dos resultados.

3.7.4.2. Resultados da Precisão intermediária

A precisão intermediária avaliou a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados calculando-se o DP e o DPR da série de medições.

A determinação da precisão intermediária obedeceu aos seguintes critérios:

- Expressou a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos.
- Contemplou as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

Tabela 16. Resumo dos resultados de Precisão intermediária no nível 0,2J.

| Elemento | DP | DPR (%) |
|----------|------|---------|
| Ag | 3,62 | 4,45 |
| As | 5,71 | 5,83 |
| Au | 4,83 | 5,61 |
| Ba | 5,07 | 5,31 |
| Cd | 2,98 | 3,18 |
| Co | 2,76 | 2,91 |
| Cr | 3,43 | 3,42 |

Tabela 16. Continuação...

| Elemento | DP | DPR (%) |
|----------|------|---------|
| Cu | 2,53 | 2,82 |
| Hg | 7,67 | 8,11 |
| Ir | 4,27 | 4,37 |
| Li | 3,97 | 5,21 |
| Mo | 2,47 | 2,56 |
| Ni | 7,38 | 9,73 |
| Os | 2,95 | 2,94 |
| Pb | 4,45 | 5,41 |
| Pd | 5,16 | 6,88 |
| Pt | 3,93 | 4,10 |
| Rh | 3,01 | 3,56 |
| Ru | 3,34 | 3,86 |
| Sb | 2,26 | 2,39 |
| Se | 2,81 | 2,73 |
| Sn | 3,88 | 4,25 |
| Tl | 3,21 | 3,24 |
| V | 2,01 | 2,05 |

Tabela 17. Resumo dos resultados de Precisão intermediária no nível 1,0J.

| Elemento | DP | DPR (%) |
|----------|------|---------|
| Ag | 4,16 | 4,56 |
| As | 3,07 | 3,05 |
| Au | 7,22 | 8,43 |
| Ba | 4,36 | 4,11 |
| Cd | 4,38 | 4,27 |
| Co | 3,68 | 3,84 |
| Cr | 3,93 | 3,97 |
| Cu | 2,73 | 2,90 |
| Hg | 5,46 | 5,41 |
| Ir | 3,66 | 3,64 |
| Li | 3,19 | 3,94 |
| Mo | 3,87 | 3,87 |
| Ni | 3,75 | 4,00 |
| Os | 3,43 | 3,32 |
| Pb | 7,08 | 9,43 |
| Pd | 4,92 | 5,82 |
| Pt | 4,02 | 4,05 |
| Rh | 4,27 | 4,56 |
| Ru | 4,68 | 4,90 |
| Sb | 4,67 | 4,46 |
| Se | 4,41 | 4,18 |
| Sn | 4,31 | 4,12 |
| Tl | 3,76 | 3,70 |
| V | 4,10 | 4,08 |

As tabelas acima reúnem os resultados da precisão intermediária para os elementos controlados pelo guia ICH Q3D, considerando os níveis de 20% (0,2J) e 100% (1,0J) da especificação. Foram avaliados os parâmetros de DP absoluto e DPR, que permitem verificar a reprodutibilidade do método em condições distintas (diferentes dias, analistas ou equipamentos).

Os valores de DP variaram entre aproximadamente 2,0 e 7,7, indicando uma dispersão relativamente baixa em relação às médias de recuperação. Isso demonstra que o método apresenta boa consistência, mesmo em condições de variação operacional.

A maioria dos elementos apresentou DPR inferior a 6%, o que é considerado satisfatório para estudos de precisão intermediária.

Os resultados demonstram que o método analítico apresenta precisão intermediária adequada para todos os elementos avaliados, atendendo aos critérios de aceitação do ICH Q3D e da USP <730>. Apesar de alguns elementos apresentarem DPR mais elevados, todos permanecem dentro de limites aceitáveis, comprovando que o método é reprodutível, robusto e confiável em diferentes condições de execução.

Assim, conclui-se que o método está validado quanto à precisão intermediária para todos os elementos controlados, garantindo segurança e consistência na determinação de impurezas elementares.

3.7.5. Limite de quantificação

No capítulo <730> da USP, o LQ é estabelecido como a menor concentração de analito que pode ser determinada de forma confiável, atendendo aos critérios de precisão e exatidão definidos para o método analítico. Diferentemente do LD, que apenas confirma a presença do analito, o LQ assegura sua quantificação com validade estatística e reprodutibilidade, sendo, portanto, um parâmetro crítico para a robustez e aplicabilidade do método.

O capítulo admite como aceitável um LQ correspondente a 50% do valor da especificação. Contudo, para fins de isenção do controle rotineiro de impurezas elementares, o método foi desenvolvido com um LQ mais restritivo, equivalente a 20% da especificação (0,2J). **Essa escolha fundamenta-se nas diretrizes do ICH Q3D, que permitem a dispensa do monitoramento de impurezas elementares quando a concentração do analito se encontra abaixo de 30% do limite estabelecido.** Dessa forma, o desenvolvimento metodológico priorizou a obtenção de um LQ mais baixo, garantindo não apenas conformidade regulatória, mas também a adequação do método ao objetivo específico de avaliação e controle de impurezas elementares.

O LQ será comprovado através do ensaio de recuperação e precisão no primeiro ponto da curva de calibração para via parenteral ([Ag]= 4,0 µg/L, equivalente a 0,1 µg/g; [As]= 6,0 µg/L, equivalente a 0,15 µg/g; [Au]= 40,0 µg/L, equivalente a 1,0 µg/g; [Ba]= 280,0 µg/L, equivalente a 7,0 µg/g; [Cd]= 0,8 µg/L, equivalente a 0,02 µg/g; [Co]= 2,0 µg/L, equivalente a 0,05 µg/g; [Cr]= 440,0 µg/L, equivalente a 11,0 µg/g; [Cu]= 120,0 µg/L, equivalente a 3,0 µg/g; [Hg]= 1,2 µg/L, equivalente a 0,03 µg/g; [Ir]= 4,0 µg/L, equivalente a 0,1 µg/g; [Li]= 100,0 µg/L, equivalente a 2,5 µg/g; [Mo]= 600,0 µg/L, equivalente a 15,0 µg/g; [Ni]= 8,0 µg/L, equivalente

a 0,2 µg/g; [Os]= 4,0 µg/L, equivalente a 0,1 µg/g; [Pb]= 7,0 µg/L, equivalente a 0,1 µg/g; [Pd]= 4,0 µg/L, equivalente a 0,1 µg/g; [Pt]= 4,0 µg/L, equivalente a 0,1 µg/g; [Rh]= 4,0 µg/L, equivalente a 0,1 µg/g; [Ru]= 4,0 µg/L, equivalente a 0,1 µg/g; [Sb]= 36,0 µg/L, equivalente a 0,9 µg/g; [Se]= 32,0 µg/L, equivalente a 0,8 µg/g; [Sn]= 240,0 µg/L, equivalente a 6,0 µg/g; [TI]= 3,2 µg/L, equivalente a 0,08 µg/g; [V]= 4,0 µg/L, equivalente a 0,1 µg/g).

3.7.5.1. Resultados do limite de quantificação

No presente estudo, os resultados obtidos para o LQ evidenciaram que:

- Os ensaios de precisão apresentaram DPR dentro dos limites de aceitação, confirmando baixa dispersão dos resultados e reprodutibilidade adequada.
- Os ensaios de exatidão demonstraram valores de recuperação dentro da faixa especificada (70–150%), comprovando que o método é capaz de quantificar o analito de forma correta e sem viés significativo, mesmo em concentrações próximas ao limite inferior da faixa analítica.

Esses dados confirmam que, no nível correspondente ao limite de quantificação, o método mantém desempenho estatisticamente satisfatório, atendendo aos critérios de robustez, confiabilidade e aplicabilidade regulatória.

3.7.6. Robustez

Citando o capítulo <730> da USP, a robustez é um parâmetro de validação que avalia a capacidade de um método analítico em manter seu desempenho confiável diante de pequenas variações deliberadas nos parâmetros operacionais. Em outras palavras, trata-se de verificar se o método continua adequado ao uso pretendido mesmo quando condições experimentais sofrem alterações mínimas, mas plausíveis, durante a rotina analítica.

A robustez é avaliada por meio da introdução de variações deliberadas e controladas em fatores críticos do método analítico, com o objetivo de verificar sua capacidade de manter desempenho consistente sob diferentes condições experimentais. Neste estudo, a robustez foi investigada especificamente quanto à variação da matriz, de modo a assegurar a aplicabilidade do método em diferentes formas farmacêuticas. Foram contempladas suspensão injetável, solução oftálmica e suspensão oftálmica, permitindo demonstrar que o método mantém sua confiabilidade e seletividade mesmo diante de alterações na composição da matriz,

confirmando sua adequação para uso em rotinas analíticas de controle de qualidade em múltiplos cenários farmacêuticos.

O preparo das soluções ácido nítrico 5 e 6% (v/v), solução PI, SPI-1 e SPI-2, e a diluição da curva de calibração dos elementos segue conforme descrito no item 3.6.3.

As soluções amostra com as diferentes matrizes foram preparadas conforme o preparo das amostras descritas nas tabelas 9 e 10.

O ensaio foi realizado e avaliado conforme repetibilidade e exatidão para todos, assim os critérios de avaliação permanecem alinhados com as recomendações do ICH Q2(R2), permitindo justificar tecnicamente que o método desenvolvido é consistente, confiável e aplicável a múltiplas matrizes farmacêuticas.

3.7.6.1. Resultados da robustez

Neste estudo, a robustez foi investigada em diferentes matrizes farmacêuticas assegurando que o método se mantenha adequado para aplicações em distintas formas farmacêuticas de relevância clínica. Sendo elas:

- Suspensão injetável: Caracterizada por uma formulação parenteral na qual o princípio ativo encontra-se disperso em meio líquido, geralmente aquoso, estabilizado por agentes suspensores e tensoativos. Essa matriz apresenta elevada complexidade analítica devido à presença de partículas sólidas em suspensão, que podem influenciar a homogeneidade da amostra, a estabilidade físico-química e a interação com excipientes;
- Solução oftálmica: Consiste em uma formulação líquida estéril, destinada à administração tópica ocular, na qual o princípio ativo encontra-se completamente solubilizado em veículo aquoso. Essa matriz exige elevada pureza e estabilidade físico-química, além de compatibilidade com o pH lacrimal e tonicidade adequada para evitar irritação ocular. Frequentemente incorpora agentes tamponantes, estabilizantes e conservantes, quando aplicável, para assegurar a integridade da formulação durante o armazenamento e uso;
- Suspensão oftálmica: Corresponde a uma formulação líquida estéril destinada à administração ocular, na qual o princípio ativo encontra-se disperso em partículas sólidas finamente micronizadas em um veículo aquoso. Essa forma farmacêutica requer agentes suspensores e estabilizantes para manter a uniformidade da dispersão, além de ajustes de pH e tonicidade compatíveis com o fluido lacrimal, a fim de garantir tolerabilidade e eficácia terapêutica.

A avaliação foi conduzida segundo as diretrizes estabelecidas pelo ICH Q2(R2), com foco nos parâmetros de exatidão e repetibilidade, considerados essenciais para garantir a confiabilidade e a consistência dos resultados analíticos. A análise sistemática desses parâmetros possibilita verificar se o método permanece válido mesmo diante de variações controladas, assegurando que os resultados obtidos sejam representativos e reproduzíveis.

Durante a execução dos testes foi identificado um erro sistemático associado ao elemento chumbo (Pb), presente em todas as matrizes avaliadas, e ao elemento ouro (Au), observado exclusivamente na matriz de suspensão oftálmica. **Para a correção desses desvios, procedeu-se ao cálculo de um fator multiplicativo de ajuste, cujos valores determinados foram respectivamente 1,78 e 1,99.** A aplicação desses fatores assegura a compensação adequada dos erros observados, garantindo maior precisão nos resultados analíticos e a conformidade estatística do método.

Adicionalmente, a caracterização físico-química das suspensões demonstrou que o diâmetro das partículas (D99) apresentou valor $\leq 20 \mu\text{m}$, estando em conformidade com o limite operacional do nebulizador utilizado, que suporta até $40 \mu\text{m}$. Essa relação confirma que as suspensões encontram-se dentro da faixa adequada para o processo, assegurando a compatibilidade entre as propriedades da formulação e a capacidade do equipamento.

No que se refere à concentração de STD (%), o limite permitido para o processo de nebulização é de até 15%. As amostras das matrizes analisadas apresentaram valores inferiores a 8%, permanecendo significativamente abaixo do limite máximo especificado.

Dessa forma, o teste de robustez aplicado às três matrizes estudadas fornece evidências da consistência metodológica e da conformidade regulatória, reforçando a aplicabilidade do método para o controle de qualidade e para o atendimento às exigências normativas internacionais.

3.7.6.1.1. Suspensão injetável

Tabela 18. Resumo dos resultados de Exatidão para Suspensão injetável.

| Elemento | Níveis | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|--------|------|---------|
| Ag | 20 | 93,65 | 0,35 | 0,37 |
| | 100 | 93,65 | 0,35 | 0,37 |
| | 150 | 98,79 | 0,66 | 0,67 |
| As | 20 | 102,90 | 1,45 | 1,41 |
| | 100 | 101,91 | 2,17 | 2,13 |
| | 150 | 104,29 | 1,95 | 1,87 |
| Au | 20 | 75,48 | 3,53 | 4,67 |
| | 100 | 97,85 | 3,23 | 3,30 |
| | 150 | 102,33 | 0,99 | 0,97 |

Tabela 18. Continuação...

| Elemento | Níveis | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|--------|------|---------|
| Ba | 20 | 101,30 | 0,90 | 0,89 |
| | 100 | 104,29 | 0,60 | 0,57 |
| | 150 | 107,74 | 0,83 | 0,77 |
| Cd | 20 | 96,92 | 2,28 | 2,35 |
| | 100 | 101,41 | 0,38 | 0,37 |
| | 150 | 105,41 | 0,90 | 0,85 |
| Co | 20 | 96,00 | 3,44 | 3,58 |
| | 100 | 92,92 | 1,41 | 1,52 |
| | 150 | 93,65 | 0,62 | 0,66 |
| Cr | 20 | 101,18 | 1,29 | 1,27 |
| | 100 | 95,17 | 1,49 | 1,57 |
| | 150 | 97,32 | 0,62 | 0,64 |
| Cu | 20 | 92,83 | 0,72 | 0,77 |
| | 100 | 96,02 | 1,99 | 2,07 |
| | 150 | 96,15 | 0,83 | 0,87 |
| Hg | 20 | 91,39 | 3,02 | 3,31 |
| | 100 | 98,31 | 2,13 | 2,17 |
| | 150 | 98,23 | 0,88 | 0,90 |
| Ir | 20 | 101,17 | 0,98 | 0,97 |
| | 100 | 99,90 | 0,41 | 0,41 |
| | 150 | 101,37 | 0,74 | 0,73 |
| Li | 20 | 88,57 | 1,74 | 1,96 |
| | 100 | 88,22 | 1,39 | 1,57 |
| | 150 | 90,83 | 0,61 | 0,67 |
| Mo | 20 | 102,81 | 0,71 | 0,69 |
| | 100 | 98,12 | 0,62 | 0,63 |
| | 150 | 99,58 | 0,78 | 0,78 |
| Ni | 20 | 91,91 | 2,34 | 2,55 |
| | 100 | 91,19 | 1,14 | 1,25 |
| | 150 | 92,73 | 0,81 | 0,87 |
| Os | 20 | 105,58 | 1,63 | 1,54 |
| | 100 | 104,68 | 0,66 | 0,63 |
| | 150 | 106,11 | 0,35 | 0,33 |
| Pb | 20 | 103,30 | 4,61 | 4,30 |
| | 100 | 90,29 | 3,17 | 3,51 |
| | 150 | 108,73 | 4,56 | 4,03 |
| Pd | 20 | 84,81 | 1,75 | 2,06 |
| | 100 | 94,85 | 1,98 | 2,08 |
| | 150 | 99,79 | 0,44 | 0,44 |
| Pt | 20 | 94,58 | 0,53 | 0,56 |
| | 100 | 96,82 | 0,59 | 0,61 |
| | 150 | 98,03 | 1,12 | 1,14 |
| Rh | 20 | 90,29 | 0,59 | 0,65 |
| | 100 | 94,10 | 0,43 | 0,46 |
| | 150 | 98,07 | 1,21 | 1,23 |
| Ru | 20 | 91,55 | 1,14 | 1,25 |
| | 100 | 95,19 | 0,70 | 0,73 |
| | 150 | 99,94 | 0,43 | 0,43 |
| Sb | 20 | 97,52 | 0,58 | 0,59 |
| | 100 | 103,92 | 0,81 | 0,78 |
| | 150 | 108,03 | 1,29 | 1,19 |
| Se | 20 | 117,84 | 1,93 | 1,64 |
| | 100 | 116,72 | 0,52 | 0,45 |
| | 150 | 118,98 | 0,38 | 0,32 |
| Sn | 20 | 93,33 | 0,40 | 0,43 |
| | 100 | 102,65 | 0,39 | 0,38 |
| | 150 | 106,15 | 0,92 | 0,87 |
| Tl | 20 | 103,03 | 0,79 | 0,77 |
| | 100 | 101,98 | 0,23 | 0,22 |
| | 150 | 102,94 | 0,42 | 0,41 |
| V | 20 | 100,24 | 2,00 | 1,99 |
| | 100 | 98,16 | 1,48 | 1,51 |
| | 150 | 100,59 | 0,51 | 0,51 |

Os resultados demonstram que todas as impurezas elementares foram validadas pela exatidão, uma vez que os valores de recuperação estão em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela USP <730> (70–150%). Os baixos desvios padrão e coeficientes de variação confirmam a precisão e confiabilidade do método analítico, assegurando sua aplicabilidade para o controle de qualidade nas diferentes matrizes.

Tabela 19. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 0,2J para Suspensão injetável.

| Elemento | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|------|---------|
| Ag | 93,89 | 0,66 | 0,70 |
| As | 103,26 | 1,63 | 1,57 |
| Au | 76,88 | 2,77 | 3,60 |
| Ba | 101,13 | 0,61 | 0,60 |
| Cd | 96,58 | 1,86 | 1,93 |
| Co | 95,53 | 2,82 | 2,95 |
| Cr | 100,73 | 1,17 | 1,16 |
| Cu | 92,85 | 0,58 | 0,62 |
| Hg | 91,21 | 2,23 | 2,45 |
| Ir | 101,43 | 0,74 | 0,73 |
| Li | 88,34 | 1,26 | 1,42 |
| Mo | 102,80 | 0,62 | 0,61 |
| Ni | 91,20 | 1,93 | 2,11 |
| Os | 105,62 | 1,19 | 1,13 |
| Pb | 95,14 | 4,85 | 4,46 |
| Pd | 91,27 | 4,36 | 4,16 |
| Pt | 93,51 | 1,67 | 1,79 |
| Rh | 90,01 | 0,67 | 0,74 |
| Ru | 91,03 | 1,32 | 1,45 |
| Sb | 97,45 | 0,49 | 0,51 |
| Se | 118,43 | 1,40 | 1,18 |
| Sn | 93,35 | 0,31 | 0,33 |
| Tl | 103,23 | 0,93 | 0,90 |
| V | 99,33 | 1,82 | 1,83 |

Tabela 20. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 1,0J para Suspensão injetável.

| Elemento | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|------|---------|
| Ag | 93,89 | 0,66 | 0,70 |
| As | 103,02 | 2,14 | 2,08 |
| Au | 99,66 | 2,86 | 2,87 |
| Ba | 104,42 | 0,66 | 0,63 |
| Cd | 101,38 | 0,50 | 0,49 |
| Co | 93,64 | 1,25 | 1,34 |
| Cr | 96,28 | 1,60 | 1,66 |
| Cu | 96,98 | 1,90 | 1,96 |
| Hg | 99,36 | 1,80 | 1,81 |
| Ir | 100,46 | 0,72 | 0,71 |
| Li | 89,18 | 1,43 | 1,60 |
| Mo | 98,97 | 1,02 | 1,03 |
| Ni | 91,71 | 1,07 | 1,17 |
| Os | 105,05 | 0,61 | 0,58 |
| Pb | 93,02 | 4,00 | 4,30 |
| Pd | 94,62 | 1,31 | 1,38 |
| Pt | 96,73 | 0,48 | 0,50 |
| Rh | 94,44 | 0,58 | 0,62 |
| Ru | 95,61 | 1,15 | 1,20 |
| Sb | 103,53 | 1,05 | 1,02 |
| Se | 117,27 | 0,82 | 0,70 |
| Sn | 102,94 | 0,76 | 0,74 |
| Tl | 102,38 | 0,62 | 0,60 |
| V | 98,88 | 1,26 | 1,27 |

Os resultados das Tabelas 19 e 20 demonstram que o método analítico apresenta repetibilidade adequada para todos os elementos avaliados, atendendo aos critérios de precisão estabelecidos pelo ICH Q3D e pela USP <730>. As médias de recuperação estão dentro da faixa de aceitação, os desvios padrão são baixos e os coeficientes de variação confirmam a consistência dos resultados.

3.7.6.1.2. Solução oftálmica

Tabela 21. Resumo dos resultados de Exatidão para Solução oftálmica.

| Elemento | Níveis | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|--------|------|---------|
| Ag | 20 | 97,19 | 4,95 | 4,41 |
| | 100 | 93,82 | 1,76 | 1,87 |
| | 150 | 95,86 | 1,74 | 1,81 |
| As | 20 | 103,04 | 1,48 | 1,43 |
| | 100 | 94,44 | 2,49 | 2,63 |
| | 150 | 103,76 | 3,04 | 2,93 |
| Au | 20 | 81,87 | 4,89 | 4,98 |
| | 100 | 103,92 | 1,35 | 1,30 |
| | 150 | 98,80 | 4,48 | 4,53 |
| Ba | 20 | 98,94 | 0,77 | 0,78 |
| | 100 | 102,35 | 1,42 | 1,39 |
| | 150 | 105,20 | 1,89 | 1,80 |
| Cd | 20 | 93,29 | 1,05 | 1,12 |
| | 100 | 97,06 | 2,05 | 2,11 |
| | 150 | 103,63 | 1,85 | 1,79 |
| Co | 20 | 94,83 | 1,76 | 1,86 |
| | 100 | 95,20 | 2,97 | 3,12 |
| | 150 | 93,34 | 2,48 | 2,66 |
| Cr | 20 | 101,04 | 0,44 | 0,43 |
| | 100 | 98,21 | 1,37 | 1,40 |
| | 150 | 95,05 | 2,99 | 3,14 |
| Cu | 20 | 92,47 | 0,79 | 0,85 |
| | 100 | 97,30 | 1,82 | 1,87 |
| | 150 | 94,24 | 2,84 | 3,01 |
| Hg | 20 | 96,89 | 4,09 | 4,22 |
| | 100 | 101,27 | 1,85 | 1,82 |
| | 150 | 100,84 | 2,96 | 2,94 |
| Ir | 20 | 102,18 | 0,76 | 0,75 |
| | 100 | 103,55 | 2,19 | 2,12 |
| | 150 | 102,48 | 1,64 | 1,60 |
| Li | 20 | 91,19 | 0,77 | 0,84 |
| | 100 | 90,78 | 2,25 | 2,48 |
| | 150 | 87,93 | 1,88 | 2,14 |
| Mo | 20 | 102,85 | 1,27 | 1,23 |
| | 100 | 97,43 | 1,53 | 1,57 |
| | 150 | 97,79 | 2,83 | 2,89 |
| Ni | 20 | 94,55 | 1,68 | 1,77 |
| | 100 | 94,40 | 2,11 | 2,23 |
| | 150 | 92,21 | 2,44 | 2,65 |
| Os | 20 | 109,02 | 1,45 | 1,33 |
| | 100 | 109,07 | 2,23 | 2,05 |
| | 150 | 107,79 | 2,03 | 1,88 |
| Pb | 20 | 105,56 | 4,42 | 7,98 |
| | 100 | 125,77 | 4,91 | 6,29 |
| | 150 | 85,57 | 3,69 | 4,31 |
| Pd | 20 | 88,29 | 0,49 | 0,55 |
| | 100 | 94,98 | 1,56 | 1,64 |
| | 150 | 97,17 | 1,78 | 1,83 |

Tabela 21. Continuação...

| Elemento | Níveis | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|--------|------|---------|
| Pt | 20 | 97,60 | 0,41 | 0,42 |
| | 100 | 100,03 | 2,14 | 2,14 |
| | 150 | 99,46 | 2,07 | 2,08 |
| Rh | 20 | 89,83 | 1,15 | 1,28 |
| | 100 | 95,82 | 1,93 | 2,01 |
| | 150 | 98,02 | 1,74 | 1,78 |
| Ru | 20 | 90,47 | 1,00 | 1,11 |
| | 100 | 97,34 | 1,78 | 1,83 |
| | 150 | 98,88 | 1,82 | 1,84 |
| Sb | 20 | 96,02 | 0,79 | 0,82 |
| | 100 | 104,09 | 1,55 | 1,49 |
| | 150 | 106,73 | 2,61 | 2,45 |
| Se | 20 | 109,03 | 1,91 | 1,75 |
| | 100 | 111,46 | 1,05 | 0,94 |
| | 150 | 109,58 | 1,88 | 1,72 |
| Sn | 20 | 92,29 | 0,66 | 0,72 |
| | 100 | 102,96 | 1,55 | 1,50 |
| | 150 | 104,22 | 2,34 | 2,24 |
| Tl | 20 | 103,29 | 2,14 | 2,07 |
| | 100 | 102,57 | 1,69 | 1,64 |
| | 150 | 101,73 | 1,58 | 1,55 |
| V | 20 | 97,85 | 0,91 | 0,93 |
| | 100 | 101,03 | 1,28 | 1,26 |
| | 150 | 98,92 | 2,73 | 2,76 |

Os resultados demonstram que todas as impurezas elementares foram validadas pela exatidão, uma vez que os valores de recuperação estão em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela USP <730> (70–150%). Os baixos desvios padrão e coeficientes de variação confirmam a precisão e confiabilidade do método analítico, assegurando sua aplicabilidade para o controle de qualidade nas diferentes matrizes.

Tabela 22. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 0,2I para Solução oftálmica.

| Elemento | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|------|---------|
| Ag | 91,15 | 4,31 | 7,50 |
| As | 101,53 | 2,94 | 2,90 |
| Au | 82,41 | 3,87 | 4,70 |
| Ba | 98,17 | 2,17 | 2,21 |
| Cd | 93,63 | 1,57 | 1,67 |
| Co | 93,98 | 2,51 | 2,67 |
| Cr | 100,25 | 1,45 | 1,44 |
| Cu | 91,65 | 2,04 | 2,23 |
| Hg | 95,07 | 3,82 | 4,02 |
| Ir | 100,75 | 2,88 | 2,85 |
| Li | 90,39 | 1,31 | 1,45 |
| Mo | 102,19 | 1,69 | 1,66 |
| Ni | 93,42 | 2,66 | 2,85 |
| Os | 107,57 | 3,39 | 3,15 |
| Pb | 110,57 | 4,78 | 7,94 |
| Pd | 87,37 | 3,92 | 4,49 |
| Pt | 96,53 | 2,83 | 2,93 |
| Rh | 88,83 | 2,76 | 3,11 |
| Ru | 89,71 | 2,56 | 2,85 |
| Sb | 94,96 | 2,29 | 2,41 |
| Se | 108,74 | 2,83 | 2,60 |
| Sn | 91,51 | 2,08 | 2,28 |
| Tl | 101,92 | 3,35 | 3,29 |
| V | 97,15 | 1,93 | 1,98 |

Tabela 23. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 1,0J para Solução oftálmica.

| Elemento | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|------|---------|
| Ag | 93,71 | 1,55 | 1,65 |
| As | 96,73 | 3,12 | 3,22 |
| Au | 103,81 | 1,36 | 1,31 |
| Ba | 101,93 | 1,53 | 1,50 |
| Cd | 96,62 | 1,57 | 1,62 |
| Co | 96,46 | 3,50 | 3,63 |
| Cr | 98,26 | 1,05 | 1,07 |
| Cu | 97,25 | 1,61 | 1,65 |
| Hg | 102,14 | 2,49 | 2,44 |
| Ir | 102,97 | 1,84 | 1,79 |
| Li | 91,19 | 1,63 | 1,78 |
| Mo | 98,72 | 3,21 | 3,25 |
| Ni | 94,57 | 1,42 | 1,50 |
| Os | 108,51 | 1,98 | 1,82 |
| Pb | 121,32 | 4,53 | 6,21 |
| Pd | 95,14 | 1,90 | 1,99 |
| Pt | 99,85 | 1,67 | 1,68 |
| Rh | 95,53 | 1,72 | 1,80 |
| Ru | 97,21 | 1,49 | 1,54 |
| Sb | 103,97 | 1,70 | 1,63 |
| Se | 111,19 | 1,30 | 1,17 |
| Sn | 102,85 | 1,49 | 1,45 |
| Tl | 102,27 | 1,55 | 1,51 |
| V | 101,20 | 1,25 | 1,23 |

As Tabelas 22 e 23 demonstram que o método apresenta repetibilidade, médias de recuperação, desvios padrão e coeficientes de variação adequados para todos os elementos avaliados, atendendo aos critérios de precisão estabelecidos pelo ICH Q3D e pela USP <730>.

3.7.6.1.3. Suspensão oftálmica

Tabela 24. Resumo dos resultados de Exatidão para Suspensão oftálmica.

| Elemento | Níveis | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|--------|------|---------|
| Ag | 20 | 86,89 | 1,87 | 2,15 |
| | 100 | 95,13 | 0,52 | 0,54 |
| | 150 | 101,98 | 0,24 | 0,24 |
| As | 20 | 99,63 | 1,73 | 1,73 |
| | 100 | 98,27 | 0,87 | 0,89 |
| | 150 | 102,85 | 1,71 | 1,67 |
| Au | 20 | 104,84 | 4,16 | 4,79 |
| | 100 | 88,99 | 4,77 | 4,98 |
| | 150 | 96,87 | 4,39 | 4,53 |
| Ba | 20 | 102,17 | 0,28 | 0,27 |
| | 100 | 105,27 | 0,92 | 0,87 |
| | 150 | 109,21 | 0,77 | 0,71 |
| Cd | 20 | 96,04 | 1,52 | 1,58 |
| | 100 | 102,30 | 0,15 | 0,15 |
| | 150 | 107,72 | 0,61 | 0,57 |
| Co | 20 | 97,28 | 1,51 | 1,55 |
| | 100 | 98,85 | 1,23 | 1,25 |
| | 150 | 101,39 | 2,60 | 2,57 |
| Cr | 20 | 103,29 | 1,77 | 1,71 |
| | 100 | 100,56 | 0,84 | 0,83 |
| | 150 | 103,60 | 2,53 | 2,44 |
| Cu | 20 | 93,65 | 2,01 | 2,14 |
| | 100 | 100,89 | 0,18 | 0,18 |
| | 150 | 97,84 | 0,86 | 0,87 |

Tabela 24. Continuação...

| Elemento | Níveis | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|--------|------|---------|
| Cu | 20 | 93,65 | 2,01 | 2,14 |
| | 100 | 100,89 | 0,18 | 0,18 |
| | 150 | 97,84 | 0,86 | 0,87 |
| Hg | 20 | 92,89 | 3,68 | 3,96 |
| | 100 | 101,84 | 1,81 | 1,78 |
| | 150 | 104,28 | 2,09 | 2,01 |
| Ir | 20 | 102,50 | 0,53 | 0,52 |
| | 100 | 104,61 | 0,15 | 0,14 |
| | 150 | 106,86 | 0,39 | 0,37 |
| Li | 20 | 89,88 | 1,23 | 1,37 |
| | 100 | 92,92 | 0,38 | 0,41 |
| | 150 | 96,66 | 1,47 | 1,53 |
| Mo | 20 | 103,72 | 0,27 | 0,26 |
| | 100 | 101,64 | 1,08 | 1,07 |
| | 150 | 102,38 | 1,28 | 1,25 |
| Ni | 20 | 93,28 | 1,64 | 1,76 |
| | 100 | 96,45 | 1,14 | 1,18 |
| | 150 | 100,10 | 2,70 | 2,70 |
| Os | 20 | 107,03 | 1,58 | 1,48 |
| | 100 | 108,56 | 0,74 | 0,68 |
| | 150 | 109,73 | 1,07 | 0,97 |
| Pb | 20 | 97,74 | 4,56 | 4,69 |
| | 100 | 103,60 | 2,85 | 2,75 |
| | 150 | 94,60 | 1,20 | 1,27 |
| Pd | 20 | 93,38 | 4,48 | 4,09 |
| | 100 | 96,56 | 0,54 | 0,56 |
| | 150 | 102,26 | 0,81 | 0,79 |
| Pt | 20 | 89,82 | 1,32 | 1,47 |
| | 100 | 99,02 | 0,75 | 0,76 |
| | 150 | 102,73 | 0,78 | 0,76 |
| Rh | 20 | 91,25 | 0,82 | 0,90 |
| | 100 | 97,13 | 0,53 | 0,54 |
| | 150 | 103,14 | 0,82 | 0,79 |
| Ru | 20 | 91,09 | 0,38 | 0,42 |
| | 100 | 97,80 | 0,27 | 0,28 |
| | 150 | 103,80 | 0,63 | 0,61 |
| Sb | 20 | 96,97 | 0,35 | 0,36 |
| | 100 | 104,18 | 0,09 | 0,09 |
| | 150 | 109,24 | 0,85 | 0,78 |
| Se | 20 | 108,82 | 1,27 | 1,17 |
| | 100 | 107,27 | 0,44 | 0,41 |
| | 150 | 106,26 | 0,34 | 0,32 |
| Sn | 20 | 93,47 | 0,39 | 0,42 |
| | 100 | 103,67 | 0,77 | 0,74 |
| | 150 | 108,01 | 0,24 | 0,23 |
| Tl | 20 | 104,40 | 0,23 | 0,22 |
| | 100 | 104,35 | 0,69 | 0,66 |
| | 150 | 105,38 | 0,53 | 0,50 |
| V | 20 | 98,56 | 2,63 | 2,66 |
| | 100 | 102,39 | 1,14 | 1,11 |
| | 150 | 106,24 | 2,12 | 2,00 |

Os resultados demonstram que todas as impurezas elementares foram validadas pela exatidão, uma vez que os valores de recuperação estão em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela USP <730> (70–150%). Além disso, os baixos desvios padrão e coeficientes de variação confirmam a precisão e confiabilidade do método analítico, assegurando sua aplicabilidade para o controle de qualidade em diferentes matrizes farmacêuticas.

Tabela 25. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 0,2J para Suspensão oftálmica.

| Elemento | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|------|---------|
| Ag | 87,10 | 1,25 | 1,43 |
| As | 100,18 | 1,89 | 1,89 |
| Au | 108,80 | 4,95 | 6,39 |
| Ba | 101,73 | 1,33 | 1,31 |
| Cd | 96,10 | 1,62 | 1,69 |
| Co | 97,68 | 1,12 | 1,14 |
| Cr | 103,34 | 1,60 | 1,55 |
| Cu | 93,58 | 2,00 | 2,13 |
| Hg | 95,19 | 3,65 | 3,83 |
| Ir | 103,00 | 0,83 | 0,80 |
| Li | 90,01 | 1,22 | 1,36 |
| Mo | 103,67 | 1,14 | 1,10 |
| Ni | 94,29 | 2,02 | 2,14 |
| Os | 107,71 | 1,52 | 1,41 |
| Pb | 96,02 | 4,57 | 4,76 |
| Pd | 91,71 | 4,18 | 6,73 |
| Pt | 89,06 | 1,99 | 2,23 |
| Rh | 91,16 | 1,13 | 1,24 |
| Ru | 91,81 | 1,15 | 1,26 |
| Sb | 97,01 | 1,10 | 1,14 |
| Se | 108,25 | 1,72 | 1,59 |
| Sn | 93,11 | 1,39 | 1,49 |
| Tl | 105,44 | 1,34 | 1,27 |
| V | 99,69 | 2,40 | 2,41 |

Tabela 26. Resumo dos resultados de Repetibilidade no nível 1,0J para Suspensão oftálmica.

| Elemento | Média | DP | DPR (%) |
|----------|--------|------|---------|
| Ag | 95,87 | 0,91 | 0,95 |
| As | 99,17 | 1,36 | 1,37 |
| Au | 95,10 | 4,14 | 9,61 |
| Ba | 105,26 | 0,66 | 0,63 |
| Cd | 102,37 | 0,31 | 0,31 |
| Co | 98,95 | 0,81 | 0,82 |
| Cr | 100,44 | 0,85 | 0,85 |
| Cu | 99,69 | 1,36 | 1,36 |
| Hg | 103,07 | 1,81 | 1,75 |
| Ir | 104,71 | 0,32 | 0,30 |
| Li | 92,91 | 0,46 | 0,50 |
| Mo | 101,99 | 0,86 | 0,84 |
| Ni | 96,26 | 0,75 | 0,78 |
| Os | 108,75 | 0,55 | 0,50 |
| Pb | 99,74 | 4,77 | 4,78 |
| Pd | 97,25 | 1,11 | 1,14 |
| Pt | 99,19 | 0,68 | 0,68 |
| Rh | 97,56 | 0,74 | 0,76 |
| Ru | 98,43 | 0,81 | 0,82 |
| Sb | 104,19 | 0,45 | 0,43 |
| Se | 107,03 | 0,59 | 0,55 |
| Sn | 104,00 | 0,81 | 0,78 |
| Tl | 104,62 | 0,70 | 0,67 |
| V | 102,50 | 1,08 | 1,06 |

Os resultados das Tabelas 25 e 26 demonstram que o método analítico apresenta repetibilidade adequada para todos os elementos avaliados, atendendo aos critérios de precisão estabelecidos pelo ICH Q3D e pela USP <730>. As médias de recuperação estão dentro da faixa

de aceitação, os desvios padrão são baixos e os coeficientes de variação confirmam a consistência dos resultados.

3.7.7. Estabilidade da solução

Na validação de métodos analíticos, o parâmetro estabilidade da solução é fundamental para assegurar que as soluções preparadas — sejam padrões, amostras ou reagentes — mantenham sua integridade química e resposta analítica dentro de limites aceitáveis durante o período de uso previsto. Esse estudo garante que não ocorram degradações, perdas de concentração ou alterações físico-químicas que possam comprometer a confiabilidade dos resultados.

A avaliação da estabilidade da solução envolve a preparação de soluções em concentrações conhecidas e sua análise em diferentes intervalos de tempo, sob condições de armazenamento previamente definidas (como temperatura ambiente, refrigeração ou proteção contra luz). Os resultados obtidos são comparados com os valores iniciais, verificando se permanecem dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para resposta instrumental.

A análise de estabilidade foi conduzida inicialmente no tempo zero (T0 horas), em uma solução padrão de verificação (check) e uma solução amostra fortificada no nível 1,0J. Nos intervalos subsequentes, **até 72 horas**, foram realizadas leituras das mesmas soluções de estabilidade, de modo a monitorar possíveis variações ao longo do tempo.

A avaliação da estabilidade foi baseada na recuperação das soluções em relação ao valor obtido no T0, sendo considerados satisfatórios os resultados que permaneceram dentro da faixa de 70 a 130%, conforme critérios de aceitação estabelecidos para validação analítica. Esse procedimento assegura que as soluções mantêm integridade e confiabilidade durante o período avaliado, garantindo a robustez do método frente às condições de armazenamento e tempo de análise.

3.7.7.1. Resultados da estabilidade das soluções

➤ Elemento: Prata (Ag)

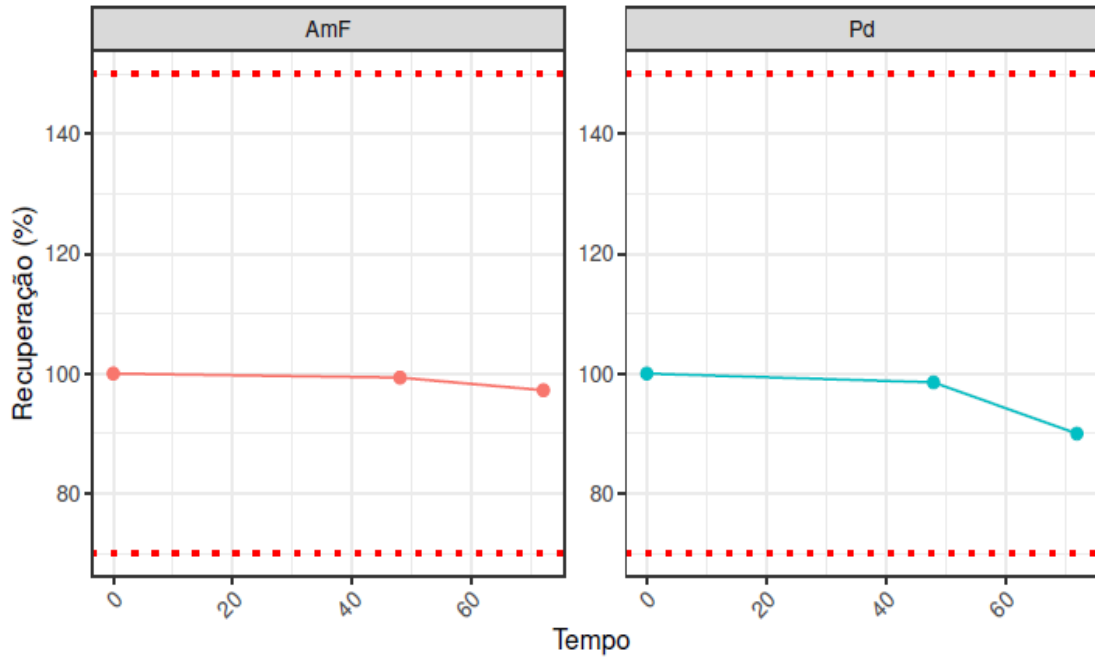


Figura 58. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Prata (Ag).

➤ Elemento: Arsênio (As)

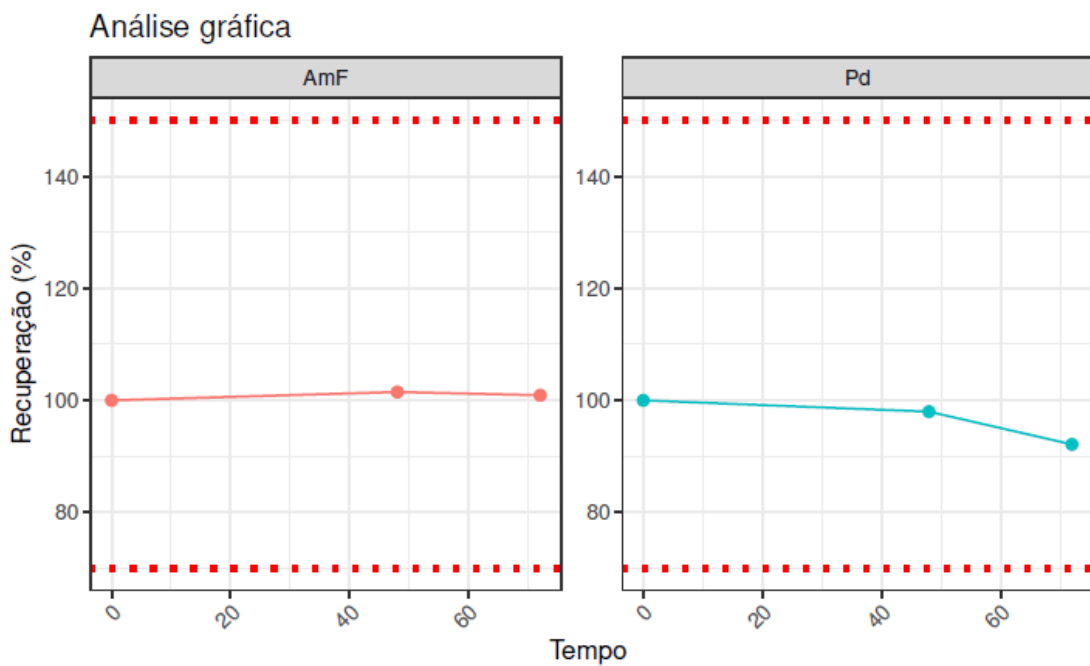


Figura 59. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Arsênio (As).

➤ **Elemento: Ouro (Au)**

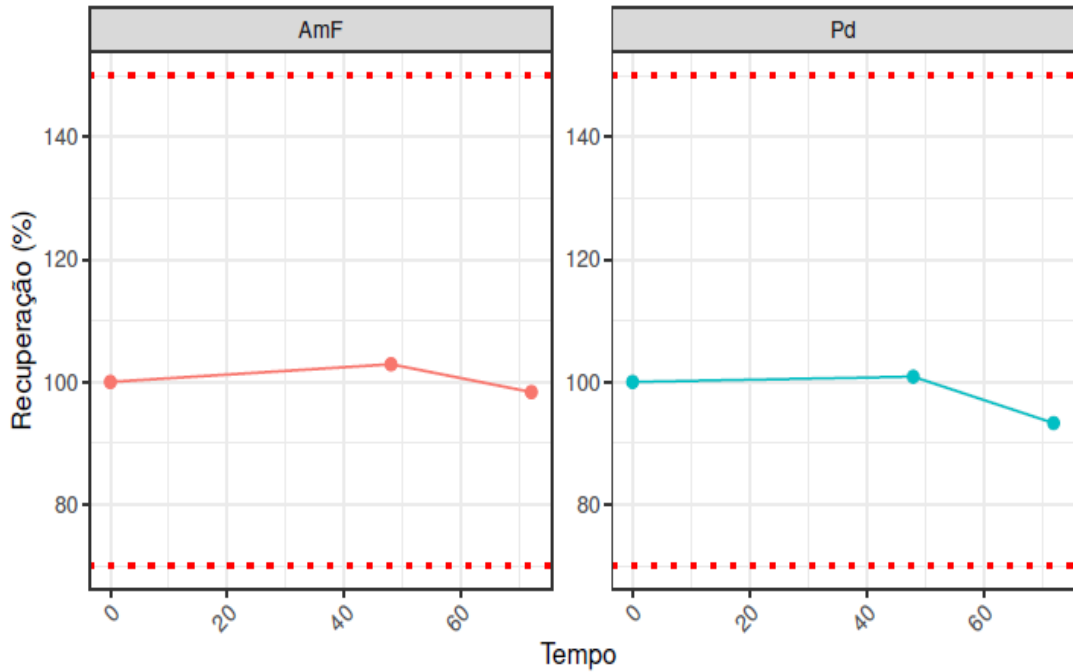


Figura 60. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Ouro (Au).

➤ **Elemento: Bário (Ba)**

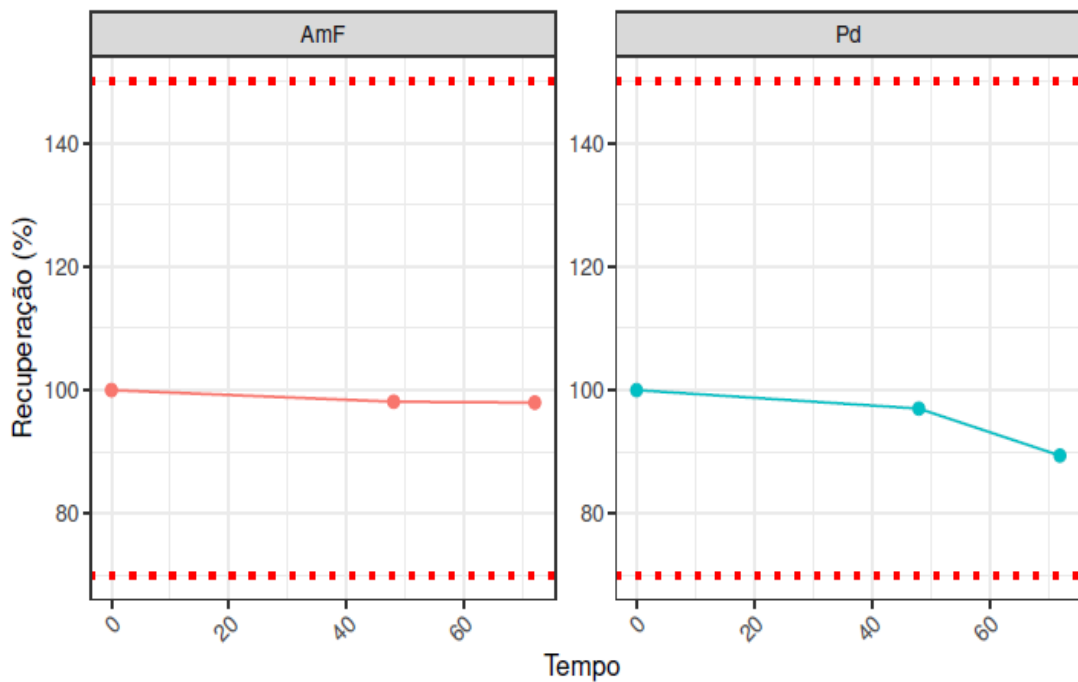


Figura 61. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Bário (Ba).

➤ **Elemento: Cádmió (Cd)**

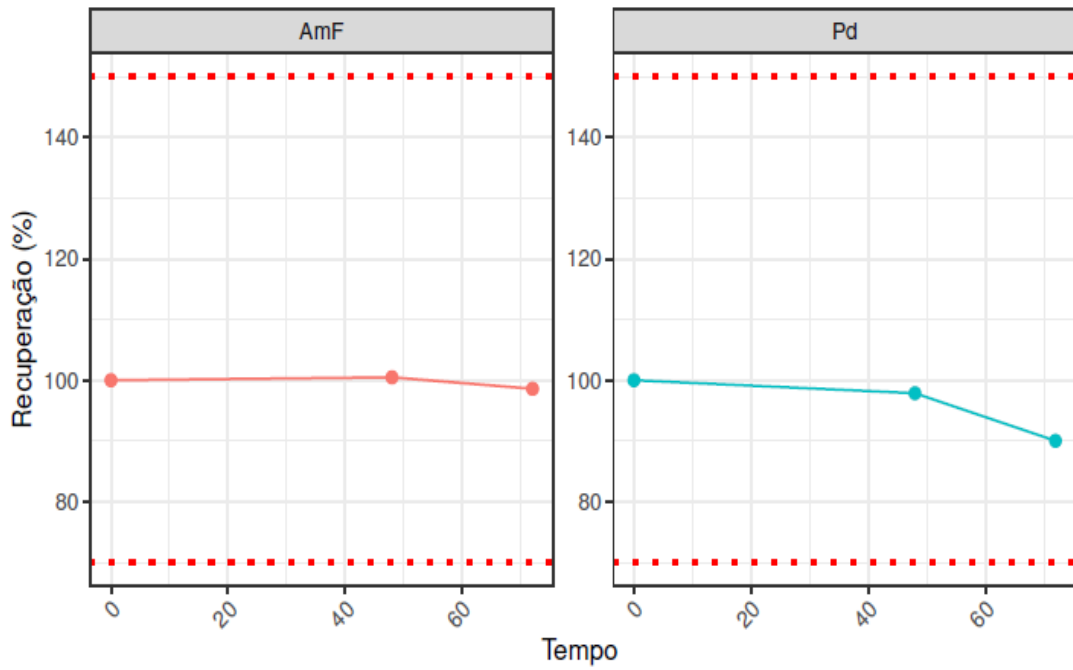


Figura 62. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Cádmió (Cd).

➤ **Elemento: Cobalto (Co)**

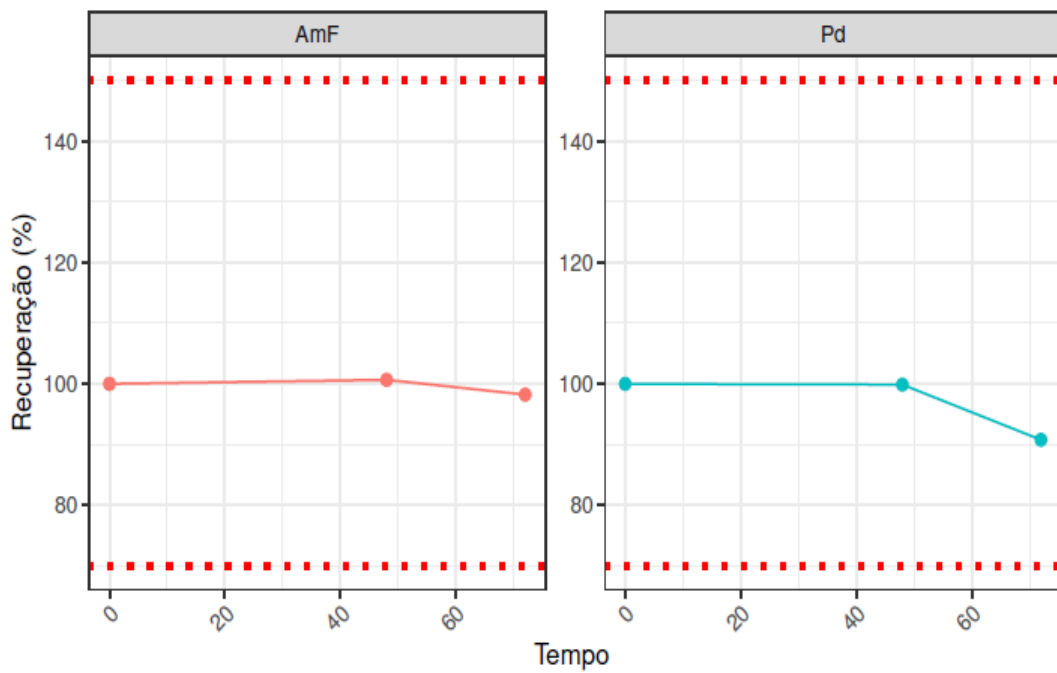


Figura 63. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Cobalto (Co).

➤ **Elemento: Cromo (Cr)**

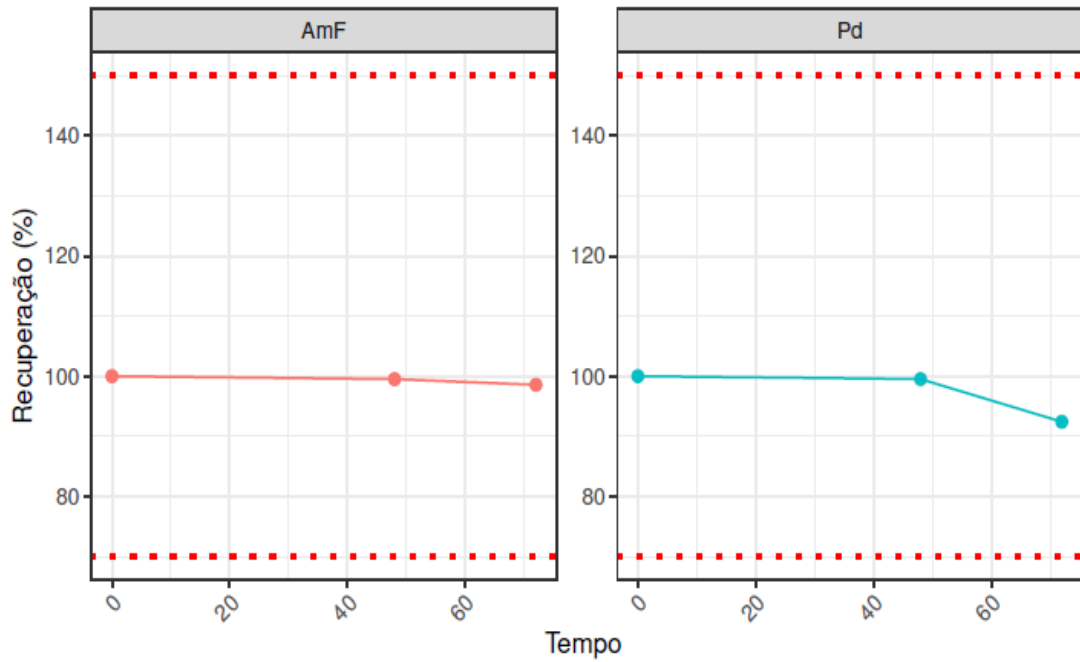


Figura 64. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Cromo (Cr).

➤ **Elemento: Cobre (Cu)**

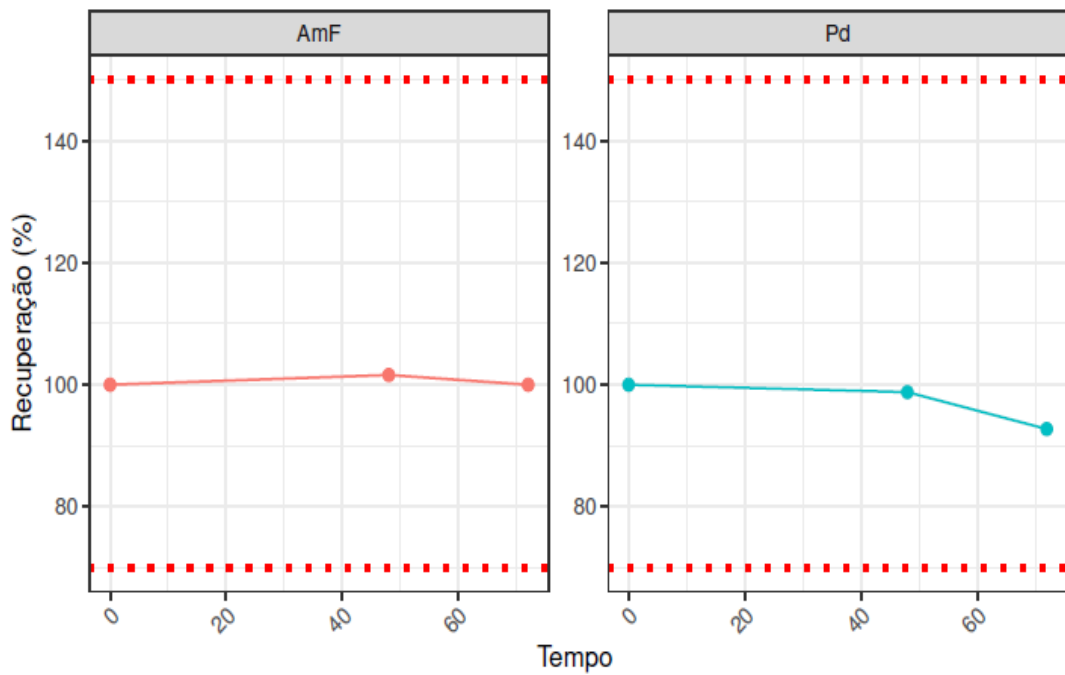


Figura 65. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Cobre (Cu).

➤ **Elemento: Mercúrio (Hg)**

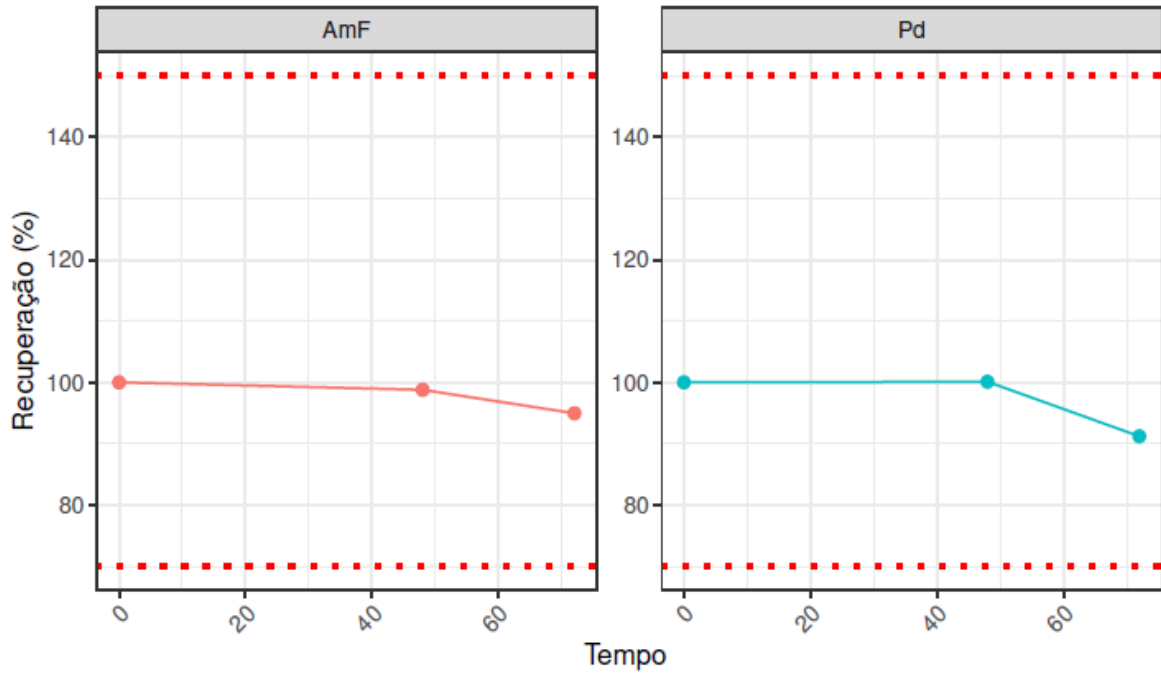


Figura 66. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Mercúrio (Hg).

➤ **Elemento: Irídio (Ir)**

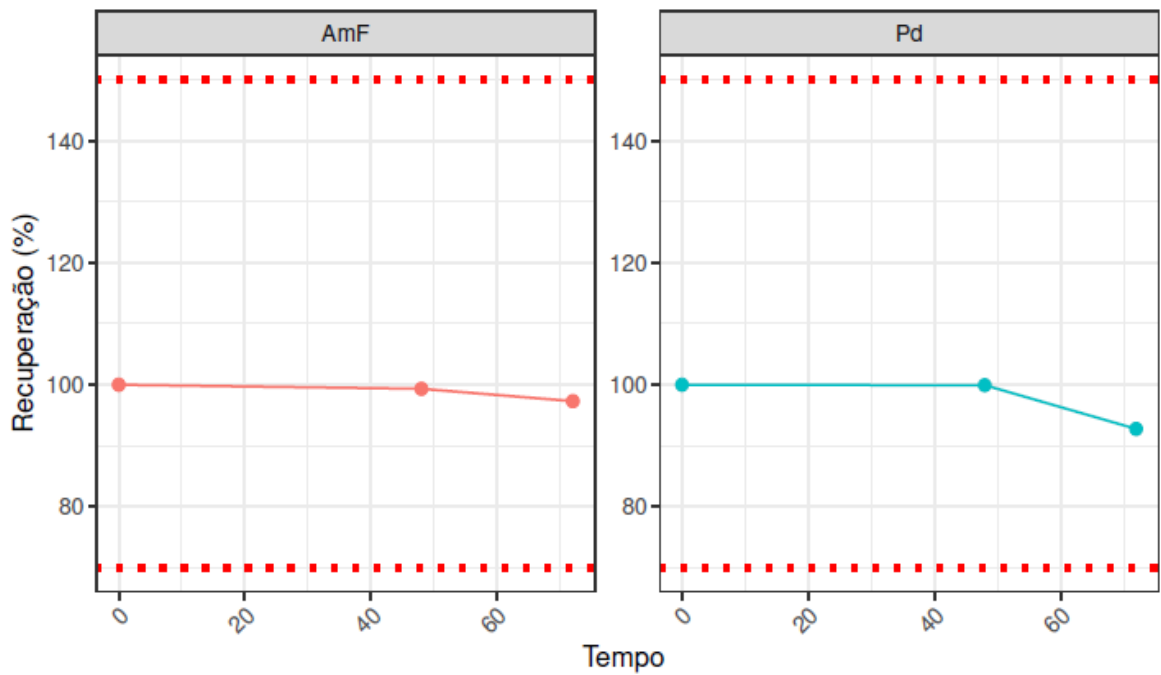


Figura 67. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Irídio (Ir).

➤ **Elemento: Lítio (Li)**

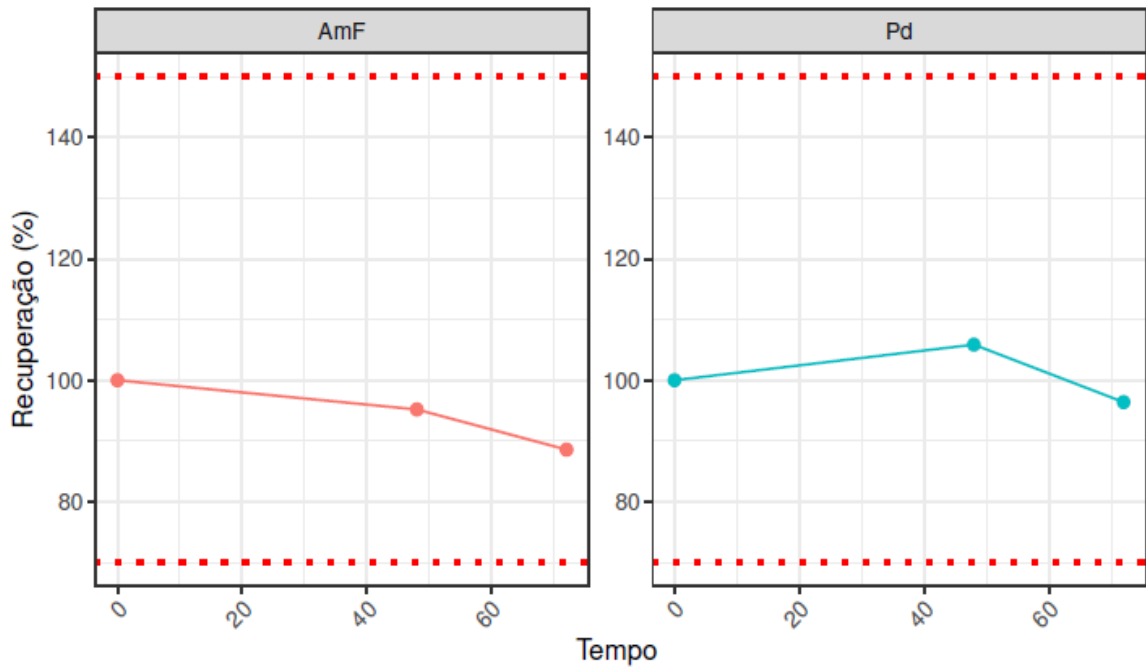


Figura 68. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Lítio (Li).

➤ **Elemento: Molibdênio (Mo)**

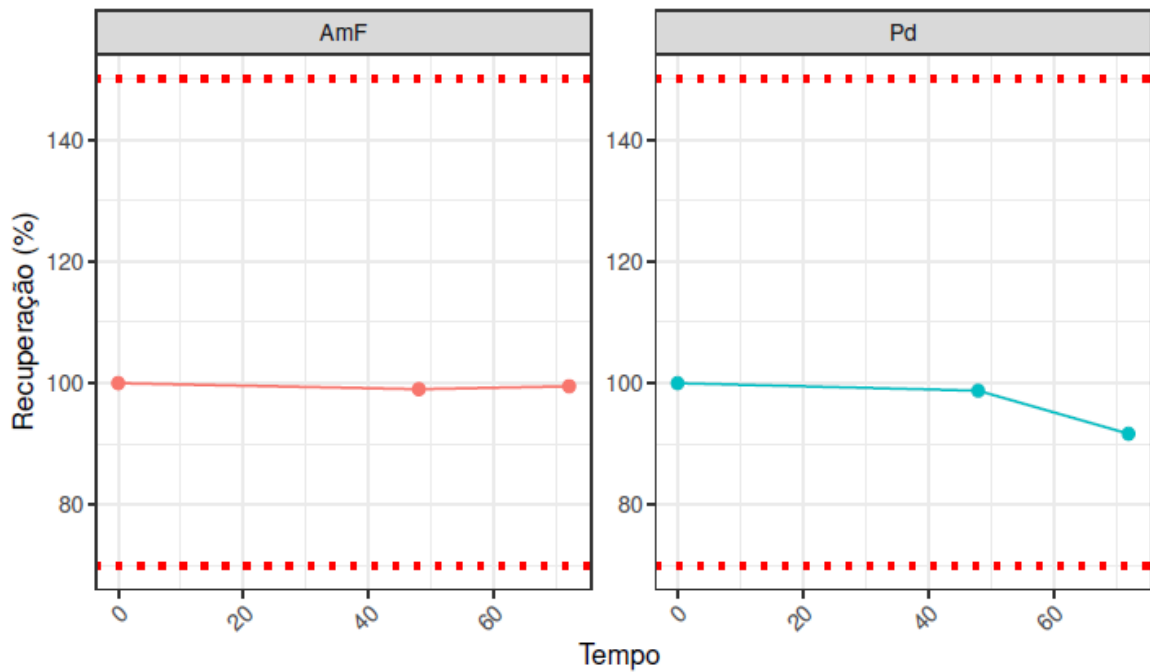


Figura 69. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Molibdênio (Mo).

➤ **Elemento: Níquel (Ni)**

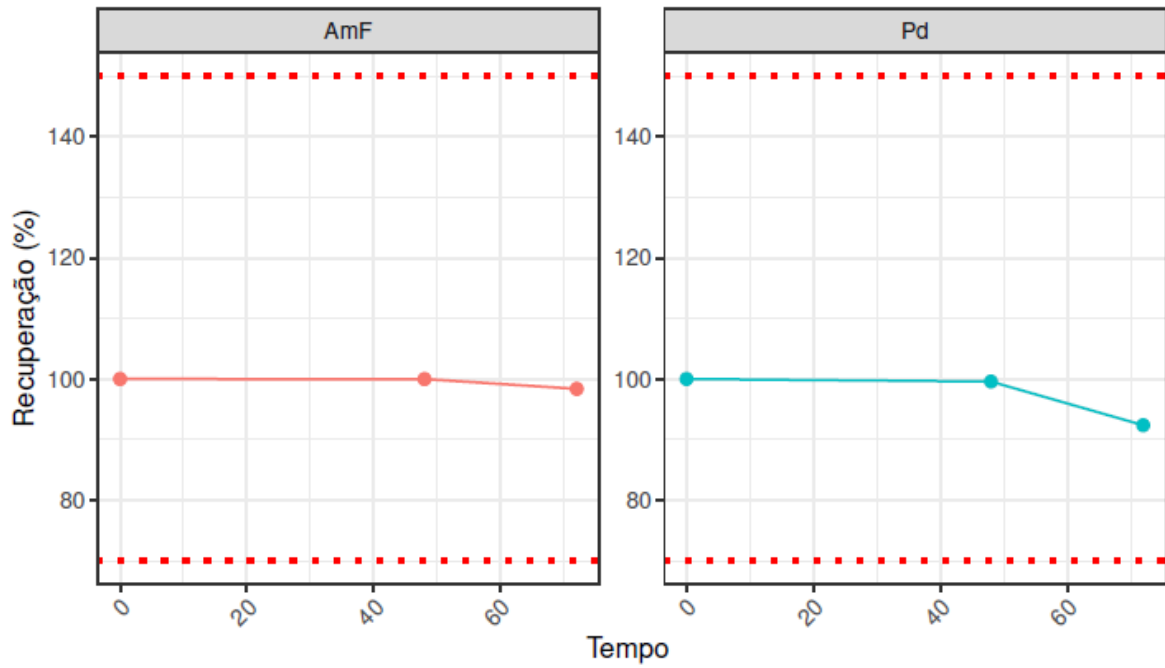


Figura 70. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Níquel (Ni).

➤ **Elemento: Ósmio (Os)**

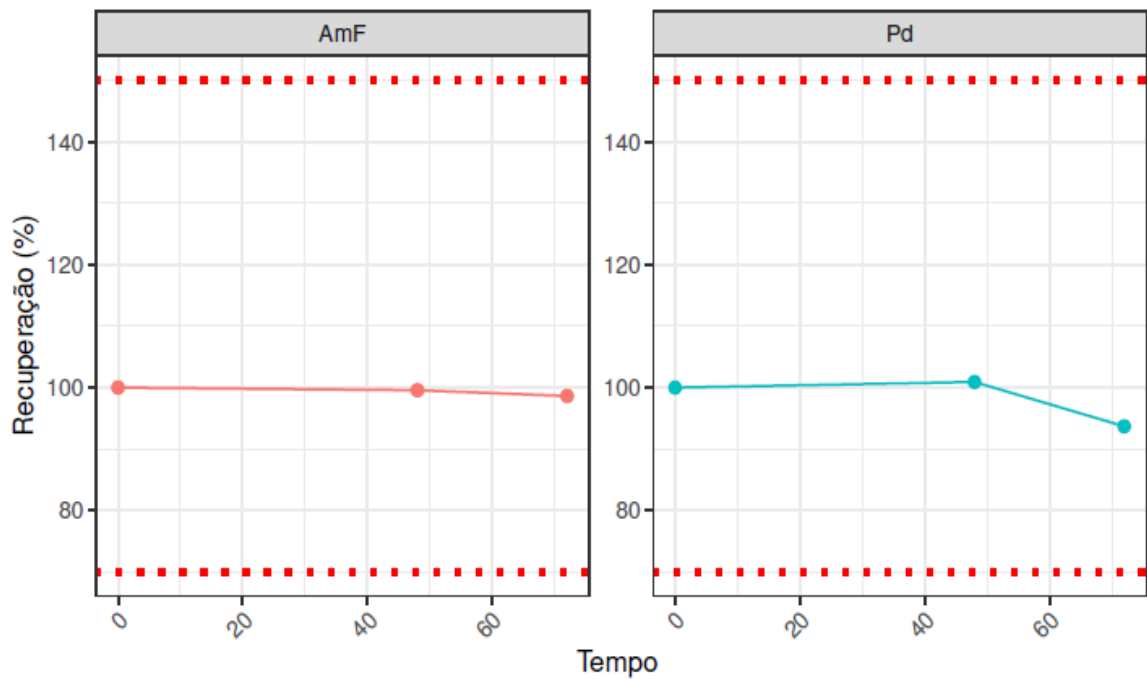


Figura 71. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Ósmio (Os).

➤ **Elemento: Chumbo (Pb)**

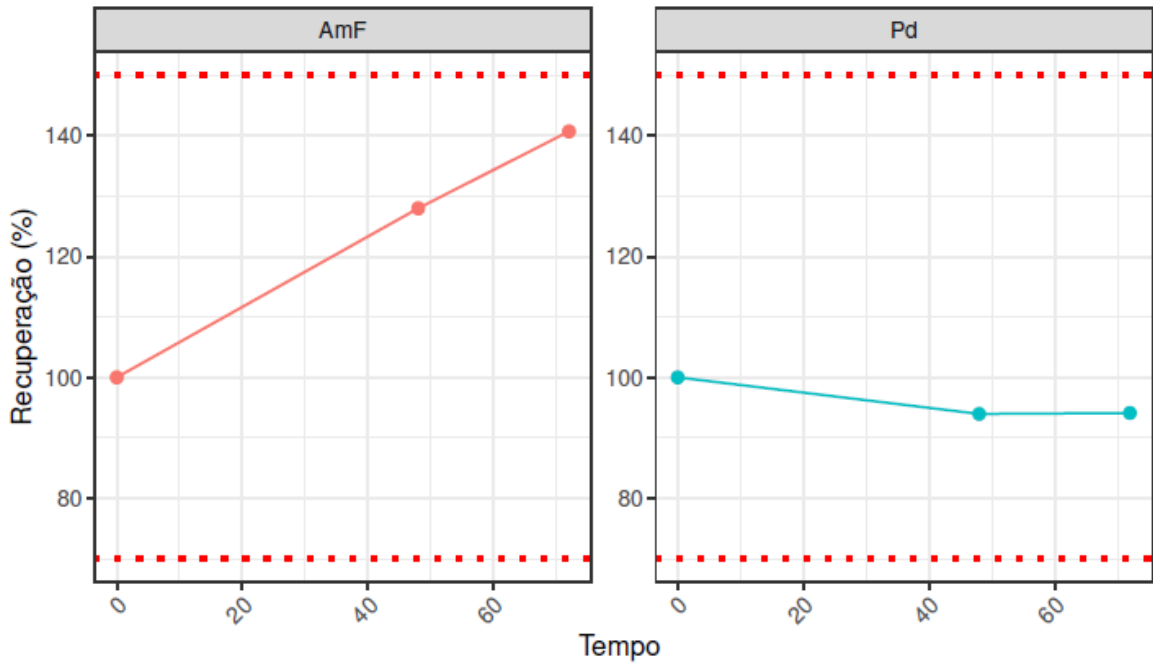


Figura 72. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Chumbo (Pb).

➤ **Elemento: Paládio (Pd)**

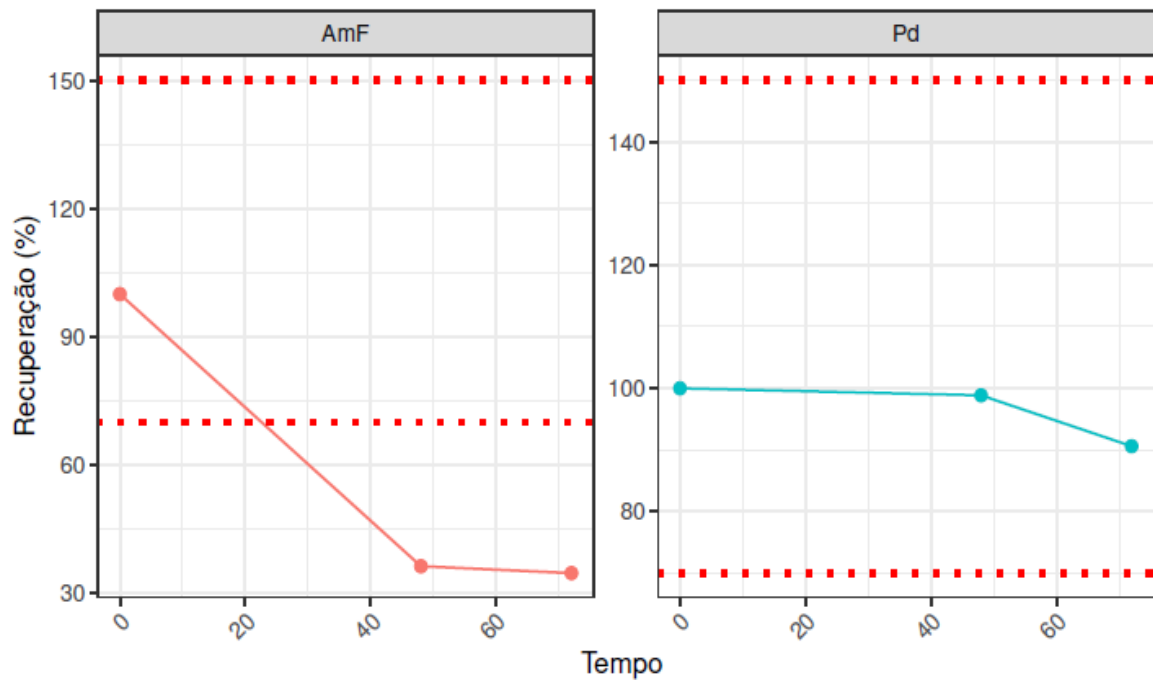


Figura 73. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Paládio (Pd).

➤ **Elemento: Platina (Pt)**

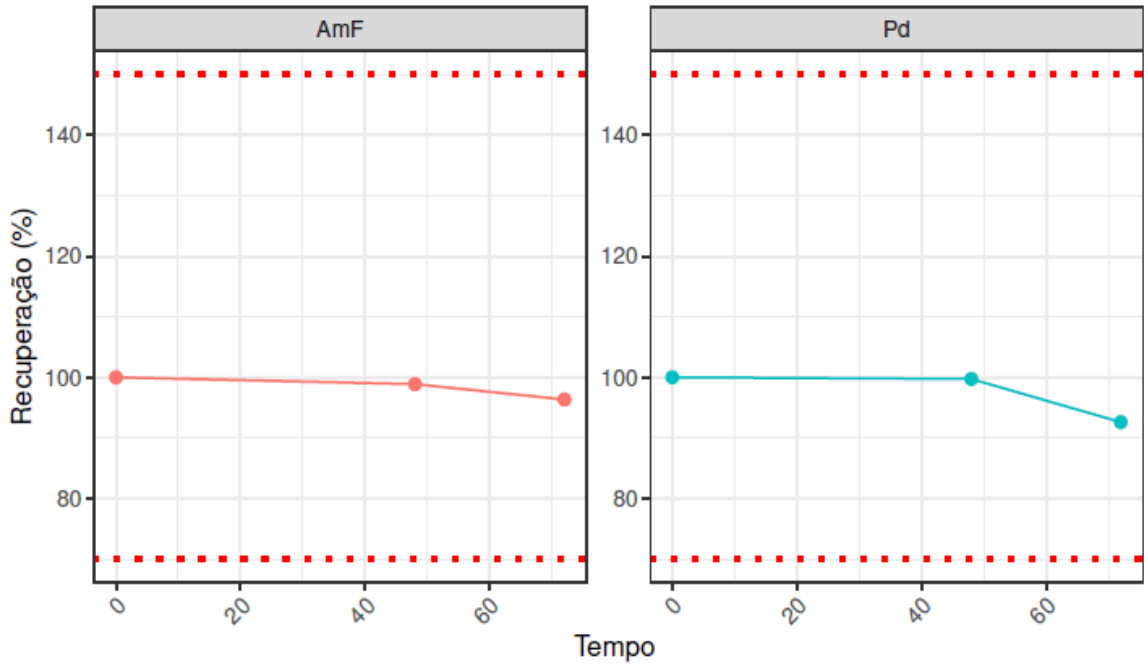


Figura 74. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Platina (Pt).

➤ **Elemento: Ródio (Rh)**

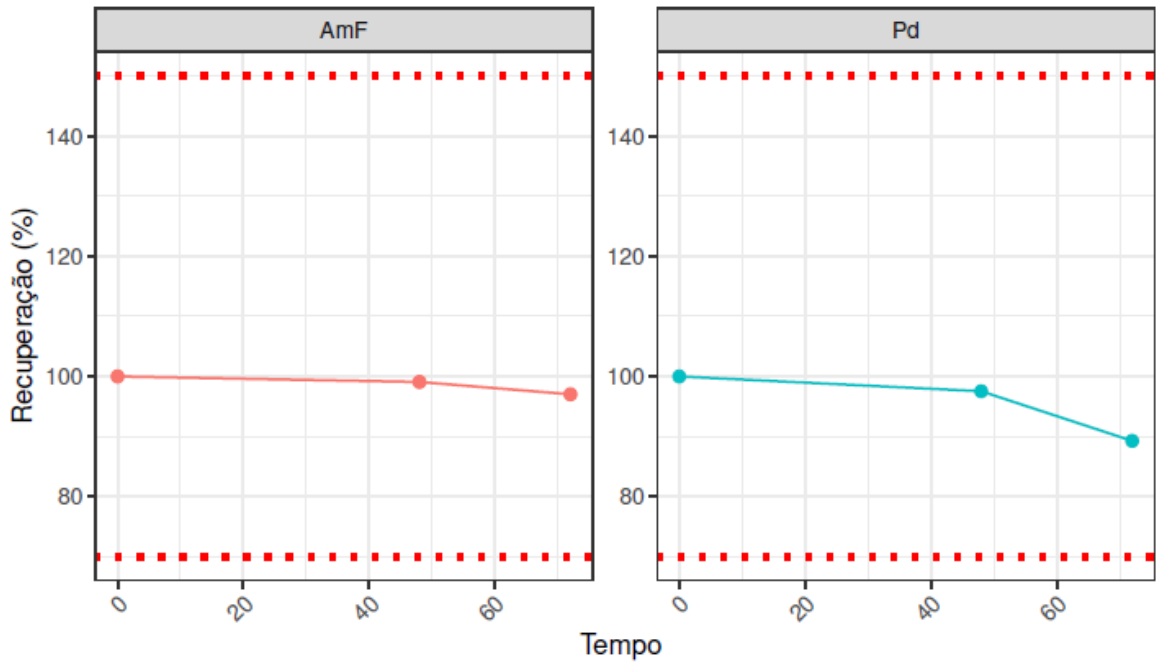


Figura 75. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Ródio (Rh).

➤ **Elemento: Rutênio (Ru)**

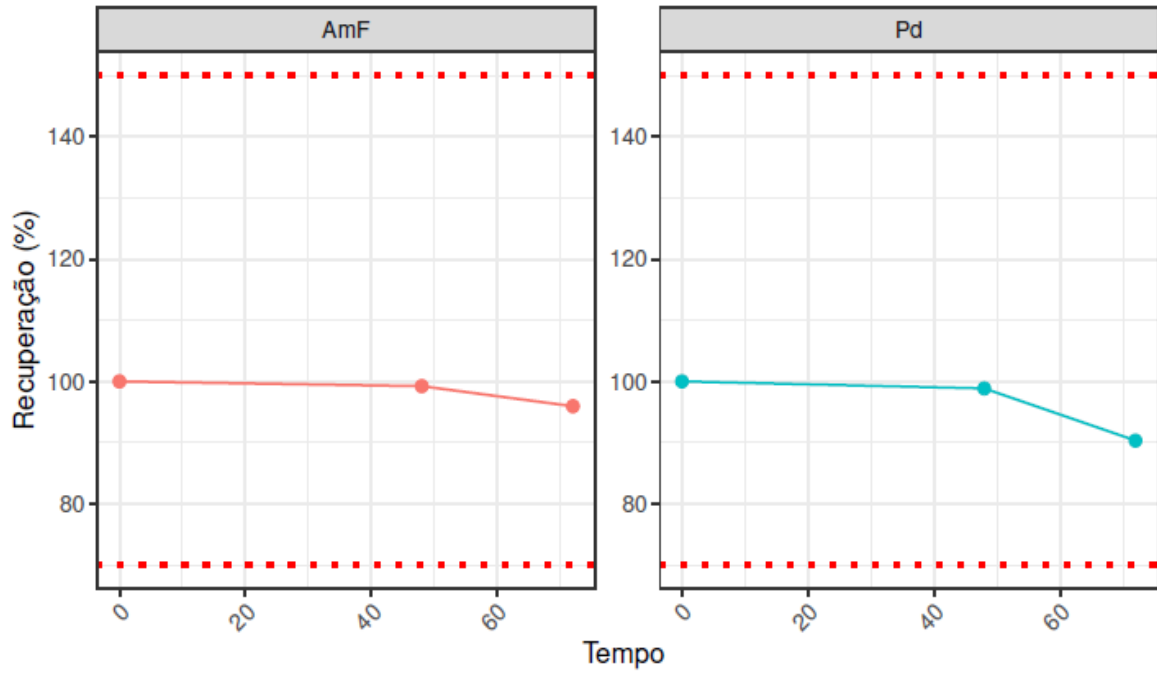


Figura 76. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Rutênio (Ru).

➤ **Elemento: Antimônio (Sb)**

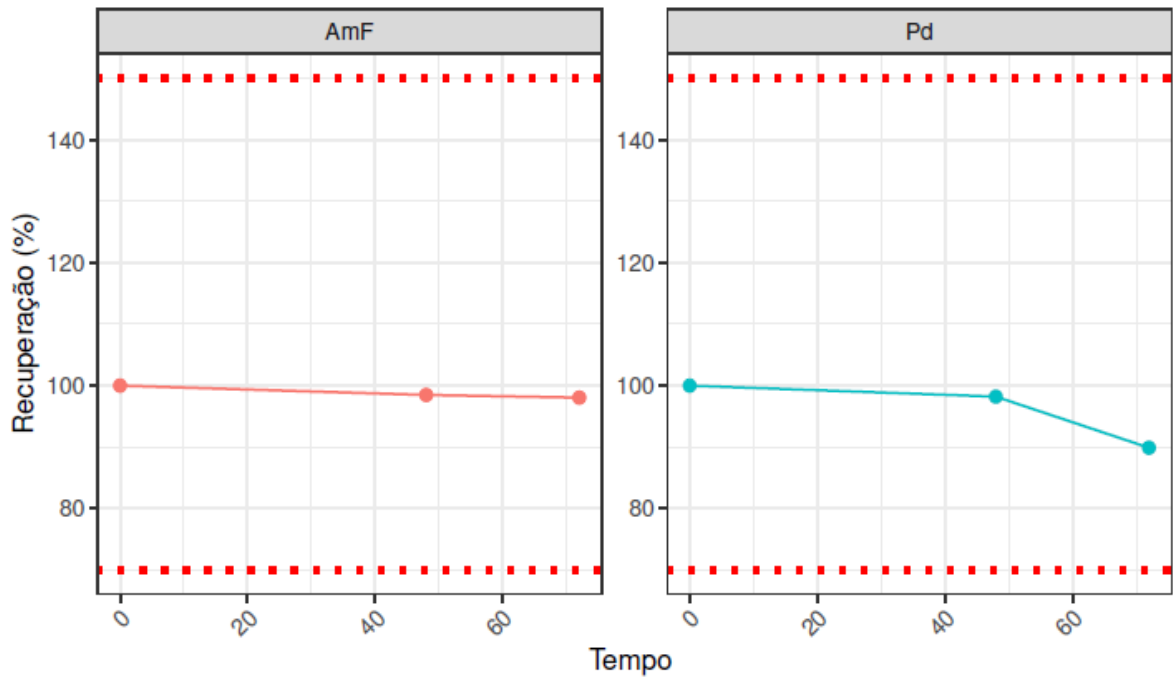


Figura 77. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Antimônio (Sb).

➤ **Elemento: Selênio (Se)**

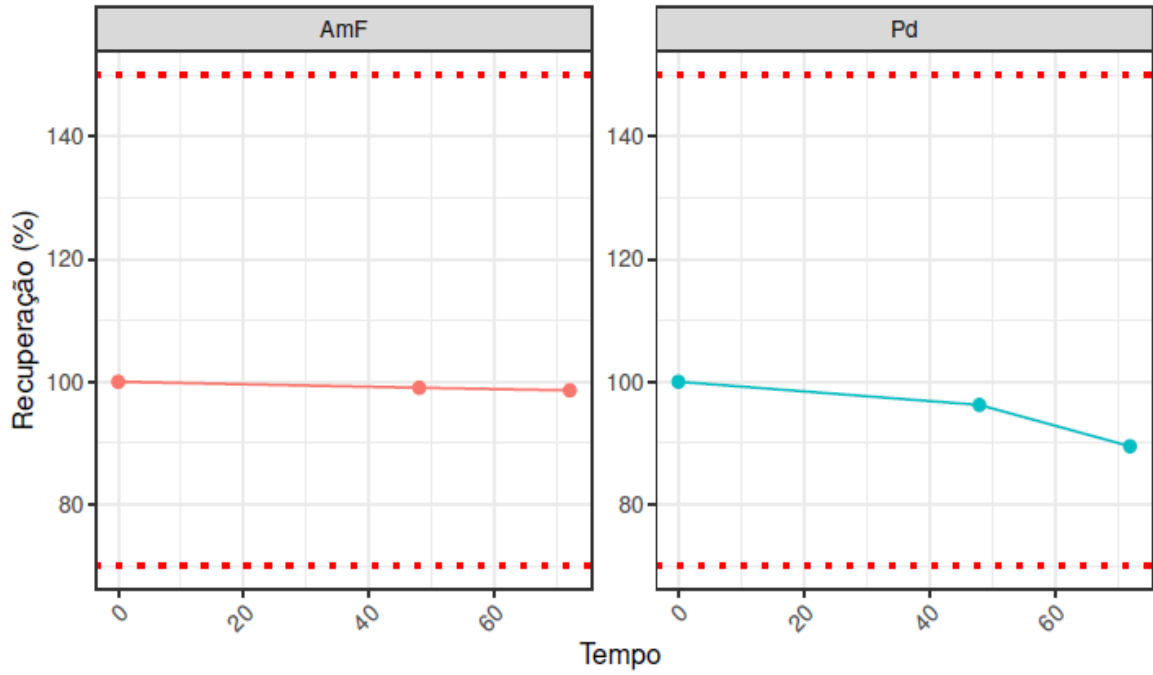


Figura 78. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Selênio (Se).

➤ **Elemento: Estanho (Sn)**

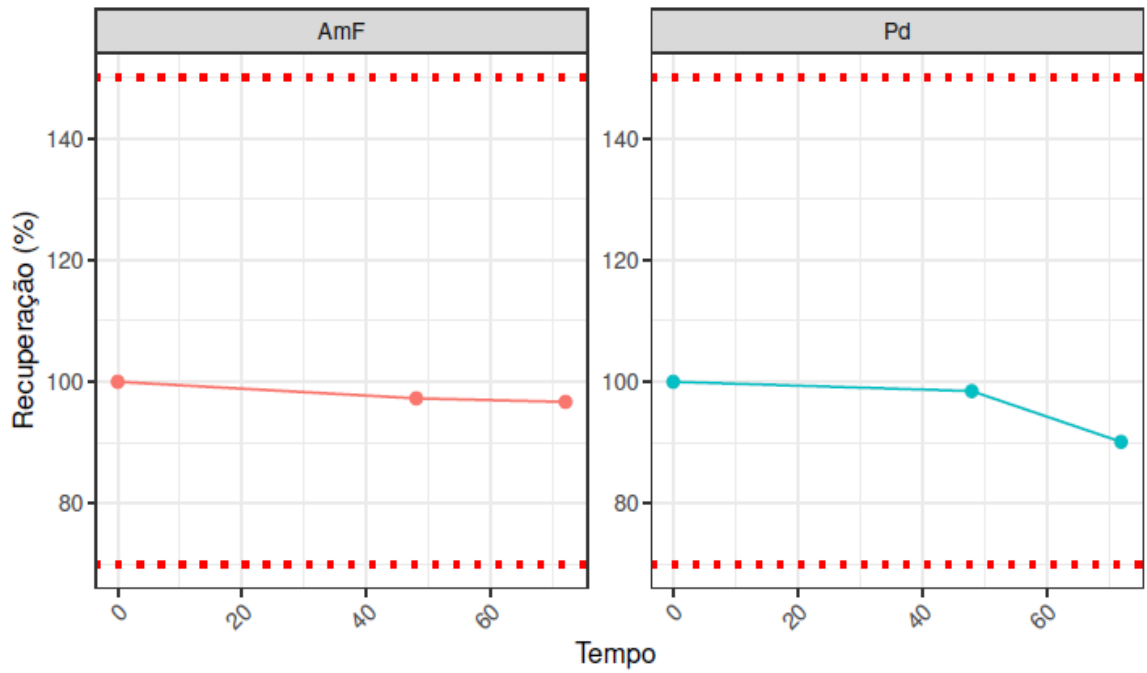


Figura 79. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Estanho (Sn).

➤ **Elemento: Tálcio (Tl)**

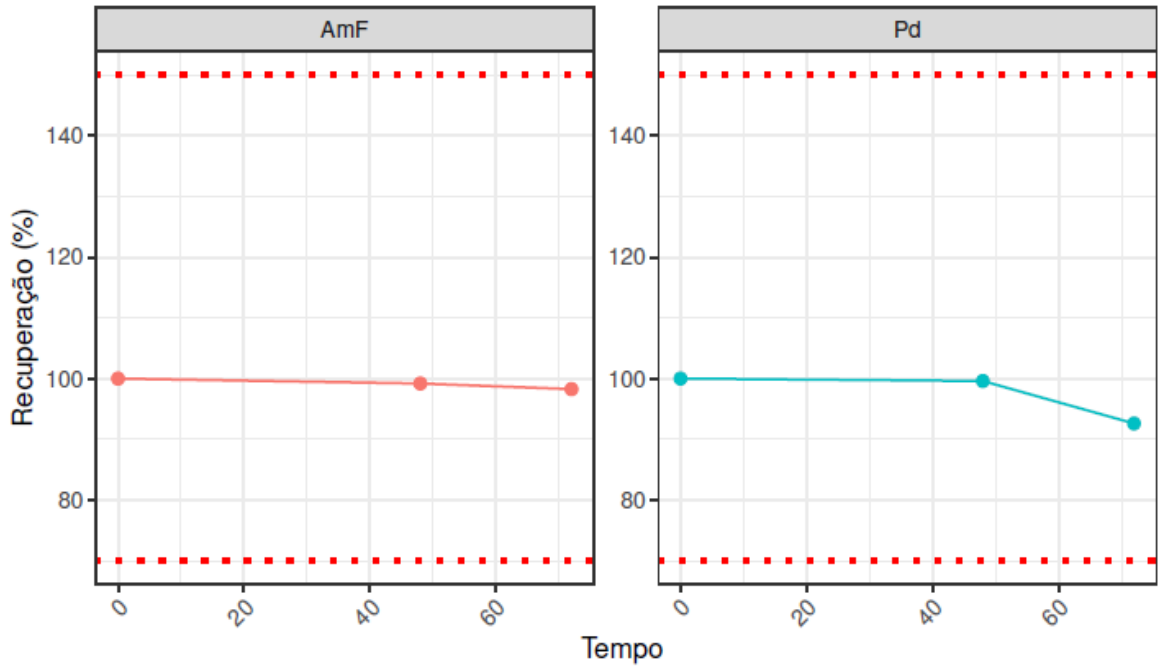


Figura 80. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Tálcio (Tl).

➤ **Elemento: Vanádio (V)**

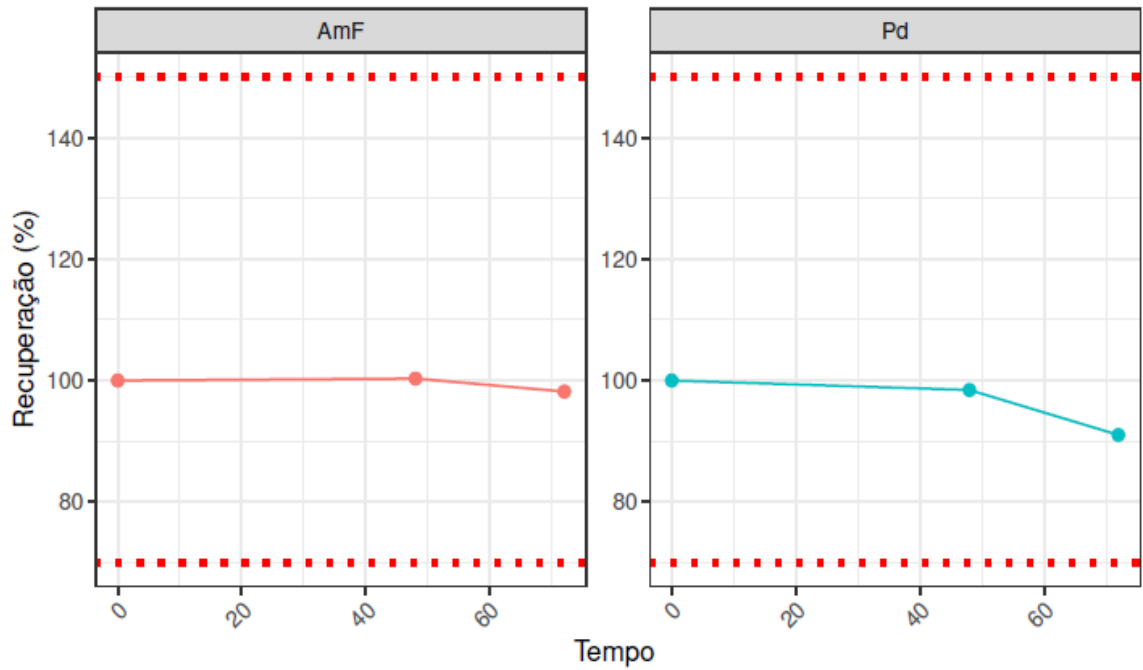


Figura 81. Gráficos dos perfis de estabilidade da solução amostra fortificada (AmF) e solução padrão (Pd) do elemento Vanádio (V).

A análise de estabilidade das soluções, conduzida em conformidade com os 24 elementos controlados pelo guia ICH Q3D, evidenciou que, ao longo de 72 horas, apenas o paládio (Pd) apresentou resultados fora dos limites estabelecidos. Na solução amostra fortificada de paládio, observou-se alteração significativa após 20 horas; contudo, para assegurar a conformidade regulatória e a confiabilidade analítica, definiu-se o limite de estabilidade em 10 horas. **Considerando que o paládio integra a solução multielementar juntamente com outros 22 elementos avaliados, este tempo de 12 horas foi estendido a todos os elementos presentes na solução amostra fortificada.**

No caso da solução amostra fortificada de chumbo (Pb), a estabilidade foi mantida durante todo o período avaliado. Entretanto, para garantir uma margem de segurança adequada, estabeleceu-se o limite de estabilidade em 24 horas.

Por sua vez, a solução padrão apresentou estabilidade satisfatória para todos os elementos durante as 72 horas de monitoramento, sem risco de ultrapassar os limites de impurezas elementares definidos pelo guia ICH Q3D.

Dessa forma, conclui-se que a estabilidade da solução amostra fortificada deve ser considerada com restrições de 12 horas para os elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V, e de 24 horas para o chumbo. Já a solução padrão mantém estabilidade adequada por até 72 horas, assegurando a robustez metodológica, a confiabilidade dos resultados e a conformidade regulatória do estudo.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho consolidou o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por ICP-MS, fundamentada na abordagem AQbD, para a determinação de impurezas elementares em soluções injetáveis. A aplicação do DoE possibilitou a avaliação sistemática dos efeitos das variáveis críticas, apoiada pelo diagrama de Ishikawa e complementada pelo FMEA, assegurando maior robustez e confiabilidade ao processo.

A metodologia validada demonstrou conformidade com os requisitos da legislação, USP <730>, atendendo plenamente aos parâmetros de linearidade, repetibilidade, exatidão e limite de quantificação. A robustez foi confirmada em diferentes matrizes — suspensão injetável, solução oftálmica e suspensão oftálmica — evidenciando a aplicabilidade do método em cenários distintos e de relevância prática.

Os resultados obtidos comprovam que o método desenvolvido é preciso, confiável e regulatoriamente aceitável, garantindo a detecção e quantificação adequada de impurezas elementares em produtos farmacêuticos. Além disso, o objetivo central do mestrado profissional, que consistia em validar e internalizar essas análises no setor, foi plenamente atingido. Dessa forma, o trabalho contribui para a autonomia analítica, o fortalecimento do controle de qualidade e a promoção da segurança dos pacientes, alinhando-se às melhores práticas internacionais.

5. REFERÊNCIAS

ANTÔNIO, Daphne Chiara. Quantificação de arsênio e mercúrio em matrizes ambientais na região da Mina D'Água em Nova Lima-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 58., 2018, São Luís. Anais [...]. São Luís: Associação Brasileira de Química, 2018. Disponível em: <https://www.abq.org.br/cbq/2018/trabalhos/1234.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2026.

ANTONY, J. Design of experiments for engineers and scientists. 2º Ed. School of Management and Languages, Heriot-Watt University, Edinburgh, Scotland, UK: Editora Elsevier. 2014.

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. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf. Acesso em: 12 jan. 2026.

FUKUDA et al. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. 2018.

GARCIA, M.O; Preparo de amostras e análise elementar de produtos farmacêuticos. Dissertação de Mestrado Profissional em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 116, 2016.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Guideline: Validation of Analytical Procedures Q2(R2). Geneva, 2022. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>. Acesso em: 12 jan. 2026.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Guideline: Guideline for Elemental Impurities Q3D(R2). Geneva, 2020. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>. Acesso em: 12 jan. 2026.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Pharmaceutical Development Q8(R2). Geneva, 2009. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>. Acesso em: 12 jan. 2026.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Guideline: Quality Risk Management Q9(R1). Geneva, 2020. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>. Acesso em: 12 jan. 2026.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Guideline: Analytical Procedure Development Q14. Geneva, 2022. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>. Acesso em: 12 jan. 2026.

KILPELAINEN, W. Experimental design as an optimization tool for inductively coupled mass spectrometry methods. University of Helsinki Chemistry and Molecular Sciences. June 30, 2020.

LANOT et al. Optimization of ICP-MS internal standardization for 26 elements by factorial design experimente. Pharmacokinetics and Toxicology Laboratory, Toulouse University Hospital, Toulouse, France. CHU Limoges, P&T, INSERM UMR1248, University of Limoges, Limoges, France. 2023.

LORENCATTO, Rodolfo. Diluição de aerossol como alternativa para amostragem direta na determinação de impurezas elementares em medicamentos líquidos por ICP-MS. 2020. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Química e Bioquímica) - Instituto de Química, Universidad de São Paulo, São Paulo, 2020. doi:10.11606/D.46.2020.tde-04082021-133740. Acesso em: 2025-01-03.

MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments. 8ª Ed. Arizona State University: Editora Wiley. John Wiley & Sons, Inc. 2013.

MÜLLER, Aline L. H. Determinação de impurezas elementares em fármacos e estudo de interferências em ICP-MS após decomposição em sistema de alta pressão e por combustão iniciada por micro-ondas. UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. 2014.

NULI et al. Analytical quality by design (AQbD) based optimization of RP-UPLC method for determination of nivolumab and relatlimab in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2024.

PYHTILÄ, H. et Al. Development and optimization of a method for detecting low mercury concentrations in humic-rich natural water samples using a CV-ICP-MS technique. *Microchemical Journal*. 20 february, 2012.

REID et al. Analytical quality by design (AQbD) in Pharmaceutical development. *American Pharmaceutical review*. 27 August 2013.

ROCHA, Adriano Ferreira da. Cádmio, Chumbo, Mercúrio – A problemática destes metais pesados na Saúde Pública. Nome da Revista, ano 2008/2009. Disponível em: <<https://hdl.handle.net/10216/54676>>. Acesso em: 12 jan. 2026.

STEVEN W. Baertschi et al. Assessing mass balance in pharmaceutical drug products: new insights into an old topic. *Trends in Analytical chemistry* 49 (2013) 126-136.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter <232>: Elemental Impurities—Limits. In: USP 41 – NF 36. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter <233>: Elemental Impurities—Procedures. In: USP 41 – NF 36. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter <730>: Plasma Spectrochemistry. In: USP 41 – NF 36. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapter <1225>: Validation of Compendial Procedures. In: USP 41 – NF 36. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018.