UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de métodos empregando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) para determinação de impurezas elementares e especiação química de arsênio e mercúrio em fármacos e excipientes

Giovanna de Fatima Moreno Aguiar

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de métodos empregando a espectrometria de massas
com plasma acoplado (ICP-MS) para determinação de impurezas
elementares e especiação química de arsênio e mercúrio em
fármacos e excipientes**

Giovanna de Fatima Moreno Aguiar

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

GIOVANNA DE FATIMA MORENO AGUIAR

Avaliação de métodos empregando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) para determinação de impurezas elementares e especiação química de arsênio e mercúrio em fármacos e excipientes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Lemos Batista

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Aguiar, Giovanna de Fatima Moreno

Avaliação de métodos empregando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) para determinação de impurezas elementares e especiação química de arsênio e mercúrio em fármacos e excipientes. Ribeirão Preto, 2017.

118 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Lemos Batista

1. Fármacos. 2. Impurezas elementares. 3. ICP-MS. 4. DRC. 5. Especiação. 6. HPLC-ICP-MS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Giovanna de Fatima Moreno Aguiar

Avaliação de métodos empregando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) para determinação de impurezas elementares e especiação química de arsênio e mercúrio em fármacos e excipientes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Lemos Batista

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*"O dia mais belo: hoje
A coisa mais fácil: errar
O maior obstáculo: o medo
O maior erro: o abandono
A raiz de todos os males: o egoísmo
A distração mais bela: o trabalho
A pior derrota: o desânimo
Os melhores professores: as crianças
A primeira necessidade: comunicar-se
O que traz felicidade: ser útil aos demais
O pior defeito: o mau humor
A pessoa mais perigosa: a mentirosa
O pior sentimento: o rancor
O presente mais belo: o perdão,
o mais imprescindível: o lar
A rota mais rápida: o caminho certo
A sensação mais agradável: a paz interior
A maior proteção efetiva: o sorriso
O maior remédio: o otimismo
A maior satisfação: o dever cumprido
A força mais potente do mundo: a fé
As pessoas mais necessárias: os pais
A mais bela de todas as coisas: o amor!"*

Poema da paz - Madre Tereza de Calcutá

Dedico este trabalho...

A Deus,

por me conduzir, me amparar e me amar incondicionalmente. Sua presença me deu coragem para continuar. Que eu saiba transmitir o que me ensinaste, admitir que pouco sei e ter perseverança e humildade para aprender cada vez mais.

"Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar. Dê-me Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir."

São Tomás de Aquino

Aos meus pais, Carlos e Fatima,

por serem meu alicerce e minha motivação. Seus exemplos de dedicação e amor foram essenciais para a minha formação. Tenho um orgulho imenso de ser fruto desta união. Amo vocês.

Ao meu irmão Vinicius, que apesar das nossas diferenças, está sempre comigo, e é meu grande amigo.

Ao meu namorado Rodrigo, por estar ao meu lado, e ser uma inestimável companhia por estes muitos anos.

Aos meus amigos, em especial, ao Bruno Lemos, Jairo Lisboa e Eloísa de Paula, pela imensa ajuda e valiosa amizade.

"O tempo muito me ensinou.

Ensinou a amar a vida. Não desistir de lutar.

Renascer na derrota. Renunciar às palavras e pensamentos negativos.

Acreditar nos valores Humanos, e a ser otimista.

Aprenderi que mais vale tentar do que recuar.

Antes acreditar do que duvidar.

Que o que vale na vida, não é o ponto de partida e sim a nossa caminhada."

Cora Coralina

Agradeço a todos que colaboraram para a realização desta tese. Muito obrigada!

A Deus, por me conceder a vida, saúde, fé, sabedoria e determinação. Minha gratidão é eterna.

Aos meus pais, por serem minha base. Agradeço por me proporcionarem crescer em uma verdadeira família, fundamentada no amor e no respeito. Sei que hoje compartilham comigo esta conquista.

A meu irmão, pela companhia, pelos conselhos e orações.

Ao Rodrigo, pelo apoio e pela parceria em todos os momentos.

A todos os meus amigos, pela ajuda, torcida, incentivo e por todo auxílio dado nesta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Fernando Barbosa Júnior, pelos ensinamentos, conselhos e confiança. É uma imensa honra tê-lo como orientador.

À Vanessa Souza, técnica do laboratório, pela ajuda e dedicação. E a todos os integrantes do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo auxílio e apoio aos alunos, em especial à Ana Lúcia, Rosemary e Rosana, pela dedicação ao Programa de Pós Graduação em Toxicologia.

*"O sucesso nasce do querer,
da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis."*

José de Alencar

RESUMO

AGUIAR, G. F. M. **Avaliação de métodos empregando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) para determinação de impurezas elementares e especiação química de arsênio e mercúrio em fármacos e excipientes.** 2017. 118f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Com o aumento das exigências regulatórias e estabelecimento de limites mais restritos para impurezas elementares em fármacos e excipientes usados em formulações farmacêuticas, ocorreu uma busca por técnicas analíticas capazes de quantificar elementos em níveis traço e assegurar a qualidade e a segurança dos medicamentos. A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é uma técnica multielementar, que apresenta alta sensibilidade e é empregada com eficiência na análise de elementos traço em diferentes matrizes. O ICP-MS, acoplado a um sistema separador como o cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), possibilita a especiação de elementos químicos, o que é importante, pois a toxicidade pode estar diretamente ligada à forma química do elemento, como ocorre para o Hg e As. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar um método de análise simples, rápido e com alta sensibilidade, para determinação de 15 impurezas elementares: As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Hg, Os e Mo, em diferentes fármacos e excipientes, em níveis que atendam aos novos critérios estabelecidos pelos órgãos regulatórios, avaliar a utilização da cela de reação dinâmica (DRC) para eliminação de interferências espectrais na determinação de As, Cr e V, realizar a especiação de As e Hg, e aplicar esta metodologia para análise de diversas amostras comprovando sua robustez, versatilidade e vantagens para utilização em rotina. Foram avaliadas cinco estratégias de preparo de amostra: digestão em micro-ondas sistema fechado e digestão em micro-ondas - sistema aberto, digestão em banho-maria, diluição direta em meio ácido e extração utilizando ponteira de ultrassom. Através de ensaios de recuperação e materiais de referência certificados, os melhores resultados (84 a 101%) foram obtidos com a digestão das amostras em sistema fechado de micro-ondas e extração por ponteira de ultrassom. Os limites de detecção variaram entre 0,001 ng g⁻¹ (¹⁰³Rh) e 0,083 ng g⁻¹ (⁷⁵As). Em seguida, a metodologia analítica foi empregada para determinação dos elementos em estudo em 74 amostras de fármacos e excipientes. O elemento mais frequentemente encontrado foi o Cu, seguido por Cr, Mo, Ni, Pd e V. Já os elementos químicos Ir, Pt, Os e Ru não foram detectados. Cabe destacar que as concentrações de Pd, Rh, As, Cd, Cr, Cu, Ni, V e Mo encontraram-se acima do limite preconizado pela farmacopeia americana em algumas amostras. A análise por especiação química de As mostrou que as amostras possuíam apenas as formas inorgânicas e mais tóxicas. Em relação ao Hg, apenas uma amostra apresentou níveis detectáveis deste elemento, mas a concentração estava abaixo do limite estabelecido pela farmacopeia americana.

Palavras-chave: fármacos. impurezas elementares. ICP-MS. DRC. especiação. HPLC-ICP-MS.

ABSTRACT

AGUIAR, G. F. M. **Evaluation of methods using coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for determination of elemental impurities and chemical speciation of arsenic and mercury in drugs and excipients.** 2017. 118f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Due to quality and safety reasons, regulatory requirements and establishment of more restricted limits for elemental impurities in drugs and excipients are increasing. These regulations promoted a search for simple and robust analytical techniques for quantification of trace elements. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is an attractive technique for this purpose, presenting multielement and high sensitivity capabilities. ICP-MS can be hyphenated to separation techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC), enabling chemical speciation analysis. Speciation analysis may reveal the chemical form of the element that may be more directly related to the toxicity. In this sense, the objectives of this work were to develop and validate a simple, fast and highly sensitive method for the determination of 15 elemental impurities: As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Ir, Pd, Rh, Ru, Hg, Os and Mo, in different drugs and excipients, at levels that meet the new criteria established by the regulatory agencies. We also evaluated the use of the dynamic reaction cell (DRC) to eliminate spectral interferences for As, Cr And V. Finally, for As and Hg, speciation methods were applied. All analysis were performed focusing on robustness, versatility and sample high-throughput. We tested five sample preparation strategies: closed microwave system digestion, microwave digestion – open system, water bath digestion, direct acid dilution and ultrasound probe extraction. Recovery studies in ordinary samples and reference certified materials were observed with the closed microwave digestion system and ultrasound probe extraction (84 and 101%). Detection limits ranged from 0.001 ng g^{-1} for ^{103}Rh to 0.083 ng g^{-1} for ^{75}As . The analytical methodology was then applied for the determination of the elements in study in 74 samples of drugs and excipients. The most frequently found element was Cu, followed by Cr, Mo, Ni, Pd and V. The chemical elements Ir, Pt, Os and Ru were not detected. It should be mention that the concentrations of Pd, Rh, As, Cd, Cr, Cu, Ni, V and Mo were above the limit recommended by the American pharmacopeia in some samples. Only inorganic arsenic (most toxic forms) was found in samples by applying speciation analysis. Regarding Hg, only one sample had detectable levels of this element, but the concentration was below the limit established by the American pharmacopeia.

Keywords: drugs. elemental impurities. ICP-MS. DRC. speciation. HPLC-ICP-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prováveis fontes de contaminação por impurezas elementares durante o processo de produção de medicamentos	02
Figura 2 – Esquema da ponteira de ultrassom utilizada para preparo das amostras	48
Figura 3 - Avaliação da concentração de ácido nítrico a ser utilizada para extração das amostras por ponteira de ultrassom	71
Figura 4 - Avaliação do tempo a ser utilizado para a extração das amostras por ponteira de ultrassom	72
Figura 5 - Concentrações equivalentes ao sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões de H_2 (a esquerda) e razão entre a intensidade e sinal de fundo em função da variação do RPq (a direita) para a determinação de ^{75}As	74
Figura 6 - Concentrações equivalentes ao sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões de NH_3 (a esquerda) e razão entre a intensidade e sinal de fundo em função da variação do RPq (a direita) para a determinação de ^{52}Cr e ^{51}V	74
Figura 7 - Frequência dos elementos avaliados em 74 amostras de fármacos e excipientes	79
Figura 8 - Distribuição das impurezas elementares, em relação a quantidade de elementos, presentes nas amostras de fármacos	86
Figura 9 - Distribuição das impurezas elementares, em relação a quantidade de elementos, presentes nas amostras de excipientes	87
Figura 10 - Distribuição das amostras de insumos farmacêuticos (fármacos e excipientes) em relação ao país de origem do fabricante	91
Figura 11 - Distribuição das amostras de insumos farmacêuticos (fármacos e excipientes), de acordo com a localidade de origem do fabricante, nas diferentes divisões administrativas da China	92

Figura 12 - Cromatograma da amostra padrão de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ com as espécies de arsênio avaliadas – arsênio inorgânico As^{3+} e As^{5+} , dimetil-arsênio (DMA) e monometil-arsênio (MMA)	97
Figura 13 - Cromatogramas das amostras de sulfato de gentamicina B, demonstrando o pico de As^{5+} , com tempo de retenção de aproximadamente 7,5 minutos e hiclato de doxiciclina A, com pico que representa a espécie As^{3+} , com tempo de retenção de aproximadamente 2,5 minutos	99
Figura 14 - Cromatograma da amostra padrão de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ com as espécies de mercúrio avaliadas – inorgânico (i-Hg), metil mercúrio (MeHg) e etil mercúrio (EHg)	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Impurezas elementares, cujos limites estão sendo reduzidos, e seus principais efeitos tóxicos, relacionados, em alguns casos, a forma química	16
Tabela 2 - Classificação das impurezas elementares e concentrações limite propostas pelos guias do EMA e ICH (Guia Q3D), considerando a exposição por via oral	20
Tabela 3 – Principais guias e compêndio internacionais que tratam sobre impurezas elementares em fármacos e produtos farmacêuticos e data de publicação ou revisão	22
Tabela 4 - Interferentes espectrais de isótopos dos elementos em estudo e suas abundâncias	30
Tabela 5 - Classificação e procedência das 74 amostras de fármacos e excipientes avaliados, para determinação do perfil de impurezas elementares e aplicação do método, após validação da metodologia analítica	43
Tabela 6 - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado para digestão em sistema fechado das amostras de fármacos analisadas por ICP-MS	46
Tabela 7 - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado para digestão em sistema aberto das amostras de fármacos analisadas por ICP-MS	46
Tabela 8 - Parâmetros operacionais do ICP-MS modo padrão (Elan DRC II, PerkinElmer)	49
Tabela 9 - Parâmetros operacionais do DRC-ICP-MS (Elan DRC II, PerkinElmer)	51
Tabela 10 - Resultados (expressos em ng g^{-1}) obtidos na análise de 12 fármacos por diferentes estratégias de preparo: diluição direta (DD), banho-maria (BM) e digestão em micro-ondas - sistema aberto (SA)	58
Tabela 11 - Resultados obtidos na análise dos materiais de referência por diferentes estratégias de preparo: diluição direta (DD), banho-maria (BM) e digestão em micro-ondas - sistema aberto (SA)	60
Tabela 12 - Resultados de recuperação obtidos na análise de amostras adicionadas de padrão (concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$), por diferentes estratégias de preparo: diluição direta (DD), banho-maria (BM) e digestão em micro-ondas - sistema aberto (SA)	60

Tabela 13 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, As, Cd e Cr, em 21 fármacos, por diferentes estratégias de preparo: digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF) e ponteira de ultrassom (PU)	63
Tabela 14 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Cu, Pb, Ni, V, Mo, Hg e Os, em 21 fármacos, por diferentes estratégias de preparo: digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF) e ponteira de ultrassom (PU)	65
Tabela 15 - Resultados obtidos na análise dos materiais de referência por diferentes estratégias de preparo: digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF) e ponteira de ultrassom (PU)	67
Tabela 16 - Resultados de recuperação obtidos com amostras adicionadas de padrão (concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$), preparadas por digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF)	67
Tabela 17 - Resultados de recuperação obtidos com amostras adicionadas de padrão (concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$), preparadas por extração utilizando ponteira de ultrassom (PU)	68
Tabela 18 - Avaliação do DRC-ICP-MS e q-ICP-MS para análise de As, Cr e V em amostras de fármacos, resultados expressos em ng g^{-1}	75
Tabela 19 - Avaliação dos valores de coeficiente angular, coeficiente de correlação linear (r), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) no modo q-ICP-MS e no modo DRC-ICP-MS	76
Tabela 20 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e coeficiente de correlação linear (r) determinados por ICP-MS	77
Tabela 21 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, As, Cd e Cr, em fármacos e excipientes, por ICP-MS	80
Tabela 22 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Cu, Pb, Ni, V, Mo, Hg e Os, em fármacos e excipientes, por ICP-MS	83

Tabela 23 - Concentração limite ($\mu\text{g g}^{-1}$) de impurezas elementares para componentes de produtos farmacêuticos, fármacos e excipientes, administrados por diferentes vias, com dose máxima diária de 10 g e limites de quantificação da metodologia validada neste estudo, expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$	88
Tabela 24 - Fármacos e excipientes que apresentaram concentrações acima do limite proposto pela farmacopeia americana, considerando uma dose máxima diária de 10 g, e a via de administração, estabelecida pela farmacopeia, na qual o limite foi ultrapassado	89
Tabela 25 - Concentração (expressa em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) das espécies de arsênio – As^{3+} , As^{5+} , dimetil-arsênio (DMA) e monometil-arsênio (MMA), nas amostras de fármacos e excipientes	98
Tabela 26 - Resultados obtidos na determinação de As total por ICP-MS, e na determinação das espécies de arsênio – arsênio inorgânico As^{3+} e As^{5+} , por HPLC-ICP-MS, nas amostras de fármacos e excipientes	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AsB	Arsenobetaína
AsC	Arsenocolina
AFS	Atomic fluorescence spectrometry (Espectrometria de fluorescência atômica)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças)
BEC	Background Equivalent Concentration (Concentração equivalente de sinal de fundo)
BM	Banho-maria
BP	British Pharmacopeia (Farmacopeia britânica)
CV	Coeficiente de Variação
CV AAS	Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio)
CG	Cromatografia gasosa
DD	Diluição direta
DMA	Dimetil-arsênio
DMF	Drug Master File (Arquivo mestre de medicamento)
DP	Desvio padrão
DRC	Dynamic Reaction Cell (Cela de Reação Dinâmica)
EMA	European Medicines Agency (Agência Europeia de Medicamentos)
EHg	Etil mercúrio
EP	European Pharmacopeia (Farmacopeia europeia)
F AAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de absorção atômica com chama)
FB	Farmacopeia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration (Agência Americana de Administração de Alimentos e Medicamentos)
GF AAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite)
Hg ⁰	Mercúrio metálico ou elementar

HG AAS	Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (Espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)
i-Hg	Mercúrio inorgânico
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)
ICH	International Conference on Harmonisation (Conferência Internacional sobre Harmonização)
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente)
ICP OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente)
IFA	Insumo farmacêutico ativo
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeHg	Metil mercúrio
MMA	Monometil-arsênio
MSF	Sistema fechado de micro-ondas
m/z	Razão massa/carga
NIST	National Institute of Standard and Technology (Instituto Nacional de Padrão e Tecnologia)
o-Hg	Mercúrio orgânico
PDE	Permitted Daily Exposure (Exposição Diária Permitida)
PI	Potencial de ionização
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
ppt	Partes por trilhão
PU	Ponteira de ultrassom
PVC	Policloroeteno

r	Coeficiente de correlação linear de <i>Pearson</i>
r^2	Coeficiente de determinação
RF	Radiofrequência
SA	Sistema aberto de micro-ondas
SRC	Câmara de reação única
SRM	Standard Reference Material (Material de referência certificado)
TXRF	Total Reflection X-ray Fluorescence (Espectrometria de fluorescência de raios-X por reflexão total)
USP	United States Pharmacopeia (Farmacopeia americana)
WDXRF	Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence (Espectrometria de fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Impurezas Elementares	1
1.2 Requerimentos Regulatórios	17
1.3 Estratégias para o preparo de amostras	23
1.4 Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)	26
1.5 Cella de Reação Dinâmica (DRC)	32
1.6 Espectração química de mercúrio e arsênio pelo acoplamento HPLC-ICP-MS	35
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Instrumentação e Acessórios	40
3.2 Reagentes, soluções e limpeza de material	40
3.3 Preparo das amostras de fármacos e excipientes	41
3.3.1 Digestão em sistema fechado de micro-ondas	45
3.3.2 Digestão em micro-ondas - sistema aberto	46
3.3.3 Digestão em banho-maria	46
3.3.4 Diluição direta	47
3.3.5 Extração utilizando ponteira de ultrassom	47
3.4 Padrão interno	48
3.5 Condições instrumentais de operação do ICP-MS	49
3.6 Otimização da Cella de Reação Dinâmica (DRC)	50
3.7 Espectração de arsênio e mercúrio	51
3.8 Validação Analítica	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Estratégias de preparo de amostra	57
4.2 Otimização da extração utilizando ponteira de ultrassom	70
4.3 Utilização da cela de reação dinâmica para determinação de As, Cr e V.	73
4.4 Estudos de validação do método analítico	76
4.5 Aplicação da metodologia para análise de impurezas elementares em fármacos e excipientes	78
4.6 Espectração de arsênio e mercúrio	95
5 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Impurezas Elementares

É fundamental garantir a eficácia e a segurança de todo medicamento. A eficácia pode ser garantida por estudos clínicos e farmacológicos, *in vivo* e/ou *in vitro*, e a segurança deve ser determinada não somente pelo perfil farmacológico e toxicológico do fármaco, mas também pelo perfil de impurezas e produtos de degradação presentes na formulação, que muitas vezes, devido a sua toxicidade, superam os benefícios do medicamento. Portanto, é evidente que os produtos farmacêuticos devem passar por um rigoroso monitoramento, capaz de controlar estas substâncias, pois além de garantir a qualidade é de suma importância atestar a segurança aos pacientes (RAO; TALLURI, 2007; SINGH et al., 2012; WANG et al., 2000).

Nas últimas décadas a preocupação em relação aos produtos farmacêuticos está focada na determinação de impurezas e produtos de degradação. A presença destes compostos pode causar sérios problemas à saúde, desde reações alérgicas até carcinogenicidade e genotoxicidade. Para atender esta demanda, requerimentos regulatórios e compêndios oficiais como a farmacopeia americana estão sendo revisados para adotar critérios mais rígidos para estas substâncias e conseqüentemente, incentivar a utilização de técnicas analíticas mais sensíveis para a determinação de impurezas e produtos de degradação, que permitam um monitoramento pela indústria farmacêutica (EMA, 2008; HOLM; ELDER, 2016; ICH, 2014; RAO; TALLURI, 2007; SINGH et al., 2012; WANG et al., 2000).

Segundo definição do *International Conference on Harmonisation* (ICH), impureza é qualquer substância presente em um medicamento ou produto farmacêutico, que não seja quimicamente o próprio fármaco ou excipientes, e são classificadas em orgânicas, inorgânicas e solventes residuais. Impurezas orgânicas podem ser formadas durante o processo de fabricação e armazenamento do fármaco, excipiente ou produto farmacêutico, e incluem produtos de degradação, catalisadores, reagentes e subprodutos. Impurezas inorgânicas também podem se originar do processo de fabricação e compreendem reagentes, catalisadores, metais

pesados e outros metais residuais, sais inorgânicos e resíduos provenientes de filtros ou outros materiais usados no processo de fabricação. Solventes residuais são líquidos orgânicos ou inorgânicos, que se mantêm no insumo farmacêutico após o processo de síntese e processamento ou purificação (ICH, 2006; ICH, 2008; ICH, 2011; ICH, 2014).

A contaminação de fármacos e excipientes usados em produtos farmacêuticos, por impurezas elementares, pode ocorrer de diversas maneiras, intencionais ou acidentais, a partir de matérias-primas ou materiais de embalagem, reagentes, tanques, equipamentos, filtros e tubulações usadas durante o processo de síntese ou fabricação, exposição a partículas metálicas presentes no ar e principalmente pelo uso de catalisadores durante o processo de síntese. A figura 1 apresenta exemplos de fontes de contaminação, tais como, materiais, equipamentos e componentes típicos usados na produção de um medicamento. Cada uma destas fontes pode contribuir para a presença de impurezas elementares no produto final. Uma vez que estes elementos têm a habilidade de catalisar reações, não têm benefícios terapêuticos e apresentam potencial para toxicidade, é muito importante controlar suas concentrações e conhecer a rota de síntese dos insumos farmacêuticos e o processo de manufatura de formulações para prever quais destas impurezas poderão estar presentes e garantir seu controle (BALARAM, 2016; EMA, 2008; ICH, 2014; RAO; TALLURI, 2007; SINGH et al., 2012; WANG et al., 2000).

Figura 1 - Prováveis fontes de contaminação por impurezas elementares durante o processo de produção de medicamentos

Fonte: adaptado de ICH (2014).

Fármaco, também denominado como insumo farmacêutico ativo (IFA), ou simplesmente princípio ativo, é o componente farmacologicamente ativo destinado ao emprego em um medicamento. Produto farmacêutico ou medicamento, é um produto tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, é uma forma farmacêutica terminada que contém o fármaco, geralmente em associação com adjuvantes farmacotécnicos, também chamados de excipientes (ANVISA, 2017).

A toxicidade de impurezas elementares depende do elemento químico, do seu estado de oxidação, concentração, via e frequência de exposição (aguda ou crônica) e da via de administração (oral, parenteral e inalatória) (ICH, 2014). No caso da presença de impurezas em fármacos e excipientes, é importante atentar para o fato de que muitos medicamentos são usados de maneira contínua, no tratamento de doenças crônicas e/ou alterações metabólicas, como diabetes e hipertensão, o que aumenta a necessidade de uma avaliação e controle destas impurezas, pois o paciente estará exposto durante um longo período a esta medicação e consequentemente às impurezas presentes (EMA, 2008; ICH, 2014).

Alguns elementos são utilizados como princípios ativos de medicamentos com o objetivo de gerar benefício à saúde, como o lítio em fármacos antipsicóticos, platina em quimioterápicos, zinco em suspensões de insulina e ferro no tratamento de anemias. Outros podem ainda ser incorporados por alguns fármacos, como antimicrobianos, que podem conter ferro, prata e ouro, ou serem usados em contraste de exames de imagem (bário, ferro, manganês e sódio). Metais como platina e paládio são excelentes catalisadores amplamente utilizados na síntese de fármacos e podem estar presentes no produto acabado como resíduos de catalisador. Apesar do cuidado, as matérias-primas de uso farmacêutico podem ser contaminadas por condições ambientais ou como consequência de processos naturais, além disso, entram em contato com uma vasta gama de materiais durante a fabricação e processamento, e condições de armazenamento, como temperatura, radiação e tempo de armazenagem, também afetam a lixiviação. Quando presente nos medicamentos, as impurezas elementares podem afetar a estabilidade e consequentemente a vida útil da formulação, ao catalisar a degradação dos fármacos ou excipientes, levando à formação de produtos de degradação que podem apresentar toxicidade significativa (BALARAM, 2016).

Outro ponto importante é a presença de impurezas elementares em excipientes usados em produtos farmacêuticos. Praticamente todos os medicamentos contêm excipientes, que são adicionados com a finalidade de aumentar a aceitabilidade (como palatilizante e corantes), melhorar a estabilidade ou performance da formulação (antioxidantes, conservantes, espessantes, desintegrantes, diluentes), controlar a liberação, alterar absorção, distribuição, biotransformação, eliminação, etc. Tipicamente, os excipientes são os principais componentes de um medicamento, em quantidade, pois o fármaco está presente em quantidades relativamente pequenas, por este motivo, a escolha e controle de qualidade destas substâncias merece especial atenção principalmente pelo fato de muitos terem origem mineral, o que pode fazer com que contenham uma alta concentração de impurezas elementares (ELDER; KUENTZ; HOLM, 2016; LI et al., 2015).

Neste cenário, os efeitos tóxicos de alguns elementos têm sido frequentemente discutidos, e limites reduzidos, em fármacos e excipientes, estão sendo propostos de acordo com suas características e estudos toxicológicos, cabendo destaque para os seguintes elementos abaixo descritos (EMA, 2008; ICH, 2014):

Arsênio (As): presente em alimentos, solo, água e no ar, em diversas formas químicas, que apresentam diferentes toxicidades, tornando necessária a diferenciação entre as espécies (especiação química). Apresenta-se geralmente na forma de compostos inorgânicos trivalentes (trióxido de arsênio e arsenito de sódio) e pentavalentes (arsenato de sódio, pentóxido de arsênio e ácido arsênico). Os compostos orgânicos, como as formas metiladas, podem ser produzidos por biotransformação. Não apresenta função biológica conhecida em mamíferos. As formas inorgânicas mais relevantes em medicamentos, têm demonstrado efeitos genotóxicos, mas não mutagênico e são denominados carcinógenos humano (arsênio e compostos inorgânicos de As), grupo 1, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) (ATSDR, 2007a; IARC, 2012a; ICH, 2014). A exposição oral, às formas inorgânicas deste elemento químico, tem sido associada a câncer de pele, fígado, pulmão, rim e bexiga. Após a exposição por inalação, há evidências de um risco aumentado de câncer de pulmão. A pele (despigmentação e

queratose) e o trato gastrointestinal (náusea) são os alvos mais sensíveis aos efeitos adversos não-carcinogênicos após ingestão oral (IARC, 2012a; ICH, 2014). Alguns compostos de arsênio ainda são encontrados em medicamentos usados para tratar leucemia (SOIGNET et al., 2001).

Produtos de origem animal ou vegetal, tratados com praguicidas, fertilizantes ou aditivos alimentares, que contenham este elemento, podem expor a população, através da contaminação de alimentos, solos e águas (SILBERGELD; NACHMAN, 2008). O arsênio possui ampla absorção por via oral (80 a 90%), e é distribuído pelo organismo ligado às proteínas plasmáticas, podendo se acumular no fígado e rins, em exposições agudas e pelos, unhas e cabelos, em exposições crônicas. As formas inorgânicas podem sofrer metilação formando monometil-arsênio (MMA) e dimetil-arsênio (DMA). As^{5+} (arsenato) é reduzido pela enzima arsenato redutase a As^{3+} (arsenito), que apresenta maior toxicidade, e pode ser metilado a MMA e em seguida a DMA, pela enzima arsênio metil transferase (KLAASSEN, 2001). Os compostos inorgânicos são até 100 vezes mais tóxicos que as formas metiladas, porém as espécies intermediárias (MMA^{3+} e DMA^{3+}) podem ser mais tóxicas que as formas inorgânicas ao se ligarem a hemoglobina ou outras proteínas no sangue (APOSHIAN; APOSHIAN, 2006). As formas que apresentam maior toxicidade são: gás arsina, As^{3+} (arsenito) e As^{5+} (arsenato), compostos orgânicos metilados (MMA e DMA) têm toxicidade intermediária e compostos orgânicos, como arsenobetaína e arsenocolina, não apresentam toxicidade (HSUEH et al., 2002).

O mecanismo de toxicidade dos compostos trivalentes está relacionado à ligação com grupo tiol de enzimas, causando sua inibição, a forma pentavalente desacopla a fosforilação oxidativa mitocondrial, através da substituição do grupo fosfato na formação de trifosfato de adenosina. O As e seus compostos também podem produzir dano oxidativo, danos ao sistema de reparo do DNA e alteração no seu estado de metilação (NRC, 2001). A exposição crônica a este elemento pode causar problemas cardiovasculares e anemia (ATSDR, 2007a).

Cádmio (Cd): é um metal de transição, existente em apenas um estado de oxidação (Cd^{2+}), e encontra-se na natureza em formas minerais. Alguns sais são solúveis em água, tais como, cloreto, sulfato e nitrato de cádmio. São usados como

catalisadores em síntese orgânica e para hidrogenação de compostos, além de compor pigmentos e estabilizadores para plásticos. Tem demonstrado efeitos genotóxicos, mas não mutagênico. É considerado pela IARC um carcinógeno humano – Cd e compostos de cádmio (grupo 1 – IARC). Sua presença está associada a vários riscos à saúde, principalmente ao desenvolvimento de câncer de pulmão, rins e próstata. Apresenta uma meia-vida biológica de aproximadamente 30 anos, e pode se acumular no fígado e rins (ATSDR, 2012a; ICH, 2014; RAO; TALLURI, 2007). O rim é considerado o órgão-alvo na exposição ao Cd, sendo a excreção urinária de proteínas de baixo peso molecular um sinal característico de disfunção tubular renal. A concentração crítica de Cd renal utilizada na avaliação de risco baseia-se nos dados toxicológicos obtidos com os sais de Cd inorgânicos (CREWS, 1998). Exposição a pequenas concentrações de cádmio por um longo período pode causar redução da densidade óssea e aumento do risco de fraturas. A absorção no trato gastrointestinal, de qualquer forma química, é relativamente baixa quando comparada com a quantidade total de cádmio absorvida através da via inalatória. Para a exposição por inalação, o tamanho de partícula e a solubilidade em fluidos biológicos são os determinantes mais importantes da toxicocinética, sendo os rins e pulmões os alvos da toxicidade. Para avaliar os efeitos da exposição por via oral, a maioria dos estudos experimentais utiliza o Cd solúvel, íon Cd^{2+} , independentemente do sal inicial, e os rins e ossos são os órgãos mais afetados. Outros efeitos observados em humanos e/ ou animais incluem toxicidade reprodutiva, efeitos hepáticos, hematológicos e imunológicos. O Cd distribui-se pelo organismo ligado a grupos aniônicos, especialmente grupos sulfidríla, de proteínas, tais como, albumina e metalotioneína. A maior parte do cádmio ingerido ou inalado é transportado para o intestino, e a parte não absorvida, é excretada pelas fezes (ATSDR, 2012a).

As exposições ao Cd estão associadas também a um risco aumentado de insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral, doença arterial periférica, osteoporose, resistência à insulina e diabetes (WISEMAN et al., 2017). A lesão óssea, em exposições crônicas, é caracterizada por osteomalacia e osteoporose, que em sua forma mais severa é conhecida como doença de Itai-Itai, na qual os pacientes também apresentam anemia grave (NORDBERG et al., 2007).

Chumbo (Pb): ocorre em formas orgânicas e inorgânicas. Os compostos de Pb bivalentes incluem sais solúveis em água (acetato) e sais insolúveis (óxidos). Compostos orgânicos incluem os aditivos, utilizados em gasolina, Pb tetrametil e tetraetil, que sofrem rápida degradação na atmosfera e formam compostos inorgânicos que persistem na água e no solo. Nos seres humanos, a exposição ao chumbo pode causar efeitos sobre o sistema imunológico, cardiovascular, renal, reprodutivo e nervoso (ATSDR, 2007b; ICH, 2014). Atualmente, o uso predominante de chumbo é em baterias, outros usos são como, pigmentos, munições, soldas, ligas, como estabilizador em policloroeteno (PVC) e na fabricação de tintas, usadas na pintura de superfícies de aço e residências. Este elemento também foi utilizado em tubulações de água, sendo que, estes materiais, podem liberar continuamente o metal (NORDBERG et al., 2007).

Cerca de 5 a 15% do Pb é absorvido pelo trato gastrointestinal após a exposição por via oral. Mais de 90% do Pb absorvido é transportado pela corrente sanguínea ligado aos eritrócitos, podendo se acumular no tecido ósseo e dentes, com uma meia-vida biológica de 10 a 30 anos. Para a população adulta, os sistemas cardiovascular e renal são os mais afetados pela exposição ao Pb. Já para crianças os efeitos sobre o sistema nervoso central são os mais críticos, tais como, encefalopatia, diminuição da condução nervosa e déficits cognitivos. Os vários mecanismos moleculares, intracelulares e celulares que causam neurotoxicidade de chumbo incluem a indução de estresse oxidativo e interferência em canais dependentes de cálcio, que amplificam a apoptose de neurônios (REBELO; CALDAS, 2016). O chumbo exerce também sua toxicidade substituindo íons como Na^+ , Ca^+ e Mg^{2+} . Isso perturba o metabolismo e também altera vários outros processos, como adesão e sinalização celular, apoptose e liberação de neurotransmissores. Além disso, pode causar anemia, nefropatia aguda e crônica, doença cardíaca isquêmica e afetar a saúde reprodutiva (IYER; SENGUPTA; VELUMANI, 2015).

As manifestações cardiotóxicas incluem distúrbios elétricos cardíacos e sinais de degeneração vascular, função anormal do músculo liso vascular e complicações vasculares (GERALDES et al., 2016). Este elemento causa efeitos tóxicos no sangue, incluindo a inibição da síntese do heme, que afeta também outras células, e na reprodução masculina (qualidade do espermatozóide). Além

disso, o Pb pode atravessar a barreira placentária, podendo causar efeitos no sistema nervoso do feto, e durante a gestação e a lactação, o Pb presente nos ossos pode ser mobilizado e transferido para o feto ou lactante. O chumbo mostrou-se carcinogênico em experimentos com animais, mas há apenas evidências limitadas para carcinogenicidade em seres humanos. Compostos inorgânicos de Pb são classificados como prováveis carcinógenos humanos pela IARC (grupo 2A), e Pb é classificado como possível carcinógeno humano (grupo 2B). Na exposição por via inalatória, a absorção de Pb depende do tamanho de partícula e da solubilidade das espécies químicas deste elemento (NORDBERG et al., 2007).

Cobre (Cu): é um elemento de transição e tem dois principais estados de oxidação (Cu^{1+} e Cu^{2+}). É essencial para os seres humanos e animais, desempenha um papel vital em uma série de sistemas enzimáticos, atuando como cofator, e está intimamente ligado com o metabolismo celular, tendo um importante papel biológico nas reações de oxidação e redução, e na eliminação de radicais livres. Compostos de cobre são utilizados como catalisadores em reações de hidrogenólise e descarboxilação. O Cu é rapidamente absorvido após ingestão por via oral, sendo a absorção maior para os sais mais solúveis. Os dados sobre a absorção variam de 15 a 97%. A análise dos dados de segurança para animais e humanos indica que o Cu pode produzir efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal, fígado e rins, após a ingestão de maiores doses (ATSDR, 2004; EMA, 2008; ICH, 2014). Estudos experimentais relatam toxicidade induzida no fígado, rins e cérebro. Em ratos, a exposição oral resulta em anormalidades neurocomportamentais e disfunções hepáticas e renais, o fígado é o órgão mais vulnerável a toxicidade (KUMAR et al., 2015). Como o Cu é altamente reativo e, portanto, prejudicial para as células, se presente como íons livres, os níveis deste elemento intracelular são estritamente controlados por transportadores transmembrana (NORDBERG et al., 2007).

Cromo (Cr): encontra-se em uma variedade de estados de oxidação, sendo os mais importantes o Cr^0 , Cr^{2+} , Cr^{3+} e Cr^{6+} . O Cr^{2+} é facilmente oxidado e é usado como um agente redutor na síntese química. Cr^{6+} é um poderoso oxidante, o cromato e o dicromato são os mais conhecidos. Cr^{3+} é a forma mais abundante e

desempenha um papel importante no metabolismo da glicose. Deficiência de Cr^{3+} provoca alterações no metabolismo de glicose e lipídios e pode estar associada a diabetes, doenças cardiovasculares e desordens do sistema nervoso (ATSDR, 2012b; EMA, 2008; ICH, 2014). Fontes de cromo em fármacos podem incluir corantes (óxido de cromo e hidróxido de Cr – verdes - sendo intencionalmente adicionado), lixiviação de equipamentos ou material de embalagem e catalisadores. Geralmente estará presente na forma de Cr^0 ou Cr^{3+} , sendo que a forma mais tóxica (Cr^{6+}) pode ser usada como catalisador. Entretanto a toxicidade das formas químicas deste elemento depende da via de administração. A absorção intestinal de Cr^{3+} é baixa (até 2%) em humanos e animais. O Cr^{6+} apresenta uma biodisponibilidade em humanos, após administração oral, de cerca de 5%. A maioria do Cr ingerido, não é absorvida e é excretada através das fezes. Porém, o Cr^{6+} pode formar cromato (CrO_4^{2-}), que penetra facilmente em todas as células através da proteína de canal iônico, por sua semelhança estrutural com fosfatos e sulfatos e é facilmente absorvido pelos tecidos. Os órgãos alvo são o fígado, rins e o sistema hematopoiético. O mecanismo de ação parece estar relacionado a oxidação de tecidos biológicos devido a formação de radicais livres. O Cr^{6+} , demonstrou ser genotóxico em vários ensaios com administração por via inalatória, e estudos epidemiológicos mostraram carcinogenicidade no trato respiratório, no entanto, não existe evidência de carcinogenicidade em estudos em ratos com administração por via oral. Isto deve-se ao fato de que o Cr^{6+} é reduzido a Cr^{3+} no trato gastrointestinal e, deste modo, apenas as ingestões que excedem a capacidade de redução no estômago irão resultar em absorção significativa de Cr^{6+} através da mucosa gastrointestinal (ATSDR, 2012b; EMA, 2008; ICH, 2014).

A exposição a compostos de Cr^{6+} é a principal fonte de efeitos adversos agudos e crônicos, sendo frequente as reações alérgicas de pele e ulcerações da mucosa do septo nasal. A exposição prolongada por inalação a vários compostos de Cr^{6+} demonstrou resultar num risco elevado de carcinomas dos órgãos respiratórios, sendo que, alguns destes compostos quando inalados, parecem estar entre os carcinógenos humanos mais potentes. Diante disto, os efeitos tóxicos de compostos de Cr^{6+} foram revisados pela IARC e este elemento e seus compostos foram classificados como carcinogênicos para humanos (grupo 1) (NORDBERG et al., 2007).

Mercúrio (Hg): é um elemento amplamente existente no ambiente, em três formas: mercúrio elementar (Hg^0) ou metálico, inorgânico (i-Hg) e orgânico (o-Hg), geralmente representado pelo metil mercúrio (MeHg). A forma mais provável de mercúrio residual em fármacos é a forma inorgânica, portanto, a avaliação de segurança geralmente baseia-se em dados toxicológicos de Hg elementar ou inorgânico e não se aplica ao o-Hg, que é a forma mais tóxica deste elemento. Não há dados que indiquem que o Hg e compostos inorgânicos são carcinógenos humanos (grupo 3 – IARC), mas ele pode induzir diferentes efeitos tóxicos sobre o sistema neurológico e renal, além de doenças cutâneas (ATSDR, 1999; ICH, 2014).

Em relação à absorção, cerca de 7% do i-Hg é absorvido por via gastrointestinal, menos de 0,01% do Hg^0 e aproximadamente 95% do MeHg é rapidamente absorvido por esta via, acumulando-se no cérebro por um longo período, onde exerce importantes efeitos tóxicos, e possui meia-vida biológica de cerca de 50 dias (LANNACCONE, 2001; PRUSZKOWSKI; NEUBAUER; THOMAS, 1998). Os principais efeitos tóxicos são sobre os sistemas: gastrointestinal, renal, músculo-esquelético, hepático, cardiovascular e neurológico, sendo o o-Hg responsável por quadros de neurotoxicidade (EBDON, 2001; SEILER; SIGEL; SIGEL, 1987). No sistema nervoso central, um dos mecanismos aceitos para explicar os efeitos tóxicos do MeHg, é a formação de um complexo, devido a ligação com grupos sulfidril da cisteína, levando a depressão da síntese proteica e degeneração de neurônios (KLAASSEN, 2001). O i-Hg também pode se ligar a cisteína, formando um complexo semelhante à cistina, e causar efeitos tóxicos sobre os rins, como lesão glomerular e danos aos túbulos renais (KLAASSEN, 2001). O mercúrio pode atravessar a placenta e atingir o feto, que é muito suscetível aos efeitos tóxicos, principalmente durante a organogênese, fato que atraiu grande atenção para as questões de saúde das mulheres e crianças, em todo o mundo. Estudos relataram que a exposição pré-natal ao MeHg, que pode estar presente em peixes e frutos do mar, está associada com baixo peso ao nascer, atraso no desenvolvimento neurológico, crescimento e desenvolvimento da criança, além de diminuição da função motora, capacidade de atenção, habilidades verbais, memória e outras funções mentais. Hg^0 foi utilizado por muitos anos na odontologia, em restaurações dentárias (amalgama contendo cerca de 50% de Hg), porém concluiu-se que não existe evidência científica sólida para estabelecer uma relação causal

entre este uso e efeitos adversos à saúde, exceto em alguns casos raros de hipersensibilidade, que podem ser gerados por polimorfismo genético. A exposição ao Hg pode ocorrer por inalação (vapor de Hg metálico/ Hg ionizado), ingestão (MeHg), através da pele devido ao uso de produtos cosméticos (cremes clareadores) e uso de injeções/ vacinas contendo timerosal (etil mercúrio), usado apenas em alguns países. Preocupações sobre a exposição a qualquer forma química são agravadas quando consideramos a carga total de Hg acumulada. Portanto, para salvaguardar o desenvolvimento neurológico de crianças e proteger a população, é importante que todas as formas de exposição ao Hg, inorgânico ou orgânico sejam identificadas e reduzidas (HA et al., 2017). Para prever os efeitos tóxicos relacionados à exposição a este elemento, é importante identificar e quantificar a espécie química presente, por este motivo, é crescente o interesse na especiação química de mercúrio (AZEVEDO, 2003).

Molibdênio (Mo): os principais estados de oxidação são Mo^{4+} e Mo^{6+} , a forma predominante é o íon molibdato, que forma compostos solúveis com uma variedade de cátions. Está presente em vegetais, laticínios e carnes, e alguns compostos são utilizados como catalisadores em síntese orgânica e como pigmentos. É um elemento essencial e sua deficiência é caracterizada por cegueira noturna, náusea, desorientação, taquicardia e diversas anormalidades bioquímicas. Na forma de trióxido de Mo, não apresenta efeito mutagênico. Exposição por via oral apresenta baixa toxicidade, mas existem evidências de carcinogenicidade em ratos quando o Mo é administrado por via inalatória. A absorção gastrointestinal depende da forma química, sendo que formas solúveis alcançam até 93% de absorção, mas sofrem interação com cobre e sulfatos presentes na dieta (EMA, 2008; ICH, 2014).

Nos seres humanos, Mo é um ativador de três enzimas: sulfito oxidase, xantina oxidase e aldeído oxidase, que estão envolvidas na oxidação de sulfito a sulfato, na produção de ácido úrico e na oxidação de aldeídos. No entanto, em exposições elevadas, observa-se a toxicidade deste elemento. Além do Mo existente naturalmente, existe a contribuição antropogênica devido a mineração e uso industrial, como componente de ligas de aço. Este elemento também é encontrado em uma série de produtos, incluindo suplementos nutricionais, produtos para cuidados de plantas e produtos de limpeza doméstica (HAYS et al., 2016). As

maiores concentrações de molibdênio são encontradas nos rins, fígado e ossos. A excreção, principalmente na urina, é rápida e a meia-vida biológica varia de algumas horas a dias. Em animais de laboratório, o excesso de Mo pode originar alterações morfológicas e funcionais no fígado, rins e no baço e podem ocorrer deformidades ósseas (NORDBERG et al., 2007).

Níquel (Ni): é um elemento de transição, pode ter as valências 0, I, II e III, mas o seu estado de oxidação principal é o Ni^{2+} . Ocorre naturalmente em várias formas, geralmente os compostos mais solúveis (cloreto, sulfato e nitrato) tendem a ser mais tóxicos que as formas menos solúveis (óxido de níquel). Em geral, os compostos de Ni mais solúveis são mais absorvidos, em jejum até 50% podem ser absorvidos no trato gastrointestinal, mas a extensão da absorção pode ser reduzida na presença de alguns constituintes de alimentos, tais como, ácido ascórbico, taninos e fosfatos. Não é essencial para os seres humanos, mas a deficiência de Ni pode causar efeitos adversos em animais. É genotóxico, mas não é mutagênico e é classificado como carcinógeno humano – grupo 1, IARC. Em combinação com o alumínio, é utilizado como catalisador em reações de hidrogenação. O maior uso de Ni é na produção de aço inoxidável (contém de 5% a 30% de Ni), utilizado na fabricação de tanques, equipamentos industriais, médicos e automotivos. Nos homens e animais, a ingestão de grandes quantidades de Ni pode causar dor de estômago, perda de peso corporal e efeitos adversos sobre o sangue e rins. Os seres humanos geralmente tornam-se sensibilizados ao Ni após contato prolongado com a pele, reações de sensibilidade e dermatite de contato alérgica são frequentes, especialmente em mulheres (possivelmente devido ao uso de brincos contendo Ni). Há evidências que sugerem que a ingestão de níquel pode contribuir para a exacerbação de eczemas em indivíduos sensibilizados (ATSDR, 2005; EMA, 2008; IARC, 2012b; ICH, 2014).

A preocupação com a exposição ao níquel varia de questões de dermatite de contato alérgica até aos cânceres pulmonares e nasais. A exposição a compostos de Ni solúveis, que normalmente não fornecem evidência de carcinogenicidade em estudos epidemiológicos, aumentou a incidência de tumores quando a exposição ocorreu simultaneamente ao Ni moderadamente solúvel e ao fumo do tabaco. Este elemento também pode ser absorvido por inalação ou em

contato com a pele. A geração de nano partículas, contendo Ni, é uma preocupação recente no campo da toxicologia, pois estes materiais estão sendo amplamente utilizados em muitos campos, incluindo biomedicina, eletrônica e engenharia de materiais, e na fabricação de artigos esportivos, roupas resistentes a manchas e protetores solares. A inalação é a via de exposição mais significativa para os compostos de Ni, e está associada a alterações respiratórias que variam de irritação e inflamação a bronquite, fibrose pulmonar, asma e edema pulmonar. A exposição a este elemento também está relacionada a doenças renais e cardiovasculares, porém a carcinogenicidade de alguns compostos de Ni é o aspecto mais preocupante da exposição (MUÑOZ; COSTA, 2012).

O Ni é relatado como a causa mais frequente de alergia de contato, afetando cerca de 30% da população com uma incidência crescente, especialmente em mulheres que tiveram anteriormente perfuração da pele para utilização de brincos. O contato dérmico do metal ativa respostas imunes e reações cutâneas como urticária, eczema, eritema e prurido. Este elemento também apresenta toxicidade sobre o sistema reprodutivo (NORDBERG et al., 2007).

Paládio (Pd): existe em três estados de oxidação Pd^0 (metálico), Pd^{2+} e Pd^{4+} , é um dos seis elementos do grupo da platina (grupo VIII). Pode formar compostos organometálicos com pouco uso industrial, mas é muito utilizado como catalisador em reações de hidrogenação, e já foi utilizado na odontologia (fabricação de coroas e pontes). Vários testes de mutagenicidade com diferentes compostos de Pd apresentaram resultados negativos. A toxicidade depende da via de administração, sendo que, a absorção por via oral é baixa. Foi demonstrado que compostos de Pd podem causar irritação ocular e reações de sensibilização da pele. Não há dados suficientes em relação aos efeitos sobre a reprodução (EMA, 2008; ICH, 2014).

Fármacos anticarcinogênicos à base de platina, cisplatina e carboplatina, estão entre os quimioterápicos mais prescritos, no entanto apresentam efeitos secundários, tais como, neurotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Diante disto, muitas pesquisas propõem a utilização de compostos de Pd com boa atividade antitumoral e menos efeitos colaterais que os compostos de platina (ALAM; HUQ, 2016).

Platina (Pt), Irídio (Ir), Ósmio (Os), Ródio (Rh) e Rutênio (Ru): são elementos de transição do grupo VIII, sendo que, Pt é o elemento mais importante deste grupo, e Pt e Pd são os mais reativos do grupo. Platina catalisa muitas reações de oxidação-redução e é amplamente utilizada na indústria, porém os demais elementos deste grupo também são usados como catalisadores. Complexos de platina exibem vários estados de oxidação, mas os principais são Pt^{2+} e Pt^{4+} . Irídio pode ocorrer nos estados de oxidação de I a IV, Rh nos estados de oxidação I, II e III (sendo Rh^{3+} o mais comum), compostos de Os e Ru exibem vários estados de oxidação, sendo III, IV e VI os mais comuns para Os e II, III e IV para Ru. A toxicidade destes compostos depende da via de administração. Dados experimentais sobre carcinogenicidade de compostos deste grupo e dados toxicológicos, sobre as formas susceptíveis de estarem presentes em produtos farmacêuticos, são limitados (EMA, 2008; ICH, 2014).

A absorção gastrointestinal de sais de Pt é extremamente baixa e a toxicidade aguda dos seus sais depende da solubilidade em água (os sais mais solúveis são os mais tóxicos). Alguns sais de platina solúveis foram relatados como sendo mutagênicos *in vitro*, porém outros compostos, como os clorados, podem causar reações alérgicas, incluindo dermatite de contato da pele e distúrbios respiratórios que vão desde espirros, falta de ar e cianose até asma grave. A cisplatina e carboplatina, são amplamente empregadas na quimioterapia devido a sua atividade antitumoral, porém outros complexos contendo ródio ou rutênio também são utilizados (EMA, 2008; ICH, 2014).

A exposição a Ir, Os, Rh e Ru, pode causar hipersensibilidade com sintomas respiratórios e dermatite de contato (ICH, 2014). O tetraóxido de Os (OsO_4) é um poderoso oxidante, volátil e tóxico, utilizado na síntese química, é um irritante grave dos olhos e do trato respiratório (EMA, 2008, ICH, 2014).

Vanádio (V): está presente como um elemento traço na crosta terrestre e pode existir em vários estados de oxidação (V^{1+} , V^0 , V^{2+} , V^{3+} , V^{4+} e V^{5+}). Também está presente em pequenas quantidades na maioria dos organismos biológicos, na forma de vanadato (VO_3^-) e vanadil (VO_2^+), as populações humanas têm concentrações séricas variáveis, mas apesar da sua presença constante, ainda não foi estabelecida uma função biológica para o vanádio em seres humanos. O V tem

mostrado efeitos benéficos no tratamento de osteoporose, osteopenia e diabetes, o sulfato de vanádio é utilizado em suplementos alimentares para promover o crescimento muscular e o óxido de vanádio é utilizado como catalisador na produção de ácido sulfúrico. Apresenta baixa absorção, após administração por via oral em humanos, sendo que, somente de 1 a 5% é excretado pela urina. Uma variedade de estudos de toxicidade foram realizados em animais, e os principais órgãos-alvo são o sistema digestivo, cardiovascular, rins e sangue. O V é genotóxico, mas não mutagênico, sendo que o pentóxido de vanádio é classificado como possível carcinógeno humano, grupo 2B - IARC (ATSDR, 2012c; EMA, 2008; ICH, 2014).

Após absorvido, o V é amplamente distribuído no organismo, depositando-se principalmente nos ossos, rins, fígado e baço, e os ossos mantêm concentrações inalteradas deste elemento durante várias semanas. Os efeitos locais em animais experimentais são principalmente observados no trato respiratório, incluindo bronquite e pneumonia, e os efeitos sistêmicos ocorreram no fígado, rins, sistema nervoso, sistema cardiovascular e nos órgãos hematopoiéticos. Os efeitos metabólicos incluem interferência com a biossíntese de cistina e colesterol, depressão e estimulação da síntese de fosfolipídios e, em concentrações mais elevadas, inibição da oxidação da serotonina (NORDBERG et al., 2007).

Este elemento foi reconhecido como um poluente potencialmente perigoso para os seres humanos, pois embora seja um elemento traço essencial para organismos vivos, quantidades excessivas podem causar asma, rinite e anemia e até aumentar a possibilidade de ocorrência de uremia e câncer de pulmão. A poluição do solo, devido a atividade agrícola, e a acumulação de V através da cadeia alimentar, estão diretamente relacionadas à segurança e à saúde humana. Na China, um dos grandes produtores de insumos farmacêuticos, a produção anual de vanádio é mais de 70.000 toneladas, uma das maiores do mundo (YANG et al., 2017).

A tabela abaixo apresenta um resumo dos principais efeitos tóxicos destes elementos, que justificam a implementação de limites restritos para a presença destas impurezas elementares em fármacos e excipientes.

Tabela 1 - Impurezas elementares, cujos limites estão sendo reduzidos, e seus principais efeitos tóxicos, relacionados, em alguns casos, a forma química

Impureza Elementar	Principais efeitos tóxicos
Arsênio (As)	Formas inorgânicas - efeitos genotóxicos, não mutagênico, carcinógeno humano (grupo 1 – IARC); Toxicidade: gás arsina > As^{3+} e As^{5+} , compostos orgânicos metilados (MMA e DMA) - toxicidade intermediária e compostos orgânicos (arsenobetaína e arsenocolina) - não apresentam toxicidade;
Cádmio (Cd)	Efeitos genotóxicos, não mutagênico, carcinógeno humano (grupo 1 – IARC);
Chumbo (Pb)	Compostos inorgânicos - prováveis carcinógenos humanos (grupo 2A – IARC); Efeitos sobre o sistema imunológico, cardiovascular, renal, reprodutivo e nervoso;
Cobre (Cu)	Efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal, fígado e rins;
Cromo (Cr)	Cr^{6+} - carcinógeno humano (grupo 1 - IARC), reações alérgicas;
Mercúrio (Hg)	Não há dados que indiquem que Hg e seus compostos inorgânicos são carcinógenos humanos (grupo 3 – IARC), pode induzir efeitos tóxicos sobre o sistema neurológico e renal, e doenças cutâneas; Mercúrio orgânico é a forma mais tóxica deste elemento;
Molibdênio (Mo)	Exposição por via oral apresenta baixa toxicidade;
Níquel (Ni)	Efeitos genotóxicos, não mutagênico, carcinógeno humano (grupo 1 – IARC), é a causa mais frequente de alergias de contato;
Paládio (Pd)	Irritação ocular e reações de sensibilização da pele;
Platina (Pt)	Alguns sais são mutagênicos <i>in vitro</i> , outros compostos, causam reações alérgicas (dermatite de contato e distúrbios respiratórios);
Írídio (Ir), Ósmio (Os), Ródio (Rh) e Rutênio (Ru)	Reações de hipersensibilidade com sintomas respiratórios e dermatite de contato. Tetraóxido de ósmio - irritante grave dos olhos e do trato respiratório;
Vanádio (V)	Efeitos genotóxicos, não mutagênico. Pentóxido de vanádio é classificado como possível carcinógeno humano (grupo 2B – IARC);

1.2 Requerimentos Regulatórios

As farmacopeias americana (USP), europeia (EP), britânica (BP) e brasileira (FB), descreviam ensaios limite para determinação de metais baseados na precipitação como sulfetos em solução aquosa e monitoramento da concentração total nas amostras. Estes testes requerem grande quantidade de amostra, aproximadamente 1,0 grama e os resultados, expressos em partes por milhão (ppm), são obtidos através da comparação visual de tubos contendo a amostra, uma solução branco (controle) e uma solução padrão de chumbo. Muitas vezes, para preparar a amostra, é necessário utilizar aquecimento em chama ou mufla, e, após ajustar o pH e adicionar sulfeto de hidrogênio ou tioacetamida, para ocorrer a formação e precipitação do sulfeto de metal, outro problema é a avaliação do resultado. As cores dos diferentes sulfetos de metais variam de branco, passando por amarelo, laranja, marrom e até preto, fazendo com que a comparação visual, inequívoca, com o sulfeto de chumbo, de cor marrom escuro seja muito difícil (BP, 2008; EP, 2000; LEWEN et al., 2004; RAO; TALLURI, 2007; SINGH et al., 2012; USP, 2012; WANG et al., 2000). Diante disto, esta metodologia apresenta baixa sensibilidade e recuperação, não é específica e precisa, requer elevado tempo de preparo e grande quantidade de amostra, e depende da inspeção e avaliação visual do analista, o que dificulta seu emprego na rotina dos laboratórios e pode gerar erros. Outro ponto negativo, é que o aquecimento ou calcinação da amostra pode resultar na perda de alguns elementos voláteis tais como mercúrio e selênio, prejudicando assim a validade deste teste (LEWEN et al., 2004; WANG et al., 2000).

Visando garantir a segurança dos medicamentos, vários órgãos regulatórios, como o ICH e *European Medicines Agency* (EMA), têm publicado guias específicos para avaliação de impurezas elementares em insumos farmacêuticos e produtos. O ICH, adotado pelos Estados Unidos, União Europeia e Japão, elaborou em 2009, e revisou em 2014, o guia Q3D: *Impurities: Guideline for Elemental Impurities* e o EMA, adotado pela Europa, elaborou o guia *Guidelines on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents*, em 2008. Estes guias têm o objetivo de recomendar critérios de aceitação para a exposição aos resíduos de impurezas elementares, baseados em dados toxicológicos, porém não apresentam uma alternativa à metodologia descrita nas farmacopeias, embora

reconheçam as limitações desta técnica e propõe a busca por um método mais sensível (EMA, 2008; ICH, 2014).

Baseado nos efeitos e na segurança, quando se tem a exposição as impurezas metálicas, o guia da EMA estabeleceu 3 classes para os elementos, de acordo com o risco para a saúde humana (EMA, 2008):

- a) Classe 1 - metais de significativa preocupação em relação à segurança, inclui metais conhecidos ou suspeitos carcinogênicos humanos ou causadores de toxicidade significativa, tais como, Pt, Pd, Ir, Rh, Ru, Os, Mo, Ni, Cr e V. Os metais desta classe são subdivididos em três subclasses: 1A, 1B e 1C. Os limites de exposição para a classe 1A e 1C referem-se aos metais individuais, enquanto os limites de exposição da classe 1B dizem respeito à quantidade total dos metais listados, pois os dados de toxicidade destes elementos, atualmente disponíveis, são limitados;
- b) Classe 2 - metais de baixa preocupação em relação à segurança, apresentam menor potencial tóxico ao homem e podem estar presentes em alimentos ou suplementos, por exemplo, cobre e manganês;
- c) Classe 3 - metais de preocupação mínima em relação à segurança, sem toxicidade significativa, com perfil de segurança estabelecido, encontrados no meio ambiente, em animais ou vegetais, como ferro e zinco.

Os limites descritos neste guia, foram baseados na dose diária máxima, duração do tratamento e via de administração do fármaco (oral, parenteral e inalatória), assim como na exposição diária permitida (PDE) ao resíduo do elemento (EMA, 2008).

O Guia Q3D, do ICH, estabelece limites de exposição diária permitida (PDE) e concentrações limite, para a administração por via oral, parenteral e inalatória. Os fatores considerados na avaliação de risco para o estabelecimento da PDE são: estado de oxidação mais provável do elemento em um medicamento; exposição humana e dados de segurança; dados de estudos em animais e via de administração. Os elementos foram divididos em três classes de acordo com sua toxicidade (PDE) e probabilidade de ocorrência no medicamento. A probabilidade de

ocorrência é derivada de vários fatores, incluindo: probabilidade de uso em processos farmacêuticos, probabilidade de ser uma impureza presente em materiais utilizados em processos farmacêuticos e a abundância natural e distribuição ambiental do elemento (ICH, 2014):

- a) Classe 1 – composta por arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo, são elementos significativamente tóxicos em todas as vias de administração, geralmente não são usados na fabricação de produtos farmacêuticos, mas podem estar presentes em excipientes e exigem atenção durante a avaliação de risco;
- b) Classe 2 - a toxicidade destes elementos depende da via de administração. São divididos em subclasses de acordo com a probabilidade de ocorrência: 2A – elementos têm alta probabilidade de ocorrência, necessitam de avaliação de risco em todas as vias de administração: cobalto, níquel e vanádio; 2B - têm baixa probabilidade de ocorrência devido a sua abundância, necessitam de avaliação de risco somente se forem adicionados intencionalmente: ouro, prata, irídio, ósmio, paládio, platina, ródio, rutênio, selênio e tálio;
- c) Classe 3 – elementos que apresentam toxicidade baixa por administração oral e não precisam ser considerados na avaliação de risco, a menos que sejam adicionados intencionalmente, mas exigem consideração na avaliação para outras vias de administração, como parenteral e inalatória, pertencem a esta classe: bário, cromo, cobre, lítio, molibdênio, antimônio e estanho.

Outras impurezas, apesar de não terem um PDE estabelecido, devido à sua baixa toxicidade, podem necessitar de avaliação de risco (ICH, 2014).

Exposição diária permitida (PDE) é definida como exposição máxima aceitável a uma impureza elementar sem que se produza qualquer efeito adverso para a saúde (EMA, 2008). As PDEs, descritas em microgramas por dia ($\mu\text{g}/\text{dia}$) fornecem a quantidade máxima permitida de cada elemento que pode estar contido na ingestão diária máxima de um medicamento, porém é útil converter a PDE em concentração para a avaliação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos ou seus componentes. As concentrações limite podem ser usadas na

avaliação de risco, em discussões com fornecedores de insumos para ajudar a estabelecer controles, para estabelecer metas de concentração ao desenvolver controles em processo e para transmitir informações sobre os controles de impurezas elementares aos órgãos regulatórios (ICH, 2014).

A tabela abaixo resume a classificação e mostra os limites adotados (concentrações limite), para exposição por via oral, citados pelo EMA e ICH (Guia Q3D). Podemos observar que, para um mesmo elemento, os guias apresentam diferentes limites de concentração, dados em $\mu\text{g/g}$, pois consideram diferentes abordagens para classificação dos elementos, conforme descrito acima (EMA, 2008; ICH, 2014).

Tabela 2 - Classificação das impurezas elementares e concentrações limite propostas pelos guias do EMA e ICH (Guia Q3D), considerando a exposição por via oral

EMA		ICH (Guia Q3D) ^a	
Classificação elementos	Concentração ($\mu\text{g/g}$)	Classificação elementos	Concentração ($\mu\text{g/g}$)
Classe 1A (Pt, Pd)	10	Classe 1 (Cd, Pb)	0,5
Classe 1B (Ir, Rh, Ru, Os)	10 ^b	Classe 1 (As)	1,5
		Classe 1 (Hg)	3,0
Classe 1C (Mo, Ni, Cr, V)	25	Classe 2A (V)	10
		Classe 2A (Ni)	20
Classe 2 (Cu, Mn)	250	Classe 2B (Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Pt)	10
		Classe 3 (Cu e Mo)	300
Classe 3 (Fe, Zn)	1300	Classe 3 (Cr)	1100

^a Limites estabelecidos para avaliar o teor de impurezas elementares em medicamentos com doses diárias não superiores a 10 gramas por dia.

^b A soma dos 4 elementos deste grupo, não deve exceder o limite especificado.

Ciente das limitações da metodologia baseada na precipitação de sulfetos, e para atender a necessidade de implementação de limites mais seguros para impurezas elementares, a farmacopeia americana publicou dois novos capítulos gerais em 2013, que se tornaram oficiais em 2015, na USP 38. O capítulo <232> *Elemental Impurities Limits*, estabelece novos limites para impurezas elementares em insumos e produtos farmacêuticos e salienta a necessidade de determinar as concentrações de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V e realizar a especiação de arsênio e mercúrio, pois a toxicidade destes elementos depende da forma química em que eles se encontram. O capítulo <233> *Elemental Impurities Procedures*, descreve dois procedimentos para a análise destas impurezas, a metodologia baseada na precipitação dos sulfetos foi substituída pela análise por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) ou espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP OES) para atender aos novos limites de especificação (USP, 2016a; USP 2016b).

As farmacopeias europeia (EP) e britânica (BP), também iniciaram a revisão de seus capítulos gerais intitulados “*heavy metals*”. A farmacopeia europeia publicou o capítulo geral 5.20 “catalisador metálico ou resíduos de reagentes metálicos” no suplemento 7.7 e a farmacopeia americana divulgou em 2015, que o capítulo geral “metais pesados” ficará vigente até janeiro de 2018 quando os novos capítulos devem ser oficialmente implementados e alinhados com o guia do ICH Q3D e EMA. O *Food and Drug Administration* (FDA), publicou em junho de 2016, o guia *Elemental Impurities in Drug Products*, no qual recomenda que o fabricante de qualquer produto farmacêutico, comercializado nos Estados Unidos, siga as recomendações do ICH Q3D e da USP, para identificar e controlar impurezas elementares, até janeiro de 2018 (FDA, 2016). A última revisão da farmacopeia brasileira (5ª edição), publicada em dezembro de 2010, já apresenta dois métodos para o ensaio de “metais pesados”, o ensaio limite, baseado na precipitação de sulfetos e a determinação por espectrometria atômica, citando a necessidade de uma previa decomposição da amostra (ANVISA, 2010). Em 2017 a Anvisa divulgou a publicação da 6ª edição da farmacopeia, porém não há informações sobre a determinação de impurezas elementares. Uma tabela dos guias e compêndio mais importantes, relacionados à determinação de impurezas elementares, é apresentada abaixo.

Tabela 3 – Principais guias e compêndio internacionais que tratam sobre impurezas elementares em fármacos e produtos farmacêuticos e data de publicação ou revisão

Agência e países abrangidos	Guia/ compêndio	Datas publicação ou revisão
ICH (Estados Unidos, Europa e Japão)	<i>Impurities Guideline for elemental impurities - Q3D</i>	Dezembro/ 2014
EMA (Europa)	<i>Guidelines on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents</i> (EMEA/CHMP/SWP/4446)	Fevereiro/ 2008
USP (Estados Unidos)	<232> <i>Elemental Impurities Limits</i> <233> <i>Elemental Impurities Procedures</i>	Dezembro/ 2015

Paralelo a estas publicações, observa-se que nos últimos anos houve uma demanda crescente por técnicas analíticas que permitam a determinação rápida, precisa e exata, de impurezas elementares em níveis traço e para atender a estes requisitos a indústria farmacêutica e os laboratórios de controle de qualidade, são obrigados a investir na formação de mão de obra qualificada e compra de instrumentos sofisticados (ARGENTINE; OWENS; OLSEN, 2007; BALARAM, 2016; CARTER et al., 2016; LEWEN, 2011; SINGH et al., 2012). Vários estudos têm descrito a utilização de técnicas de espectrometria, tais como, ICP OES (TU; WANG; ANTONUCCI, 2010; STOVING et al., 2013) e ICP-MS (ANTES et al., 2011; KAUFFMAN et al., 2007; LEWEN, 2004; LI et al., 2015; RAO; TALLURI, 2007; WANG et al., 2000) que são técnicas multielementares e citadas nos capítulos propostos pela farmacopeia americana, porém outras técnicas, tais como, espectrometria de fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF) (MARGUI; QUERALT; HIDALGO, 2013; SHAW et al., 2012), espectrometria de fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) (FIGUEIREDO et al., 2016) e espectrometria de absorção atômica por chama (F AAS) e por forno de grafite (GF AAS) (PAULA et al., 2013; WOLLEIN et al., 2015) também têm sido utilizadas para a determinação destas impurezas em insumos e produtos farmacêuticos. Quando comparado com o ICP OES, o ICP-MS apresenta a vantagem de possibilitar a análise multielementar sequencial com alta sensibilidade,

apresentar faixas lineares mais amplas, além de fornecer informações isotópicas (RAO; TALLURI, 2007; STOVING et al., 2013).

Revisões feitas por Rao e Talluri (2007) no período de 1995 a 2005 e por Huang et al. (2006) demonstraram o aumento do uso de ICP-MS na determinação de impurezas inorgânicas na área farmacêutica, uma vez que esta é a técnica mais sensível para a determinação multielementar de concentrações traço e apresenta versatilidade para a análise em rotina de diferentes matrizes (HUANG et al., 2006; RAO; TALLURI, 2007).

O controle de qualidade na indústria farmacêutica deve incluir a avaliação de impurezas elementares em todo o processo de fabricação, desde matérias-primas e fármacos, até recipientes e material de embalagem. As propriedades físico-químicas das amostras farmacêuticas e a diversidade das matrizes impõem exigências muito elevadas aos procedimentos analíticos, que devem ainda ter sensibilidade para detectar níveis traço dos elementos (BALARAM, 2016).

1.3 Estratégias para o preparo de amostras

Para a realização de análises de impurezas elementares em fármacos e excipientes, por ICP-MS, as amostras sólidas são geralmente preparadas por dissolução simples e/ ou digestão em ácidos diluídos. A digestão em micro-ondas também tem sido muito utilizada e apresenta vantagens em relação à digestão ácida tradicional em termos de recuperação, principalmente de elementos voláteis, menor risco de contaminação, menor gasto de reagentes e melhor reprodutibilidade (RAO; TALLURI, 2007).

O preparo de amostra é uma etapa crítica que exerce grande impacto sobre os resultados finais das análises. Por este motivo, diferentes estratégias são utilizadas para análise de produtos farmacêuticos, tais como: diluição de amostras em ácido nítrico (ANTES et al., 2011; LASZTITY et al., 2002; WANG et al., 1999; WANG et al., 2000), diluição em meio ácido (nítrico e ou clorídrico) e digestão em micro-ondas (FISCHER et al., 2014; LI et al., 2015; NIEMELA et al., 2004; RAO; TALLURI, 2007; SOLTYK et al., 2003; WOLLEIN et al., 2015), dissolução e digestão, com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, para facilitar os processos de

degradação oxidativa (LI et al., 2015; RAO; TALLURI, 2007), diluição em água régia (mistura de ácido nítrico e clorídrico – 1:3) e digestão em micro-ondas (HOECKE; CATRY; VANHAECKE, 2012), diluição em ácido nítrico e clorídrico – 3:1 e digestão em micro-ondas ou câmara de reação única (SRC) (MULLER et al., 2015), diluição em solvente orgânico como o 2-butoxietanol: água (25: 75% v/v) (LEWEN et al., 1995), diluição em ácido nítrico e peróxido de hidrogênio e digestão em micro-ondas, com uso de triton X-100 como emulsificante da amostra e tetralina para reduzir a viscosidade (RAO; TALLURI, 2007). Todas estas estratégias têm o objetivo de extrair os elementos a serem determinados e reduzir interferências que podem ser causadas por matéria orgânica (BALARAM, 2016).

No caso de fármacos e excipientes, algumas amostras são insolúveis em água e para alcançar a solubilidade é necessário o uso de soluções ácidas diluídas em água, geralmente ácido nítrico, que evitam a precipitação de metais e reduzem a viscosidade da solução, facilitando a introdução da amostra no ICP-MS. O uso de solventes orgânicos requer alguns cuidados para não desestabilizar o plasma, como a utilização de cone de amostragem de platina, câmara de nebulização com resfriamento e outros componentes do ICP-MS de material resistente a solventes orgânicos (WANG et al., 1999). A escolha dos solventes irá depender das características das amostras, Li et al. (2015), utilizaram inicialmente ácido clorídrico e nítrico para preparo de amostras de excipientes farmacêuticos, que foram submetidos a digestão em micro-ondas. Como algumas amostras não solubilizaram completamente, foi utilizado peróxido de hidrogênio e para análise de talco e óxido de titânio, foi adicionado ácido fluorídrico (LI et al., 2015).

Fármacos que possuem anéis aromáticos, isolados ou condensados em sua estrutura, podem ser mais resistentes à ação oxidante dos ácidos, necessitando ser submetidos à alta temperatura e pressão, em digestões por micro-ondas, conforme discutido por Muller et al. (2015). A presença de alto teor de carbono, e elementos como nitrogênio, fósforo, enxofre, oxigênio, hidrogênio e cloro, também pode gerar importantes interferências espectrais nas análises por ICP-MS (MULLER et al., 2015).

Para solucionar problemas analíticos, Wollein et al. (2015), utilizaram diferentes técnicas para a determinação de alguns elementos, porém a maioria foi determinado por ICP-MS. ICP OES foi utilizado para determinação de Cu e

espectrometria de absorção atômica para determinação de Hg por vapor frio (CV AAS), As (com geração de hidretos – HG AAS) e Cr (com forno de grafite – GF AAS) em amostras de insumos e produtos farmacêuticos (WOLLEIN et al., 2015). Na determinação de As por ICP-MS ocorreram interferências espectrais, principalmente devido a presença de cloreto, e resíduos de carbono nas amostras digeridas, interferiram na determinação de cromo (WOLLEIN et al., 2015).

Elementos voláteis, como Pd, Hg e Os, necessitam de atenção especial durante o procedimento de preparo de amostras e leitura, para que não haja perda do elemento ou efeito de memória (FISCHER et al., 2014; LI et al., 2015).

Lewen et al. (2004) testaram quatro solventes para o preparo de fármacos e classificaram os melhores na seguinte ordem: 0,5% de ácido clorídrico (HCl), 2-butoxietanol: água (25: 75% v/v), 5% de ácido nítrico e água, de acordo com os resultados de recuperação, porém como algumas amostras avaliadas foram insolúveis na primeira opção (HCl), o solvente de escolha foi 2-butoxietanol: água (LEWEN et al., 2004). Suplementos alimentares, fármacos derivados de plantas e medicamentos chineses, foram analisados por ICP-MS após diluição em ácido nítrico e digestão em micro-ondas para monitoramento de impurezas metálicas (RAO; TALLURI, 2007; WU et al., 2002).

Procedimentos de digestão em micro-ondas, em sistemas abertos ou fechados, embora apresentem muitas vantagens, requerem extremo cuidado, pois podem ser complexos e demorados, resultar em dissolução incompleta da amostra, precipitação de elementos insolúveis e perdas elementares devido ao aquecimento. Diante disto, o procedimento de preparo de amostra é de extrema importância, e merece destaque e uma avaliação crítica na etapa de desenvolvimento analítico (DONER; EGE, 2004; NARDI et al., 2009).

O procedimento alternativo de extração por ultrassom, para preparo de amostras sólidas, tem emergido nos últimos anos e apresenta potencial promissor por ser simples e rápido. Este procedimento baseia-se na lixiviação de íons metálicos a partir de materiais em pó, que formam uma suspensão quando dispersos em um solvente apropriado, geralmente uma solução de ácido diluído. A extração por ultrassom tem sido aplicada com sucesso para determinação de oligoelemento por GF AAS ou ICP OES, porém poucas aplicações são encontradas na literatura com determinação por ICP-MS (KRISHNA; ARUNACHALAM, 2004; LIMA;

BARBOSA; KRUG, 2000; NASCENTES; KORN; ARRUDA, 2001; PAULA et al., 2013; SERESHTI; HERAVI; SAMADI, 2012).

1.4 Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

Surgido na década de 80, o ICP-MS tem emergido como uma importante e poderosa técnica para determinação de elementos químicos. A utilização crescente desta técnica, deve-se principalmente ao fato de oferecer melhores limites de detecção, que variam de parte por bilhão (ppb) a parte por trilhão (ppt) para a maioria dos elementos, além de ser uma técnica rápida, exata e precisa, que possibilita a determinação multielementar e isotópica, com alta sensibilidade, eficiência e utilização de pequeno volume de amostra. Na maior parte dos casos, os limites de detecção são de até 100 a 1000 vezes melhores do que os conseguidos por ICP OES (DOUGLAS; QUAN, 1983; GRAY; DATE, 1983; LEWEN et al., 2004; RAO; TALLURI, 2007; SHAW et al., 2012).

O espectrômetro de massas é um instrumento que separa íons com base em suas razões massa-carga (m/z), e é composto por cinco partes principais: sistema de introdução de amostra, ICP (fonte de íons), interface (focalização), sistema analisador e sistema de detecção de íons (SUTTON; CARUSO, 1999; TAYLOR, 2006; THOMAS, 1999). A amostra, geralmente líquida é inserida no sistema de introdução de amostra, convencionalmente formado por um nebulizador (pneumático ou ultrassônico), responsável pela formação de um aerossol fino, seguido por uma câmara de nebulização, que separa as gotas maiores das menores. Em seguida, a amostra é transportada pelo fluxo de argônio (gás nebulizador) até o plasma, onde rapidamente sofre dessolvatação, vaporização, atomização e ionização (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; SUTTON; CARUSO, 1999; THOMAS, 2001).

O plasma é gerado em uma tocha de quartzo, composta por três tubos concêntricos para o transporte de gás argônio. O fluxo de gás externo (fluxo de resfriamento ou gás suporte) é introduzido tangencialmente na tocha, e sustenta o ICP; o fluxo central ou auxiliar (tubo intermediário) é usado para manter o plasma afastado das laterais da tocha de quartzo e o fluxo de gás interno (gás nebulizador)

transporta a amostra nebulizada até o plasma (SUTTON; CARUSO, 1999). Esta tocha é adaptada a uma fonte de radiofrequência de 27,12 ou 40,68 MHz, através de um filamento metálico, assim, a corrente de radiofrequência que circula através do filamento metálico, gera campos elétricos e magnéticos oscilantes no topo da tocha. A formação do plasma (ionização do fluxo de argônio) é iniciada por uma faísca proveniente do filamento metálico (bobina de Tesla), que fornece íons e elétrons livres, que são acelerados vetorialmente pelos campos elétricos e magnéticos, tendo energia suficiente para ionizar o gás argônio. Novas ionizações são causadas por colisões sucessivas e o plasma se torna autossustentável. Parte da energia do plasma é então transferida para excitar e ionizar o analito (SUTTON; CARUSO, 1999; THOMAS, 2001).

Para transportar os íons do ICP para o espectrômetro de massas (MS), é utilizada uma interface, com bomba de vácuo de múltiplo estágio, que acopla a tocha do ICP ao MS, e sua principal função é reduzir a pressão e a densidade do feixe, minimizando a perda de íons. O feixe de íons formado no plasma é extraído desta região por uma diferença de pressão e lançado no espectrômetro de massas à baixa pressão, através de um pequeno orifício (1 mm de diâmetro), de níquel ou platina, do cone de amostragem, que se encontra refrigerado (THOMAS, 1999). Após o cone, na região de baixa pressão, ocorre a expansão do gás, resultando em seu resfriamento. Uma fração dos íons passa através do pequeno orifício (com cerca de 0,9 mm) de um segundo cone (*skimmer* ou cone extrator) e a maior parte do gás argônio é bombeada para fora. Em seguida os íons passam para uma câmara, mantida a pressão do espectrômetro de massas, onde os íons positivos são separados dos elétrons e das espécies moleculares, por um potencial negativo, são acelerados e focalizados por uma lente magnética de íons, e seguem para o orifício de entrada de um analisador de massas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; SUTTON; CARUSO, 1999; THOMAS, 2001). No analisador, os íons são separados de acordo com sua razão massa/carga. O analisador de massas mais utilizado é o quadrupolo, embora existam analisadores de massas para se conseguir alta resolução como o focalizador de setor duplo (SUTTON; CARUSO, 1999).

Apesar das inúmeras vantagens, o ICP-MS pode sofrer alguns tipos de interferências, relacionadas à formação de óxidos, elementos presentes na matriz ou diluente, no gás argônio e no ar atmosférico, que influenciam na quantificação dos

analitos. Com o desenvolvimento de dispositivos como a cela de colisão e cela de reação dinâmica, que podem ser adicionados ao ICP-MS, esta técnica se mostrou altamente favorável para a determinação de muitos elementos em amostras complexas, simplificando a etapa de pré-tratamento das amostras e reduzindo interferências (THOMAS, 2001).

Interferências em ICP-MS

Existem dois tipos de interferências em ICP-MS, interferências físicas e espectrais, que devem ser compreendidas para a resolução ou redução deste problema e interpretação adequada dos dados.

Interferências Físicas

As propriedades físicas das amostras tais como, tensão superficial, viscosidade e volatilidade, podem interferir no processo de introdução e ionização da amostra no plasma. O uso de adição de padrão, padrão interno, diluição isotópica, ajuste de matriz ou aumento da diluição da amostra pode corrigir estas interferências, que são divididas em interferências de transporte e de supressão ou aumento da intensidade de sinal (NIXON; MOYER, 1996).

Interferências de transporte ocorrem quando são utilizadas soluções contendo altas concentrações de sais de baixa volatilidade ou compostos orgânicos, pois pode ocorrer deposição de sais ou carbono, nos orifícios de entrada do cone de amostragem e do *skimmer*, que poderão gerar obstrução, que compromete a sensibilidade e o processo de amostragem. Por este motivo, o teor tolerável de sólidos dissolvidos é 0,2%. Outra interferência de transporte, quando se utiliza a nebulização pneumática, é devido à viscosidade, pois amostras mais viscosas geram gotas maiores, isto diminui a quantidade de amostra que alcança o plasma e conseqüentemente diminui o sinal do analito. A tensão superficial também deve ser avaliada, pois líquidos com menor tensão superficial produzem partículas menores, isto aumenta a quantidade da amostra que chega ao plasma. Estas duas propriedades, viscosidade e tensão superficial, afetam o tamanho das gotas

(aerossol), a sensibilidade e a taxa de aspiração (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992; SILVA, 2004).

A supressão da ionização do analito no plasma pode ocorrer devido ao excesso de um elemento na matriz da amostra, com baixo potencial de ionização, que pode levar a um excesso de elétrons e íons positivos, que provocam um deslocamento do equilíbrio no plasma, levando a formação de átomos do analito. Excesso de elementos facilmente ionizáveis, presentes na matriz, podem causar supressão (boro e alumínio) ou aumento do sinal (sódio, magnésio, potássio e cálcio). A diluição da amostra e otimização das condições operacionais do plasma podem reduzir estas interferências relacionadas à quantidade absoluta de um elemento (EVANS; GIGLIO, 1993; GREGOIRE, 1987; JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

O efeito de espaço carga também pode provocar supressão do sinal, como os íons têm energia translacional de acordo com sua massa, um excesso de íons relativamente pesados, oriundos da matriz, pode repelir do feixe de íons os íons mais leves, causando a supressão, pois poucos íons chegarão ao detector (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992; SILVA, 2004).

O efeito de memória é uma interferência verificada pelo lento decaimento do sinal do analito para um nível de até 0,1% do sinal total, quando se analisa a amostra branco após a solução do analito. É ocasionado principalmente, pelo excesso de analito oriundo das paredes da câmara de nebulização e vidrarias, é mais severo para analitos mais voláteis, como, Pb, Cd, Li e Hg, e menos comum para refratários (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

Interferências Espectrais

Estas interferências ocorrem quando uma espécie iônica no plasma tem a mesma razão massa/carga (m/z) que um íon do analito. São mais comuns na determinação de elementos com massa inferior a 82 u.m.a. (As, Fe, Zn), e são classificadas em interferências isobáricas e poliatômicas (tabela 4).

Interferências isobáricas são caracterizadas pela presença de dois elementos com isótopos de mesma massa nominal, gerando sobreposição de leitura, como ocorre entre, o isótopo mais abundante de cálcio, ^{40}Ca e ^{40}Ar .

Raramente esta interferência impede uma determinação, pois como a maioria dos elementos possui um isótopo livre de superposição isobárica, deve-se escolher outro isótopo, para determinação de cálcio, uma alternativa seria o ^{44}Ca (segundo isótopo mais abundante) (EVANS; GIGLIO, 1993; SANTOS, 2007; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Interferências poliatômicas são originadas a partir da formação de moléculas ionizadas, nas altas temperaturas do plasma ou na região de interface. Os íons poliatômicos, produzidos a partir do argônio e outros gases (O_2 e N_2), reagentes usados no preparo de amostras (H_2SO_4 e HCl) ou componentes da matriz (sais e íons), podem interferir com isótopos de mesma massa nominal. Geralmente ocorre: formação de óxidos (MoO , CaO , ArO), íons de dupla carga (elementos com segundo potencial de ionização baixo - Ba, La), dímeros (Ar_2 , O_2 , N_2), hidretos (ArH) e hidróxidos (CaOH , ArOH). Para minimizar esta interferência, a vazão do gás carregador e a potência de radiofrequência, devem ser ajustadas, pois a formação de íons no plasma depende destes parâmetros. Quando as interferências poliatômicas estão relacionadas à formação de íons contendo H ou O, uma opção é a utilização de membranas de dessolvatação ou nebulizadores ultrassônicos, que irão diminuir o carregamento do plasma com água e a quantidade de interferentes (PRICHARD; MACKAY; POINTS, 1996; SILVA, 2004).

Tabela 4 - Interferentes espectrais de isótopos dos elementos em estudo e suas abundâncias

Isótopo	Abundância	Interferentes
^{75}As	100	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2$, $^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}$, $^{12}\text{C}^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$
^{110}Cd	12,5	$^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}^+$
^{111}Cd	12,8	$^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{94}\text{Zr}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$
^{112}Cd	24,1	$^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2$, $^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2$, $^{96}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$
^{113}Cd	12,22	$^{96}\text{Zr}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{96}\text{Ru}^{17}\text{O}^+$
^{114}Cd	28,7	$^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{98}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$
^{116}Cd	7,49	$^{100}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$
^{50}Cr	4,35	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{35}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$, $^{36}\text{S}^{14}\text{N}^+$, $^{32}\text{S}^{18}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{17}\text{O}^+$
^{52}Cr	83,76	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$, $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{36}\text{Ar}^{15}\text{N}^+\text{H}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$

Conclusão da Tabela 4

Isótopo	Abundância	Interferentes
⁵³ Cr	9,51	³⁷ Cl ¹⁶ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁵ N ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁷ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁸ O ⁺ , ³⁶ S ¹⁷ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹³ C ⁺
⁵⁴ Cr	2,38	³⁷ Cl ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁵ N ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁸ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁶ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁷ O ⁺ , ¹⁹ F ₂ ¹⁶ O ⁺
⁶³ Cu	69,1	³¹ P ¹⁶ O ₂ ⁺ , ⁴⁰ Ar ²³ Na ⁺ , ⁴⁷ Ti ¹⁶ O ⁺ , ²³ Na ⁴⁰ Ca ⁺ , ⁴⁶ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹² C ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ¹⁴ N ¹² C ³⁷ Cl ⁺ , ¹⁶ O ¹² C ³⁵ Cl ⁺
⁶⁵ Cu	30,9	⁴⁹ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ²⁵ Mg ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ³³ S ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ¹² C ¹⁶ O ³⁷ Cl ⁺ , ¹² C ¹⁸ O ³⁵ Cl ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺
⁹⁴ Mo	9,3	³⁹ K ₂ ¹⁶ O ⁺
⁹⁵ Mo	15,9	⁴⁰ Ar ³⁹ K ¹⁶ O ⁺ , ⁷⁹ Br ¹⁶ O ⁺
⁹⁶ Mo	16,7	³⁹ K ⁴¹ K ¹⁶ O ⁺ , ⁷⁹ Br ¹⁷ O ⁺
⁹⁷ Mo	9,6	⁴⁰ Ar ₂ ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ₂ ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ⁴¹ K ¹⁶ O ⁺ , ⁸¹ Br ¹⁶ O ⁺
⁹⁸ Mo	24,1	⁸¹ Br ¹⁷ O ⁺ , ⁴¹ K ₂ ¹⁶ O ⁺
⁵⁸ Ni	67,77	²³ Na ³⁵ Cl ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ⁴² Ca ¹⁶ O ⁺ , ²⁹ Si ₂ ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ²³ Na ³⁵ Cl ⁺
⁶⁰ Ni	26,16	⁴⁴ Ca ¹⁶ O ⁺ , ²³ Na ³⁷ Cl ⁺ , ⁴³ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺
⁶¹ Ni	1,25	⁴⁴ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁵ Sc ¹⁶ O ⁺
⁶² Ni	3,66	⁴⁶ Ti ¹⁶ O ⁺ , ²³ Na ³⁹ K ⁺ , ⁴⁶ Ca ¹⁶ O ⁺
⁶⁴ Ni	1,16	³² S ¹⁶ O ⁺ , ³² S ₂ ⁺
²⁰⁶ Pb	24,1	¹⁹⁰ Pt ¹⁶ O ⁺
²⁰⁷ Pb	22,1	¹⁹¹ Ir ¹⁶ O ⁺
²⁰⁸ Pb	52,4	¹⁹² Pt ¹⁶ O ⁺
¹⁰⁵ Pd	22,3	⁴⁰ Ar ⁶⁵ Cu ⁺
¹⁰³ Rh	100,0	⁴⁰ Ar ⁶³ Cu ⁺
¹⁰¹ Ru	17,0	⁴⁰ Ar ⁶¹ Ni ⁺ , ⁶⁴ Ni ³⁷ Cl ⁺
⁵⁰ V	0,24	³⁴ S ¹⁶ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁵ N ⁺ , ³⁶ S ¹⁴ N ⁺ , ³² S ¹⁸ O ⁺ , ³³ S ¹⁷ O ⁺
⁵¹ V	99,76	³⁴ S ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁶ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹³ C ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁵ N ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁴ N ⁺ , ³⁶ S ¹⁵ N ⁺ , ³³ S ¹⁸ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁷ O ⁺

Fonte: May e Wiedmeyer (1998).

A dissociação incompleta da amostra, recombinação de íons no plasma e a quantidade de vapor de água transportado, podem gerar uma interferência poliatômica relacionada a formação de óxidos, nestes casos, a atomização do analito ocorre em um excesso de átomos de oxigênio. A eliminação destes

interferentes é dependente da força de ligação entre o analito e o oxigênio. A resposta de óxido é determinada pela razão óxido/ íon (MO^+/M^+), expressa em porcentagem, esta razão é uma aproximação da razão correta $MO^+/(MO^++M^+)$ e na maioria dos casos não deve exceder 3%. Este tipo de interferência pode ser reduzida com o aumento da potência do plasma (aumento da temperatura), diminuição da vazão do gás carregador, introdução de uma câmara de nebulização resfriada (a pelo menos 4°C), utilização de nebulizador ultrassônico com sistema de dessolvatação ou utilização da Cella de Reação Dinâmica (DRC). Como exemplo temos a interferência de $^{40}Ar^{16}O$ e $^{40}Ca^{16}O$ sobre o ^{56}Fe (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

Outra interferência poliatômica é a do tipo íons de dupla carga, que aparecem no espectro com metade da massa do íon univalente, gerando pequena perda de sinal e consequentemente, da sensibilidade. São mais suscetíveis a esta interferência os elementos de baixo potencial de ionização (alcalinos terrosos, terras-raras e alguns metais de transição). O controle dos íons de dupla carga é realizado pelo monitoramento da razão M^{2+}/M^+ , que não deve exceder 3%. Para reduzir esta interferência deve-se, aumentar a vazão do gás carregador ou diminuir a potência de radiofrequência (reduzindo a temperatura do plasma) (SILVA, 2004).

1.5 Cella de Reação Dinâmica (DRC)

O DRC começou a ser comercializado em 1999, para reduzir interferências espectrais. O DRC está localizado na câmara de vácuo, entre as lentes iônicas e o analisador de massas e atua como uma interface, promovendo a reação entre o íon (analito ou interferente) e a molécula (gás de reação), para conter as interferências e, assim, melhorar a sensibilidade do analito. O DRC é constituído por um quadrupolo, pressurizado com um gás de reação, que pode ser Xe, CH_4 , $(CH_3)_2$, NH_3 , He e mistura $H_2:Ar$ (1:9 v/v), com lentes em cada extremidade sendo alimentado por radiofrequência (rf) – focaliza os íons e promove as colisões e reações, e voltagem DC (contínua) (BARANOV; TANNER, 1999; TANNER; BARANOV; VOLLKOPF, 2000).

A utilização do DRC apresenta vantagens, pois, permite simplificar a etapa de pré-tratamento da amostra, eliminando possíveis contaminações durante

este processo, possibilitando a análise das amostras através de uma simples diluição e reduzindo interferências espectrais, como a que ocorre com ^{75}As , em matrizes com alto teor de cloreto, devido a formação de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, e com ^{52}Cr e ^{51}V , devido a formação de $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$ e $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, respectivamente, em matrizes com carbono, cloreto e enxofre. Além disso, o DRC apresenta outros benefícios, tais como, aumento da sensibilidade, precisão e resolução das massas (KOPPENAAL; EIDEN; BARINAGA, 2004; TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002; TANNER; BARANOV; VOLLKOPF, 2000).

Após passar pela interface do ICP-MS, os analitos e interferentes são levados até o DRC, sob vácuo, e dois modos podem ser utilizados para eliminar interferentes: discriminação por energia cinética e discriminação por massa. Na discriminação por energia cinética o DRC é utilizado com polarização menos positiva que a do filtro de massas, isto faz com que os íons do analito, com maior energia, sejam transmitidos e os produtos iônicos das colisões, com a mesma energia da cela, sejam rejeitados. Na discriminação por massa é utilizado um quadrupolo, que funciona como um filtro de massas, no interior do DRC, a transmissão dos íons neste quadrupolo é gerenciada por um diagrama de estabilidade e o seu posicionamento é definido por dois parâmetros de rejeição: RP_a (proporcional a voltagem DC) e RP_q (proporcional a voltagem rf), a e q são parâmetros definidos pelas equações de *Mathieu* e descrevem as regiões de estabilidade e instabilidade dos íons no quadrupolo (TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002; THOMAS, 2002a).

Os tipos de reações que ocorrem no interior do DRC geralmente são: reação de transferência de carga (equação 1) – depende do potencial de ionização (PI), deve-se considerar: $\text{PI}_{\text{analito}} < \text{PI}_{\text{gás de reação}} < \text{PI}_{\text{íon interferente}}$; reação de transferência de prótons (equação 2); e reação de oxidação – onde o gás, reage com o íon do analito ao invés de reagir com o interferente e forma-se o óxido do elemento (equação 3).

A otimização do DRC deve considerar a vazão do gás com a qual se obtém o menor sinal de fundo e máxima intensidade para o íon do analito. É necessário observar que a vazão do gás, deve estar de acordo com o menor limite de detecção e com a natureza reativa dos analitos de interesse com o gás de reação. A eficácia do DRC depende do gás de reação e das taxas de reação do analito e dos interferentes. O gás de reação NH_3 é utilizado com êxito, para eliminação de interferentes, como, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$ e $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, na determinação de ^{52}Cr e ^{51}V . O potencial de ionização da amônia (10,2 eV) é maior que o dos analitos ^{52}Cr (6,77 eV) e ^{51}V (6,75 eV), porém é menor que o potencial de ionização de alguns interferentes, tais como, Ar (15,76 eV), C (11,26 eV) e Cl (12,97 eV), assim a reação de transferência de elétrons (ou de carga), entre o gás de reação e o interferente, ocorre, pois é exotérmica, e esta especificidade de reação permite reduzir a interferência sobre o sinal do analito (TANNER; BARANOV; BANDURA, 2002; THOMAS, 2002a).

O gás de reação H_2 também é muito utilizado. Um exemplo é para a eliminação da interferência de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ na determinação de ^{75}As . Este gás possui duas particularidades em relação a sua seletividade química. A ligação H-H é relativamente forte, energia de dissociação de 4,5 eV, no mínimo 2,0 eV mais forte que a maioria das ligações MH^+ , isto faz com que as reações de transferência do átomo H com cátions de metais, sejam endotérmicas e não ocorram. A segunda particularidade, é que as reações de troca de energia entre o H_2 (potencial de ionização de 15,6 eV) e os cátions dos metais, com menor energia de ionização (6,0 a 9,0 eV), são energeticamente impossíveis, e isto resulta em uma especificidade de reação com o interferente. Porém, embora tenha vantagens, devido a sua pequena massa, o H_2 (puro) é incapaz de produzir um ambiente termicamente eficiente para a entrada do feixe de íons na cela, por este motivo, geralmente se utiliza misturas de H_2 com gases de maior peso, como, neônio (Ne), xenônio (Xe) ou argônio (Ar) – geralmente na proporção de 5:95 (H_2 :Ar), para eliminação dos interferentes (KOPPENAAL; EIDEN; BARINAGA, 2004).

Insumos e excipientes de uso farmacêutico podem conter uma alta concentração de elementos que causam interferências, além de cloreto, carbono e enxofre, podemos ter ainda, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e fosforo, por este

motivo, é essencial avaliar a utilização do DRC para redução destas interferências (ANTES et al., 2011; MULLER et al., 2015).

1.6 Especificação química de mercúrio e arsênio pelo acoplamento HPLC-ICP-MS

A especificação química tornou-se fundamental nos estudos que envolvem a toxicologia de elementos químicos, pois os efeitos tóxicos dos elementos estão diretamente relacionados às formas químicas nas quais eles se encontram, por isso, o objetivo da especificação química é determinar as espécies nas quais os elementos são encontrados e quantificá-las a fim de proporcionar um completo entendimento da maneira pela qual um determinado elemento afeta os organismos vivos ou o ambiente (ROSEN; HIEFTJE, 2004). Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o termo especificação química é definido como distribuição de um elemento entre espécies químicas definidas em um sistema, e análise por especificação é definida como processo de identificação e/ou quantificação de uma ou mais espécies químicas em uma amostra (TEMPLETON et al., 2000).

Na especificação química, geralmente são empregadas técnicas de separação, como a cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar, acopladas a técnicas de detecção de alta sensibilidade, como a espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e a espectrometria de fluorescência atômica (AFS). Vantagens do ICP-MS, como a sensibilidade, que pode melhorar em aproximadamente três ordens de grandeza quando comparado aos detectores convencionais, como os de absorvância ultravioleta – visível (UV-vis) e índice reflectivo, e a especificidade, fazem com que esta técnica seja a mais utilizada com a cromatografia para análises de especificação. Outras vantagens são a facilidade de acoplar a cromatografia líquida com o ICP-MS, principalmente por causa das vazões usadas no HPLC, da ordem de 0,1 a 1,0 mL min⁻¹, que são compatíveis com o sistema de introdução de amostras no ICP e vários nebulizadores podem ser usados para corresponder a esse fluxo. Além disso, a fase móvel que elui da coluna do HPLC está à pressão atmosférica e se torna apropriada para o sistema de introdução de amostras do ICP-MS. A interface entre estas técnicas é feita conectando-se a saída da coluna cromatográfica do HPLC, à entrada do nebulizador

do ICP-MS, com tubo de aço inoxidável ou polímero inerte, como o *peek* (polieteretercetona), que evite a adsorção dos compostos (SUTTON; CARUSO, 1999).

A cromatografia líquida é uma técnica muito utilizada para separação de compostos. Na cromatografia de fase reversa, é empregada uma fase móvel polar e uma fase estacionária apolar, que interagem com o analito, como fase móvel podem ser utilizados solventes orgânicos, tampões e reagentes de par iônico, escolhidos de acordo com as características físico-químicas do analito, tais como pK_a , polaridade e solubilidade, e pode-se também utilizar fases estacionárias de troca iônica, para se obter as condições ideais de separação. Existem algumas dificuldades relacionadas ao acoplamento HPLC-ICP-MS. Os solventes orgânicos utilizados em HPLC podem desestabilizar o plasma e gerar um acúmulo de carbono, que pode causar interferências ou se depositar no cone de amostragem, porém isto pode ser corrigido com a adição de oxigênio ao gás nebulizador, aumento da potência de rádio-frequência, uso de um cone de amostragem de platina, nebulizador com um baixo fluxo de injeção direta ou uma unidade de dessolvatação eficiente. A utilização do modo gradiente, com variação na proporção dos solventes, gera problemas para a temperatura do plasma e densidade de elétrons que resulta em diferentes eficiências e energias de ionização. Outra dificuldade está relacionada à utilização de tampão ou uma solução de elevada força iônica, pois altas concentrações de sal podem resultar em supressão de sinais devido a aumento dos efeitos de espaço carga (HORLICK; MONTASER, 1998; LARSEN, 1998; RAO; TALLURI, 2007; TAYLOR; HUFF; MONTASER, 1998).

Elementos como arsênio e mercúrio são conhecidos por sua toxicidade, porém o potencial tóxico destes elementos depende da forma química presente. Por este motivo, é importante utilizar técnicas que permitam a especiação como a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (BALARAM, 2016; CREWS, 1998; RAO; TALLURI, 2007; SUTTON, SUTTON, CARUSO, 1997).

O arsênio está presente em uma grande variedade de compostos, os compostos inorgânicos, tais como, arsenato (As^{5+}) e arsenito (As^{3+}), são conhecidos por serem altamente tóxicos, enquanto os compostos orgânicos, como a arsenobetaina (AsB) e arsenocolina (AsC), geralmente não apresentam toxicidade e os compostos metilados, como o monometil-arsênio (MMA) e dimetil-arsênio (DMA)

têm toxicidades intermediárias (HULLE et al., 2002; HSUEH et al., 2002; RAO; TALLURI, 2007). Os limites de As baseiam-se no pressuposto de que todo o As presente em uma amostra de medicamento, fármaco ou excipiente, é de natureza inorgânica, a forma mais tóxica e, por conseguinte, deve ser medido utilizando um procedimento para determinação de As total, como ICP-MS. Se o resultado exceder o limite, é importante que um procedimento de especiação seja adotado para se verificar as formas deste elemento presentes na amostra (BALARAM, 2016).

Para especiação química de arsênio, a separação cromatográfica por HPLC, geralmente utiliza par iônico ou troca iônica, dependendo das características dos compostos de arsênio que se deseja quantificar. Pareamento iônico é usado para determinação de espécies neutras ou ionizadas, a separação, em fase reversa, é feita com uma fase estacionária apolar, e a fase móvel contém solventes que formam um par aniônico ou catiônico. A troca aniônica é muito utilizada para determinação de As^{3+} , As^{5+} , MMA^{5+} e DMA^{5+} e para AsB e AsC a troca catiônica é a mais usada (BATISTA et al., 2011b; DO et al., 2001; GONG et al., 2002; MARTIN et al., 1995). O cuidado em relação ao preparo das amostras é fundamental para manter a integridade das espécies químicas e garantir a confiabilidade nos resultados. É importante evitar a oxidação e conversão de As^{3+} em As^{5+} , por este motivo, vários métodos são descritos para preservar as espécies de arsênio nas amostras durante as etapas de armazenamento e preparo, tais como, o uso de ácido clorídrico e ácido ascórbico. O procedimento de preparo e extração das amostras, geralmente utiliza ultrassom, micro-ondas ou banho-maria e uma grande variedade de solventes, como água, ácidos e metanol, de acordo com as características e solubilidade da amostra. Porém, é importante garantir a total extração das espécies de arsênio, sem que ocorra sua conversão, e que não haja interferência dos solventes utilizados (GONG et al., 2002; MANDAL et al., 2004; SANZ; MUNOZ-OLIVAS; CÂMARA, 2005).

Em relação ao mercúrio, as principais formas químicas deste elemento são o mercúrio metálico (Hg^0), mercúrio inorgânico (i-Hg) e o mercúrio orgânico (o-Hg) representado principalmente pelo metil mercúrio (MeHg) e pelo etil mercúrio (EHg), sendo que, as formas orgânicas apresentam maior toxicidade. O Hg existe em 3 estados de oxidação, Hg^0 , mercurioso (Hg^+) e mercúrico (Hg^{2+}), e pode ainda se ligar a cadeias contendo um ou mais carbonos, originando assim as formas

orgânicas (KLAASSEN, 2001). Os limites de Hg são baseados na concentração de Hg^{2+} , pois a forma mais tóxica, metil mercúrio, é raramente encontrada em produtos farmacêuticos, e sua determinação não é necessária quando o teor de Hg total for inferior ao limite (BALARAM, 2016).

Para especiação química de mercúrio, as técnicas de cromatografia gasosa (CG) e HPLC, vêm sendo acopladas principalmente a detectores de fluorescência atômica (AFS) e ICP-MS, sendo que, a cromatografia gasosa é uma das técnicas de separação mais utilizada, porém, requer uma etapa de derivatização da amostra, para formação de espécies mais voláteis de Hg (derivados alquilados não polares), antes da introdução da amostra na coluna. Para derivatização, diversos reagentes têm sido utilizados, como os organoboratos, porém introduz-se uma etapa adicional no preparo da amostra, dificultando seu uso em rotina. Por este motivo, atualmente, alguns autores têm preferido o uso do HPLC, pois permite a separação à temperatura ambiente, sem necessidade de derivatização, a injeção de maiores volumes de amostra e redução de perdas ou conversão antes da análise, isto gera um menor número de etapas de preparação da amostra e menor risco de contaminação. Vários métodos de HPLC-ICP-MS têm sido propostos, a maioria utiliza fase reversa (fase estacionária apolar), C8 ou C18, e uma ampla variedade de solventes para composição da fase móvel, tais como, metanol, 2-mercaptoetanol e L-cisteína. Atenção especial deve ser dada em relação a limpeza do sistema, entre as análises, para que não ocorra efeito de memória (GOMEZ-ARIZA et al., 2004; LEE; JIANG, 2000; LIANG et al., 2003; REUTHER; JAEGER; ALLARD, 1999; RODRIGUES et al., 2010; STOICHEV et al., 2002).

2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método analítico, rápido e simples, para determinação de quinze impurezas elementares: arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), chumbo (Pb), vanádio (V), irídio (Ir), paládio (Pd), platina (Pt), ródio (Rh), rutênio (Ru), mercúrio (Hg), ósmio (Os) e molibdênio (Mo), em fármacos e excipientes, atendendo aos requerimentos das agências regulatórias, utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), avaliando diferentes estratégias para o preparo de amostra. Para eliminar interferências espectrais a cela de reação dinâmica (DRC) será avaliada para a determinação de As, Cr e V.

Aplicar a metodologia desenvolvida para análise de impurezas elementares em diferentes fármacos e excipientes, para se obter o perfil de impurezas elementares e comprovar a versatilidade do método frente a diferentes matrizes, possibilitando seu uso em rotina.

Realizar a especiação química nas amostras, para a determinação das espécies de arsênio e mercúrio, utilizando HPLC acoplado ao ICP-MS, devido à importância toxicológica das diferentes formas químicas destes elementos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação e Acessórios

Foi utilizado um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente equipado com cela de reação dinâmica – DRC-ICP-MS, modelo ELAN DRC II (PerkinElmer, USA), conectado a um computador com o *software* ELAN versão 3.4, instalado em uma sala limpa classe “1000”. O sistema de introdução da amostra foi composto por câmara de nebulização de quartzo tipo ciclônica e nebulizador Meinhard, foram utilizados cone de amostragem e *skimmer* de platina (PerkinElmer, USA).

Os gases usados foram argônio 99,999%, amônia 99,999% e H₂/Ar 5:95% (White Martins, São Paulo, Brasil). Para o preparo das amostras foram utilizados micro-ondas, modelo Ethos Start D (Milestone, USA), ponteira ultrassônica de titânio Vibracell VC 100 controlada por processador USS-100 (Sonics Materials, Danbury, CT, EUA), ultrassom 1400 A (Unique, Brasil) e centrífuga 80-2B (Centribio/Daiki, Brasil).

Para as análises de especiação, foi utilizado um cromatógrafo líquido (HPLC), serie 200, da PerkinElmer, conectado a um computador com o *software* Chromera versão 2.1.0.1631. O HPLC foi acoplado ao ICP-MS através de uma válvula de injeção de seis saídas (Rheodyne 9725), o eluente vindo do cromatógrafo (saída da coluna), foi introduzido na entrada do nebulizador do ICP-MS através de tubos de peek (1,59 mm o.d.) e conectores de peek.

3.2 Reagentes, soluções e limpeza de material

Em todo o trabalho foram utilizados reagentes de grau de pureza analítica, exceto ácido nítrico (HNO₃) 65% v/v (Sigma[®], Stenheim, Alemanha) e ácido clorídrico (HCl), (Sigma[®], Stenheim, Alemanha), que foram destilados em temperatura inferior à de ebulição, empregando-se destilador de quartzo (Marconi) para eliminação de impurezas e água deionizada de alta pureza, resistividade 18,2 MΩ cm, obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore RiOs-DITM, EUA).

Todos os frascos utilizados foram mantidos em solução de ácido nítrico 15% v/v por 24 horas, enxaguados cinco vezes com água ultra pura, Milli-Q, e secos

em câmara de fluxo laminar, pois a limpeza do material utilizado para preparo e armazenamento das soluções e amostras requer uma atenção especial no caso de análise de baixas concentrações de metais (FADINI; JARDIM, 2000).

Soluções estoque dos analitos foram preparadas pela diluição de quantidades apropriadas de soluções padrão dos analitos de interesse em ácido nítrico bidestilado 3% v/v. Foram empregadas solução multielementar a 10 mg L^{-1} (*Multi-element ICP-MS Calibration*, PerkinElmer), contendo os analitos - solução 1: As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e V e solução 2: Ir, Pd, Pt, Rh, e Ru, e soluções a 10 mg L^{-1} de Hg, Os e Mo (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA).

As curvas de calibração foram preparadas na faixa de concentração de 1 a $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em ácido nítrico bidestilado 3% v/v. Em todas as amostras foi adicionado o padrão interno ítrio (Y) na concentração de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, obtido através da diluição da solução padrão de Y (Atomic spectroscopy standard, PerkinElmer), de 1000 mg L^{-1} em ácido nítrico bidestilado 3% v/v.

Para a digestão das amostras em micro-ondas, foram utilizados ácido nítrico bidestilado 14 mol L^{-1} e peróxido de hidrogênio 30% v/v (Merck®, Darmstadt, Germany). Nas análises por DRC-ICP-MS foram utilizados L-cisteína (Sigma, St Louis, MO, USA) e cloreto de sódio (Puratonic, Ward Hill, USA) e os padrões foram diluídos em uma matriz sintética composta por L-cisteína ($1,1 \text{ mg mL}^{-1}$), cloreto de sódio ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e ácido nítrico bidestilado 3% v/v, para realizar a calibração por ajuste de matriz. As curvas de calibração foram preparadas na faixa de concentração de 1 a $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e em todas as amostras foi adicionado o padrão interno ítrio (Y) na concentração de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Para validar a metodologia analítica, foram utilizados materiais de referência certificados (SRM), SRM 1568a (Rice flour) e SRM 8415 (Whole egg) adquiridos do *National Institute of Standard and Technology* (NIST, USA).

3.3 Preparo das amostras de fármacos e excipientes

Foi avaliado um total de cinco estratégias de preparo de amostras utilizando fármacos (antibióticos e anti-helmínticos). Para a avaliação das primeiras três estratégias (diluição direta, banho-maria e digestão em micro-ondas sistema aberto) foram utilizadas 12 amostras: azitromicina, cefalexina, cloridrato de

ciprofloxacina, hclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, penicilina G benzatina, sulfametoxazol, trimetoprim, ivermectina, febantel, pamoato de pirantel e praziquantel. Em seguida, diante dos resultados obtidos, discutidos no item Resultados e Discussão, foram utilizadas 21 amostras, para avaliação da digestão em micro-ondas sistema fechado e ponteira de ultrassom: azitromicina, cefalexina, cloridrato de ciprofloxacina, hclato de doxiciclina, enrofloxacin, sulfato de estreptomicina, sulfato de gentamicina, norfloxacina, sulfato de neomicina, oxitetraciclina, penicilina G benzatina, penicilina G potássica, penicilina G procaína, sulfametoxazol, trimetoprim, abamectina, sulfóxido de albendazol, ivermectina, febantel, pamoato de pirantel e praziquantel. Para avaliação de todas as estratégias de preparo, as amostras foram analisadas em triplicata e foram realizados ensaios de recuperação com adição dos padrões na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Em todas as amostras foi adicionado o padrão interno ítrio (Y) na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, obtido através da diluição da solução padrão de Y (Atomic spectroscopy standard, PerkinElmer), de 1000 mg L^{-1} em ácido nítrico bidestilado 3% v/v e foram preparadas amostras branco contendo padrão interno (Y) em solução diluente.

Após escolha da estratégia de preparo da amostra e validação da metodologia, para a aplicação deste método e verificação do perfil de impurezas elementares, foram analisadas, em triplicata, um total de 74 amostras, sendo as 21 amostras citadas acima (de diferentes lotes e/ou fornecedores – representados por letras maiúsculas) e mais as amostras de fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios, anti-helmínticos, hormônio) e excipientes usados em formulações farmacêuticas e obtidos de diferentes fabricantes – moxidectina, ormetoprim, prednisolona, sulfadimetoxina, sulfato de dihidroestreptomicina, progesterona, celulose + lactose (mistura comercial), mistura comercial para auxiliar compressão (composta por: fosfato de cálcio, maltose, celulose, amido de milho, sílica e estearato de magnésio), copovidona, crospovidona, hidroxietilcelulose, palatilizante, sacarose, cobre quelato, manganês quelato, zinco quelato, dióxido de titânio, estearato de magnésio e lactose. Antes da realização das análises, todas as amostras foram tamisadas em peneira de $150 \mu\text{m}$ e homogeneizadas. A tabela abaixo apresenta a classificação e procedência das amostras analisadas.

Tabela 5 – Classificação e procedência das 74 amostras de fármacos e excipientes avaliados, para determinação do perfil de impurezas elementares e aplicação do método, após validação da metodologia analítica

Amostra*	Classificação	Procedência (cidade, província – país)
Azitromicina	Antibiótico	Shanghai - China
Cefalexina - A	Antibiótico	Barcelona - Espanha
Cefalexina - B	Antibiótico	Barcelona - Espanha
Ciprofloxacina Cloridrato - A	Antibiótico	Marastra - Índia
Ciprofloxacina Cloridrato - B	Antibiótico	Shangyu, Zhejiang - China
Doxiciclina Hiclato - A	Antibiótico	Zhangjiagang, Jiangsu - China
Doxiciclina Hiclato - B	Antibiótico	Zhangjiagang, Jiangsu - China
Enrofloxacin	Antibiótico	Brasil
Estreptomicina Sulfato - A	Antibiótico	Sichuan - China
Estreptomicina Sulfato - B	Antibiótico	Sichuan - China
Gentamicina Sulfato - A	Antibiótico	Yantai, Shandong - China
Gentamicina Sulfato - B	Antibiótico	Yantai, Shandong - China
Norfloxacina	Antibiótico	Taizhou, Zhejiang - China
Neomicina Sulfato - A	Antibiótico	Yichang, Hubei - China
Neomicina Sulfato - B	Antibiótico	Leshan, Sichuan - China
Neomicina Sulfato - C	Antibiótico	Shijiazhuang, Hebei - China
Neomicina Sulfato - D	Antibiótico	Yichang, Hubei - China
Oxitetraciclina - A	Antibiótico	Shijiazhuang, Hebei - China
Oxitetraciclina - B	Antibiótico	Chifeng, Inner Mongolia - China
Oxitetraciclina - C	Antibiótico	Shijiazhuang, Hebei - China
Oxitetraciclina - D	Antibiótico	Newry - Irlanda do Norte
Penicilina G Benzatina - A	Antibiótico	Shijiazhuang, Hebei - China
Penicilina G Benzatina - B	Antibiótico	Shijiazhuang, Hebei - China
Penicilina G Benzatina - C	Antibiótico	Hebei - China
Penicilina G Benzatina - D	Antibiótico	Kundl - Áustria
Penicilina G Potássica - A	Antibiótico	Shijiazhuang, Hebei - China
Penicilina G Potássica - B	Antibiótico	Shijiazhuang, Hebei - China

Continuação da Tabela 5

Amostra*	Classificação	Procedência (cidade, província – país)
Penicilina G Procaína - A	Antibiótico	Kundl - Áustria
Penicilina G Procaína - B	Antibiótico	Kundl - Áustria
Penicilina G Procaína - C	Antibiótico	Shijiazhuang, Hebei - China
Penicilina G Procaína - D	Antibiótico	Leping, Jiangxi - China
Penicilina G Procaína - E	Antibiótico	Hebei - China
Penic. G Procaína sem lecitina	Antibiótico	Leping, Jiangxi - China
Sulfametoxazol - A	Antibiótico	Hyderabad - Índia
Sulfametoxazol - B	Antibiótico	Hyderabad - Índia
Trimetoprim - A	Antibiótico	Shouguang, Shandong - China
Trimetoprim - B	Antibiótico	Shandong - China
Abamectina - A	Anti-helmíntico	Shijiazhuang, Hebei - China
Abamectina - B	Anti-helmíntico	Shijiazhuang, Hebei - China
Sulfóxido Albendazol - A	Anti-helmíntico	Changzhou, Jiangsu - China
Sulfóxido Albendazol - B	Anti-helmíntico	Changzhou, Jiangsu - China
Cloridrato de Albendazol	Anti-helmíntico	Changzhou, Jiangsu - China
Ivermectina - A	Anti-helmíntico	Shijiazhuang, Hebei - China
Ivermectina - B	Anti-helmíntico	Shijiazhuang, Hebei - China
Febantel - A	Anti-helmíntico	Hyderabad - Índia
Febantel - B	Anti-helmíntico	Hyderabad - Índia
Pamoato Pirantel	Anti-helmíntico	Shaoxing, Zhejiang - China
Praziquantel - A	Anti-helmíntico	Shaoxing, Zhejiang - China
Praziquantel - B	Anti-helmíntico	Shaoxing, Zhejiang - China
Praziquantel - C	Anti-helmíntico	Shaoxing, Zhejiang - China
Dihidroestreptomicina Sulfato - A	Antibiótico	Sichuan - China
Dihidroestreptomicina Sulfato - B	Antibiótico	Sichuan - China
Dihidroestreptomicina Sulfato - C	Antibiótico	Hebei - China
Moxidectina	Anti-helmíntico	Taizhou, Zhejiang - China
Ormetoprim	Antibiótico	Shanghai - China
Prednisolona	Corticoide (anti-inflamatório)	Taizhou, Zhejiang - China

Conclusão da Tabela 5

Amostra*	Classificação	Procedência (cidade, província – país)
Progesterona	Hormônio	Yacheng, Jiangsu - China
Sulfadimetoxina	Antibiótico	Jiangsu - China
Celulose + Lactose	Excipiente	Wasserburg - Alemanha
Mistura para compressão	Excipiente	Brasil
Copovidona	Excipiente	Brasil
Crospovidona	Excipiente	Miami - Estado Unidos
Dióxido de titânio	Excipiente	Brasil
Estearato de magnésio	Excipiente	Limburgo - Países Baixos
Hidroxietilcelulose	Excipiente	Michigan - Estado Unidos
Lactose (DCL11) - A	Excipiente	Kleve - Alemanha
Lactose (DCL11) - B	Excipiente	Wasserburg - Alemanha
Lactose (DCL11) - C	Excipiente	Rothschild - Estado Unidos
Lactose M450	Excipiente	Kleve - Alemanha
Palatabilizante	Excipiente	Brasil
Sacarose	Excipiente	Brasil
Cobre quelato**	Excipiente ou ativo	Brasil
Manganês quelato**	Excipiente ou ativo	Brasil
Zinco quelato**	Excipiente ou ativo	Brasil

* as letras maiúsculas (de A a E) representam diferentes lotes de amostras ou fabricantes.

** são utilizados como excipientes ou ativos em suplementos alimentares.

3.3.1 Digestão em sistema fechado de micro-ondas

Foram pesados aproximadamente 100 mg de amostra, transferidos para o frasco de PFA (copolímero de tetrafluoretileno e perfluoralcóxido) do micro-ondas e adicionados 4 mL de ácido nítrico bidestilado (14 mol L^{-1}) e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% v/v.

As amostras foram digeridas em micro-ondas, segundo o programa de digestão descrito na tabela 6. Após a digestão as amostras foram transferidas para tubo do tipo Falcon® de 50 mL e diluídas em água ultra pura para um volume final de 30 mL.

Tabela 6 - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado para digestão em sistema fechado das amostras de fármacos analisadas por ICP-MS

Etapa	Tempo	Potência (W)	Temperatura (°C)
1	00:15:00	1100	120
2	00:15:00	1100	170
3	00:15:00	1100	160
4	00:15:00	---	resfriamento

3.3.2 Digestão em micro-ondas - sistema aberto

Foram pesados aproximadamente 100 mg de amostra, transferidos para o tubo do tipo Falcon® de 50 mL e adicionados 2 mL de ácido nítrico bidestilado (14 mol L^{-1}) e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% v/v. Após 24 horas em repouso, em temperatura ambiente (pré-digestão), as amostras foram digeridas em micro-ondas, com o frasco semi aberto (por este motivo foi utilizada a designação sistema aberto), segundo o programa de digestão descrito na tabela 7. Após a digestão as amostras foram diluídas em água ultra pura para um volume final de 15 mL.

Tabela 7 - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado para digestão em sistema aberto das amostras de fármacos analisadas por ICP-MS

Etapa	Tempo	Potência (W)	Temperatura (°C)
1	00:05:00	450	55
2	00:10:00	750	55
3	00:15:00	750	75
4	00:35:00	750	90
5	00:30:00	---	resfriamento

3.3.3 Digestão em banho-maria

Foram pesados aproximadamente 100 mg de amostra, transferidos para o tubo do tipo Falcon® de 15 mL e adicionados 2 mL de ácido nítrico bidestilado (14 mol L^{-1}) e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% v/v. Após 24 horas em repouso, em temperatura ambiente (pré-digestão), as amostras foram digeridas em banho-maria a 60°C por 6 horas. Em seguida, as amostras foram diluídas em água ultra pura para um volume final de 15 mL.

3.3.4 Diluição direta

Foram pesados aproximadamente 100 mg de amostra, transferidos para o tubo do tipo Falcon® de 15 mL e o volume foi completado para 15 mL com ácido nítrico bidestilado 5% v/v.

3.3.5 Extração utilizando ponteira de ultrassom

Inicialmente foi avaliada a metodologia de extração de vários elementos em amostras de cabelo (BATISTA et al., 2009) utilizando ponteira de ultrassom, desenvolvida pelo Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e as devidas otimizações para análise de fármacos foram realizadas.

Foram avaliadas a massa de amostra (30 a 150 mg), ácido (nítrico e clorídrico), concentração de ácido (0 a 100% v/v) e tempo de extração (0 a 10 minutos), para isto foram utilizadas as amostras de: azitromicina, hiclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, penicilina G benzatina e abamectina, com a adição de solução padrão dos 15 elementos, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e foram avaliadas as recuperações para cada elemento e condição avaliada. Para esta avaliação, as amostras foram escolhidas de acordo com sua composição química e solubilidade em meio ácido, todas têm alto teor de matéria orgânica, algumas possuem elementos que podem causar interferências, como cloro e enxofre, nas amostras de hiclato de doxiciclina e sulfato de gentamicina respectivamente, e abamectina é insolúvel em meio aquoso. Em todos os testes, as amostras foram sonicadas utilizando a ponteira de ultrassom (100% de amplitude, 50 W de potência e 20 kHz de frequência). Para evitar contaminações, a ponteira foi lavada com água ultra pura, sonicada em ácido nítrico 50% v/v por 20 segundos e lavada novamente com água ultra pura, entre a realização das análises.

Após otimização, foram realizadas análises pesando-se 100 mg de amostra, transferidas para tubo do tipo Falcon® de 15 mL e adicionados 3 mL de ácido nítrico bidestilado (50% v/v). As amostras foram submetidas ao ultrassom por 1 minuto (100% de amplitude, 50 W de potência e 20 kHz de frequência) e centrifugadas por 2 minutos a 900 x g, em seguida, 1 mL do sobrenadante, foi transferido para um tubo do tipo Falcon® de 15 mL e as amostras foram diluídas em

água ultra pura para um volume final de 7,5 mL. A figura abaixo mostra o esquema da ponteira de ultrassom utilizada para preparo das amostras.

Figura 2 – Esquema da ponteira de ultrassom utilizada para preparo das amostras

Fonte: próprio autor.

3.4 Padrão interno

O padrão interno é uma espécie química, não presente na amostra, incorporado a cada amostra e padrões de calibração em uma concentração fixa e conhecida, com o objetivo de corrigir flutuações do sinal (contagens por minuto) causadas por variações na densidade, viscosidade e tensão superficial, os quais podem afetar diretamente o transporte da amostra, a repetitividade e a exatidão (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

Para a seleção do elemento a ser utilizado como padrão interno, deve-se considerar o espectro de massas dos analitos a serem analisados e a ocorrência de interferências espectrais sobre o padrão interno. O procedimento de cálculo para a concentração das amostras envolve o cálculo da razão do sinal do analito pelo sinal do elemento escolhido como padrão interno. No presente trabalho, devido a gama de elementos analisados, foi utilizado o padrão interno ítrio (^{89}Y), adicionado na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, em cada uma das amostras e nos padrões.

Outros elementos, tais como, ouro (Au), índio (In), ródio e irídio poderiam ter sido utilizados, porém, Au e In, estão presentes em uma das soluções

multielementares utilizada para elaboração da curva de calibração, e Rh e Ir são elementos determinados neste trabalho.

3.5 Condições instrumentais de operação do ICP-MS

A tabela abaixo descreve as condições instrumentais de operação do ICP-MS, ELAN DRC II, utilizadas para análise da concentração elementar total das amostras de fármacos e excipientes.

Tabela 8 - Parâmetros operacionais do ICP-MS modo padrão (Elan DRC II, PerkinElmer)

Parâmetro	Condição/ característica
Nebulizador	Meinhard®
Câmara de nebulização	Ciclônica
Bico injetor	Quartzo - amostras clínicas (2,0mm)
Auto lentes	Ligada
Potência de radiofrequência (W)	1100
Vazão do argônio (L min ⁻¹)	
Nebulizador	0,56 - 0,98 (otimizado diariamente)
Plasma	15
Auxiliar	1,2
Interface	Cones de platina
Cone de amostragem	1,1mm
Skimmer	0,9mm
Modo de varredura	Intensidade máxima do sinal
Tempo de integração do sinal (ms)	2000
Replicatas	3
Sweeps (varredura quadrupolo analisador)	40
Leituras	1
Dwell time (tempo residência por analito - ms)	50
Voltagem das lentes (v)	6,0 a 8,0
Voltagem das lentes estágio analógico (v)	-1587
Voltagem das lentes estágio pulso (v)	800
Tempo morto do detector (ns)	55
Fluxo de aspiração da amostra (mL min ⁻¹)	1,0
Modo padrão (quadrupolo-ICP-MS)	⁷⁵ As, ¹¹¹ Cd, ⁵² Cr, ⁶³ Cu, ²⁰² Hg, ¹⁹³ Ir, ⁹⁸ Mo, ⁶⁰ Ni, ⁵⁸ Ni, ¹⁹² Os, ²⁰⁸ Pb, ¹⁰⁶ Pd, ¹⁹⁵ Pt, ¹⁰³ Rh, ¹⁰² Ru e ⁵¹ V
Equação de correção (chumbo)	(²⁰⁴ Pb-[0.230074× ²⁰² Hg])+ ²⁰⁶ Pb+ ²⁰⁷ Pb+ ²⁰⁸ Pb)

3.6 Otimização da Cella de Reação Dinâmica (DRC)

Avaliou-se a utilização do DRC-ICP-MS, com os gases de reação hidrogênio (H_2/Ar) - mistura de hidrogênio e argônio na proporção 5: 95%, para determinação de arsênio, e amônia (99,999%), para a determinação de cromo e vanádio, que são os elementos mais suscetíveis a interferências espectrais.

A otimização dos parâmetros do DRC, vazão e Rp_q , foi realizada através da leitura da matriz sintética e da matriz sintética adicionada dos padrões. Foram considerados os parâmetros vazão do gás de reação e Rp_q , para cada valor de vazão do gás foi feita uma varredura no quadrupolo, instalado no DRC, para determinar o melhor Rp_q . O ponto, vazão e Rp_q , que apresentou menor concentração equivalente de sinal de fundo (BEC), foi considerado a melhor condição devido a menor presença de interferentes. Desta forma, foram definidos os valores de vazão e Rp_q que apresentam melhor sensibilidade para a concentração avaliada do analito em relação à matriz. As condições instrumentais de operação do DRC-ICP-MS estão descritas na tabela 9.

Para esta avaliação, foi preparada uma matriz sintética contendo os principais interferentes presentes nas amostras, que irão gerar o sinal de fundo, composta por: L-cisteína ($1,1\text{ mg mL}^{-1}$, fonte de carbono e enxofre), cloreto de sódio ($0,5\text{ mg mL}^{-1}$, fonte de sódio e cloro) e ácido nítrico bidestilado 3% v/v e uma matriz sintética adicionada dos analitos (*spike*) na concentração de $1,0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Em todas as amostras foi adicionado o padrão interno ítrio (Y) na concentração de $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. A matriz sintética, contendo $0,33\text{ mg mL}^{-1}$ de carbono, $0,30\text{ mg mL}^{-1}$ de enxofre e $0,30\text{ mg mL}^{-1}$ de cloro, concentração média destes interferentes nas amostras, também foi utilizada para realizar a calibração por ajuste de matriz.

Para garantir que o sistema contenha apenas o gás de reação, após ignição do plasma, o gás de reação foi purgado três vezes (por 30 segundos), a uma vazão de $0,001\text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 9 - Parâmetros operacionais do DRC-ICP-MS (Elan DRC II, PerkinElmer)

Parâmetro	Condição/ característica
Nebulizador	Meinhard®
Câmara de nebulização	Ciclônica
Bico injetor	Quartzo - amostras clínicas (2,0mm)
Auto lentes	Ligada
Potência de radiofrequência (W)	1100
Vazão do argônio (L min ⁻¹)	
Nebulizador	0,56 - 0,98 (otimizado diariamente)
Plasma	15
Auxiliar	1,2
Interface	Cones de platina
Cone de amostragem	1,1mm
Skimmer	0,9mm
Modo de varredura	Intensidade máxima do sinal
Tempo de integração do sinal (ms)	2000
Replicatas	3
<i>Sweeps</i> (varredura quadrupolo analisador)	40
Leituras	1
<i>Dwell time</i> (tempo residência por analito - ms)	50
Voltagem das lentes (v)	6,0 a 8,0
Voltagem das lentes estágio analógico (v)	-1587
Voltagem das lentes estágio pulso (v)	800
Tempo morto do detector (ns)	55
Fluxo de aspiração da amostra (mL min ⁻¹)	1,0
Modo DRC (DRC-ICP-MS)	Gás de reação H ₂ /Ar: ⁷⁵ As Gás de reação NH ₃ : ⁵² Cr e ⁵¹ V
Vazão H ₂ /Ar (mL min ⁻¹)	0,1 a 1,4 (otimização diária)
Vazão NH ₃ (mL min ⁻¹)	0,1 a 1,4 (otimização diária)
Variação do RPq	H ₂ /Ar: 0,40 a 0,90 e NH ₃ : 0,40 a 0,90

3.7 Especificação de arsênio e mercúrio

Foram avaliados os métodos de especificação química de mercúrio e arsênio, utilizando HPLC-ICP-MS, já desenvolvidos e validados pelo Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e as devidas otimizações das metodologias para análise de Hg e As em fármacos foram realizadas de acordo com as necessidades de separação cromatográfica e preparo das amostras (BATISTA et al., 2011a; BATISTA et al., 2011b; RODRIGUES et al., 2010).

Para especificação de Hg, foi utilizada uma seringa de injeção com “loop” de 100 µL, análises a temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, modo

isocrático, coluna cromatográfica de fase reversa C18 (150 mm x 4,0 mm – 5,0 μm , Brownlee Columns, PerkinElmer, USA) e pré-coluna C18, e tempo de corrida de aproximadamente 10 minutos. A fase móvel foi composta por 95% de uma solução contendo: 0,05% v/v de 2-mercaptoetanol (Sigma, St Louis, MO, USA); 0,4% m/v de L-cisteína (Fluka, Japan); acetato de amônio 99,99% (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA) solução 0,06 mol L⁻¹ e por 5% v/v de metanol (grau HPLC - J.T. Baker, EUA) e fluxo 1,0 mL min⁻¹ (BATISTA et al., 2011a; RODRIGUES et al., 2010).

Foram utilizadas soluções padrão de mercúrio inorgânico 10 mg L⁻¹ (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA), cloreto de metil mercúrio (CH₃HgCl) 1000 mg L⁻¹ e cloreto de etil mercúrio (CH₃CH₂HgCl) 1000 mg L⁻¹ (Alfa Aesar), diluídas na faixa de concentração de 2,0 – 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para elaboração da curva analítica. Os padrões e amostras foram diluídos em uma solução composta por: ácido clorídrico 0,10% v/v, L-cisteína 0,05% m/v e 2-mercaptoetanol 0,10% v/v e submetidos ao ultrassom por 15 minutos. Para preparo das amostras, foram transferidos cerca de 200 mg de amostra para tubo do tipo Falcon[®] de 15 mL e adicionados 10 mL da solução acima. Após ultrassom e homogeneização, as amostras foram filtradas em membrana de celulose 0,20 μm (Millipore, USA) e analisadas.

Para especiação de As, foi utilizada uma seringa de injeção com “loop” de 100 μL , análises a temperatura de 25°C, modo isocrático, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, coluna cromatográfica de troca iônica (aniônica) PRP-X 100 - 150 mm x 4,6 mm e 5 μm (Hamilton, Reno, NV EUA), tempo de corrida de 9 minutos e fase móvel, preparada diariamente, composta por 98% v/v de tampão 10 mmol L⁻¹ HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻, pH 8,5 e 2% v/v de metanol conforme proposto por Batista et al. (2011b). Todos os reagentes utilizados, mono-hidrogenofosfato de di-amônio ((NH₄)₂HPO₄), (Sigma, Steinheim, Alemanha), di-hidrogenofosfato de amônio (NH₄H₂PO₄), (Fluka, St Louis, MO, USA), metanol (grau HPLC - J.T. Baker, EUA) e hidróxido de amônio (NH₄OH), (Fluka, St Louis, MO, USA) são de grau analítico. As condições cromatográficas foram otimizadas de acordo com as necessidades de separação, durante a realização das análises de especiação (BATISTA et al., 2011b; SANZ; MUNOZ-OLIVAS; CÂMARA, 2005).

As soluções estoque, de todas as espécies de As, foram preparadas na concentração de 1000 mg L⁻¹ e armazenadas em frascos âmbar a temperatura inferior a 4°C. Foram preparadas soluções padrão de 100 mg L⁻¹ de quatro diferentes

espécies de arsênio. As^{3+} (As_2O_3 , Aldrich, St Louis, USA) foi preparado em 25 mL de hidróxido de sódio (NaOH) $0,18 \text{ mol L}^{-1}$, após solubilização, a solução foi acidificada com a adição de 25 mL de HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ para tornar o meio não oxidante e prevenir a conversão a As^{5+} . O padrão de As^{5+} ($\text{As}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Aldrich, St Louis, USA) foi preparado em 25 mL de NaOH $0,18 \text{ mol L}^{-1}$, após solubilização a solução foi acidificada com 25 mL de ácido nítrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (meio oxidante). As soluções padrão de dimetil-arsênio ($\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$, Fluka, St Louis, USA) e monometil-arsênio ($\text{Na}_2\text{CH}_3\text{O}_3 \cdot \text{As} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Chem Service, West Chester, USA) foram preparadas em ácido nítrico $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Foram preparadas soluções intermediárias de 10 mg L^{-1} , para isto, As^{3+} foi diluído em HCl $0,024 \text{ mol L}^{-1}$ e As^{5+} , DMA e MMA foram diluídos em ácido nítrico $0,0014 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, foi preparada uma solução intermediária dos padrões, a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em ácido nítrico 2% v/v. As soluções padrão foram diluídas em ácido nítrico 0,4% v/v e metanol 2% v/v, na faixa de concentração de $2,0 - 20,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para elaboração da curva analítica.

Para o preparo das amostras, foram pesados cerca de 100 mg de amostra em tubo do tipo Falcon[®] de 15 mL e adicionados 5 mL de uma solução extratora contendo ácido nítrico 0,4% v/v e metanol 2% v/v. A amostra foi aquecida em banho-maria a 80°C por 30 minutos, e após homogeneização e resfriamento a temperatura ambiente, as amostras foram filtradas em membrana de celulose $0,20 \text{ } \mu\text{m}$ (Millipore, USA) e analisadas.

As quantificações das espécies de Hg e As foram baseadas na calibração externa e área do pico.

3.8 Validação Analítica

Todo método analítico deve ser respaldado pela credibilidade que uma validação analítica pode proporcionar e é essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo adequado ao propósito de utilização do método. Segundo definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação analítica deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados e fornecendo uma evidência documentada (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2007; USP, 2016c).

Os parâmetros analíticos, também chamados de figuras de mérito ou características de desempenho, são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Seletividade é a capacidade do método analítico avaliar, de forma inequívoca, o elemento de interesse na presença de componentes da matriz ou elementos com propriedades semelhantes ao analito, que podem interferir na sua determinação (ANVISA, 2003; ICH 1996). Na técnica de ICP-MS, utilizando o detector de espectrômetro de massas, a seletividade é avaliada pela razão massa/carga do elemento, estudos de adição e recuperação também podem ser utilizados apesar das limitações (USP, 2016c).

A capacidade de o método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do elemento em estudo é definida como linearidade. A equação de reta ou curva analítica ($y = ax + b$), expressa a relação entre o sinal obtido e a concentração do elemento. A estimativa dos coeficientes angular, (inclinação ou *slope*) e linear, é feita usando o método dos mínimos quadrados, também são calculados os coeficientes de correlação de *Pearson* (r) e de determinação (r^2), que permitem estimar a qualidade da curva obtida, quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,99 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2007; USP, 2016c). Para cada analito avaliado, foram elaboradas curvas analíticas com 5 pontos (concentrações) e foram avaliados os coeficientes de correlação para validação da linearidade.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do elemento, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do elemento, que pode ser quantificada, com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando um determinado procedimento experimental (ANVISA, 2003; USP, 2016c). O LD e LQ podem ser calculados pelas equações 4 e 5, respectivamente, onde DP representa o desvio padrão de 10 leituras consecutivas da amostra branco e o *slope* (coeficiente angular) é obtido a partir da curva analítica. Os valores obtidos pelas equações abaixo são

multiplicados pelo fator de diluição da amostra para obtenção do LD e LQ do método.

$$LD = 3,0 \times \frac{DP}{\text{slope}} \quad (\text{Equação 4})$$

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{\text{slope}} \quad (\text{Equação 5})$$

A precisão é definida como a dispersão de resultados entre ensaios independentes, de uma mesma amostra ou amostras semelhantes, sob determinadas condições. Este parâmetro é avaliado pelo cálculo do desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação - CV), expresso em porcentagem, de um número significativo de medições, segundo a equação 6, onde: DP é o desvio padrão das medidas e $\bar{x}$ é a média dos valores obtidos (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2007; USP, 2016c).

$$CV(\%) = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Este parâmetro pode ser avaliado em três níveis: repetitividade ou precisão intraensaio (concordância entre resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra e sob as mesmas condições); precisão intermediária ou interensaio (avalia o efeito de variações dentro do laboratório, como diferentes dias, analistas ou equipamentos) e reprodutibilidade (concordância entre os resultados de medições de uma mesma amostra, sob condições variadas, como a alteração de laboratório) (ANVISA, 2003; USP, 2016c).

Para avaliar a precisão desta metodologia foram feitas análises de cinco amostras de fármacos (azitromicina, hiclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, penicilina G benzatina e abamectina), adicionadas de padrão dos 15 elementos avaliados (concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$), preparadas em 6 replicatas ($n=6$). Este procedimento foi realizado em 2 diferentes dias, avaliando-se assim a precisão

intraensaio e a precisão intermediária, através do cálculo do coeficiente de variação (CV).

A exatidão é definida como o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Para esta avaliação, geralmente se utiliza materiais de referência certificados, comparação de métodos e ensaios de recuperação (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2007; USP, 2016c).

Como não existem materiais de referência dos fármacos e excipientes analisados, a exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação realizados em 6 replicatas ($n=6$), com amostras de cinco fármacos (azitromicina, hclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, penicilina G benzatina e abamectina), adicionadas de padrão de cada um dos 15 elementos avaliados (concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$). Para avaliar a exatidão, foi subtraído o resultado encontrado na análise destas amostras sem a adição dos padrões e a concentração de padrão adicionada foi considerada como 100% de recuperação (valor teórico). Também foram realizadas análises de materiais de referência certificados, compostos por outras matrizes complexas - SRM 1568a (Rice flour) e SRM 8415 (Whole egg), arroz e ovo, adquiridos do *National Institute of Standard and Technology* (NIST, USA).

Para avaliação da precisão e exatidão, as amostras foram escolhidas de acordo com sua composição química e solubilidade em meio ácido. Todas apresentam alto teor de carbono. Algumas possuem elementos que podem causar interferências, como cloro e enxofre, nas amostras de hclato de doxiciclina e sulfato de gentamicina respectivamente, e abamectina é insolúvel em meio aquoso, representando assim, um desafio analítico para avaliação destes parâmetros.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estratégias de preparo de amostra

Para definir a melhor estratégia de preparo, foram avaliadas inicialmente 12 amostras de fármacos, preparados em triplicata - azitromicina, cefalexina, cloridrato de ciprofloxacina, hclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, penicilina G benzatina, sulfametoxazol, trimetoprim, ivermectina, febantel, pamoato de pirantel e praziquantel e 3 procedimentos de preparo – diluição direta, banho-maria e digestão em micro-ondas - sistema aberto.

A maioria das amostras avaliadas (ciprofloxacina, doxiciclina, trimetoprim, febantel, penicilina G benzatina, ivermectina, pamoato de pirantel e praziquantel) não solubilizou completamente em meio ácido, para a avaliação da diluição direta. Para realização da análise por ICP-MS, estas amostras foram filtradas em membrana de celulose de 0,20 µm. Esta estratégia, embora seja simples, não se mostrou robusta para avaliação de diferentes fármacos devido à limitação relacionada à solubilização das amostras. O banho-maria não foi eficiente para a solubilização de ciprofloxacina, febantel e pamoato de pirantel, que necessitaram de filtração antes da análise. A digestão em micro-ondas - sistema aberto, também não atingiu a completa solubilização de todas as amostras avaliadas. Ciprofloxacina, febantel, ivermectina, pamoato de pirantel e penicilina G benzatina, apresentaram quantidade significativa de precipitado após a digestão, e foi necessária a filtração antes da análise. A tabela 10 descreve os resultados obtidos na análise por diluição direta em meio ácido (DD), banho-maria (BM) e digestão em micro-ondas - sistema aberto (SA). Para avaliar a exatidão dos procedimentos, foram analisados dois materiais de referência certificados: SRM 1568a (Rice flour) e SRM 8415 (Whole egg), que não solubilizaram completamente na DD e BM, e foram realizados ensaios de recuperação, com adição dos padrões na concentração de 10 µg L⁻¹, às amostras de azitromicina e sulfato de gentamicina, pois estas ficaram completamente solúveis. Para esta avaliação, foi subtraído o resultado encontrado na análise destas amostras sem a adição dos padrões e a concentração de padrão adicionada foi considerada como 100% de recuperação (valor teórico). Os resultados obtidos estão descritos nas tabelas 11 e 12.

Tabela 10 - Resultados (expressos em ng g⁻¹) obtidos na análise de 12 fármacos por diferentes estratégias de preparo: diluição direta (DD), banho-maria (BM) e digestão em micro-ondas - sistema aberto (SA)

Elemento	¹⁹³ Ir	¹⁰⁶ Pd	¹⁹⁵ Pt	¹⁰³ Rh	¹⁰² Ru	⁷⁵ As	¹¹¹ Cd	⁵² Cr	⁶³ Cu	²⁰⁸ Pb	⁶⁰ Ni	⁵¹ V	⁹⁸ Mo	²⁰² Hg	¹⁹² Os
Preparo															
Azitromicina															
DD	ND	ND	ND	0,496	ND	ND	ND	3052	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3477	26,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4126	21,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cefalexina															
DD	ND	ND	ND	0,926	ND	ND	ND	8586	548	57,1	660	47,5	495	ND	ND
BM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8880	713	32,5	1088	58,2	643	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9028	721	24,9	727	48,0	622	ND	ND
Cloridrato de Ciprofloxacina															
DD	ND	ND	ND	ND	ND	302	ND	772	65,5	ND	84,8	625	23,1	ND	ND
BM	ND	ND	ND	ND	ND	276	ND	2799	62,4	ND	117	548	33,9	ND	ND
SA	ND	1,68	ND	ND	ND	146	ND	2547	51,3	ND	81,2	301	25,0	ND	ND
Hiclato de Doxíciclina															
DD	ND	96,7	ND	ND	ND	244	ND	6633	66,5	29,7	365	482	184	ND	ND
BM	ND	353	ND	ND	ND	421	ND	10461	74,1	36,9	421	778	312	ND	ND
SA	ND	386	ND	ND	ND	306	ND	10698	87,9	32,8	414	560	320	ND	ND
Sulfato de Gentamicina															
DD	ND	3,13	ND	ND	ND	323	184	1735	ND	106	214	70,9	7,09	ND	ND
BM	ND	3,67	ND	ND	ND	410	200	2089	31,7	120	285	150	7,40	ND	ND
SA	ND	5,31	ND	ND	ND	378	205	2078	ND	116	212	83,1	6,59	ND	ND
Penicilina G Benzatina															
DD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1946	ND	ND	ND	29,1	ND	ND	ND
BM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2553	ND	ND	ND	55,5	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2610	ND	ND	ND	28,5	ND	ND	ND

*As, Cr e V foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração (ng g⁻¹) - média da leitura de três réplicas da amostra

***ND – abaixo do limite de detecção

Conclusão da Tabela 10 - Resultados (ng g^{-1}) obtidos na análise de 12 fármacos por diferentes estratégias de preparo: diluição direta (DD), banho-maria (BM) e digestão em micro-ondas - sistema aberto (SA)

Elemento	^{193}Ir	^{106}Pd	^{195}Pt	^{103}Rh	^{102}Ru	^{75}As	^{111}Cd	^{52}Cr	^{63}Cu	^{208}Pb	^{60}Ni	^{51}V	^{98}Mo	^{202}Hg	^{192}Os
Preparo															
Sulfametoxazol															
DD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2590	ND	58,5	34,8	40,0	2,62	ND	ND
BM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2355	ND	64,7	55,1	43,6	1,98	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3046	ND	65,2	ND	37,0	ND	ND	ND
Trimetoprim															
DD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2983	24,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1806	29,3	ND	ND	12,5	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3015	31,0	ND	ND	9,96	ND	ND	ND
Ivermectina															
DD	ND	ND	ND	27,9	ND	ND	ND	137	19,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BM	ND	ND	ND	102	ND	ND	ND	4277	66,6	ND	ND	7,30	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	92,1	ND	ND	ND	4562	70,1	ND	ND	6,21	ND	ND	ND
Febantel															
DD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	162	ND	ND	ND	5,25	ND	ND	ND
BM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3034	ND	ND	ND	13,3	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2393	ND	ND	ND	10,1	ND	ND	ND
Pamoato de Pirantel															
DD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1173	57,1	ND	ND	16,4	ND	ND	ND
BM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3831	108	ND	20,7	14,8	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3220	55,5	ND	ND	15,0	ND	ND	ND
Praziquantel															
DD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1528	19,5	ND	123	ND	ND	ND	ND
BM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4215	35,1	ND	224	ND	ND	ND	ND
SA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5220	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*As, Cr e V foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração (ng g^{-1}) - média da leitura de três réplicas da amostra

***ND – abaixo do limite de detecção

Tabela 11 - Resultados obtidos na análise dos materiais de referência por diferentes estratégias de preparo: diluição direta (DD), banho-maria (BM) e digestão em micro-ondas - sistema aberto (SA)

SRM 1568a Rice Flour (NIST)				
Elemento	Valor certificado $\pm$ DP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Valor obtido $\pm$ DP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)		
		DD	BM	SA
As*	290 $\pm$ 30	241 $\pm$ 23	227 $\pm$ 35	134 $\pm$ 11
Cd	22 $\pm$ 2	18 $\pm$ 0,3	24 $\pm$ 5	19 $\pm$ 2
Cu	2400 $\pm$ 300	2231 $\pm$ 321	2564 $\pm$ 213	2618 $\pm$ 338
Mo	1460 $\pm$ 80	1239 $\pm$ 94	1367 $\pm$ 104	1543 $\pm$ 99
Hg	5,8 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 2,5	2,2 $\pm$ 1,8	1,7 $\pm$ 1,2
SRM 8415 Whole egg powder (NIST)				
Elemento	Valor certificado $\pm$ DP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Valor obtido $\pm$ DP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)		
		DD	BM	SA
Cu	2700 $\pm$ 350	2584 $\pm$ 114	2479 $\pm$ 133	2440 $\pm$ 142
V*	459 $\pm$ 81	433 $\pm$ 18	411 $\pm$ 27	414 $\pm$ 13
Cr*	370 $\pm$ 180	352 $\pm$ 13	462 $\pm$ 28	485 $\pm$ 2
Mo	247 $\pm$ 23	117 $\pm$ 121	199 $\pm$ 13	204 $\pm$ 7
Pb	61 $\pm$ 12	17 $\pm$ 0,9	17 $\pm$ 1,7	19 $\pm$ 1,8
Hg	4 $\pm$ 3	1,0 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,6	ND

*As, Cr e V foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração média ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra (n = 3)

***ND – abaixo do limite de detecção

Tabela 12 – Resultados de recuperação obtidos na análise de amostras adicionadas de padrão (concentração 10 $\mu\text{g L}^{-1}$), por diferentes estratégias de preparo: diluição direta (DD), banho-maria (BM) e digestão em micro-ondas - sistema aberto (SA)

Amostra	Azitromicina			Sulfato de Gentamicina		
	DD	BM	SA	DD	BM	SA
Elemento	Recuperação (%) $\pm$ DP					
¹⁹³ Ir	90 $\pm$ 2,2	100 $\pm$ 3,5	100 $\pm$ 2,7	94 $\pm$ 2,0	97 $\pm$ 1,2	100 $\pm$ 3,1
¹⁰⁶ Pd	94 $\pm$ 3,1	90 $\pm$ 2,4	91 $\pm$ 3,4	95 $\pm$ 2,4	94 $\pm$ 2,0	96 $\pm$ 2,0
¹⁹⁵ Pt	91 $\pm$ 2,5	92 $\pm$ 3,1	95 $\pm$ 2,4	90 $\pm$ 1,4	93 $\pm$ 3,4	95 $\pm$ 2,5
¹⁰³ Rh	96 $\pm$ 1,4	96 $\pm$ 2,7	97 $\pm$ 1,9	96 $\pm$ 1,8	97 $\pm$ 2,1	97 $\pm$ 3,7
¹⁰² Ru	84 $\pm$ 3,4	85 $\pm$ 2,7	85 $\pm$ 3,4	84 $\pm$ 2,8	86 $\pm$ 1,5	86 $\pm$ 1,0
⁷⁵ As	80 $\pm$ 2,7	78 $\pm$ 2,9	77 $\pm$ 3,0	80 $\pm$ 1,9	77 $\pm$ 1,6	78 $\pm$ 2,5
¹¹¹ Cd	81 $\pm$ 3,4	88 $\pm$ 3,7	82 $\pm$ 3,1	79 $\pm$ 4,1	85 $\pm$ 2,3	81 $\pm$ 3,2
⁵² Cr	82 $\pm$ 3,6	97 $\pm$ 2,9	99 $\pm$ 3,7	79 $\pm$ 4,1	93 $\pm$ 2,9	95 $\pm$ 2,7
⁶³ Cu	86 $\pm$ 1,3	93 $\pm$ 2,4	99 $\pm$ 3,3	88 $\pm$ 2,0	94 $\pm$ 3,1	101 $\pm$ 1,7
²⁰⁸ Pb	69 $\pm$ 3,4	66 $\pm$ 4,1	67 $\pm$ 2,7	70 $\pm$ 2,4	69 $\pm$ 3,8	66 $\pm$ 3,0
⁶⁰ Ni	92 $\pm$ 2,4	94 $\pm$ 1,5	92 $\pm$ 3,1	93 $\pm$ 1,8	95 $\pm$ 2,3	95 $\pm$ 2,1
⁵¹ V	91 $\pm$ 2,5	87 $\pm$ 3,1	92 $\pm$ 3,7	90 $\pm$ 2,8	88 $\pm$ 3,0	90 $\pm$ 2,9
⁹⁸ Mo	75 $\pm$ 2,3	78 $\pm$ 3,6	77 $\pm$ 2,4	74 $\pm$ 1,2	77 $\pm$ 3,0	75 $\pm$ 3,2
²⁰² Hg	63 $\pm$ 4,1	65 $\pm$ 3,7	57 $\pm$ 3,8	60 $\pm$ 2,2	63 $\pm$ 3,8	59 $\pm$ 2,9
¹⁹² Os	90 $\pm$ 2,8	90 $\pm$ 1,9	92 $\pm$ 2,5	90 $\pm$ 3,4	91 $\pm$ 3,0	92 $\pm$ 3,6

*As, Cr e V foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em % de recuperação $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra (n = 3)

Podemos observar que o elemento mais frequente entre as 12 amostras analisadas por 3 diferentes procedimentos: diluição direta em meio ácido (DD), banho-maria (BM) e digestão em micro-ondas - sistema aberto (SA), foi o Cr, presente em todas as amostras, seguido pelo V, Cu, Ni e Mo. Não foram detectados Ir, Pt, Ru, Hg e Os em nenhuma amostra avaliada e alguns elementos só foram detectados, em baixa concentração, em um dos procedimentos de preparo, como o Rh nas amostras de cefalexina e azitromicina, Pd na ciprofloxacina, Cu no sulfato de gentamicina e Ni no pamoato de pirantel.

Embora alguns valores tenham apresentado semelhança entre os três procedimentos, tais como, Cr nas amostras de cefalexina, Cd, Pb e Mo no sulfato de gentamicina e V no sulfametoxazol, os resultados de recuperação (57 a 101%) e a avaliação da exatidão através da análise dos materiais de referência, demonstraram que estas estratégias não foram eficazes para a obtenção de resultados consistentes.

Apesar de ser uma estratégia extremamente simples, a DD não é capaz de solubilizar a maioria das amostras e apresentou baixa recuperação, principalmente para Pb, Mo e Hg (63 a 75%), o BM também apresentou problemas em relação a solubilização e recuperação, e requer um tempo alto de preparo (mais de 24 horas) e SA além das desvantagens discutidas acima, tempo e problemas de solubilização das amostras, requer ainda a utilização de um micro-ondas, o que aumenta o custo da análise, e não apresentou ganhos significativos em relação a recuperação.

Diante disto, foram avaliadas duas outras estratégias para preparo das amostras, digestão em sistema fechado de micro-ondas (MSF) e extração com ponteira de ultrassom (PU) – após otimização, conforme descrito no item 4.2.

Para estas avaliações, foram analisadas 21 amostras, em triplicata - azitromicina, cefalexina, cloridrato de ciprofloxacina, hclato de doxiciclina, enrofloxacin, sulfato de estreptomicina, sulfato de gentamicina, norfloxacin, sulfato de neomicina, oxitetraciclina, penicilina G benzatina, penicilina G potássica, penicilina G procaína, sulfametoxazol, trimetoprim, abamectina, sulfóxido de albendazol, ivermectina, febantel, pamoato de pirantel e praziquantel.

Todas as amostras solubilizaram completamente e os resultados obtidos são demonstrados nas tabelas 13 e 14.

Para avaliar a exatidão destes procedimentos, foram analisados dois materiais de referência certificados: 1568a (Rice flour) e 8415 (Whole egg), tabela 15,

e foram realizados ensaios de recuperação, com adição dos padrões na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, às amostras de azitromicina, hclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, penicilina G benzatina e abamectina. Para o cálculo da exatidão, foram subtraídos os resultados encontrados na análise destas amostras sem a adição dos padrões e a concentração de padrão adicionada foi considerada como 100% de recuperação (valor teórico). Os resultados obtidos estão descritos nas tabelas 16 e 17.

A avaliação estatística dos dados obtidos na análise de 21 fármacos, utilizando os 2 procedimentos de preparo avaliados, MSF e PU, foi realizada aplicando-se o teste *t* de *Student*, de comparação das médias (alfa 0,05 e nível de confiança de 95%), e demonstrou que os resultados apresentam similaridade, isto é, os dois procedimentos podem ser utilizados para a aplicação da metodologia e os resultados obtidos serão concordantes.

A digestão em sistema fechado de micro-ondas (MSF) apresenta a vantagem de realizar a digestão de várias amostras ao mesmo tempo, porém requer um programa de digestão de 60 minutos e a disponibilidade de um sistema de micro-ondas de relativo alto custo. A extração utilizando ponteira de ultrassom requer o preparo individualizado da amostra, porém são necessários apenas alguns minutos de preparo por amostra, e a aquisição de uma ponteira de ultrassom de relativo baixo custo. É importante ressaltar que os dois procedimentos apresentam necessidades diferentes em relação ao tempo de preparo e equipamentos, porém podem ser utilizados com êxito para determinação de impurezas elementares em fármacos e excipientes.

Tabela 13 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, As, Cd e Cr, em 21 fármacos, por diferentes estratégias de preparo: digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF) e ponteira de ultrassom (PU)

Elemento	^{193}Ir	^{106}Pd	^{195}Pt	^{103}Rh	^{102}Ru	^{75}As	^{111}Cd	^{52}Cr
Amostra e Preparo								
Azitromicina - MSF	ND	$7,2 \pm 0,4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Azitromicina - PU	ND	$9,0 \pm 0,4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cefalexina - MSF	ND	$27,0 \pm 1,0$	ND	ND	ND	ND	ND	$171 \pm 8,1$
Cefalexina - PU	ND	$33,7 \pm 1,7$	ND	ND	ND	ND	ND	$107 \pm 3,0$
Ciprofloxacina - MSF	ND	$6,3 \pm 0,3$	ND	ND	ND	ND	ND	$72,0 \pm 1,0$
Ciprofloxacina - PU	ND	$7,5 \pm 0,4$	ND	ND	ND	ND	ND	$62,8 \pm 3,1$
Doxiciclina - MSF	ND	$531 \pm 14,3$	ND	ND	ND	$128 \pm 4,9$	ND	$734 \pm 24,1$
Doxiciclina - PU	ND	$437 \pm 23,6$	ND	ND	ND	$127 \pm 1,5$	ND	$706 \pm 20,0$
Enrofloxacin - MSF	ND	$3,7 \pm 0,2$	ND	ND	ND	ND	ND	$25,3 \pm 1,2$
Enrofloxacin - PU	ND	$2,6 \pm 0,1$	ND	ND	ND	ND	ND	$21,0 \pm 1,0$
Estreptomicina - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	$155 \pm 7,1$	ND	$277 \pm 7,2$
Estreptomicina - PU	ND	ND	ND	ND	ND	$152 \pm 3,4$	ND	$248 \pm 2,8$
Gentamicina - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	$168 \pm 2,1$	$54,0 \pm 2,5$	$44,4 \pm 2,1$
Gentamicina - PU	ND	$2,6 \pm 0,1$	ND	ND	ND	$161 \pm 7,4$	$60,3 \pm 1,8$	$35,3 \pm 0,4$
Norfloxacin - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Norfloxacin - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Neomicina - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	$573 \pm 17,3$	ND	$196 \pm 1,3$
Neomicina - PU	ND	ND	ND	ND	ND	$550 \pm 18,1$	ND	$187 \pm 5,0$
Oxitetraciclina - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$396 \pm 20,1$
Oxitetraciclina - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$374 \pm 17,1$
Penic. G Benz. - MSF	ND	$9,5 \pm 0,5$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Penic. G Benz. - PU	ND	$10,7 \pm 0,5$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Potássica - MSF	ND	$8,1 \pm 0,4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Potássica - PU	ND	$8,7 \pm 0,2$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - MSF	ND	$8,4 \pm 0,4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - PU	ND	$9,4 \pm 0,5$	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*As e Cr foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra (n = 3)

***ND – abaixo do limite de detecção

Conclusão da Tabela 13 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, As, Cd e Cr, em 21 fármacos, por diferentes estratégias de preparo: digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF) e ponteira de ultrassom (PU)

Elemento	^{193}Ir	^{106}Pd	^{195}Pt	^{103}Rh	^{102}Ru	^{75}As	^{111}Cd	^{52}Cr
Amostra e Preparo								
Sulfametoxazol - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfametoxazol - PU	ND	$2,3 \pm 0,1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Trimetoprim - MSF	ND	$6,1 \pm 0,2$	ND	ND	ND	ND	ND	$28,1 \pm 1,2$
Trimetoprim - PU	ND	$6,7 \pm 0,2$	ND	ND	ND	ND	ND	$24,2 \pm 0,6$
Abamectina - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Abamectina - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulf. Albendazol - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$68,1 \pm 3,2$
Sulf. Albendazol - PU	ND	$2,6 \pm 0,1$	ND	ND	ND	ND	ND	$55,7 \pm 2,8$
Ivermectina - MSF	ND	ND	ND	$19,7 \pm 0,2$	ND	ND	ND	ND
Ivermectina - PU	ND	ND	ND	$7,8 \pm 0,4$	ND	ND	ND	ND
Febantel - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$28,4 \pm 1,1$
Febantel - PU	ND	$4,8 \pm 0,2$	ND	ND	ND	ND	ND	$19,6 \pm 0,8$
Pamoato Pirantel - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pamoato Pirantel - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Praziquantel- MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Praziquantel - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*As e Cr foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$)

***ND – abaixo do limite de detecção

Tabela 14 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Cu, Pb, Ni, V, Mo, Hg e Os, em 21 fármacos, por diferentes estratégias de preparo: digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF) e ponteira de ultrassom (PU)

Elemento	^{63}Cu	^{208}Pb	^{60}Ni	^{51}V	^{98}Mo	^{202}Hg	^{192}Os
Amostra e Preparo							
Azitromicina - MSF	$44,7 \pm 1,2$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Azitromicina - PU	$30,3 \pm 0,3$	ND	ND	ND	ND	ND	$5,2 \pm 0,1$
Cefalexina - MSF	$105 \pm 4,8$	$42,2 \pm 2,0$	$77,2 \pm 3,2$	ND	$119 \pm 2,8$	ND	ND
Cefalexina - PU	$101 \pm 3,3$	$35,1 \pm 1,6$	$69,3 \pm 3,2$	ND	$109 \pm 4,2$	$21,7 \pm 0,7$	ND
Ciprofloxacina - MSF	$87,8 \pm 4,3$	ND	$97,0 \pm 3,2$	ND	$73,8 \pm 3,2$	ND	ND
Ciprofloxacina - PU	$70,1 \pm 3,6$	ND	$102 \pm 5,4$	ND	$66,1 \pm 1,6$	$15,5 \pm 0,4$	ND
Doxiciclina - MSF	ND	ND	$41,1 \pm 1,0$	ND	$25,2 \pm 1,2$	$23,4 \pm 0,7$	ND
Doxiciclina - PU	ND	ND	$39,3 \pm 1,2$	ND	$20,4 \pm 0,5$	$38,0 \pm 1,6$	ND
Enrofloxacin - MSF	$51,1 \pm 2,2$	ND	ND	$15,3 \pm 0,7$	ND	ND	ND
Enrofloxacin - PU	$56,0 \pm 2,7$	ND	ND	$17,1 \pm 0,8$	ND	$10,8 \pm 0,4$	ND
Estreptomicina - MSF	$45,9 \pm 2,2$	ND	$44,2 \pm 1,3$	ND	$33,1 \pm 0,5$	ND	ND
Estreptomicina - PU	$41,2 \pm 1,7$	ND	$33,2 \pm 1,5$	ND	$30,6 \pm 1,4$	ND	ND
Gentamicina - MSF	ND	$42,1 \pm 1,2$	$212 \pm 9,7$	ND	$4,5 \pm 0,7$	ND	ND
Gentamicina - PU	ND	$43,7 \pm 0,5$	$220 \pm 8,9$	ND	$4,1 \pm 0,2$	ND	ND
Norfloxacin - MSF	ND	ND	$55,0 \pm 2,2$	ND	ND	ND	ND
Norfloxacin - PU	ND	ND	$67,4 \pm 1,7$	ND	ND	ND	ND
Neomicina - MSF	$41,1 \pm 0,5$	ND	$101 \pm 3,0$	ND	$45,7 \pm 1,8$	ND	ND
Neomicina - PU	$34,4 \pm 1,6$	ND	$90,7 \pm 4,2$	ND	$50,3 \pm 2,0$	ND	ND
Oxitetraciclina - MSF	$120 \pm 1,2$	ND	$748 \pm 12,8$	$62,3 \pm 2,6$	$6,9 \pm 0,3$	ND	ND
Oxitetraciclina - PU	$130 \pm 5,2$	ND	$769 \pm 13,1$	$55,4 \pm 2,0$	$4,1 \pm 0,2$	ND	ND
Penic. G Benz. - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Penic. G Benz. - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Potássica - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Potássica - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*V foi analisado no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$)

***ND – abaixo do limite de detecção

Conclusão da Tabela 14 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Cu, Pb, Ni, V, Mo, Hg e Os, em 21 fármacos, por diferentes estratégias de preparo: digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF) e ponteira de ultrassom (PU)

Elemento	^{63}Cu	^{208}Pb	^{60}Ni	^{51}V	^{98}Mo	^{202}Hg	^{192}Os
Amostra e Preparo							
Sulfametoxazol - MSF	$52,3 \pm 1,3$	$251 \pm 4,2$	$53,0 \pm 1,7$	ND	$4,6 \pm 0,2$	ND	ND
Sulfametoxazol - PU	$55,0 \pm 2,0$	$271 \pm 13,6$	$51,0 \pm 1,9$	ND	$5,8 \pm 0,1$	ND	ND
Trimetoprim - MSF	ND	ND	ND	$12,2 \pm 0,6$	ND	ND	ND
Trimetoprim - PU	ND	ND	ND	$16,9 \pm 0,6$	ND	ND	ND
Abamectina - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Abamectina - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulf. Albendazol - MSF	4360 ± 96	ND	$53,1 \pm 1,3$	ND	$7,4 \pm 0,2$	ND	ND
Sulf. Albendazol - PU	4390 ± 187	ND	$44,3 \pm 1,9$	ND	$6,8 \pm 0,2$	ND	ND
Ivermectina - MSF	ND	ND	$41,4 \pm 1,4$	ND	ND	ND	ND
Ivermectina - PU	ND	ND	$49,9 \pm 1,6$	ND	ND	ND	ND
Febantel - MSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Febantel - PU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pamoato Pirantel - MSF	$47,1 \pm 2,3$	ND	ND	$13,0 \pm 0,7$	ND	ND	ND
Pamoato Pirantel - PU	$52,5 \pm 2,3$	ND	ND	$14,9 \pm 0,8$	ND	ND	ND
Praziquantel- MSF	$47,0 \pm 1,2$	ND	$40,3 \pm 1,0$	ND	$8,5 \pm 0,4$	ND	ND
Praziquantel - PU	$30,9 \pm 1,1$	ND	$43,6 \pm 0,1$	ND	$5,1 \pm 0,1$	ND	ND

*V foi analisado no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$)

***ND – abaixo do limite de detecção

Tabela 15 - Resultados obtidos na análise dos materiais de referência por diferentes estratégias de preparo: digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF) e ponteira de ultrassom (PU)

SRM 1568a Rice Flour (NIST)			
Elemento	Valor certificado $\pm$ DP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Valor obtido $\pm$ DP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	
		MSF	PU
As*	290 $\pm$ 30	287 $\pm$ 21	306 $\pm$ 14
Cd	22 $\pm$ 2	23,7 $\pm$ 1,1	23,2 $\pm$ 0,8
Cu	2400 $\pm$ 300	2578 $\pm$ 267	2268 $\pm$ 108
Mo	1460 $\pm$ 80	1481 $\pm$ 53	1478 $\pm$ 62
Hg	5,8 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 1,2
SRM 8415 Whole egg powder (NIST)			
Elemento	Valor certificado $\pm$ DP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Valor obtido $\pm$ DP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	
		MSF	PU
Cu	2700 $\pm$ 350	2876 $\pm$ 231	2571 $\pm$ 124
V*	459 $\pm$ 81	406 $\pm$ 33	415 $\pm$ 12
Cr*	370 $\pm$ 180	394 $\pm$ 15	309 $\pm$ 9
Mo	247 $\pm$ 23	229 $\pm$ 7	237 $\pm$ 9
Pb	61 $\pm$ 12	57 $\pm$ 6	69 $\pm$ 3
Hg	4 $\pm$ 3	3,9 $\pm$ 2,3	3,8 $\pm$ 2,6

*As, Cr e V foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração média ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra (n = 3)

Tabela 16 - Resultados de recuperação obtidos com amostras adicionadas de padrão (concentração 10 $\mu\text{g L}^{-1}$), preparadas por digestão em micro-ondas sistema fechado (MSF)

Amostra	Azitromicina	Hiclato de Doxiciclina	Sulfato de Gentamicina	Penicilina G Benzatina	Abamectina
Elemento	Recuperação (%) $\pm$ DP				
¹⁹³ Ir	100 $\pm$ 4,6	101 $\pm$ 4,6	97 $\pm$ 4,6	92 $\pm$ 3,5	101 $\pm$ 1,7
¹⁰⁶ Pd	92 $\pm$ 1,7	93 $\pm$ 3,0	94 $\pm$ 1,7	99 $\pm$ 3,0	97 $\pm$ 4,6
¹⁹⁵ Pt	94 $\pm$ 1,7	95 $\pm$ 4,6	93 $\pm$ 3,0	96 $\pm$ 3,0	95 $\pm$ 3,5
¹⁰³ Rh	100 $\pm$ 3,5	97 $\pm$ 4,6	92 $\pm$ 1,7	97 $\pm$ 3,5	93 $\pm$ 3,0
¹⁰² Ru	92 $\pm$ 3,5	92 $\pm$ 1,7	92 $\pm$ 3,5	92 $\pm$ 3,5	93 $\pm$ 0,0
⁷⁵ As	94 $\pm$ 1,7	95 $\pm$ 3,5	95 $\pm$ 3,5	94 $\pm$ 4,6	93 $\pm$ 3,0
¹¹¹ Cd	101 $\pm$ 1,7	101 $\pm$ 4,6	95 $\pm$ 4,6	97 $\pm$ 3,5	98 $\pm$ 1,7
⁵² Cr	98 $\pm$ 1,7	100 $\pm$ 1,7	101 $\pm$ 1,7	100 $\pm$ 1,7	100 $\pm$ 1,7
⁶³ Cu	97 $\pm$ 3,5	98 $\pm$ 4,6	99 $\pm$ 3,0	100 $\pm$ 4,6	101 $\pm$ 1,7
²⁰⁸ Pb	94 $\pm$ 1,7	92 $\pm$ 3,5	94 $\pm$ 1,7	94 $\pm$ 4,6	93 $\pm$ 3,0
⁶⁰ Ni	96 $\pm$ 3,0	94 $\pm$ 4,6	93 $\pm$ 3,0	96 $\pm$ 3,0	92 $\pm$ 4,6
⁵¹ V	97 $\pm$ 4,6	98 $\pm$ 4,6	101 $\pm$ 1,7	98 $\pm$ 4,6	101 $\pm$ 4,6
⁹⁸ Mo	94 $\pm$ 1,7	94 $\pm$ 1,7	94 $\pm$ 3,5	92 $\pm$ 4,6	96 $\pm$ 3,0
²⁰² Hg	94 $\pm$ 1,7	92 $\pm$ 3,5	94 $\pm$ 1,7	92 $\pm$ 4,6	93 $\pm$ 3,0
¹⁹² Os	95 $\pm$ 3,5	96 $\pm$ 3,0	97 $\pm$ 3,5	97 $\pm$ 3,5	96 $\pm$ 3,0

*As, Cr e V foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em % de recuperação $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra (n = 3)

Tabela 17 - Resultados de recuperação obtidos com amostras adicionadas de padrão (concentração 10 µg L⁻¹), preparadas por extração utilizando ponteira de ultrassom (PU)

Amostra	Azitromicina	Hiclato de Doxíciclina	Sulfato de Gentamicina	Penicilina G Benzatina	Abamectina
Elemento	Recuperação (%) ± DP				
¹⁹³ Ir	90 ± 2,7	91 ± 2,2	92 ± 2,2	92 ± 3,4	90 ± 2,5
¹⁰⁶ Pd	84 ± 3,4	90 ± 4,3	86 ± 4,1	95 ± 3,6	86 ± 2,3
¹⁹⁵ Pt	92 ± 2,5	90 ± 3,2	92 ± 2,5	91 ± 4,1	93 ± 2,9
¹⁰³ Rh	87 ± 4,2	84 ± 4,3	94 ± 3,1	88 ± 2,4	88 ± 2,2
¹⁰² Ru	90 ± 3,6	85 ± 2,1	93 ± 3,1	88 ± 4,9	98 ± 3,4
⁷⁵ As	95 ± 1,1	101 ± 3,6	100 ± 4,4	92 ± 2,0	91 ± 1,1
¹¹¹ Cd	92 ± 2,7	87 ± 1,3	91 ± 3,2	86 ± 3,1	89 ± 1,3
⁵² Cr	95 ± 3,4	88 ± 3,8	97 ± 4,2	89 ± 2,5	95 ± 0,4
⁶³ Cu	93 ± 3,1	87 ± 3,6	91 ± 2,6	101 ± 4,3	101 ± 3,2
²⁰⁸ Pb	99 ± 1,8	97 ± 1,2	96 ± 4,0	84 ± 4,7	100 ± 3,1
⁶⁰ Ni	91 ± 2,7	88 ± 2,3	88 ± 2,7	88 ± 4,0	91 ± 3,2
⁵¹ V	87 ± 3,1	84 ± 2,8	88 ± 3,8	90 ± 2,8	87 ± 0,4
⁹⁸ Mo	88 ± 3,4	87 ± 3,8	90 ± 3,8	84 ± 3,7	86 ± 1,0
²⁰² Hg	90 ± 3,6	88 ± 3,8	93 ± 1,6	92 ± 1,4	85 ± 2,1
¹⁹² Os	100 ± 2,8	90 ± 3,2	101 ± 3,1	92 ± 3,2	88 ± 0,6

*As, Cr e V foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em % de recuperação ± desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra (n = 3)

Entre as amostras analisadas, de acordo com os resultados das tabelas 13 e 14, Ni foi o elemento mais frequente, presente em 57% das amostras. A frequência dos demais elementos encontrados foi: Cr e Cu - 52%, Mo – 48%, Pd – 43% (porém se considerarmos a presença deste elemento em apenas um dos procedimentos de preparo, sua frequência aumenta para 62%), As e V – 19%, Pb – 14%, Rh, Cd e Hg – 5%. Não foram detectados Ir, Pt e Ru, e Os foi detectado em apenas uma amostra utilizando PU, dentre os fármacos investigados.

Os fármacos que apresentaram maior número de elementos foram: cefalexina (Pd, Cu, Pb, Ni, Mo, Cr), hiclato de doxiciclina (Pd, Ni, Mo, As, Cr, Hg) e sulfato de gentamicina (Pb, Cd, Ni, Mo, As, Cr), seguidos por, cloridrato de ciprofloxacina (Pd, Cu, Ni, Mo, Cr), sulfato de estreptomicina (Cu, Ni, Mo, As, Cr), sulfato de neomicina (Cu, Ni, Mo, As, Cr) e oxitetraciclina (Cu, Ni, Mo, Cr, V), enrofloxacin (Pd, Cu, Cr, V), sulfametoxazol (Pd, Cu, Ni, Mo) e sulfóxido de albendazol (Cu, Ni, Mo, Cr), trimetoprim (Pd, Cr, V) e praziquantel (Cu, Ni, Mo), azitromicina (Pd, Cu), ivermectina (Rh, Ni) e pamoato de pirantel (Cu, V), norfloxacina

(Ni), penicilina G benzatina (Pd), penicilina G potássica (Pd), penicilina G procaína (Pd), e febantel (Cr). Na amostra de abamectina não foi detectado nenhum elemento.

A análise dos materiais de referência certificados e a avaliação da exatidão da metodologia, através de estudos de recuperação (valores encontrados entre 84 e 101%), demonstraram que os procedimentos, MSF e PU, são adequados para a quantificação destes 15 elementos em diferentes matrizes.

Podemos notar que foram encontradas altas concentrações de alguns elementos como: As (acima de 550 ng g^{-1}) nas amostras de sulfato de neomicina, Cr ($>700 \text{ ng g}^{-1}$) no hclato de doxiciclina e ($>350 \text{ ng g}^{-1}$) na oxitetraciclina, Ni ($>700 \text{ ng g}^{-1}$) na oxitetraciclina e Cu ($>4300 \text{ ng g}^{-1}$) no sulfóxido de albendazol. A conformidade destes valores com os limites regulatórios será discutida no item 4.5 Aplicação da metodologia para análise de impurezas elementares em fármacos e excipientes.

Algumas precauções específicas para determinação de elementos voláteis como Hg, Os e Pd podem ser necessárias, principalmente quando se analisam amostras complexas. O Hg pode volatilizar e impregnar o sistema de introdução de amostra do ICP, exigindo um longo tempo de limpeza entre as análises para que não ocorra efeito de memória. Por esta razão, alguns trabalhos utilizam adição de HCl e KBrO_3 na matriz de digestão ou ouro como estabilizador de Hg em solução, embora haja controvérsias sobre os méritos destas abordagens (ALLIBONE; FATEMIAN; WALKER, 1999; FISCHER et al., 2014; LI et al., 2015). Em relação ao Os, durante processos de digestão por micro-ondas, pode ocorrer sua oxidação, formando OsO_4 , volátil e tóxico, que pode resultar em um desafio analítico para determinação deste elemento, pois é necessário evitar sua perda devido a volatilização e também prevenir o efeito de memória. As estratégias geralmente utilizadas são a solubilização das amostras em água régia ou ácido clorídrico, ou adição de um estabilizante como a tiouréia – agente complexante do Os, em combinação com ácido ascórbico, após a digestão (FISCHER et al., 2014; HOECKE; CATRY; VANHAECKE, 2012; LI et al., 2015; VENZAGO et al., 2013).

Nas amostras analisadas não foram necessárias estas estratégias, pois recuperações adequadas foram alcançadas, padrões submetidos aos mesmos procedimentos de preparo das amostras demonstraram resultados concordantes com padrões preparados apenas por solubilização em meio ácido e não se observou efeito de memória. Foram tomados os cuidados necessários ao abrir os frascos de micro-

ondas, após a digestão e foram realizadas limpezas periódicas do sistema durante as análises das amostras.

4.2 Otimização da extração utilizando ponteira de ultrassom

A extração por ultrassom baseia-se na lixiviação dos elementos químicos, de materiais em pó, formando uma suspensão ou solução, ao serem transferidos para um solvente adequado. Este procedimento tem sido aplicado com sucesso, pois simplifica a etapa de preparo da amostra, é uma alternativa simples, rápida e de baixo custo. A energia do ultrassom, após passar através do líquido, produz bolhas, devido a mudanças na pressão do líquido. As bolhas explodem durante o processo de extração, gerando energia térmica que acelera os efeitos físicos e aumenta a eficiência de extração. Os principais mecanismos de extração por ultrassom são os efeitos térmicos e de cavitação (SUSLICK et al., 1999). A recuperação obtida neste procedimento irá depender das interações entre o analito e a matriz, características da amostra, solventes utilizados e condições de extração, por este motivo, antes de utilizar o procedimento de extração por ponteira de ultrassom, para análise de fármacos, foi necessário estabelecer as condições ideais de trabalho.

Ao contrário de métodos de preparação de amostras que envolvem altas temperaturas e pressões, como a digestão em micro-ondas, a extração ácida em condições suaves, parece promissora com o uso da ponteira de ultrassom, que possibilita a rápida extração de analitos a partir de amostras sólidas, utilizando uma intensidade ultrassônica muito superior ao banho de ultrassom. Este procedimento tem sido utilizado com êxito na determinação de metais em amostras ambientais e de cabelo, e apresenta um alto rendimento quando comparado aos processos de digestão por micro-ondas (BATISTA et al., 2009; KRISHNA; ARUNACHALAM, 2004).

Os diferentes parâmetros como a composição da solução de extração, concentração de ácido, massa de amostra e tempo de sonicação (extração), associados ao processo de extração, foram otimizados para obter a máxima eficiência de extração para os elementos avaliados. Inicialmente foi avaliada a eficiência de extração utilizando os ácidos clorídrico e nítrico, os testes foram realizados com um volume de 3 mL dos ácidos a 50% v/v, massa de 100 mg de amostra, tempo de ultrassom de 10 minutos, amplitude de 100%, 50 W de potência e 20 kHz de

frequência, as amostras apresentaram melhor solubilidade e recuperação em ácido nítrico, e por este motivo, este foi o meio utilizado nos testes subsequentes, pois a amostra solúvel apresentou maior eficiência de extração.

Em relação à quantidade de amostra, foram avaliadas massas de 30 a 150 mg, preparadas em ácido nítrico 50% v/v, tempo de ultrassom de 10 minutos e amplitude de 100%, 50 W de potência e 20 kHz de frequência. Por se tratar de amostras pouco homogêneas e concentrações a nível traço, uma massa maior de amostra apresentou resultados mais reprodutíveis ($CV < 5\%$), recuperação adequada (maior que 80%) e não houve aglomeração de partículas, que pode dificultar a extração, por isso foi escolhida a massa de 100 mg. Massas maiores resultaram em baixa recuperação certamente por reduzir o efeito do ultrassom, e massas menores geraram resultados pouco precisos ($CV > 10\%$) devido a pouca homogeneidade das amostras. A concentração de ácido nítrico avaliada foi de 0 (amostra preparada em água) a 100% v/v de ácido, utilizando uma massa de 100 mg de amostra, tempo de ultrassom de 10 minutos, amplitude de 100%, 50 W de potência e 20 kHz de frequência. Os resultados são apresentados na figura 3. Podemos observar que a concentração de 50% v/v de ácido nítrico foi adequada para se atingir uma boa recuperação dos elementos (80 a 98%) com precisão satisfatória ($CV < 5\%$), desta forma, não é necessária a utilização de ácido concentrado, o que aumenta a segurança e reduz o gasto de reagentes neste tipo de análise.

Figura 3 - Avaliação da concentração de ácido nítrico a ser utilizada para extração das amostras por ponteira de ultrassom

O tempo de utilização da ponteira de ultrassom (tempo de extração) é importante para se garantir a total extração dos elementos, e depende da interação do analito com a matriz e com a solução extratora. Foi avaliado o tempo de 0 (sem uso da ponteira de ultrassom) a 10 minutos, com uma massa de 100 mg de amostra diluída em 3 mL de ácido nítrico 50% v/v, amplitude, potência e frequência de 100%, 50W e 20 kHz, respectivamente. Foram obtidas boas recuperações (valores entre 81 e 103%), com precisão adequada ($CV < 5\%$), para um tempo de apenas 1 minuto de utilização da ponteira de ultrassom, isto demonstra que este procedimento requer um tempo reduzido de preparo, o que viabiliza seu uso em rotina. Os resultados são apresentados na figura 4.

Figura 4 - Avaliação do tempo a ser utilizado para a extração das amostras por ponteira de ultrassom

Diante destes resultados, foram estabelecidas as condições ideais para o preparo das amostras de fármacos utilizando ponteira de ultrassom: massa de 100 mg de amostra diluída em 3 mL de ácido nítrico 50% v/v, tempo de ultrassom de 1 minuto, amplitude, potência e frequência de 100%, 50W e 20 kHz, respectivamente. As amostras dos fármacos azitromicina, hiclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, penicilina G benzatina e abamectina, devido a sua composição química e solubilidade, foram utilizadas para estas avaliações. Para tal, foi realizada a adição de solução padrão dos 15 elementos avaliados na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e foram avaliadas as recuperações médias para cada elemento e condição avaliada.

Após estabelecer as condições para extração utilizando ponteira de ultrassom, este procedimento foi adotado para analisar 21 amostras de fármacos e os

resultados foram comparados com a digestão em sistema fechado de micro-ondas, conforme já demonstrado no item 4.1.

4.3 Utilização da cela de reação dinâmica para determinação de As, Cr e V.

Os fármacos e excipientes avaliados podem conter uma alta concentração de interferentes, tais como carbono, enxofre e cloreto, responsáveis por significativas interferências poliatômicas que não são eliminadas com a diluição da amostra, calibração por ajuste de matriz, avaliação de um isótopo alternativo e digestão da amostra. Os elementos ^{75}As , ^{52}Cr e ^{51}V podem sofrer interferências importantes e por este motivo foi utilizada a cela de reação dinâmica para estas determinações. Para a avaliação do DRC foi preparada uma matriz sintética contendo os principais interferentes presentes nas amostras - carbono e enxofre (L-cisteína) e sódio e cloreto (cloreto de sódio) em concentração semelhante às encontradas nas amostras, e matriz sintética adicionada dos padrões (*spike*) e também foi avaliada a elaboração da curva analítica em meio aquoso (ácido nítrico) e em matriz sintética.

Arsênio pode sofrer interferências de Ar e Cl, devido a formação de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. O Cr pode sofrer a interferência de Ar, Cl, C e S, devido a formação de $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{1}\text{H}^+$ e $^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$. Já V, sofre principalmente interferência de Cl, devido a formação de $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$. Estes interferentes estão presentes em algumas amostras e, por este motivo, uma maior vazão do gás de reação foi necessária para reduzir o sinal de fundo.

A presença de C, Cl, S, P, N, O e H, nas amostras analisadas, pode causar interferências na determinação de elementos como ^{63}Cu e ^{60}Ni devido a formação de $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$ e $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}^+$, respectivamente. Porém não foi necessário a utilização de DRC nestas determinações pois obtivemos precisão e recuperação adequadas com a utilização do ICP-MS no modo padrão.

Os parâmetros RPq e vazão do gás hidrogênio foram otimizados com a finalidade de se obter uma baixa concentração equivalente do sinal de fundo (BEC) para a determinação de arsênio. Os dados de intensidade e sinal de fundo em função do RPq e vazão do gás estão apresentados na figura 5 e demonstram que o valor ideal de RPq é 0,80 e vazão de $0,85 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 5 - Concentrações equivalentes ao sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões de H_2 (a esquerda) e razão entre a intensidade e sinal de fundo em função da variação do RPq (a direita) para a determinação de ^{75}As . Os pontos sem preenchimento correspondem ao valor otimizado.

Para Cr e V, os parâmetros RPq e vazão do gás amônia também foram otimizados, RPq de 0,70 e 0,85 e vazão de 0,70 e 1,00 $mL min^{-1}$ respectivamente. Os dados de intensidade e sinal de fundo em função do RPq e vazão do gás estão apresentados na figura 6.

Figura 6 - Concentrações equivalentes ao sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões de NH_3 (a esquerda) e razão entre a intensidade e sinal de fundo em função da variação do RPq (a direita) para a determinação de ^{52}Cr e ^{51}V . Os pontos sem preenchimento correspondem ao valor otimizado.

Após a otimização dos parâmetros do DRC, vazão do gás de reação e RPq, foram realizadas as determinações de As, Cr e V em algumas amostras de fármacos, que contêm interferentes, tais como, carbono, cloro e enxofre. As calibrações foram realizadas em meio aquoso para análise por q-ICP-MS e em matriz, para análise por DRC-ICP-MS, pois verificamos que há uma diferença de aproximadamente 20% entre os resultados obtidos utilizando curva em matriz ou meio aquoso, o que comprova a necessidade da calibração em matriz para a utilização do DRC.

Os resultados obtidos na análise das amostras, com e sem utilização de DRC estão na tabela 18 e demonstram que a redução das interferências poliatômicas, com o uso do DRC, gerou resultados diferentes de As, Cr e V, quando comparados com os obtidos por q-ICP-MS, geralmente valores menores de concentração e desvio padrão, comprovando a necessidade de utilização do DRC nestas determinações.

Tabela 18 – Avaliação do DRC-ICP-MS e q-ICP-MS para análise de As, Cr e V em amostras de fármacos, resultados expressos em ng g^{-1}

Elemento	Amostra - Concentração $\pm$ DP			
	Hiclato de Doxiciclina	Sulfato de Gentamicina	Oxitetraciclina	Trimetoprim
^{75}As (a)	$128 \pm 4,9$	$168 \pm 2,1$	ND	ND
^{75}As (b)	$185 \pm 6,1$	$175 \pm 4,6$	ND	ND
^{52}Cr (a)	$734 \pm 24,1$	$44,4 \pm 2,1$	$396 \pm 20,1$	$28,1 \pm 1,2$
^{52}Cr (b)	$884 \pm 32,9$	$67,1 \pm 6,3$	$513 \pm 32,9$	$44,4 \pm 4,1$
^{51}V (a)	ND	ND	$62,3 \pm 2,6$	$12,2 \pm 0,6$
^{51}V (b)	ND	ND	$54,8 \pm 3,1$	$19,5 \pm 1,2$

* Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$)

** (a) modo DRC-ICP-MS e (b) modo q-ICP-MS

O coeficiente angular (*slope*) das curvas analíticas obtidas com DRC, para Cr e V, se apresentou maior, isto demonstra um aumento da sensibilidade e foram obtidos menores valores de LD e LQ. Para As, o uso do DRC gerou uma redução do coeficiente angular, isto gera uma diminuição da sensibilidade, pois pode ter havido perda do analito devido ao gás de reação do DRC, porém, sinais mais altos, na ausência do DRC, podem ser devidos a interferências poliatômicas que promovem um aumento no número de contagens, não relacionado ao analito.

A tabela 19 apresenta os valores do coeficiente angular, coeficiente de correlação linear (r), limite de detecção e de quantificação para ^{75}As , ^{52}Cr e ^{51}V nas análises com e sem DRC. Diante destes resultados, foi comprovada a necessidade de utilização do DRC, para eliminação de interferências poliatômicas, na determinação de ^{75}As , ^{52}Cr e ^{51}V .

Tabela 19 - Avaliação dos valores de coeficiente angular, coeficiente de correlação linear (r), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) no modo q-ICP-MS e no modo DRC-ICP-MS

Elemento	Coeficiente angular	r	LD (ng g^{-1})*	LQ (ng g^{-1})*
^{75}As (a)	0,04638	0,99982	0,083	0,277
^{75}As (b)	0,11627	0,99999	0,039	0,130
^{52}Cr (a)	3,65956	0,99946	0,020	0,067
^{52}Cr (b)	0,48898	0,99992	0,143	0,478
^{51}V (a)	9,23070	0,99937	0,009	0,031
^{51}V (b)	0,59595	0,99992	0,019	0,065

* Resultados baseados na análise de 10 replicatas ($n = 10$)

** (a) modo DRC-ICP-MS e (b) modo q-ICP-MS

4.4 Estudos de validação do método analítico

Após definir as condições do DRC a metodologia foi validada para que possa ser utilizada com segurança para a quantificação das amostras. A tabela 20 demonstra os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e o coeficiente de correlação linear (r), obtidos com as curvas de calibração, preparadas na faixa de concentração de 1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os coeficientes de correlação ($r > 0,999$) comprovam ótimas correlações lineares, os limites de detecção e quantificação demonstram que a metodologia atende o propósito de analisar traços de impurezas elementares em fármacos e excipientes.

A precisão foi avaliada em dois níveis: precisão intraensaio e precisão intermediária, através da análise de 5 amostras de fármacos (azitromicina, hiclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, penicilina G benzatina e abamectina) adicionadas dos padrões (concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) e preparadas em 6 replicatas – utilizando os

dois procedimentos de preparo de amostra propostos – digestão em sistema fechado de micro-ondas e ponteira de ultrassom. Os resultados de coeficiente de variação (CV) foram inferiores a 5% e 10%, na avaliação da precisão intraensaio e intermediária, respectivamente, comprovando a precisão adequada dos métodos.

Tabela 20 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e coeficiente de correlação linear (r) determinados por ICP-MS

Analito	LD (ng g ⁻¹)	LQ (ng g ⁻¹)	r
¹⁹³ Ir ^a	0,002	0,007	0,99993
¹⁰⁶ Pd ^a	0,003	0,009	0,99994
¹⁹⁵ Pt ^a	0,003	0,010	0,99992
¹⁰³ Rh ^a	0,001	0,003	0,99990
¹⁰² Ru ^a	0,002	0,008	0,99991
⁷⁵ As ^{b,c}	0,083	0,277	0,99982
¹¹¹ Cd ^a	0,010	0,032	0,99998
⁵² Cr ^{b,c}	0,020	0,067	0,99946
⁶³ Cu ^a	0,038	0,127	0,99998
²⁰⁸ Pb ^a	0,042	0,139	0,99999
⁶⁰ Ni ^a	0,038	0,126	0,99996
⁵¹ V ^{b,c}	0,009	0,031	0,99937
⁹⁸ Mo ^a	0,004	0,013	0,99993
²⁰² Hg ^a	0,011	0,036	0,99909
¹⁹² Os ^a	0,003	0,010	0,99979

^a Resultados baseados na análise de 10 replicatas do branco (ácido nítrico diluído) - (n = 10)

^b Resultados baseados na análise de 10 replicatas do branco (matriz sintética) - (n = 10)

^c Análises por DRC-ICP-MS

Para avaliação da exatidão, como não há disponibilidade de material de referência certificado de fármacos, foram utilizadas outras matrizes complexas - SRM 1568a (Rice flour) e SRM 8415 (Whole egg) adquiridas do *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e foram realizados ensaios de recuperação com 5 amostras de fármacos - azitromicina, hiclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, penicilina G benzatina e abamectina, com adição dos padrões na concentração de 10 µg L⁻¹, preparadas em 6 replicatas. Os resultados obtidos reforçam a exatidão do método, recuperação entre 84 e 101% – utilizando os dois procedimentos de preparo

de amostra propostos com sucesso – digestão em sistema fechado de micro-ondas e ponteira de ultrassom (tabelas 16 e 17) e resultados concordantes com os certificados dos materiais de referência (tabela 15), já demonstrados no item 4.1 Estratégias de preparo de amostra.

As opiniões sobre o uso de materiais de referência para análise de impurezas elementares em fármacos e excipientes estão sendo muito debatidas dentro da farmacopeia americana, mas ainda há divergências. Em primeiro lugar, há preocupações de que é impraticável criar padrões de impureza para todos os materiais a serem testados. Em seguida, a farmacopeia anunciou planos para desenvolver misturas padronizadas que poderiam ser usadas em estudos de validação e recomendou o uso de padrões rastreáveis, quando um padrão farmacopeico não estiver disponível (DESTEFANO et al., 2010; USP, 2009). Como tais padrões ainda não foram estabelecidos, utilizamos uma abordagem alternativa, avaliando cinco diferentes matrizes (fármacos) e dois materiais de referência, SRM 1568a (Rice flour) e SRM 8415 (Whole egg) compostos por matrizes complexas. As amostras foram escolhidas de acordo com sua composição química e solubilidade. Por serem moléculas orgânicas, todas têm alto teor de matéria orgânica. Hiclato de doxiciclina possui cloro e sulfato de gentamicina contém enxofre, elementos que podem causar interferências, e abamectina é insolúvel em meio aquoso. Cabe destacar que, os procedimentos de preparo propostos neste estudo, foram robustos para dissolução e extração dos elementos das matrizes sólidas, obtendo exatidão adequada.

4.5 Aplicação da metodologia para análise de impurezas elementares em fármacos e excipientes

O método desenvolvido e validado foi aplicado para determinação de 15 impurezas elementares: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V, em 74 amostras de insumos farmacêuticos ativos, tais como, antibióticos, anti-inflamatórios, anti-helmínticos, hormônio, quelatos e excipientes usados em formulações farmacêuticas: azitromicina, cefalexina, cloridrato de ciprofloxacina, hiclato de doxiciclina, enrofloxacin, sulfato de estreptomicina, sulfato de gentamicina, norfloxacina, sulfato de neomicina, oxitetraciclina, penicilina G benzatina, penicilina G

potássica, penicilina G procaína, sulfametoxazol, trimetoprim, abamectina, sulfóxido de albendazol, ivermectina, febantel, pamoato de pirantel, praziquantel, moxidectina, ormetoprim, prednisolona, sulfadimetoxina, sulfato de dihidroestreptomicina, progesterona, celulose + lactose (mistura comercial), mistura comercial para auxiliar compressão (composta por: fosfato de cálcio, maltose, celulose, amido de milho, sílica e estearato de magnésio), copovidona, crospovidona, hidroxietilcelulose, palatabilizante, sacarose, cobre quelato, manganês quelato, zinco quelato, dióxido de titânio, estearato de magnésio e lactose.

Os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 21 e 22. Para estas determinações foi utilizado o procedimento de digestão das amostras em sistema fechado de micro-ondas, embora a ponteira de ultrassom também tenha demonstrado eficácia. As amostras identificadas por letras maiúsculas (A, B, C, D e E) referem-se a diferentes lotes de insumo ou diferentes fabricantes, e podemos observar que em alguns casos, como nas amostras de cefalexina e ciprofloxacina, a concentração de elementos, tais como, Cr, Cu e Mo, apresenta valores diferentes em cada amostra analisada, reforçando a importância deste tipo de avaliação. A figura 7 apresenta a frequência dos elementos avaliados nas 74 amostras de fármacos e excipientes, podemos verificar que o elemento mais frequente nas amostras analisadas foi o Cu, presente em 51% das amostras, seguido pelo Cr e Mo – 49%. Os demais elementos encontrados foram: Ni - 38%, Pd – 27%, V – 19%, As – 16%, Pb – 14%, Cd – 11%, Rh – 3% e Hg - 1% de frequência. Não foram detectados Ir, Pt, Ru e Os, nas amostras avaliadas.

Figura 7 - Frequência dos elementos avaliados em 74 amostras de fármacos e excipientes

Tabela 21 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, As, Cd e Cr, em fármacos e excipientes, por ICP-MS

Elemento	^{193}Ir	^{106}Pd	^{195}Pt	^{103}Rh	^{102}Ru	^{75}As	^{111}Cd	^{52}Cr
Amostra								
Azitromicina	ND	$7,2 \pm 0,4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cefalexina - A	ND	$27,0 \pm 1,0$	ND	ND	ND	ND	ND	$171 \pm 8,1$
Cefalexina - B	ND	$13,4 \pm 0,6$	ND	ND	ND	ND	ND	$85,1 \pm 0,6$
Ciprofloxacina - A	ND	$6,3 \pm 0,3$	ND	ND	ND	ND	ND	$72,0 \pm 1,0$
Ciprofloxacina - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$267 \pm 12,8$
Doxiciclina - A	ND	$531 \pm 14,3$	ND	ND	ND	$128 \pm 4,9$	ND	$734 \pm 24,1$
Doxiciclina - B	ND	$532 \pm 20,0$	ND	ND	ND	$113 \pm 4,1$	ND	2559 ± 123
Enrofloxacin	ND	$3,7 \pm 0,2$	ND	ND	ND	ND	ND	$25,3 \pm 1,2$
Estreptomicina - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$176 \pm 2,1$
Estreptomicina - B	ND	ND	ND	ND	ND	$155 \pm 7,1$	ND	$277 \pm 7,2$
Gentamicina - A	ND	ND	ND	ND	ND	$168 \pm 2,1$	$54,0 \pm 2,5$	$44,4 \pm 2,1$
Gentamicina - B	ND	ND	ND	ND	ND	$206 \pm 3,0$	$33,0 \pm 0,6$	$49,1 \pm 1,8$
Norfloxacina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Neomicina - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$731 \pm 28,9$
Neomicina - B	ND	ND	ND	ND	ND	$573 \pm 17,3$	ND	$196 \pm 1,3$
Neomicina - C	ND	ND	ND	ND	ND	$140 \pm 3,7$	ND	$211 \pm 8,4$
Neomicina - D	ND	ND	ND	ND	ND	$175 \pm 2,9$	ND	$193 \pm 3,8$
Oxitetraciclina - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$352 \pm 11,3$
Oxitetraciclina - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$238 \pm 10,8$
Oxitetraciclina - C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$582 \pm 7,6$
Oxitetraciclina - D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$396 \pm 20,1$
Penic. G Benz. - A	ND	$9,5 \pm 0,5$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Penic. G Benz. - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Penic. G Benz. - C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Penic. G Benz. - D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Potássica - A	ND	$8,1 \pm 0,4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Potássica - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*As e Cr foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS **Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$) ***ND – abaixo do limite de detecção

Continuação da Tabela 21 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, As, Cd e Cr, em fármacos e excipientes, por ICP-MS

Elemento	^{193}Ir	^{106}Pd	^{195}Pt	^{103}Rh	^{102}Ru	^{75}As	^{111}Cd	^{52}Cr
Amostra								
P. G Procaína - A	ND	$8,4 \pm 0,4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína s lecitina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfametoxazol - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfametoxazol - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Trimetoprim - A	ND	$6,1 \pm 0,2$	ND	ND	ND	ND	ND	$28,1 \pm 1,2$
Trimetoprim - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Abamectina - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Abamectina - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulf. Albendazol - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$222 \pm 6,3$
Sulf. Albendazol - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$68,1 \pm 3,2$
Cloridrato Albendazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$880 \pm 40,2$
Ivermectina - A	ND	ND	ND	$21,5 \pm 0,8$	ND	ND	ND	ND
Ivermectina - B	ND	ND	ND	$19,7 \pm 0,2$	ND	ND	ND	ND
Febantel - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$28,4 \pm 1,1$
Febantel - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pamoato Pirantel	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Praziquantel - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$115 \pm 2,3$
Praziquantel - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Praziquantel - C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dihidroestreptomicina - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$155 \pm 5,5$
Dihidroestreptomicina - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$137 \pm 6,6$
Dihidroestreptomicina - C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$53,0 \pm 1,3$

*As e Cr foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS **Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$) ***ND – abaixo do limite de detecção

Conclusão da Tabela 21 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, As, Cd e Cr, em fármacos e excipientes, por ICP-MS

Elemento	^{193}Ir	^{106}Pd	^{195}Pt	^{103}Rh	^{102}Ru	^{75}As	^{111}Cd	^{52}Cr
Amostra								
Moxidectina	ND	$8,2 \pm 0,4$	ND	$4,0 \pm 0,1$	ND	ND	ND	$48,5 \pm 1,8$
Ormetoprim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$316 \pm 5,1$
Prednisolona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Progesterona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfadimetoxina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Celulose + Lactose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mistura para compressão	ND	$30,0 \pm 1,0$	ND	$3,1 \pm 0,1$	ND	ND	$10,8 \pm 0,3$	$153 \pm 7,5$
Copovidona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Crospovidona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dióxido de titânio	ND	$25,9 \pm 1,1$	ND	ND	ND	$180 \pm 7,5$	ND	ND
Estearato de magnésio	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$37,4 \pm 1,7$	$100 \pm 0,6$
Hidroxietilcelulose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	$27,6 \pm 1,1$
Lactose - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lactose - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lactose - C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lactose M450	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Palatabilizante	ND	$26,7 \pm 1,3$	ND	ND	ND	$225 \pm 0,4$	$18,5 \pm 0,7$	$121 \pm 0,6$
Sacarose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cobre quelato	ND	$23,3 \pm 0,7$	ND	11768 ± 374	ND	$286 \pm 11,5$	$22,0 \pm 1,1$	2845 ± 108
Manganês quelato	ND	$107 \pm 4,4$	ND	$26,1 \pm 0,8$	ND	$577 \pm 28,0$	$3160 \pm 83,3$	$1385 \pm 50,5$
Zinco quelato	ND	$642 \pm 7,6$	ND	$19,1 \pm 0,6$	ND	ND	$54,6 \pm 1,4$	ND

*As e Cr foram analisados no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$)

***ND – abaixo do limite de detecção

Tabela 22 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Cu, Pb, Ni, V, Mo, Hg e Os, em fármacos e excipientes, por ICP-MS

Elemento	^{63}Cu	^{208}Pb	^{60}Ni	^{51}V	^{98}Mo	^{202}Hg	^{192}Os
Amostra							
Azitromicina	$44,7 \pm 1,2$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cefalexina - A	$105 \pm 4,8$	$42,2 \pm 2,0$	$77,2 \pm 3,2$	ND	$119 \pm 2,8$	ND	ND
Cefalexina - B	$83,8 \pm 2,8$	ND	$59,7 \pm 2,5$	ND	$36,2 \pm 1,7$	ND	ND
Ciprofloxacina - A	$87,8 \pm 4,3$	ND	$97,0 \pm 3,2$	ND	$73,8 \pm 3,2$	ND	ND
Ciprofloxacina - B	$152 \pm 6,3$	ND	ND	ND	$27,0 \pm 0,5$	ND	ND
Doxiciclina - A	ND	ND	$41,1 \pm 1,0$	ND	$25,2 \pm 1,2$	$23,4 \pm 0,7$	ND
Doxiciclina - B	ND	ND	ND	ND	$17,1 \pm 0,8$	ND	ND
Enrofloxacin	$51,1 \pm 2,2$	ND	ND	$15,3 \pm 0,7$	ND	ND	ND
Estreptomicina - A	$50,9 \pm 1,6$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Estreptomicina - B	$45,9 \pm 2,2$	ND	$44,2 \pm 1,3$	ND	$33,1 \pm 0,5$	ND	ND
Gentamicina - A	ND	$42,1 \pm 1,2$	$212 \pm 9,7$	ND	$4,5 \pm 0,7$	ND	ND
Gentamicina - B	ND	ND	$61,0 \pm 2,8$	ND	ND	ND	ND
Norfloxacina	ND	ND	$55,0 \pm 2,2$	ND	ND	ND	ND
Neomicina - A	ND	ND	ND	ND	$23,2 \pm 0,9$	ND	ND
Neomicina - B	$41,1 \pm 0,5$	ND	$101 \pm 3,0$	ND	$45,7 \pm 1,8$	ND	ND
Neomicina - C	$80,6 \pm 1,1$	ND	ND	ND	$20,6 \pm 0,7$	ND	ND
Neomicina - D	$48,5 \pm 1,8$	ND	$84,7 \pm 3,2$	$15,8 \pm 0,5$	$17,9 \pm 0,7$	ND	ND
Oxitetraciclina - A	ND	ND	ND	$14,7 \pm 0,5$	ND	ND	ND
Oxitetraciclina - B	$73,4 \pm 2,8$	ND	ND	$13,6 \pm 0,6$	$8,9 \pm 0,4$	ND	ND
Oxitetraciclina - C	ND	ND	$43,7 \pm 1,4$	$11,0 \pm 0,3$	ND	ND	ND
Oxitetraciclina - D	$120 \pm 1,2$	ND	$748 \pm 12,8$	$62,3 \pm 2,6$	$6,9 \pm 0,3$	ND	ND
Penic. G Benz. - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Penic. G Benz. - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Penic. G Benz. - C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Penic. G Benz. - D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Potássica - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Potássica - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*V foi analisado no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS **Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$) ***ND – abaixo do limite de detecção

Continuação da Tabela 22 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Cu, Pb, Ni, V, Mo, Hg e Os, em fármacos e excipientes, por ICP-MS

Elemento	^{63}Cu	^{208}Pb	^{60}Ni	^{51}V	^{98}Mo	^{202}Hg	^{192}Os
Amostra							
P. G Procaína - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína - E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P. G Procaína s lecitina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfametoxazol - A	ND	$72,6 \pm 1,9$	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfametoxazol - B	$52,3 \pm 1,3$	$251 \pm 4,2$	$53,0 \pm 1,7$	ND	$4,6 \pm 0,2$	ND	ND
Trimetoprim - A	ND	ND	ND	$12,2 \pm 0,6$	ND	ND	ND
Trimetoprim - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Abamectina - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Abamectina - B	ND	ND	ND	ND	$18,1 \pm 0,5$	ND	ND
Sulf. Albendazol - A	$253 \pm 3,5$	ND	$138 \pm 6,6$	ND	$10,7 \pm 0,4$	ND	ND
Sulf. Albendazol - B	$4360 \pm 96,3$	ND	$53,1 \pm 1,3$	ND	$7,4 \pm 0,2$	ND	ND
Cloridrato Albendazol	$52,0 \pm 2,4$	ND	$326 \pm 12,7$	ND	$5,0 \pm 0,2$	ND	ND
Ivermectina - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ivermectina - B	ND	ND	$41,4 \pm 1,4$	ND	ND	ND	ND
Febantel - A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Febantel - B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pamoato Pirantel	$47,1 \pm 2,3$	ND	ND	$13,0 \pm 0,7$	ND	ND	ND
Praziquantel - A	$96,8 \pm 4,0$	ND	$76,0 \pm 3,3$	ND	$10,9 \pm 0,4$	ND	ND
Praziquantel - B	$47,0 \pm 1,2$	ND	$40,3 \pm 1,0$	ND	$8,5 \pm 0,4$	ND	ND
Praziquantel - C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dihidroestreptomicina - A	$222 \pm 5,2$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dihidroestreptomicina - B	$226 \pm 4,5$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dihidroestreptomicina - C	$211 \pm 7,6$	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*V foi analisado no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS **Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$) ***ND – abaixo do limite de detecção

Conclusão da Tabela 22 - Resultados (expressos em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) obtidos na análise de Cu, Pb, Ni, V, Mo, Hg e Os, em fármacos e excipientes, por ICP-MS

Elemento	^{63}Cu	^{208}Pb	^{60}Ni	^{51}V	^{98}Mo	^{202}Hg	^{192}Os
Amostra							
Moxidectina	204 $\pm$ 1,6	ND	125 $\pm$ 3,0	ND	5,8 $\pm$ 0,2	ND	ND
Ormetoprim	158 $\pm$ 1,6	327 $\pm$ 9,4	ND	ND	ND	ND	ND
Prednisolona	ND	ND	ND	ND	19,6 $\pm$ 0,5	ND	ND
Progesterona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfadimetoxina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Celulose + Lactose	1573 $\pm$ 58,5	ND	ND	ND	19,0 $\pm$ 0,4	ND	ND
Mistura para compressão	1588 $\pm$ 15,3	ND	1891 $\pm$ 73,4	31,6 $\pm$ 0,5	41,0 $\pm$ 1,3	ND	ND
Copovidona	1710 $\pm$ 33,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Crospovidona	3938 $\pm$ 112	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dióxido de titânio	8643 $\pm$ 404	85,1 $\pm$ 2,3	1439 $\pm$ 30,1	352 $\pm$ 6,5	8,3 $\pm$ 0,4	ND	ND
Estearato de magnésio	ND	ND	72,8 $\pm$ 2,0	48,4 $\pm$ 2,2	275 $\pm$ 10,9	ND	ND
Hidroxietilcelulose	3325 $\pm$ 101,0	ND	216 $\pm$ 10,8	ND	5,7 $\pm$ 0,3	ND	ND
Lactose - A	ND	ND	ND	ND	29,2 $\pm$ 0,9	ND	ND
Lactose - B	774 $\pm$ 10,3	ND	ND	ND	18,3 $\pm$ 0,9	ND	ND
Lactose - C	767 $\pm$ 30,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lactose M450	649 $\pm$ 11,6	ND	ND	ND	28,5 $\pm$ 0,6	ND	ND
Palatabilizante	21278 $\pm$ 819	62,1 $\pm$ 3,2	166 $\pm$ 2,6	338 $\pm$ 9,7	2561 $\pm$ 90,8	ND	ND
Sacarose	1982 $\pm$ 95,9	ND	ND	ND	13,3 $\pm$ 0,7	ND	ND
Cobre quelato	NA****	426 $\pm$ 13,1	3446 $\pm$ 148	88,0 $\pm$ 3,6	515 $\pm$ 2,8	ND	ND
Manganês quelato	1947 $\pm$ 68,2	125 $\pm$ 2,0	651 $\pm$ 23,6	27,1 $\pm$ 1,1	253 $\pm$ 2,6	ND	ND
Zinco quelato	2245 $\pm$ 36,8	91,1 $\pm$ 3,7	165 $\pm$ 3,4	ND	14,4 $\pm$ 0,3	ND	ND

*V foi analisado no modo DRC-ICP-MS e demais analitos modo q-ICP-MS

**Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra (n = 3)

***ND – abaixo do limite de detecção

****NA – não se aplica a determinação de Cu para a amostra de cobre quelato

As figuras 8 e 9, demonstram a distribuição das impurezas elementares, em relação a quantidade de elementos, presentes nas amostras de fármacos e excipientes, respectivamente. Entre os fármacos, as amostras que apresentaram maior número de elementos foram: cefalexina (Pd, Cr, Cu, Pb, Ni, Mo), hclato de doxiciclina (Pd, As, Cr, Ni, Mo e Hg) e sulfato de gentamicina (As, Cd, Cr, Pb, Ni e Mo) – com a presença de 6 elementos, seguidas pelas amostras de ciprofloxacina, sulfato de estreptomicina, sulfato de neomicina, oxitetraciclina e moxidectina, que apresentaram 5 diferentes elementos. Apenas nas amostras de sulfadimetoxina e progesterona, não foram detectados nenhum elemento.

Entre os excipientes, o palatabilizante (Pd, As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, V e Mo) e a mistura para compressão (Pd, Rh, Cd, Cr, Cu, Ni, V e Mo) apresentaram mais elementos. Já os quelatos de Mn (Pd, Rh, As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, V e Mo), Cu (Pd, Rh, As, Cd, Cr, Pb, Ni, V e Mo) e Zn (Pd, Rh, Cd, Cu, Pb, Ni e Mo) apresentaram uma grande diversidade de analitos, provavelmente devido a sua origem de produção.

Figura 8 - Distribuição das impurezas elementares, em relação a quantidade de elementos, presentes nas amostras de fármacos

Figura 9 - Distribuição das impurezas elementares, em relação a quantidade de elementos, presentes nas amostras de excipientes

O novo capítulo geral da farmacopeia americana, cuja última revisão foi oficializada em dezembro de 2015 e se tornará vigente em janeiro de 2018, <232> *Elemental Impurities Limits*, estabelece limites gerais para impurezas em produtos farmacêuticos. Estes limites são válidos, desde que, não esteja especificado limite em monografia individual, porém enfatiza que, as concentrações destes elementos em fármacos e excipientes, devem ser conhecidas, documentadas e controladas, para que se possa garantir a qualidade do produto final. Como este documento ainda não está totalmente harmonizado com outros órgãos regulatórios dos Estados Unidos e Europa, como *Food and Drug Administration* (FDA), EMA e ICH, algumas alterações podem ocorrer até 2018 (USP, 2016a).

A toxicidade de uma impureza está relacionada à biodisponibilidade, por isso, para a determinação dos limites, foram consideradas três vias de administração: oral, parenteral e inalatória. Baseado na exposição crônica e nos valores de exposição diária permitida (PDE) por via oral, foram estabelecidos os limites para as demais vias. Para demonstrar a conformidade com os limites estabelecidos, a farmacopeia americana propõe 3 alternativas: análise do produto farmacêutico, considerando sua dose diária máxima - o resultado obtido deve ser inferior ao PDE; análise de cada componente da formulação – realizar a somatória das impurezas encontradas considerando a proporção de cada componente na fórmula, o resultado obtido deve ser inferior ao PDE ou análise individual dos componentes, para medicamentos com uma dose diária de no máximo 10 g, neste

caso, se todas as substâncias da formulação satisfazerem os limites estabelecidos, demonstrados na tabela 23, estes componentes podem ser utilizados em qualquer proporção na formulação (USP, 2016a). A tabela 23 também apresenta os limites de quantificação (LQ) da metodologia validada, dados em $\mu\text{g g}^{-1}$, comprovando assim que o método atende ao propósito de quantificar impurezas elementares, segundo os novos requerimentos regulatórios.

Tabela 23 – Concentração limite ($\mu\text{g g}^{-1}$), de impurezas elementares para componentes de produtos farmacêuticos, fármacos e excipientes, administrados por diferentes vias, com dose máxima diária de 10 g e limites de quantificação da metodologia validada neste estudo, expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$

Elemento	Concentração limite ($\mu\text{g g}^{-1}$)			Limite de Quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)
	Produto de uso oral	Produto de uso parenteral	Produto de uso inalatório	
Ir	10	1	0,1	$7,0 \cdot 10^{-6}$
Pd	10	1	0,1	$9,0 \cdot 10^{-6}$
Pt	10	1	0,1	$1,0 \cdot 10^{-5}$
Rh	10	1	0,1	$3,0 \cdot 10^{-6}$
Ru	10	1	0,1	$8,0 \cdot 10^{-6}$
As*	1,5	1,5	0,2	$2,77 \cdot 10^{-4}$
Cd	0,5	0,2	0,2	$3,2 \cdot 10^{-5}$
Cr	1100	110	0,3	$6,7 \cdot 10^{-5}$
Cu	300	30	3	$1,27 \cdot 10^{-4}$
Pb	0,5	0,5	0,5	$1,39 \cdot 10^{-4}$
Ni	20	2	0,5	$1,26 \cdot 10^{-4}$
V	10	1	0,1	$3,1 \cdot 10^{-5}$
Mo	300	150	1	$1,3 \cdot 10^{-5}$
Hg*	3	0,3	0,1	$3,6 \cdot 10^{-5}$
Os	10	1	0,1	$1,0 \cdot 10^{-5}$

* As e Hg inorgânico

Fonte: concentração limite - farmacopeia americana (USP), capítulo <232> *Elemental Impurities Limits* (USP, 2016a).

Considerando os limites propostos pela USP, os fármacos e excipientes avaliados neste trabalho, que apresentaram impurezas acima do critério estabelecido, de acordo com a via de administração do medicamento e considerando uma dose máxima diária de 10 g, estão demonstrados na tabela 24.

As concentrações obtidas neste estudo expressas em ng g^{-1} , foram convertidas em $\mu\text{g g}^{-1}$, que é a unidade utilizada pela farmacopeia para demonstrar os limites.

Tabela 24 – Fármacos e excipientes que apresentaram concentrações acima do limite proposto pela farmacopeia americana, considerando uma dose máxima diária de 10 g, e a via de administração, estabelecida pela farmacopeia, na qual o limite foi ultrapassado

Elemento	Amostra	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	Via de administração
Pd	hiclato de doxiciclina (A e B)	~0,530	inalatória
	manganês quelato	0,107	inalatória
	zinco quelato	0,642	inalatória
Rh	cobre quelato	11,768	inalatória, parenteral e oral
As**	sulfato de gentamicina B	0,206	inalatória
	sulfato de neomicina B	0,573	inalatória
	palatabilizante	0,225	inalatória
	cobre quelato	0,286	inalatória
	manganês quelato	0,577	inalatória
Cd	manganês quelato	3,16	inalatória, parenteral e oral
Cr	hiclato de doxiciclina A	0,734	inalatória
	hiclato de doxiciclina B	2,559	inalatória
	sulfato de neomicina A	0,731	inalatória
	oxitetraciclina A	0,352	inalatória
	oxitetraciclina C	0,582	inalatória
	oxitetraciclina D	0,396	inalatória
	cloridrato de albendazol	0,880	inalatória
	ormetoprim	0,316	inalatória
	cobre quelato	2,845	inalatória
	manganês quelato	1,385	inalatória
Cu	sulfóxido de albendazol B	4,360	inalatória
	crospovidona	3,938	inalatória
	dióxido de titânio	8,643	inalatória
	hidroxietilcelulose	3,325	inalatória
	palatabilizante	21,278	inalatória
Ni	oxitetraciclina D	0,748	inalatória
	mistura para compressão	1,891	inalatória
	dióxido de titânio	1,439	inalatória
	cobre quelato	3,446	inalatória e parenteral
	manganês quelato	0,651	inalatória
V	dióxido de titânio	0,352	inalatória
	palatabilizante	0,338	inalatória
Mo	palatabilizante	2,561	inalatória

*os limites farmacopeicos foram estabelecidos em $\mu\text{g g}^{-1}$, e as análises realizadas neste trabalho foram reportadas em ng g^{-1} , portanto, foi realizada a conversão das unidades para comparação com os valores limite.

** o valor apresentado refere-se à concentração de As total, obtida na análise por ICP-MS.

Podemos observar que o elemento mais frequente, acima do limite, foi o Cr (10 amostras), sendo que as amostras de hiclato de doxiciclina B e Cu quelato apresentaram concentrações quase 10 vezes acima do valor limite para via inalatória. Em seguida, As, Cu e Ni (5 amostras), as amostras de sulfato de neomicina B e manganês quelato apresentaram mais do que o dobro do limite de As. O palatabilizante apresentou um valor sete vezes acima do limite de Cu e cobre quelato apresentou mais de seis vezes o limite de Ni, para via inalatória, ultrapassando também o limite de Ni para via parenteral.

Paládio foi detectado em 4 amostras acima do valor limite, sendo que, as amostras de hiclato de doxiciclina (A e B) e zinco quelato apresentaram valores cinco vezes acima do limite. Para V, 2 amostras apresentaram mais do que o dobro do limite (via inalatória). Ródio, Cd e Mo apresentaram apenas 1 amostra acima do limite, porém Cu quelato apresentou valores de Rh acima do limite estabelecido para as 3 vias de administração, o mesmo ocorreu para Cd na amostra de manganês quelato. Já Mo está mais de duas vezes acima do limite (via inalatória), na amostra de palatabilizante. Nenhuma amostra avaliada apresentou concentrações de Ir, Pt, Ru, Pb, Hg e Os acima dos limites propostos.

A amostra com maior incidência de elementos acima do limite foi manganês quelato (Pd, As, Cd, Cr e Ni), seguida por, cobre quelato (Rh, As, Cr e Ni), palatabilizante (As, Cu, V e Mo), dióxido de titânio (Cu, Ni e V), hiclato de doxiciclina (Pd e Cr), sulfato de neomicina (As e Cr), oxitetraciclina (Cr e Ni), sulfato de gentamicina (As), zinco quelato (Pd), cloridrato de albendazol (Cr), ormetoprim (Cr), sulfóxido de albendazol (Cu), cospovidona (Cu), hidroxietilcelulose (Cu) e mistura para compressão (Ni). A maioria das amostras apresentou concentrações acima do limite apenas para a via inalatória (limites mais restritos), porém na amostra de cobre quelato as concentrações de Rh estão acima dos limites propostos para as três vias de exposição, e o mesmo ocorre para a concentração de Cd na amostra de manganês quelato.

Segundo a USP, as concentrações aceitáveis de impurezas dependem do uso final do produto. Por este motivo, os fabricantes de produtos farmacêuticos, devem possuir técnicas e métodos analíticos que possam determinar a concentração de impurezas elementares nos fármacos e excipientes utilizados em seus produtos. Os valores indicados pela farmacopeia e demonstrados na tabela, são exemplos de

concentração limite de impurezas nos componentes da formulação (fármacos e excipientes), considerando uma dose diária máxima de 10 g por dia, e servem como limites padrão para auxiliar nas discussões entre os fabricantes de produtos e os fornecedores de insumos farmacêuticos – fármacos e excipientes. Nesta abordagem, impurezas elementares derivadas do processo de fabricação ou material de embalagem do produto final, não são avaliadas, porém, espera-se que o fabricante do medicamento garanta que estas fontes não contribuam significativamente para o conteúdo total de impurezas elementares (USP, 2016a).

Em relação a procedência, das 74 amostras de fármacos e excipientes avaliados, a maioria dos fabricantes são chineses (62%), seguidos por países europeus – 15% (Alemanha, Áustria, Espanha, Irlanda do Norte e Países Baixos), Brasil (12%), Índia (7%) e Estados Unidos (4%). A figura abaixo mostra a distribuição das amostras de insumos farmacêuticos (fármacos e excipientes) em relação ao país de origem do fabricante.

Figura 10 - Distribuição das amostras de insumos farmacêuticos (fármacos e excipientes) em relação ao país de origem do fabricante

Cabe destacar que a República Popular da China é atualmente um dos maiores fornecedores de insumos para as indústrias farmacêuticas, das 74 amostras avaliadas, 46 foram produzidas neste país, que é organizado em divisões administrativas, sendo: 23 províncias, 4 municipalidades, 5 regiões autônomas e 2 regiões administrativas especiais.

A figura abaixo mostra a porcentagem de amostras fabricadas em cada região da China. Podemos verificar que as províncias de Hebei, Jiangsu, Sichuan e Zhejiang são regiões industriais, responsáveis pela produção da maioria das amostras (76%). Algumas amostras que apresentaram valores acima do limite, foram fabricadas na China, tais como: hiclato de doxiciclina, sulfato de gentamicina, sulfato de neomicina, oxitetraciclina (A e C), ormetoprim, cloridrato e sulfóxido de albendazol.

Figura 11 - Distribuição das amostras de insumos farmacêuticos (fármacos e excipientes), de acordo com a localidade de origem do fabricante, nas diferentes divisões administrativas da China

Em relação as amostras de fármacos, o *Drug Master File* (DMF), é um documento elaborado pelo fabricante do insumo, que assegura os aspectos relacionados à qualidade e segurança e contém informações sobre sua composição química, método de obtenção (rota de síntese), estabilidade, pureza e perfil de impurezas. Alguns fabricantes relatam no DMF a utilização de catalisadores, que são considerados impurezas elementares, tais como, Pt na síntese de azitromicina (embora nossas análises não tenham detectado este elemento) e Rh na ivermectina. Porém, além do uso de catalisadores, a contaminação por impurezas elementares pode ocorrer durante o processo de fabricação, devido ao uso de água, reagentes e solventes, além do material de embalagem, filtros, condições de armazenamento e transporte. Por isso é importante a rastreabilidade, ou seja, que o fabricante garanta

o controle de qualidade do insumo durante todas as etapas de produção até a comercialização.

Dentre as amostras de fármacos que apresentaram concentrações de impurezas elementares acima dos limites regulatórios, seguem informações, relacionadas ao processo de síntese e controle de qualidade, descritas pelos fabricantes, no DMF. Como este documento contém informações sigilosas, não serão citados os fabricantes dos documentos consultados, porém a procedência das amostras foi citada na tabela 5.

Hiclato de doxiciclina – fabricante não cita a utilização de catalisadores metálicos, é um fármaco semi sintético obtido a partir de uma reação de fermentação, que forma oxitetraciclina e depois hidreto de doxiciclina. Seu processo de síntese utiliza, etanol, água, hidróxido de amônia e ácido clorídrico, além de filtros de carvão ativo. É realizado o ensaio de metais, com limite de 50 ppm (ou mg Kg⁻¹), adotando o antigo procedimento das farmacopeias. O acondicionamento do insumo é feito em sacos de plástico.

Sulfato de gentamicina – é uma mistura de substâncias produzidas por processo fermentativo, tendo 4 principais componentes, seguido por um processo de purificação. Na preparação deste insumo são utilizados, hidróxido de sódio, água, ácido clorídrico, cloreto de amônia e ácido sulfúrico, além de resina de troca iônica e carvão ativo. Após a fabricação, o insumo é esterilizado e acondicionado em embalagem de alumínio. O fabricante não cita a utilização de catalisadores e não é apresentado nenhum controle em relação a impurezas elementares.

Sulfato de neomicina - fabricante não cita a utilização de catalisadores e solventes orgânicos. É um fármaco semi sintético obtido a partir de uma reação de fermentação, seguida por uma reação com ácido sulfúrico e processos de purificação que formam neomicina B (farmacologicamente mais ativa) e neomicina C. Para fermentação são utilizados, dentre outros componentes, amido de milho, glicose, peptona, cloreto de sódio, carbonato de cálcio, sulfato de amônia, farelo de arroz e de soja, para purificação, é utilizado ácido clorídrico, água, resina de troca iônica e filtro de carvão ativo. O insumo é armazenado em sacos de plástico. Não há informações sobre controle de impurezas elementares.

Oxitetraciclina - é um fármaco obtido a partir de uma reação de fermentação (é um produto do metabolismo secundário de bactérias), seguida por

processos de purificação. O fabricante não cita a utilização de catalisadores. A fermentação necessita de farelo de soja e de milho e dextrina, além de outras fontes de carbono, fósforo e nitrogênio. Em seguida são adicionados, ácido oxálico, sulfato de zinco, amônia, água, ferrocianeto de sódio e sulfito de sódio, além do uso de coluna de troca iônica e filtros de carvão ativo, para purificação do insumo. O controle de impurezas inorgânicas é feito durante o processo de purificação e são realizadas análises de metais, considerando o limite de 50 ppm.

Cloridrato e sulfóxido de albendazol – são obtidos a partir de reações com albendazol. Para síntese de albendazol não é citado o uso de catalisadores, mas utiliza-se, metanol, propanol, hidróxido de sódio e ácido clorídrico. No processo de oxidação, para formação de sulfóxido de albendazol, são utilizados, ácido acético, peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio, água e acetona. Para formação do cloridrato é utilizado apenas ácido clorídrico e água. Após a síntese, o insumo é acondicionado em sacos de polietileno. O fabricante declara que não utiliza catalisador, e impurezas inorgânicas, oriundas da utilização de solventes, são controladas por vários procedimentos internos, sendo que o limite adotado para metais é 10 ppm.

Ormetoprim – fármaco sintético, obtido a partir de uma reação de ciclização, na presença de dimetilformamida, metanol, metóxido de sódio e cloridrato de guanidina. Para purificação, são utilizados, ácido acético glacial, água, amônia e filtro de carvão ativo. O fornecedor não cita o uso de catalisadores metálicos. O limite adotado para metais é 20 ppm.

Os excipientes (mistura para compressão, crospovidona, dióxido de titânio, hidroxietilcelulose, palatabilizante e quelatos), que apresentaram concentrações de impurezas elementares acima do limite, não tiveram o DMF ou documento semelhante com informações sobre sua síntese, disponibilizado pelo fabricante. Dentre eles, apenas o fabricante de crospovidona monitora a concentração de metais (máximo de 10 ppm), segundo consta em laudo.

Uma vez que, os processos de síntese e purificação destes fármacos não cita a utilização de metais como catalisadores, a contaminação pode ter ocorrido devido ao uso de reagentes e água, contato com tanques, filtros e material de embalagem, ou durante o processo de armazenamento e transporte. É importante notar que os fornecedores utilizam ainda o ensaio limite de metais, baseado na

precipitação de sulfetos, e adotam concentrações máximas dadas em ppm, o que está em desacordo com os novos limites regulatório. Por este motivo, os fabricantes de insumo terão que implementar mudanças nos processos de fabricação e controle de qualidade, para se adequar a legislação e restringir os limites de impurezas elementares.

No caso dos excipientes, o fato de estarem presentes em maior quantidade nos medicamentos aumenta a preocupação em relação a presença de impurezas elementares e pelo fato de muitos terem origem mineral, observa-se uma alta concentração de elementos como Pd, Rh, As, Cd, Cr, Cu, Ni, V e Mo, que podem ser originadas do processo de síntese ou manufatura.

Apesar dos limites propostos pela farmacopeia serem apenas um valor de referência, é de suma importância a avaliação de impurezas elementares, e para o estabelecimento de limites seguros em produtos farmacêuticos, deve-se avaliar o uso do produto, a composição da formulação, dose e a via de administração. Neste contexto, podemos verificar que a metodologia apresentou versatilidade e robustez para a determinação de 15 impurezas elementares em 74 diferentes matrizes, fármacos e excipientes, sendo, portanto, uma importante ferramenta para atendimento aos novos requisitos regulatórios.

4.6 Especificação de arsênio e mercúrio

Devido a diferente toxicidade das formas químicas de As e Hg, é essencial realizar a especificação química para garantir a segurança na utilização dos medicamentos. Deste modo, as amostras que apresentaram teores significativos de destes elementos foram escolhidas para realização da especificação por HPLC-ICP-MS.

Os métodos de especificação química de As e Hg utilizados neste trabalho foram desenvolvidos e validados pelo Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (BATISTA et al., 2011a; BATISTA et al., 2011b; RODRIGUES et al., 2010). Foram realizadas apenas algumas otimizações para a determinação das espécies destes elementos em fármacos e excipientes.

Na especiação de arsênio é importante avaliar o meio de diluição das amostras para evitar mudanças estruturais nas moléculas. As espécies orgânicas (MMA e DMA) foram solubilizadas em ácido de baixa concentração (ácido nítrico 0,15 mol L⁻¹), As³⁺ foi solubilizado inicialmente em meio alcalino (NaOH 0,18 mol L⁻¹), para dissolução do sal, e em seguida, em meio ácido não oxidante (HCl) para evitar a conversão em As⁵⁺. Para o As⁵⁺, a dissolução do sal também foi realizada em meio alcalino, porém o ácido nítrico (oxidante) foi utilizado em seguida, pois mantém a espécie dissolvida e no estado de oxidação desejado. Foram mantidas as condições cromatográficas e fase móvel já utilizadas pelo nosso grupo, pois observou-se seletividade e resolução adequadas para as análises de especiação em fármacos (BATISTA et al., 2011b).

Durante o desenvolvimento e validação do método foi avaliado se o cloro, presente em algumas amostras, poderia prejudicar a seletividade da metodologia, porém o tempo de retenção do Cl⁻ não interfere com as espécies de As. Também avaliou-se a estabilidade das espécies de arsênio, garantindo assim que não haja interconversão das espécies durante o preparo de padrões e amostras.

As curvas analíticas foram elaboradas nas concentrações de 2,0 a 20,0 µg L⁻¹, os limites de detecção obtidos foram: 0,110; 0,390; 0,430 e 0,094 ng g⁻¹ para As³⁺, DMA, MMA e As⁵⁺, respectivamente. Os valores de coeficiente de correlação (r) foram superiores a 0,996 para todas as espécies. Como solução extratora, foi utilizado uma solução contendo ácido nítrico 0,4% v/v e metanol 2% v/v e as amostras foram mantidas em banho-maria a 80°C por 30 minutos. A utilização de 100 mg de amostra e 5 mL de solução extratora produziu resultados satisfatórios, com CV inferior a 6%, entre as leituras das replicatas de amostra.

A precisão foi avaliada em dois níveis: intraensaio e intermediária, através da análise de 2 amostras de fármacos: sulfato de neomicina B e sulfato de estreptomicina B adicionadas das espécies de As na concentração de 10 µg L⁻¹, preparadas em 6 replicatas (n=6). Os coeficientes de variação (CV) obtidos foram inferiores a 6 e 13%, respectivamente. A exatidão foi avaliada através do cálculo da recuperação obtida com estas amostras de fármacos adicionadas de padrões, sendo superior a 85%. Estes resultados demonstraram que a metodologia pode ser utilizada para especiação das amostras de fármacos e excipientes.

A figura abaixo demonstra o cromatograma de uma amostra padrão com as espécies de As avaliadas, As inorgânico (As^{3+} e As^{5+}), dimetil-arsênio (DMA) e monometil-arsênio (MMA).

Figura 12 – Cromatograma da amostra padrão de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ com as espécies de arsênio avaliadas – arsênio inorgânico As^{3+} e As^{5+} , dimetil-arsênio (DMA) e monometil-arsênio (MMA)

Dentre as 74 amostras de fármacos e excipientes analisadas, As foi quantificado em apenas 12 amostras. Dentre estas amostras, 5 apresentaram concentrações acima do limite especificado pela farmacopeia americana ($0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ ou 200 ng g^{-1} – para produtos administrados por via inalatória - considerando uma dose máxima diária de 10 g). As amostras com teor de As acima do limite foram: sulfato de gentamicina B, sulfato de neomicina B, palatabilizante e os quelatos de cobre e manganês.

O resultado da especiação química de As empregando HPLC-ICP-MS está apresentado na tabela 25. Podemos observar que as amostras apresentaram somente as formas inorgânicas de arsênio, que são as mais relevantes em medicamentos. Estas espécies são reconhecidamente carcinógenos humano, sendo que, arsenito (As^{3+}) apresenta maior toxicidade que arsenato (As^{5+}).

Tabela 25 – Concentração (expressa em $\text{ng g}^{-1} \pm$ desvio padrão) das espécies de arsênio – As^{3+} , As^{5+} , dimetil-arsênio (DMA) e monometil-arsênio (MMA), nas amostras de fármacos e excipientes

Amostra	Concentração das espécies de As ($\text{ng g}^{-1} \pm \text{DP}$)*			
	As^{3+}	As^{5+}	DMA	MMA
hiclato de doxiciclina A	$126 \pm 18,8$	ND	ND	ND
hiclato de doxiciclina B	$119 \pm 12,8$	ND	ND	ND
sulfato de estreptomicina B	ND	$143 \pm 9,5$	ND	ND
sulfato de gentamicina A	ND	$163 \pm 4,6$	ND	ND
sulfato de gentamicina B**	ND	$225 \pm 15,9$	ND	ND
sulfato de neomicina B**	ND	$621 \pm 37,2$	ND	ND
sulfato de neomicina C	ND	$130 \pm 12,1$	ND	ND
sulfato de neomicina D	ND	$161 \pm 13,6$	ND	ND
dióxido de titânio	$166 \pm 9,3$	ND	ND	ND
palatabilizante**	ND	$237 \pm 12,0$	ND	ND
cobre quelato**	ND	$312 \pm 27,1$	ND	ND
manganês quelato**	ND	$632 \pm 55,8$	ND	ND

*Resultados expressos em concentração média (ng g^{-1}) $\pm$ desvio padrão (DP) – obtido da leitura de três réplicas da amostra ($n = 3$)

**amostras que apresentaram concentração de As total acima do limite proposto pela farmacopeia americana, considerando uma dose máxima diária de 10 g, e administração por via inalatória.

***ND – abaixo do limite de detecção

A figura abaixo demonstra os cromatogramas representativos das espécies de As, obtidos na análise de duas das amostras avaliadas, sulfato de gentamicina B, que apresenta o pico relacionado a As^{5+} e hiclato de doxiciclina A, que apresenta o pico de As^{3+} .

Figura 13 – Cromatogramas das amostras de sulfato de gentamicina B, demonstrando o pico de As^{5+} , com tempo de retenção de aproximadamente 7,5 minutos e hclato de doxiciclina A, com pico que representa a espécie As^{3+} , com tempo de retenção de aproximadamente 2,5 minutos

Os resultados obtidos nas análises de especiação, soma das espécies inorgânicas - As^{3+} e As^{5+} , foram comparados com a concentração de As total, obtida por ICP-MS. Os valores de recuperação, entre 92 a 110%, demonstrados na tabela 26, comprovam a boa exatidão das metodologias.

A similaridade dos dados de As total e soma das espécies de As, foi comprovada pela aplicação do teste t de *Student*, de comparação das médias (alfa

0,05 e nível de confiança de 95%), comprovando que os dois procedimentos apresentaram resultados concordantes.

Tabela 26 – Resultados obtidos na determinação de As total por ICP-MS, e na determinação das espécies de arsênio – arsênio inorgânico As^{3+} e As^{5+} , por HPLC-ICP-MS, nas amostras de fármacos e excipientes

Amostra	As total (ng g^{-1})*	Soma das espécies de As - As^{3+} e As^{5+} (ng g^{-1})**	Recuperação (%)
hiclato de doxiciclina A	128	126	98
hiclato de doxiciclina B	113	119	105
sulfato de estreptomicina B	155	143	92
sulfato de gentamicina A	168	163	97
sulfato de gentamicina B	206	225	109
sulfato de neomicina B	573	621	108
sulfato de neomicina C	140	130	93
sulfato de neomicina D	175	161	92
dióxido de titânio	180	166	92
palatabilizante	225	237	105
cobre quelato	286	312	109
manganês quelato	577	632	110

* o valor apresentado refere-se à concentração de As total, obtida na análise por DRC-ICP-MS.

** o valor refere-se a soma das espécies inorgânicas - As^{3+} e As^{5+} , obtidas na análise de especiação utilizando HPLC-ICP-MS

Diante dos resultados de especiação, especial atenção deve ser dada as amostras que apresentaram teores acima do permitido, pois a concentração de As foi devida apenas a presença das formas inorgânicas que apresentam maior toxicidade.

Na especiação de mercúrio, para extração das espécies, foi utilizada uma solução contendo ácido clorídrico, L-cisteína e 2-mercaptoetanol. É importante que o pH desta solução seja compatível com o pH da fase estacionária utilizada e não promova transformação de espécies durante o preparo da amostra (LIANG; LAZOFF, 1999; RODRIGUES et al., 2010). Para acelerar o processo de extração foi utilizado o ultrassom por 15 minutos. Obtivemos desta forma, uma extração eficiente das espécies nas amostras de fármacos. A fase móvel, contendo 95% de uma solução de: 2-mercaptoetanol (0,05% v/v), L-cisteína (0,4% m/v), acetato de amônio ($0,06 \text{ mol L}^{-1}$) e 5% de metanol, apresentou seletividade adequada para a realização das análises. Com pH próximo de 6,7 os picos cromatográficos apresentaram boa

resolução em um tempo de corrida de aproximadamente 10 minutos. Um aumento na concentração de mercaptoetanol gera um aumento no tempo de retenção das espécies, já um aumento na concentração de metanol, gera um aumento de sensibilidade. Porém, concentrações superiores a 5% de metanol podem desestabilizar o plasma. A L-cisteína forma o complexo cisteína-mercúrio que interage com a fase estacionária, melhorando a separação das espécies e tempo de retenção (RODRIGUES et al., 2010).

As curvas analíticas foram elaboradas nas concentrações de 2,0 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, os limites de detecção obtidos foram: 0,170; 0,340 e 0,310 ng g^{-1} para metil mercúrio, etil mercúrio e mercúrio inorgânico, respectivamente. Os valores de coeficiente de correlação (r) foram superiores a 0,995 para todas as espécies. A utilização de 200 mg de amostra produziu resultados satisfatórios, com CV inferior a 7%, entre as leituras das replicatas de amostra.

A precisão foi avaliada em dois níveis: intraensaio e intermediária, através da análise de 2 amostras de fármacos, hclato de doxiciclina A e sulfato de gentamicina A. Foram realizadas adições das espécies de mercúrio inorgânico, metil mercúrio e etil mercúrio na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. O ensaio foi realizado em número de 6 replicatas (n=6). Os coeficientes de variação (CV) obtidos foram inferiores a 7 e 15% respectivamente. A exatidão foi avaliada através do cálculo da recuperação obtida com estas amostras de fármacos adicionadas de padrões, as recuperações foram superiores a 82%. As amostras apresentaram estabilidade adequada, até 2 dias após a extração, quando mantidas em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Estes resultados demonstraram que a metodologia pode ser utilizada para especiação das amostras de fármacos, e apresenta a vantagem de ser um método rápido e de simples procedimento de preparo. A figura abaixo demonstra o cromatograma de uma amostra padrão com as espécies de mercúrio avaliadas.

Figura 14 – Cromatograma da amostra padrão de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ com as espécies de mercúrio avaliadas – inorgânico (i-Hg), metil mercúrio (MeHg) e etil mercúrio (EHg)

Dentre as 74 amostras de fármacos e excipientes analisados, apenas a amostra de hiclato de doxiciclina (amostra A), apresentou níveis detectáveis de mercúrio ($23,4 \text{ ng g}^{-1}$ mercúrio total – equivalente a $0,0234 \mu\text{g g}^{-1}$), porém esta concentração está abaixo do limite de quantificação (LQ) do método de especiação, considerando o valor do LQ x fator de diluição ($\text{FD} = 50$).

A concentração de Hg encontrada nesta amostra também está abaixo do limite especificado pela farmacopeia ($0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ – para produtos administrados por via inalatória - considerando uma dose máxima diária de 10 g). Uma vez que os limites de mercúrio são baseados na concentração de Hg^{2+} , pois o metil mercúrio que é a forma mais tóxica, é raramente encontrado em produtos farmacêuticos, sua determinação não é necessária quando o teor de Hg total for inferior ao limite regulatório e por este motivo não foi realizada a especiação.

5 CONCLUSÕES

Entre os 5 procedimentos de preparo de amostras de insumos farmacêuticos ativos e excipientes, avaliados (digestão em sistema fechado e em sistema aberto utilizando micro-ondas, digestão em banho-maria, diluição direta em meio ácido e extração utilizando ponteira de ultrassom), os preparos digestão em sistema fechado de micro-ondas e extração por ponteira de ultrassom apresentaram os melhores resultados, e podem ser utilizados para análise em rotina, satisfazendo as exigências regulatórias da USP, EMA, FDA e ICH.

Avaliando os métodos propostos, o micro-ondas apresenta a vantagem do preparo simultâneo de pelo menos 10 amostras, dependendo do sistema utilizado, gerando em média 40 amostras em 8 horas de trabalho diário, considerando o tempo de digestão das amostras, resfriamento dos frascos e limpeza entre cada ciclo de amostras. Porém requer cuidados adicionais por utilizar altas temperatura e pressão. Já a ponteira de ultrassom, embora necessite de um preparo individualizado das amostras e cuidados com a limpeza da ponteira entre as leituras, requer apenas 1 minuto de extração, seguida de centrifugação (2 minutos), possibilitando o preparo de 50-60 amostras por dia. Em relação ao custo dos equipamentos, o micro-ondas apresenta um custo mais elevado de aquisição além da necessidade de substituição dos frascos de acordo com o desgaste, devido a utilização. Não houve diferença significativa em relação ao volume de solventes utilizados pelos dois métodos, entretanto a extração por ponteira de ultrassom apresenta menor risco de operação por não utilizar altas temperatura e pressão. Diante das particularidades apresentadas, podemos concluir a adequabilidade de ambos procedimentos de preparo, para análise em rotina, com alta produtividade.

Para eliminar interferências espectrais, devido a presença de carbono, enxofre, cloreto e sódio, dentre outros concomitantes, para determinação de As, Cr e V foi necessária a utilização da cela de reação dinâmica (DRC) com o gás de reação hidrogênio, para determinação de arsênio, e amônia para a determinação de cromo e vanádio.

Os métodos de análise por ICP-MS foram validados para a determinação de 15 impurezas elementares, propostas pelo novo capítulo geral da farmacopeia americana: As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Hg, Os e Mo,

em amostras de insumos farmacêuticos ativos e excipientes. Os métodos também apresentaram sensibilidade adequada para determinação de traços e ultra traços dos elementos em estudo, comprovada pelos valores de limite de detecção e quantificação. Além disso, os procedimentos de análise propostos apresentam inúmeras vantagens em relação à metodologia anteriormente utilizada pelas farmacopeias para determinação de impurezas elementares. Com estes novos procedimentos, reduz-se o tempo de preparo e a quantidade de amostra, além de minimizar os riscos de perda de elementos voláteis.

A aplicação da metodologia para análise de 74 amostras de fármacos e excipientes de diferentes lotes e/ou fornecedores possibilitou uma avaliação, até então inédita, do perfil de impurezas elementares nestas amostras. Diante das novas exigências regulatórias, estes dados poderão servir de base para adoção de medidas de controle de qualidade, avaliação da rota de síntese e verificação das fontes de contaminação, intencional ou acidental, garantindo assim a segurança e qualidade do produto final. Os elementos mais frequentes nas amostras analisadas foram Cu, Cr, Mo, Ni, Pd e V. Considerando os limites propostos pela farmacopeia americana (dose máxima diária de 10 g), as concentrações de Pd, Rh, As, Cd, Cr, Cu, Ni, V e Mo apresentaram-se acima do limite em algumas amostras, com destaque para o Cr cuja concentração excedeu o limite em 10 amostras e, Rh e Cd que ultrapassaram, em uma das amostras, os limites propostos para as três vias de exposição. Estes dados demonstram que os fabricantes de insumos farmacêuticos devem tomar medidas preventivas para redução das impurezas elementares.

A especiação de arsênio possibilitou a avaliação das diferentes formas químicas deste elemento nas amostras em estudo, o que é fundamental para avaliação toxicológica. As amostras analisadas apresentaram apenas as formas inorgânicas e mais tóxicas de As, arsenito (As^{3+}) e arsenato (As^{5+}). A especiação de mercúrio não foi realizada pois nenhuma amostra apresentou concentração acima dos limites estabelecidos pela farmacopeia.

REFERÊNCIAS¹

ALAM, M. N.; HUQ, F. Comprehensive review on tumour active palladium compounds and structure–activity relationships. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 316, p. 36–67, 2016.

ALLIBONE, J.; FATEMIAN, E.; WALKER, P. J. Determination of mercury in potable water by ICP-MS using gold as a stabilising agent. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 14, p. 235-239, 1999.

ANTES, F. G. et al. Development of multi-elemental method for quality control of parenteral component solutions using ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 144-149, 2011.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. Volume 1, 5ª edição, 24 de novembro de 2010. Brasília, DF. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2017.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. 02 de julho de 2003. Brasília, DF. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 09 nov. 2015.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Conceitos e definições de medicamentos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/conceitos-e-definicoes7>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

APOSHIAN, H. V.; APOSHIAN, M. M. Arsenic toxicology: five questions. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 1-15, 2006.

ARGENTINE, M. D.; OWENS, P. K; OLSEN, B. A. Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 12-28, 2007.

ATSDR, **Toxicological profile for mercury**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 1999.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ATSDR, **Profile for copper**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 2004.

ATSDR, **Toxicological profile for nickel**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 2005.

ATSDR, **Toxicological profile for arsenic**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 2007a.

ATSDR, **Toxicological profile for lead**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 2007b.

ATSDR, **Toxicological profile of cadmium**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 2012a.

ATSDR, **Toxicological profile of chromium**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 2012b.

ATSDR, **Toxicological profile for vanadium**, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 2012c.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do Mercúrio**. 1ª ed. São Carlos: RiMa, 2003.

BALARAM, V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – status, challenges and moving frontiers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 83-95, 2016.

BARANOV, V. I.; TANNER, S. D. A dynamic reaction cell for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-DRC-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry Part I**, v. 14, p. 1133-1142, 1999.

BATISTA, B. L. et al. A fast ultrasound-assisted extraction procedure for trace elements determination in hair samples by ICP-MS for forensic analysis. **Forensic Science International**, v. 192, p. 88–93, 2009.

BATISTA, B. L. et al. Mercury speciation in seafood samples by LC–ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. **Food Chemistry**, v. 126, p. 2000-2004, 2011a.

BATISTA, B. L. et al. Speciation of arsenic in rice and estimation of daily intake of different arsenic species by Brazilians through rice consumption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 191, p. 342-348, 2011b.

BP, **British Pharmacopoeia**, The Stationery Office under license from The Controller of Her Majesty's Stationery Office, Norwich, England, A229, Limits test for heavy metals (Ph. Eur. Meth. 2.4.8), 2008.

CARTER, S. et al. Atomic spectrometry update: review of advances in the analysis of metals, chemicals and functional materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, p. 2114-2164, 2016.

CREWS, H. M. Speciation of trace elements in foods, with special reference to cadmium and selenium: is it necessary? **Spectrochimica Acta Part B**, v. 53, p.213–219, 1998.

DESTEFANO, A. J. et al. Elemental impurities – comments and responses. **Pharmacopeial Forum**, v. 36, p. 298-305, 2010.

DO, B. et al. Speciation of arsenic and selenium compounds by ion-pair reversed-phase chromatography with electrothermic atomic absorption spectrometry. Application of experimental design for chromatographic optimization. **Journal of Chromatography Part A**, v. 918, p. 87-98, 2001.

DONER, G.; EGE, A. Evaluation of digestion procedures for the determination of iron and zinc in biscuits by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 217–222, 2004.

DOUGLAS, D. J.; QUAN, E. S. K.; SMITH, R. G. Elemental analysis with an atmospheric pressure plasma (MIP, ICP)/ quadrupole mass spectrometer system. **Spectrochimica Acta**, v. 38B, p. 39–48, 1983.

EBDON, L. et al. The trace element speciation for environment, food and health. **The Royal Society of Chemistry**, p. 55-69, 2001.

ELDER, D. P.; KUENTZ, M.; HOLM, R. Pharmaceuticals excipients – quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 88-99, 2016.

EMA, **Guidelines on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents** (EMA/CHMP/SWP/4446), Committee for Medicinal Products for Human Use, in: European Medicines Agency, London, 2008.

EP, **European Pharmacopoeia**, third ed. (Suppl.), France: Council of Europe, Method 2.4.8, 2001, p. 41–42.

EVANS, E. H.; GIGLIO, J. J. Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry: a review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 8, p. 1-18, 1993.

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Storage of natural water samples for total and reactive Mercury analysis in PET bottles. **Analyst**, v. 125, p. 549 – 551, 2000.

FDA, **Elemental Impurities in Drug Products** - Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration, Rockville, 2016.

FIGUEIREDO, A. et al. Feasibility of wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the determination of metal impurities in pharmaceutical products and dietary supplements in view of regulatory guidelines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 122, p. 52-58, 2016.

FISHER, L. et al. Flow injection combined with ICP-MS for accurate high throughput analysis of elemental impurities in pharmaceutical products according to USP <232>/<233>. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.95, p. 121-129, 2014.

GERALDES, V. et al. Lead toxicity promotes autonomic dysfunction with increased chemoreceptor sensitivity. **Neurotoxicology**, v. 54, p. 170–177, 2016.

GÓMEZ-ARIZA, J. L. et al. Analytical approach for routine methylmercury determination in seafood using gas chromatography-atomic fluorescence spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 165 - 173, 2004.

GONG, Z. et al. Arsenic speciation analysis. **Talanta**, v. 58, p. 77–96, 2002.

GRAY, A. L.; DATE, A. R. Plasma source mass spectrometry of inorganic samples – recent developments of the technique. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics**, n. 46, p. 7–10, 1983.

GREGOIRE, D. C. The effect of easily ionizable concomitant elements on non-spectroscopic interferences in inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 42B, n. 7, p. 395-907, 1987.

HA, E. et al. Current progress on understanding the impact of mercury on human Health. **Environmental Research**, v.152, p. 419–433, 2017.

HAYS, S. M. et al. Biomonitoring Equivalents for molybdenum. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 77, p. 223-229, 2016.

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

HOLM, R.; ELDER, D. P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 118-135, 2016.

HORLICK, G.; MONTASER, A. **Analytical characteristics of ICPMS**, in: A. Montaser (Ed.), *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Wiley–VCH, New York, NY, 1998, p. 543–547.

HSUEH, Y. M. et al. Urinary arsenic speciation in subjects with or without restriction from seafood dietary intake. **Toxicology Letters**, v.133, p. 83-91, 2002.

HUANG, J. et al. The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 40, p. 227-234, 2006.

HULLE, M.V. et al. Arsenic speciation in Chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS. **Analyst**, v. 127, p. 634–640, 2002.

IARC, **Arsenic and arsenic compounds**, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, 100C, 2012a.

IARC, **Nickel and nickel compounds**, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, 100C, 2012b.

ICH, INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Q2B Validation of analytical procedures: methodology**, 1996. Rockville.

ICH, **Impurities in new drug substances Q3A (R2)**, in: International Conference on Harmonisation, Geneva, 2008.

ICH, **Impurities in new drug products Q3B (R2)**, in: International Conference on Harmonisation, Geneva, 2006.

ICH, **Impurities Guideline for residual solvents Q3C (R5)**, in: International Conference on Harmonisation, Geneva, 2011.

ICH, **Impurities Guideline for elemental impurities Q3D**, in: International Conference on Harmonisation, Geneva, 2014.

INMETRO, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, Revisão 2, 2007. Brasília, DF.

IYER, S.; SENGUPTA, C.; VELUMANI, A. Lead toxicity: An overview of prevalence in Indians. **Clinica Chimica Acta**, v. 451, p. 161–164, 2015.

JARVIS, K. E.; GRAY, A. L.; HOUK, R. S. **Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**, New York: Blackie & Son Ltd., 1992, p. 380.

KAUFFMAN, J. F. et al. Lead in pharmaceutical products and dietary supplements. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v. 48, p. 128–134, 2007.

KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: **The basic Science of Poisons**. 6^a ed. New York: Mc Graw-Hill Medical Pub. Division, 2001. p. 603, 834-837.

KOPPENAAL, D. W.; EIDEN, G. C.; BARINAGA, C. J. Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status and applications. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, p. 561-570, 2004.

KRISHNA, M. V. B.; ARUNACHALAN, J. Ultrasound-assisted extraction procedure for the fast estimation of major, minor and trace elements in lichen and mussel samples by ICP-MS and ICP-AES. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, p. 179-187, 2004.

KUMAR, V. et al. A study of dose response and organ susceptibility of copper toxicity in a rat model. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 269–274, 2015.

LANNACCONE, P. M. Toxicogenomics: “the call of the wild chip”. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 8-11, 2001.

LARSEN, E. H. Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 53, p. 253–265, 1998.

LASZTITY, A. et al. Development of atomic spectrometric methods for trace metal analysis of pharmaceuticals. **Microchemical Journal**, v. 73, p. 59-63, 2002.

LEE, T. H.; JIANG, S. J.; Determination of mercury compounds by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry with micro concentric nebulization. **Analytica Chimica Acta**, v. 413, p. 197-205, 2000.

LEWEN, N. et al. The determination of palladium in fosinopril sodium (monopril) by ICP-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, p. 879-883, 1995.

LEWEN, N. et al. A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 739–752, 2004.

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

LI, G. et al. Elemental Impurities in Pharmaceutical Excipients - Pharmaceuticals, Drug Delivery and Pharmaceutical Technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 4197-4206, 2015.

LIANG, L.; LAZOFF, S. Evaluation of the procedure for alkaline digestion solvent estimation for methyl mercury artifact formation. **Talanta**, v. 48, p. 231-233, 1999.

LIANG, L. N. et al. Speciation analysis of mercury in seafood by using high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold-vapor atomic fluorescence spectrometry via a post column microwave digestion. **Analytica Chimica Acta**, v. 477, p. 131-137, 2003.

LIMA, E. C.; BARBOSA JR, F.; KRUG, F. J. The use of tungsten–rhodium permanent chemical modifier for cadmium determination in decomposed samples of biological materials and sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 409, p. 267–274, 2000.

MANDAL, B. K. et al. Speciation of arsenic in biological samples. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, p. 307-318, 2004.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Determination of platinum group metal catalyst residues in active pharmaceutical ingredients by means of total reflection X-ray spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 86, p. 50–54, 2013.

MARTIN, I. et al. Evaluation of high-performance liquid chromatography for the separation and determination of arsenic species by on-line high-performance liquid chromatographic-hydride generation-atomic absorption spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 666, p. 101-109, 1995.

MAY, T. W.; WIEDMEYER, R. H. A table of polyatomic interferences in ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, v. 19, v. 5, p. 150-155, sept./oct. 1998.

MULLER, A. L. H. et al. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. **Talanta**, v.136, p. 161-169, 2015.

MUNÕZ, A.; COSTA, M. Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: A review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 260, p. 1–16, 2012.

NARDI, E. P. et al. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. **Food Chemistry**, v. 112, p. 727–732, 2009.

NASCENTES, C. C.; KORN, M.; ARRUDA, M. A. Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. **Microchemical Journal**, v. 69, p. 37-43, 2001.

NIEMELA, M. et al. Development of analytical methods for the determination of sub-ppm concentrations of palladium and iron in methotrexate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 433-439, 2004.

NIXON, D. E.; MOYER, T. P. Routine clinical determination of lead, arsenic, cadmium and thallium in urine and whole blood by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 51, p. 13-25, 1996.

NORDBERG, G. F. et al. **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3^a ed. United States: Academic Press - Elsevier, 2007.

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Arsenic in the drink water**. Washington, DC: National Academy Press, 225 p, 2001.

PAULA, C. E. R. et al. Development of a focused ultrasound-assisted extraction method for the determination of trace concentrations of Cr and Mn in pharmaceutical formulations by ETAAS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 74, p. 284-290, 2013.

PRICHARD, E.; MACKAY, G. M.; POINTS, J. **Trace analysis: a structured approach to obtaining reliable results**. Bodmin: Crown, 1996.

PRUSZKOWSKI, E.; NEUBAUER, K.; THOMAS, R. An overview of clinical applications by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Atomic Spectroscopy**, v. 19, p. 111 – 115, 1998.

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

REBELO, F. M.; CALDAS, E. D. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. **Environmental Research**, v. 151, p. 671–688, 2016.

REUTHER, R.; JAEGER, L.; ALLARD, B. Determination of organometallic forms of mercury, tin and lead by in situ derivatization, trapping and gas chromatography - atomic emission detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 394, p. 259 - 269, 1999.

RODRIGUES, J. L. et al. Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure. **Talanta**, v. 80, p.1158-1163, 2010.

ROSEN, A. L.; HIEFTJE, G. M. Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, p. 135-146, 2004.

SANTOS, S. B. **Elementos traço em soro sanguíneo medidos pelos métodos PIXE e ICP-MS**. 2007. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Instituto de Física, São Paulo, 2007.

SANZ-MEDEL, A. Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. **Spectrochimica Acta**, v. 53B, p. 197–211, 1998.

SANZ, E.; MUNOZ-OLIVAS, R.; CÁMARA, C. Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1097, p. 1-8, 2005.

SEILER, H. G.; SIGEL, H.; SIGEL, A. **Handbook on Toxicity of inorganic compounds**. New York: Copyright, 1987. p. 420-431.

SERESHTI, H.; HERAVI, Y. E.; SAMADI, S. Optimized ultrasound-assisted emulsification microextraction for simultaneous trace multielement determination of heavy metals in real water samples by ICP-OES. **Talanta**, v. 97, p. 235–241, 2012.

SILBERGELD, E. K.; NACHMAN, K. The environmental and public health risks associated with arsenical use in animal feeds. **New York Academy of Sciences**, v. 1140, p. 346-357, 2008.

SILVA, A. S. **Desenvolvimento de métodos para a determinação de mercúrio e tálio em amostras ambientais usando GF AAS e ETV-ICP-MS**. 2004. 124 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Santa Catarina, 2004.

SINGH, S. et al. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 148-173, 2012.

SHAW, B. J. et al. Applicability of total reflection X-ray fluorescence (TXRF) as a screening platform for pharmaceutical inorganic impurity analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 63, p. 151–159, 2012.

SOIGNET, S. L. et al. United States Multicenter Study of Arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. **Journal Clinical Oncology**, v. 19, p. 3852-3860, 2001.

SOLTYK, K. et al. Determination of chromium and selected elements in multimineral and multivitamin preparations and in pharmaceutical raw material. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 425-432, 2003.

STOICHEV, T. et al. Improvement of analytical performances for mercury speciation by on-line derivatization, cryofocussing and atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, v. 62, p. 433 - 438, 2004.

STOVING, C.; JENSEN, H.; GAMMELGAARD, B.; STÜRUP, S. Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 209–214, 2013.

SUSLICK, K. L. et al. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 357, p. 335-353, 1999.

SUTTON, K. L.; CARUSO, J. A. Liquid chromatography–inductively coupled plasma mass Spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 243-258, 1999.

SUTTON, K. L.; CARUSO, J. A. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 243-258, 1999.

SKOOG, D. A.; HOLLER F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ªed. Ed. Bookman, 2002.

SUTTON, K.; SUTTON, R. M. C.; CARUSO, J. A. Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 789, p. 85–126, 1997.

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

TANNER, S. D.; BARANOV, V. I.; VOLLKOPF, U. A dynamic reaction cell for inductively coupled mass spectrometry (ICP-DRC-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, pt. III, p. 1261-1269, 2000.

TAYLOR, A. Atomic spectrometry and the clinical chemistry of trace elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, p. 381-383, 2006.

TAYLOR, H. E.; HUFF, R. A.; MONTASER, A. **Novel applications of ICPMS**, in: A. Montaser (Ed.), Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Wiley–VCH, New York, NY, 1998. p. 711.

TEMPLETON, D. M. et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches. **Pure Applied Chemistry**, v. 72, p. 1453 - 1470, 2000.

THOMAS, R. Choosing the right trace element technique. **Today's Chemist at Work**, v. 8, n. 10, p. 42-48, 1999.

THOMAS, R. A beginner's Guide to ICP-MS. **Spectroscopy**, v. 16, pt II, III, IV, IX e XII, n. 5, p. 26-34, 56-60, 2001.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS. Mass analyzers: collision/reaction cell technology, **Spectroscopy**, v. 17, pt. IX, v. 2, p. 42-48, 2002a.

THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS. A review of interferences, **Spectroscopy**, v. 17, pt. XII, v. 10, p. 24-31, 2002b.

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

USP, **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION**, Digest of Comments Received on the Stimuli Article "General Chapter on Inorganic Impurities: Heavy Metals", 2009.

USP, **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION**, U. S. Pharmacopeia 35, NF 30, General Chapters 231 - Heavy Metals. Twinbrook Parkway, Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2012.

USP, **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION**, U. S. Pharmacopeia 39, NF 34, General Chapters 232 - Elemental Impurities Limits. Twinbrook Parkway, Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2016a.

USP, **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION**, U. S. Pharmacopeia 39, NF 34, General Chapters 233 - Elemental Impurities Procedures. Twinbrook Parkway, Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2016b.

USP, **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION**, U. S. Pharmacopeia 39, NF 34. General Chapters 1225 - Validation of Compendial Procedures. Twinbrook Parkway, Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2016c.

VENZAGO, C. et al. Pharmacopeial requirements for elemental impurities: a novel approach to the trace determination of osmium by oxidative pressure vessel sample digestion and measurement using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after complexation and stabilization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, p. 1125-1129, 2013.

WANG, T. et al. Determination of tungsten in bulk drug substance and intermediates by ICP-AES and ICP-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 937-943, 1999.

WANG, T. et al. A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 867-890, 2000.

WISEMAN, C. L. S. Blood cadmium concentrations and environmental exposure sources in newcomer South and East Asian women in the Greater Toronto Area, Canada. **Environmental Research**, v. 154, p. 19–27, 2017.

WOLLEIN, U. et al. Potential metal impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products – A market surveillance study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 100-105, 2015.

WU, X. et al. Analysis and leaching characteristics of mercury and arsenic in Chinese medicinal material. **Analytica Chimica Acta**, v. 453, p. 311-323, 2002.

YANG, J. et al. Current status and associated human health risk of vanadium in soil in China. **Chemosphere**, v. 171, p. 635-643, 2017.