

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Faculdade de Farmácia**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Julia Facci Colangelo

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM AMOSTRAS  
AUTÊNTICAS E APREENDIDAS DE COMPRIMIDOS CONTENDO  
SILDENAFILA E TADALAFILA**

Belo Horizonte

2023

Julia Facci Colangelo

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM AMOSTRAS  
AUTÊNTICAS E APREENDIDAS DE COMPRIMIDOS CONTENDO  
SILDENAFILA E TADALAFILA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Christian Fernandes –  
UFMG

Coorientadoras: Profa. Dra. Clésia Cristina  
Nascentes – UFMG

Profa. Dra. Fernanda Costa Pinheiro – UFMG

Belo Horizonte

2023

C683d Colangelo, Julia Facci.  
Determinação de impurezas elementares em amostras autênticas e apreendidas de comprimidos contendo sildenafil e tadalafila [recurso eletrônico] / Julia Facci Colangelo. – 2023.  
1 recurso eletrônico (77 f. : il.) : pdf

Orientador: Christian Fernandes.  
Coorientadoras: Clésia Cristina Nascentes.  
Fernanda Costa Pinheiro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Medicamentos – Teses. 2. Controle de qualidade – Teses. 3. Medicamentos – Análise – Teses. 4. Citrato de sildenafil. 5. Tadalafila. I. Fernandes, Christian. II. Nascentes, Clésia Cristina. III. Pinheiro, Fernanda Costa. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

## FOLHA DE APROVAÇÃO

“DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM AMOSTRAS AUTÊNTICAS E APREENDIDAS DE  
COMPRIMIDOS CONTENDO SILDENAFILA E TADALAFILA.”

**JÚLIA FACCI COLANGELO**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Comissão

Profa. Dra. Letícia Malta Costa  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dr. Luan Farinelli Diniz  
Eurofarma Laboratórios SA

Prof. Dr. Christian Fernandes - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dra. Fernanda Costa Pinheiro - coorientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Clésia Cristina Nascentes - coorientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 01 de setembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 01/09/2023, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luan Farinelli Diniz, Usuário Externo**, em 01/09/2023, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Costa Pinheiro, Usuária Externa**, em 01/09/2023, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clesia Cristina Nascentes, Professora do Magistério Superior**, em 20/09/2023, às 20:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Malta Costa, Professora do Magistério Superior**, em 20/09/2023, às 20:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2559425** e o código CRC **A43485A1**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família que sempre foi meu suporte. Aos meus avós Antonio e Vera e minha mãe Fabiana que são meus maiores apoiadores, incentivadores e o meu alicerce. Mãe muito obrigada por todo o apoio ao longo dessa trajetória, sem você nada disso seria possível. Ao meu grande amigo Luís Fernando Gonçalves por todo apoio, pelas conversas, pelo carinho, paciência e incentivo. Ao meu orientador, professor Christian Fernandes por todo auxílio e apoio para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço pela orientação, pelos conhecimentos, pela compreensão e paciência diante das adversidades que surgiram em minha vida pessoal durante esse período e, acima de tudo, por acreditar no meu potencial e me incentivar a buscar os meus objetivos. Agradeço imensamente a toda a equipe LEAQUAA que me acolheu com muito carinho nessa parceria, em especial a professora Clésia Cristina Nascentes por todo o apoio e auxílio, pelos conhecimentos e pela amizade. A minha coorientadora e grande amiga Fernanda Costa Pinheiro por todos os ensinamentos, conhecimentos, por me mostrar o caminho me ensinando para além dos quesitos teóricos e técnicos. Fer, muito obrigada por todo o auxílio, por toda a paciência e dedicação nesse trabalho junto a mim. Você foi essencial na concretização dessa etapa da minha vida. Aos meus queridos amigos Gregório Saravia e Nathália Rodrigues de Oliveira pela parceria, por toda a ajuda, apoio e pelos momentos de descontração, alegria e amizade. A Laura Aguiar Santos por me acompanhar e auxiliar no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço também ao Setor Técnico e Científico da Superintendência de Polícia Federal de Minas Gerais e ao Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais pela doação das amostras de medicamentos apreendidos. Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade, a todos os professores e funcionários, em especial ao ex-secretário Marton pela disponibilidade e apoio. À UFMG por ser a minha segunda casa desde 2015, é um grande privilégio ter minha trajetória acadêmica desenvolvida nessa universidade que reúne profissionais incríveis e proporciona todo o suporte para que nossa formação seja de altíssimo nível. Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida. Finalmente, agradeço a Deus por todas as graças, por sempre me sustentar e viabilizar a concretização dos meus sonhos.

## RESUMO

A falsificação de medicamentos é uma atividade ilegal em crescimento no mundo. Os principais alvos deste crime são os medicamentos de alto custo e os mais procurados pela população, particularmente aqueles destinados à impotência sexual contendo sildenafil e tadalafila. A determinação elementar em produtos farmacêuticos é um assunto que está em destaque devido às mudanças regulatórias e das técnicas analíticas empregadas para o monitoramento destas impurezas, e, sobretudo, devido à toxicidade de alguns elementos. A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é a técnica de maior detectabilidade para análise elementar. Diante disto, neste trabalho foram analisadas seis amostras autênticas e dez amostras apreendidas pela Polícia Federal e pela Polícia Civil do Estado de Minas Gerais de comprimidos contendo sildenafil e tadalafila, de acordo com os capítulos 232 e 233 da Farmacopeia Americana (USP). O objetivo foi estabelecer uma comparação entre os teores das impurezas elementares determinadas nas amostras autênticas e apreendidas. Para isso, um novo método utilizando digestão ácida em forno de micro-ondas e ICP-MS foi desenvolvido e validado visando a determinação simultânea dos elementos Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V. O procedimento de preparo de amostras foi otimizado por meio de planejamento fatorial completo  $2^2$  com ponto central, avaliando-se a concentração da água régia invertida e o volume de  $H_2O_2$ . Nas condições ótimas, 0,1 g das amostras foram submetidas à digestão em forno assistido por radiação micro-ondas usando 5 mL de  $3HNO_3:1HCl$  20% v v<sup>-1</sup> e 2 mL de  $H_2O_2$  30% v v<sup>-1</sup>. A precisão e a exatidão foram avaliadas em três níveis (0,5; 1,0 e 5,0  $\mu g L^{-1}$ ) em duas amostras autênticas. As recuperações obtidas variaram entre 70 e 127%, com exceção de Ag, Cu e Ni. Os limites de quantificação foram calculados a partir de 10 brancos independentes e variaram entre 0,005 (Tl) e 1,3  $\mu g g^{-1}$  (Se). Os teores determinados variaram de 0,006 (Cd) a 6,0  $\mu g g^{-1}$  (Ni), sendo que as maiores concentrações foram determinadas nas amostras apreendidas. Os teores determinados nas amostras autênticas e apreendidas estavam abaixo dos seus respectivos limites máximos permitidos, porém os resultados obtidos demonstram o risco ao qual a população está submetida quando utiliza medicamentos falsificados.

Palavras-chave: controle de qualidade de medicamentos; análise elementar; sildenafil; tadalafila; ICP-MS.

## ABSTRACT

Drug counterfeiting is an illegal activity in expansion worldwide. In this regard, the main targets are those medicines with high costs, or the ones sought after by the population, among which stand out those intended for sexual impotence, particularly drugs containing sildenafil and tadalafil. Elemental impurities determination in pharmaceuticals has become an emerging topic due to the regulatory changes about the permissible limits, the analytical techniques applied for this determination and also because of the toxicity of some elements even at trace levels. The inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is the technique that presents the highest sensitivity for elemental impurities analysis. Based on the above considerations, in this study six authentic samples and ten samples seized by the Federal Police and the Civil Police of the state of Minas Gerais of tablets containing sildenafil and tadalafil were analyzed in accordance with chapter 232 and 233 of the United States Pharmacopeia (USP). The main goal of this study was to establish a comparison between the levels of elemental impurities determined in the authentic and seized samples. For this, a new method using a microwave assisted acid digestion and ICP-MS was developed and validated aiming at the simultaneous determination of the elements Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V. The sample preparation procedure was optimized through a  $2^2$  factorial design with central point, evaluating the reverse aqua regia concentration and the volume of  $H_2O_2$ . In optimal conditions 0.1 g of the samples were submitted to a microwave-assisted digestion using 5 mL of  $3HNO_3:1HCl$  20% v v<sup>-1</sup> and 2 mL de  $H_2O_2$  30% v v<sup>-1</sup>. The precision and accuracy were evaluated by addition and recovery experiments at three levels (0.5; 1.0 e 5.0  $\mu g L^{-1}$ ) in two authentic samples. Recoveries ranged from 70 to 127% except for Ag, Cu and Ni. The limits of quantification were calculated from 10 independent blanks and ranged from 0.005 (Tl) to 1.3  $\mu g g^{-1}$  (Se). The levels determined ranged from 0.006 (Cd) to 6.0  $\mu g g^{-1}$  (Ni) and the highest concentrations were determined in the seized samples. The levels determined in authentic and seized samples are below their respective maximum allowable limits, as established in chapter 232 of USP, although, this study shows the risk people are submitted when exposed to counterfeit drug products.

Keywords: quality control of pharmaceuticals; elemental analysis; sildenafil; tadalafil; ICP-MS

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Incidência de crimes farmacêuticos no mundo em 2021.....	16
<b>Figura 2.</b>	Incidência de crimes farmacêuticos reportados no ano de 2021, por classe terapêutica.....	17
<b>Figura 3.</b>	Estruturas químicas da tadalafila (A) e citrato de sildenafil (B).....	18
<b>Figura 4.</b>	Mecanismo de ação dos fármacos inibidores da PDE-5 sobre a ereção peniana.....	19
<b>Figura 5.</b>	Abrangência das farmacopeias.....	22
<b>Figura 6.</b>	Formação de íons positivamente carregados no plasma.....	30
<b>Figura 7.</b>	Representação esquemática de um equipamento de ICP-MS destacando suas principais partes.....	31
<b>Figura 8.</b>	Imagens das amostras de medicamentos apreendidos disponibilizados pela PF e PCMG.....	38
<b>Figura 9.</b>	Amostras de comprimidos de TAD 20 mg digeridos com diferentes concentrações de água régia invertida: (a) 3HNO <sub>3</sub> :1HCl v v <sup>-1</sup> 100%; (b) 3HNO <sub>3</sub> :1HCl v v <sup>-1</sup> 50%; (c) 3HNO <sub>3</sub> :1HCl v v <sup>-1</sup> 25%; (d) 3HNO <sub>3</sub> :1HCl v v <sup>-1</sup> 12,5%.....	44
<b>Figura 10.</b>	Gráficos de contorno dos fatores e respostas estudados no planejamento experimental.....	48
<b>Figura 11.</b>	Gráfico de contorno dos fatores e da resposta desejabilidade global.....	50
<b>Figura 12.</b>	Gráficos de desejabilidade para a otimização do processo de preparo de amostras com a utilização de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.....	51
<b>Figura 13.</b>	Desvios padrões relativos para os elementos em três níveis de adição no estudo da repetibilidade.....	62
<b>Figura 14.</b>	Concentração média de Li, V, Cr, Ni, Co, Cu, Mo, Cd, Sn, Ba e Pb determinadas nas amostras.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das impurezas elementares e Exposição Diária Permitida (EDP, em $\mu\text{g dia}^{-1}$ ) segundo a USP.....	28
<b>Tabela 2.</b> Amostras autênticas e suas composições.....	37
<b>Tabela 3.</b> Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial $2^2$ com ponto central para a otimização do preparo de amostras.....	40
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros instrumentais utilizados na quantificação dos analitos por ICP-MS.....	41
<b>Tabela 5.</b> Planejamento fatorial $2^2$ com ponto central para a otimização do preparo de amostra.....	47
<b>Tabela 6.</b> Figuras de mérito obtidas para a determinação de Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V em amostras de medicamentos por ICP-MS usando Y como padrão interno.....	53
<b>Tabela 7.</b> Limites de concentração permitidos dos 24 elementos (em $\mu\text{g g}^{-1}$ e devidamente convertidos para $\mu\text{g L}^{-1}$ ) nos comprimidos contendo SIL e TAD segundo recomendações da USP.....	54
<b>Tabela 8.</b> Experimentos de adição e recuperação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) para Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V por ICP-MS com Y como padrão interno.....	56
<b>Tabela 9.</b> Determinação de As, Co, Cr, Cu, Li, Mo, Ni, Pd, Rh, Ru, Se e V ( $\mu\text{g L}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) nas amostras de comprimidos contendo SIL e TAD por ICP-MS com Y como padrão interno .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AR</b>	Acidez residual
<b>BPF</b>	Boas práticas de fabricação de medicamentos
<b>CC/KED</b>	Cela de colisão e discriminação por energia cinética
<b>C<sub>máx</sub></b>	Concentração plasmática máxima
<b>CSR</b>	Carbono solúvel residual
<b>D</b>	Desejabilidade global
<b>DDM</b>	Dose diária máxima
<b>DE</b>	Disfunção erétil
<b><i>di</i></b>	Desejabilidade individual
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>EDP</b>	Exposição Diária Permitida
<b>ER</b>	Erro relativo
<b>FB</b>	Farmacopeia brasileira
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>GMPC</b>	Monofosfato cíclico de guanosina
<b>HAP</b>	Hipertensão arterial pulmonar
<b>HPB</b>	Hiperplasia prostática benigna
<b>ICH</b>	<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
<b>ICP-OES</b>	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> )
<b>IFA</b>	Insumo farmacêutico ativo
<b>KED</b>	Discriminação de energia cinética (do inglês <i>Kinetic energy discrimination</i> )

<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LMP</b>	Limite máximo permitido
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PCMG</b>	Polícia Civil do Estado de Minas Gerais
<b>PDE-5</b>	Fosfodiesterase-5
<b>PF</b>	Polícia Federal
<b>PSI</b>	Instituto de Segurança Farmacêutica (do inglês <i>Pharmaceutical Security Institute</i> )
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>SIL</b>	Sildenafil
<b>TAD</b>	Tadalafila
<b>TCC</b>	Tecnologia de cela de colisão
<b>USP</b>	<i>United States Pharmacopeia</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1 Falsificação de medicamentos.....	14
3.2 Sildenafil e tadalafila .....	17
3.3 Controle de qualidade de medicamentos e determinação de impurezas elementares	21
3.3.1 <i>Capítulos gerais 232 e 233 da USP</i> .....	27
3.4 Determinação elementar por ICP-MS.....	29
3.5 Preparo de amostra para determinação elementar.....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
4.1 Amostras.....	36
4.2 Reagentes e soluções .....	38
4.3 Procedimento de preparo de amostra.....	39
4.4 Otimização do procedimento de preparo de amostra.....	39
4.5 Instrumentação .....	40
4.6 Validação do método analítico.....	41
4.7 Aplicação do método validado.....	42
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
5.1 Otimização do procedimento de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas..	43
5.2 Planejamento experimental .....	44
5.3 Desempenho analítico.....	52
5.3.1 <i>Avaliação da exatidão</i> .....	54
5.4 Determinação elementar nas amostras de comprimidos contendo SIL e TAD .....	63
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

O mercado farmacêutico tem apresentado um acelerado crescimento e faturamento no Brasil e no mundo. O gasto global com medicamentos atingiu R\$ 5 trilhões no ano de 2018 e estima-se que ultrapasse R\$ 6,2 trilhões em 2023, enquanto o mercado farmacêutico brasileiro deve movimentar entre R\$ 162 a R\$ 179 bilhões em 2023 [1]. De acordo com dados levantados pela Associação Brasileira de Redes de Farmácias e Drogarias, a tendência é que até o final de 2023 o Brasil esteja entre as cinco primeiras colocações no ranking dos maiores mercados da indústria farmacêutica mundial, podendo assumir a quinta posição, cujo líder atual são os Estados Unidos [2].

Diante desse cenário, o mercado farmacêutico representa um grande atrativo para atividades ilegais relacionadas à falsificação e contrabando de medicamentos, o que representa um severo risco à saúde da população. Levantamentos realizados pelo Instituto de Segurança Farmacêutica (PSI, do inglês *Pharmaceutical Security Institute*) demonstram que os medicamentos que constituem o maior alvo de falsificação e contrabando são os destinados ao tratamento de distúrbios do trato geniturinário, dentre os quais destacam-se aqueles para o tratamento de disfunção erétil (DE) [3,4]. Autoridades policiais e sanitárias brasileiras revelaram, por meio do levantamento de apreensões, que a classe dos inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE-5), cujos fármacos mais comuns são a sildenafil (SIL) e a tadalafila (TAD), estão entre os mais falsificados no Brasil [5,6].

A qualidade, segurança e eficácia do medicamento se correlacionam diretamente com o sucesso do tratamento, o que destaca a importância do controle de qualidade desses produtos. As impurezas, além de não apresentarem efeito terapêutico, podem causar efeitos tóxicos, até mesmo em baixas concentrações. Ademais, uma grande preocupação acerca dessas substâncias é o potencial de bioacumulação de determinadas impurezas elementares que podem se correlacionar à toxicidade crônica [7–9].

Diante disso, importantes mudanças regulatórias colocaram em destaque o controle de qualidade de impurezas elementares em excipientes, insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e medicamentos. A Farmacopeia Americana (USP), em consonância com o *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), estabeleceu a classificação das impurezas elementares de acordo com a toxicidade e a probabilidade de ocorrência em medicamentos, e definiu os limites máximos permitidos dessas impurezas em medicamentos. Além disso, alterou as técnicas

de análise, exigindo a utilização de técnicas instrumentais espectrométricas: a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) ou a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*). Estas técnicas permitem a quantificação multielementar em níveis de traço [10–13]. Dentre as técnicas citadas, a de ICP-MS pode ser considerada a mais adequada para análises elementares em IFAs, excipientes e medicamentos por ser a técnica multielementar de maior detectabilidade para a determinação de elementos em níveis de traço ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e ultratraço ( $\text{ng L}^{-1}$ ) em diferentes matrizes [8].

Considerando a importância da falsificação de medicamentos em escala global e as novas exigências para o controle de qualidade de impurezas elementares, esse trabalho apresenta um novo método baseado em ICP-MS para a determinação dos 24 elementos recomendados pelos capítulos 232 e 233 da USP em amostras de comprimidos contendo SIL e TAD apreendidas por autoridades policiais brasileiras. Para isso, a otimização do procedimento de preparo de amostras visou a utilização de soluções ácidas diluídas, a fim de minimizar os impactos ao analista e ao meio ambiente. Adicionalmente, o método foi desenvolvido de forma a requerer a mínima quantidade de amostra para a realização da análise em triplicata, considerando que a apreensão de medicamentos pode disponibilizar quantidade reduzida de amostras para análise. Por fim, foi possível quantificar as impurezas elementares, mesmo em níveis abaixo do estabelecido pela USP, a fim de possibilitar uma análise comparativa sobre os teores encontrados nas amostras apreendidas e autênticas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver e validar método analítico empregando digestão ácida assistida por radiação micro-ondas e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente para determinação de impurezas elementares em comprimidos contendo sildenafil e tadalafila apreendidos pela Polícia Federal (PF) e pela Polícia Civil do Estado de Minas Gerais (PCMG).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Desenvolver um procedimento de preparo de amostra para comprimidos contendo SIL e TAD, aplicando planejamento experimental com a utilização de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas empregando água régia invertida diluída;
- Otimizar os parâmetros instrumentais da técnica de ICP-MS para a determinação simultânea de Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V, avaliando estratégias instrumentais e métodos de calibração para corrigir efeitos de matriz e possíveis interferências espectrais;
- Determinar simultaneamente os 24 elementos preconizados pela USP nas amostras autênticas e apreendidas pela PF e pela PCMG;
- Estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos para as amostras autênticas e apreendidas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Falsificação de medicamentos

A falsificação de medicamentos é uma atividade ilegal que está em crescimento em escala global e representa uma ameaça à saúde pública. No Brasil, essa prática se configura como crime hediondo contra a saúde pública, segundo a Lei nº 9677/1998 [6,14]. A falsificação pode abranger tanto os medicamentos referência quanto os genéricos, o que pode resultar em produtos com a composição inapropriada, seja devido ao teor inadequado do IFA, ausência do IFA ou embalagem falsa, representando assim, riscos à saúde de quem os utiliza [15]. A expansão dessa atividade está relacionada aos altos lucros associados à prática, uma vez que os custos de produção são substancialmente reduzidos pela negligência dos parâmetros de qualidade, segurança e eficácia desses medicamentos [6,16].

No Brasil, a lei nº 6360/1976 dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos e correlatos e estabelece que tais produtos podem ser comercializados apenas por empresas autorizadas pelo Ministério da Saúde, inclusive os importados, cujos estabelecimentos sejam licenciados pelo órgão sanitário das unidades federativas em que se localizem [17]. Além da falsificação, a pirataria ou contrabando constitui outra vertente importante relacionada aos crimes farmacêuticos, situação em que medicamentos são importados sem autorização e registro na agência nacional competente [18].

Diante desse cenário, o crime de falsificação tem se tornado extremamente expressivo e preocupante no que diz respeito à saúde pública, uma vez que novos polos de falsificação são descobertos em diversas áreas do mundo com alta frequência. Estima-se que a falsificação de medicamentos seja uma das atividades criminosas com maior escala de crescimento global [16,19]. Algumas dificuldades em relação ao levantamento de dados acerca das fraudes relacionadas aos medicamentos e ao combate a esse crime consistem na falta de uma definição universal sobre o tema e na falta de legislações rigorosas que se apliquem para além das fronteiras, bem como a limitação do intercâmbio de dados e informações sobre o assunto entre os diversos países [19,20].

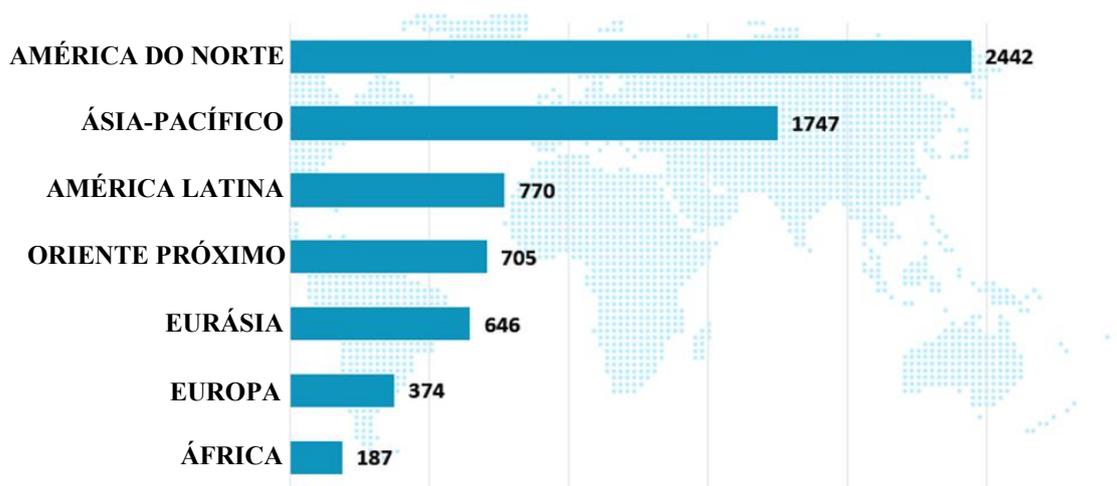
No intuito de diminuir as barreiras de informação acerca do tema de falsificação, a Organização Mundial de Saúde (OMS) criou o programa intitulado “*The global surveillance and monitoring system for substandard and falsified medical products*” em

julho de 2013. O intuito é trabalhar junto aos países membros visando facilitar as denúncias e centralizar os dados para promover ações de prevenção, identificação e punição de maneira mais eficiente a esse problema emergente que constitui uma ameaça à saúde da população [21].

Segundo um estudo realizado pela OMS em 2017, um em cada dez medicamentos em circulação no mercado de países em desenvolvimento é falsificado ou de qualidade inferior. De 2013 a 2017, 1500 denúncias de medicamentos desta natureza foram reportadas junto ao sistema de vigilância da OMS, sendo a região africana responsável por 42% dessas denúncias e as Américas por 21%. Entretanto, acredita-se que esses números representam apenas uma pequena fração da situação real, devido à subnotificação e dificuldade relacionada à identificação dos casos diante da globalização e do comércio *online* [22].

Em 2018, a OMS definiu um novo sistema de classificação para as fraudes relacionadas a medicamentos. Para tanto, definiu-se três classificações de medicamentos denominados suspeitos: (i) medicamentos fora do padrão (produtos relacionados à saúde autorizados, mas que possuem falhas no que diz respeito aos parâmetros de qualidade, ou especificações, ou ambos); (ii) medicamentos sem registro (aqueles que não foram submetidos à análise e subsequente aprovação pela agência regulatória responsável); e (iii) medicamentos falsificados (aqueles que foram adulterados de maneira deliberada e fraudulenta quanto à sua identidade, composição ou origem) [23,24].

Em 2021, o PSI realizou um levantamento acerca de irregularidades relacionadas a medicamentos, que foram denominados incidentes, nas 7 regiões do mundo. Foram contabilizados 5987 incidentes criminais, com um crescimento de 38% no total mundial e 142 países foram impactados por tais crimes. O número de incidentes em cada região do mundo está representado na Figura 1. É importante destacar que as regiões cuja incidência é mais alta, não necessariamente traduzem as áreas de menor vigilância, ao contrário, demonstram eficiência por parte das autoridades em identificar os crimes farmacêuticos [3].

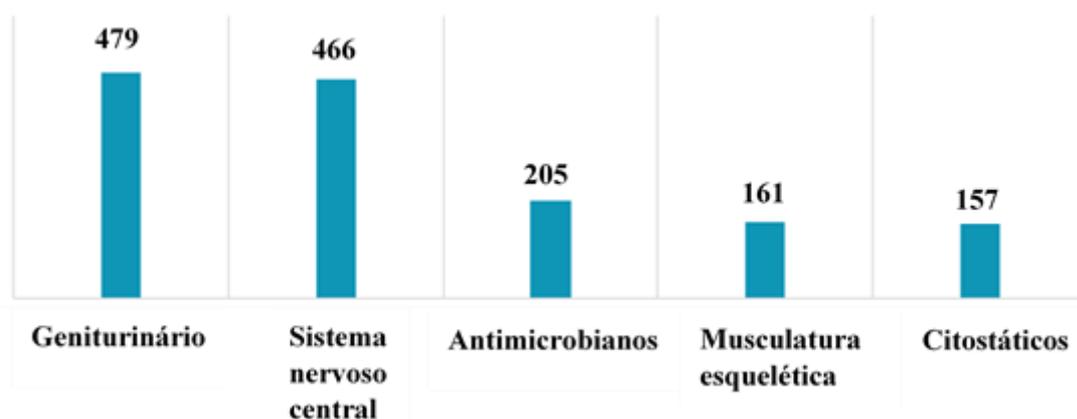


**Figura 1.** Incidência de crimes farmacêuticos no mundo em 2021. [3]

Observa-se que a falsificação de medicamentos é um problema global e consiste em um grande desafio que atinge todas as regiões do mundo (Figura 1). Além disso, o panorama se alterou em relação à distribuição desse crime, uma vez que em 2017 o levantamento realizado pela OMS apontou maior incidência nos países em desenvolvimento; entretanto, no ano de 2021, a liderança em crimes farmacêuticos reportados foi na América do Norte [3,22]. A incidência globalizada desse crime correlaciona-se diretamente com o crescimento exponencial do comércio via *internet*, à facilidade e comodidade aliada aos preços frequentemente mais baixos em relação ao comércio tradicional, fatores que constituem fortes atrativos para os consumidores, inclusive no ramo de medicamentos. O comércio *online* facilita a distribuição mundial dos produtos e o controle e regulamentação relacionada a essa modalidade é mais difícil, uma vez que as agências regulatórias vigentes no país importador não conseguem assegurar a segurança e eficácia dos medicamentos de origem estrangeira [23,25].

O Brasil acompanha o cenário mundial no crescimento de falsificação e contrabando de medicamentos. Hurtado e Lasmar conduziram um estudo entre 2007 e 2011 com apreensões de medicamentos irregulares e demonstraram que os medicamentos destinados ao tratamento de DE se destacaram como os mais prevalentes [6]. Em um estudo realizado por Ames e Souza (2012) foram avaliados os laudos periciais de medicamentos apreendidos no Brasil no período de janeiro de 2007 a setembro de 2010, sendo demonstrado que 69% pertenciam à classe de inibidores da PDE-5, cujos IFAs mais comuns são a SIL e a TAD, destinados ao tratamento da DE [5].

A falsificação não se restringe a uma classe terapêutica específica de medicamentos, mas abrange principalmente os medicamentos mais procurados pela população e de custo mais elevado no mercado oficial, dentre os quais destacam-se os denominados medicamentos de estilo vida ou medicamentos de bem-estar, que incluem aqueles destinados ao emagrecimento e impotência sexual [21]. O PSI realizou uma análise dos 5987 incidentes criminais reportados em 2021, classificando-os de acordo com as classes terapêuticas alvo, conforme demonstrado na Figura 2. A classe terapêutica que constitui o maior alvo, seja de falsificação, contrabando ou demais irregularidades é a constituída por medicamentos destinados ao tratamento de distúrbios do trato geniturinário, incluindo aqueles para impotência sexual [3,4].



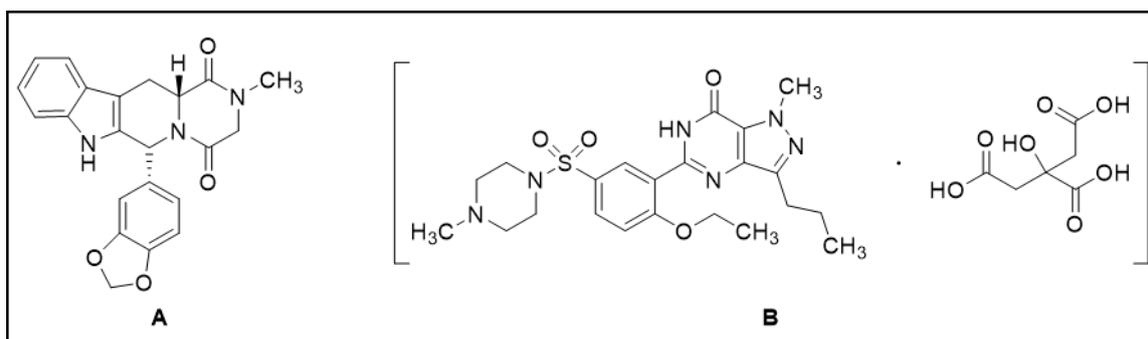
**Figura 2.** Incidência de crimes farmacêuticos no mundo em 2021, por classe terapêutica. [4]

### 3.2. Sildenafil e tadalafila

De acordo com o consenso do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, a DE é uma condição definida como a incapacidade persistente de obter e manter uma ereção suficiente para permitir um desempenho sexual satisfatório [26]. Apesar da literatura apresentar-se relativamente escassa sobre dados epidemiológicos acerca dessa disfunção, é notória uma elevada prevalência desse distúrbio em homens, principalmente acima de 40 anos em todo o mundo, sendo que os estudos corroboram no que diz respeito à correlação entre o aumento da idade e aumento da prevalência da DE [27,28]. O estudo de maior destaque sobre o tema foi realizado em 11 cidades próximas a Boston no estado de Massachusetts nos Estados Unidos, no período entre 1987 e 1989, com homens entre

40 e 70 anos de idade. A prevalência de DE encontrada nos participantes desse estudo foi de 52% [29]. Aytaç e colaboradores conduziram um estudo utilizando os dados de prevalência desse trabalho para calcular a possível prevalência de DE no mundo até o ano de 2025 e as projeções são de que até 2025 haverá 322 milhões de homens com a disfunção em todo o mundo [30].

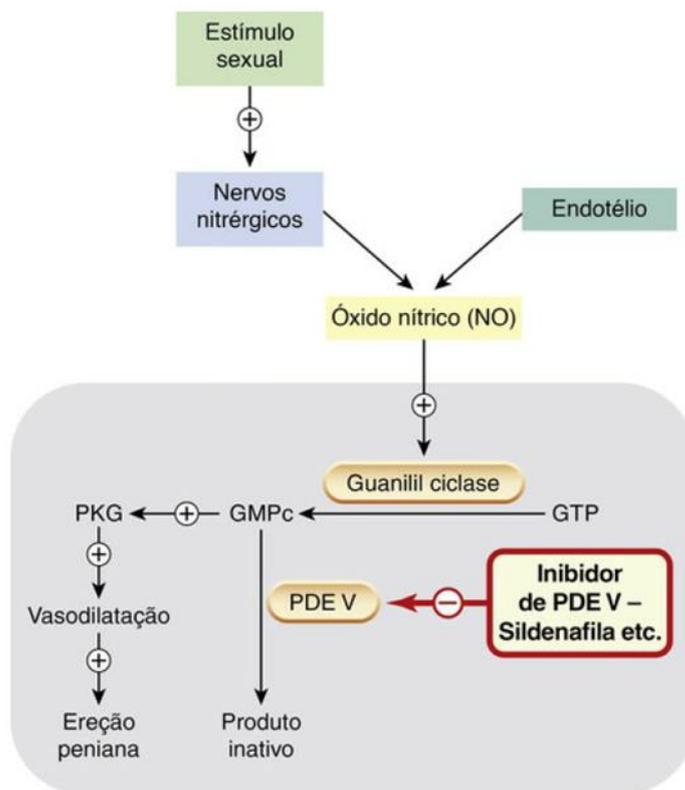
Os fármacos inibidores da PDE-5 constituem o tratamento de primeira linha para a DE. Ao serem introduzidos no mercado a partir da década de 1990, tais fármacos revolucionaram o tratamento da DE. Dentro desta classe, se destacam a SIL e a TAD [27,31,32]. A SIL é utilizada na forma de sal, citrato de SIL, na composição do medicamento, sendo sua fórmula molecular  $C_{22}H_{30}N_6O_4S \cdot C_6H_8O_7$  e massa molar 666,70 g/mol. A TAD possui fórmula molecular  $C_{22}H_{19}N_3O_4$  e massa molar 389,40 g/mol [33–35]. As estruturas químicas de ambos os fármacos são apresentadas na Figura 3.



**Figura 3.** Estruturas químicas da tadalafila (A) e do citrato de sildenafil (B).

A Figura 4 apresenta o processo fisiológico envolvido na ereção peniana e o mecanismo de ação dessa classe de medicamentos [36]. O estímulo sexual promove a liberação de óxido nítrico (NO) a partir dos nervos nitrérgicos e das células endoteliais, o que ativa a enzima guanilil ciclase elevando a concentração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) intracelular. Este mensageiro celular promove o relaxamento das artérias do pênis e das malhas trabeculares das fibras musculares lisas no tecido erétil dos corpos cavernosos e esponjosos na haste do pênis. Como consequência, os músculos lisos vasculares, ao relaxarem, promovem um aumento no fluxo sanguíneo para o pênis, causando a liberação de óxido nítrico das células endoteliais e posterior vasodilatação [37]. Portanto, o GMPc é um importante mensageiro celular no processo de ereção peniana, uma vez que ele se correlaciona ao relaxamento da musculatura lisa, além de prolongar o efeito vasodilatador do NO. Entretanto, sua ação é abreviada pela presença

da enzima PDE-5, que é a isoforma que promove a sua inativação. O mecanismo de ação da SIL e TAD ocorre pela inibição seletiva e competitiva da enzima PDE-5, de modo a promover um aumento da concentração de GMPc intracelular, favorecendo o efeito vasodilatador do NO e, conseqüentemente, a ereção peniana [36,38].



**Figura 4.** Mecanismo de ação dos fármacos inibidores da PDE-5 sobre a ereção peniana. O retângulo cinza representa a célula muscular lisa no corpo cavernoso. Guanosina trifosfato (GTP); Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc); Proteína quinase (PKG); Fosfodiesterase-5 (PDE V). Adaptado de [36].

A PDE-5 foi identificada pela primeira vez no ano de 1978 em plaquetas de ratos, e, a partir de então, as pesquisas se intensificaram a fim de explorar e aprofundar os conhecimentos relacionados às funções dessa isoenzima [39]. Neste sentido, nos anos seguintes foi iniciada uma “corrida” da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de fármacos inibidores da PDE-5, de modo que na década de 1980, a empresa farmacêutica Pfizer instaurou um programa de pesquisa, sediado em Sandwich na Inglaterra, que buscava por novos fármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares. Este programa rendeu importantes patentes à empresa e inseriu novos vasodilatadores no mercado, como a prazosina, a doxazosina e o anlodipino [40,41].

Entretanto, o grande marco do programa foi o desenvolvimento da SIL, fármaco inicialmente destinado ao tratamento de angina pectoris, doença cardiovascular relacionada à isquemia do músculo cardíaco [42]. Devido ao curto tempo de meia vida desse fármaco, dosagens de até 75 mg deveriam ser administradas três vezes ao dia para a manutenção da concentração terapêutica; com isso, alguns voluntários apresentaram efeitos colaterais dentre os quais se destacou a ereção peniana [41]. Dessa forma, houve uma mudança no direcionamento das pesquisas para o tratamento da DE e, em 1998, a agência regulatória americana, *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou a SIL para o tratamento dessa disfunção. Esse medicamento foi registrado com o nome comercial Viagra e revolucionou o tratamento de DE, por ser o pioneiro por via oral para esta condição. A OMS recomenda que as terapias por via oral constituam o tratamento de primeira escolha, uma vez que não são invasivas, são de fácil administração, efetivas e seguras [43]. Com isso, após poucas semanas da sua chegada ao mercado dos Estados Unidos, mais de um milhão de pacientes já haviam recebido prescrição de Viagra [41,44].

Diante disso, novas pesquisas foram conduzidas em busca de outras potenciais indicações para esse fármaco. Posteriormente, foi evidenciado que a SIL é capaz de reduzir seletivamente a pressão e resistência vascular pulmonar, sendo indicada também para o tratamento de hipertensão arterial pulmonar (HAP) [45]. Em 2005, teve a aprovação do FDA para o tratamento dessa condição e chegou ao mercado com o nome comercial Revatio [41]. A grande repercussão da SIL no mercado fomentou a continuidade das pesquisas em busca de novos fármacos inibidores da PDE-5; com isso, em 2003, a TAD foi licenciada para o tratamento de DE com o nome comercial Cialis e patenteada pela indústria farmacêutica Eli Lilly. A TAD também é indicada para o tratamento de hiperplasia prostática benigna (HPB), condição caracterizada pelo aumento benigno da próstata que pode culminar em sintomas relacionados ao trato urinário inferior, devido à interferência no fluxo normal da urina pela compressão da uretra prostática [46-48].

Apesar do mecanismo de ação semelhante, a SIL e a TAD diferem no que diz respeito à potência de inibição da enzima e às propriedades farmacocinéticas, como meia-vida plasmática, velocidade de absorção e a duração do efeito [43]. A SIL é rapidamente absorvida após administração oral, sendo a concentração plasmática máxima (C<sub>máx</sub>) atingida, em média, 60 minutos após a administração em jejum. Quando administrada concomitantemente a uma refeição rica em lipídeos, a taxa de absorção é reduzida, o que leva a um atraso médio de 60 minutos para que a concentração máxima seja atingida, com

uma redução média de 29% na  $C_{máx}$ ; contudo, a extensão de absorção não é significativamente afetada. O tempo de meia-vida é de aproximadamente 4 horas e a duração do efeito entre 4 e 6 horas. A TAD atinge a  $C_{máx}$  em média 2 horas após a administração, a velocidade e extensão da absorção não são afetadas pela alimentação e o tempo de meia-vida é de 17,5 horas. Por sua vez, a duração do efeito da TAD é significativamente maior do que da SIL, podendo durar até 36 horas [27,38,49].

### **3.3. Controle de qualidade de medicamentos e determinação de impurezas elementares**

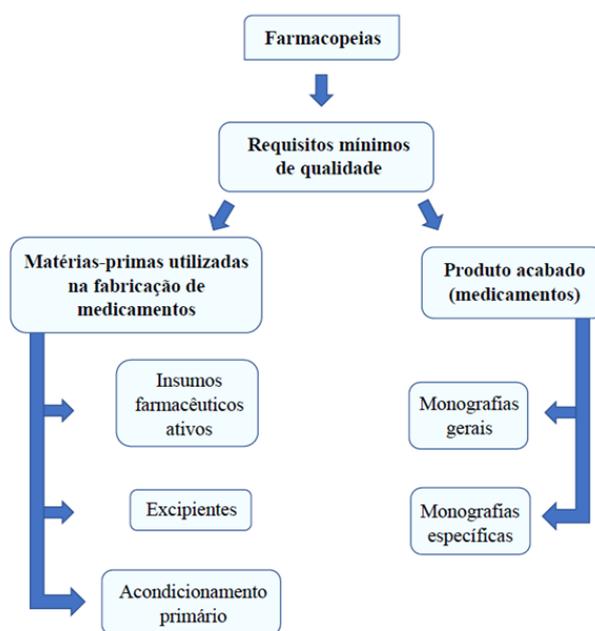
A Farmacopeia Brasileira (FB) define controle de qualidade de medicamentos como o “conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos, que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade” [50]. O controle de qualidade é crucial em todas as etapas da produção de medicamentos e aplica-se à matéria prima, aos produtos intermediários e ao produto acabado. Visa assegurar a qualidade, segurança e eficácia, correlacionando-se diretamente com o sucesso do tratamento. Além disso, desvios de qualidade podem representar graves riscos à saúde daqueles que utilizam os produtos farmacêuticos [51].

Para tanto, uma regulamentação extensa e rigorosa deve ser atendida para que o processo produtivo cumpra com os requisitos mínimos e o medicamento obtenha registro junto à agência reguladora competente, que no Brasil cabe a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para em seguida chegar ao mercado e aos consumidores [52]. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 658/2022 que dispõe sobre as diretrizes gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) é a principal legislação brasileira sobre o assunto e determina os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de produtos farmacêuticos. De acordo com esta resolução, as BPF constituem a parte do gerenciamento da qualidade responsável por assegurar que a produção dos medicamentos aconteça de maneira consistente e controlada, de acordo com os padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro sanitário [53].

Nesse sentido, além das legislações, existem também as farmacopeias, que são compêndios farmacêuticos oficiais que constituem uma literatura tecnicamente elaborada em convergência com o desenvolvimento científico e tecnológico. Possuem como

objetivo estabelecer as exigências mínimas de qualidade, autenticidade e pureza de insumos farmacêuticos, de medicamentos e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária [54]. Portanto, as farmacopeias são códigos farmacêuticos da qualidade, e servem de guias tanto para as autoridades de saúde pública quanto para os fabricantes de IFAs, excipientes e de medicamentos [55,56]. Além disso, as farmacopeias desempenham um importante papel no combate aos medicamentos falsificados, ilegais ou contrafeitos. No Brasil, o não atendimento integral às exigências farmacopeicas configura-se como um crime, uma vez que resulta no enquadramento do produto como adulterado, alterado ou impróprio para a utilização, segundo a Lei nº 6360/1976, incorrendo os responsáveis nas sanções estabelecidas pela Lei nº 6337/1977 [17,50,57].

Os compêndios oficiais reúnem informações organizadas, como esquematizado na Figura 5, em monografias tanto das matérias-primas utilizadas na fabricação de medicamentos (IFAs e excipientes), quanto dos produtos acabados (medicamentos). Além disso, também descrevem os métodos gerais, que trazem a descrição dos procedimentos indicados nas monografias visando a padronização da sua execução. Reúnem também informações sobre reagentes, materiais de embalagens e demais referências concernentes à avaliação da qualidade do que é produzido [55-59].



**Figura 5.** Abrangência das farmacopeias Adaptado de [55].

A segurança do produto farmacêutico é determinada pelo seu perfil farmacológico e toxicológico, além da avaliação de possíveis efeitos adversos causados por impurezas

nele presentes. As impurezas podem gerar efeitos indesejados e até mesmo tóxicos. A grande preocupação relacionada a essas substâncias é que muitas delas, mesmo em baixas concentrações, são prejudiciais à saúde humana [7,8]. Segundo o guia Q3A do ICH, as impurezas são classificadas em impurezas orgânicas, inorgânicas e solventes residuais [59].

Nesse contexto, um assunto que ganhou crescente destaque e interesse nos últimos anos foi a determinação de impurezas elementares em IFAs, excipientes e medicamentos, devido às mudanças regulatórias no que diz respeito aos limites máximos toleráveis e às técnicas analíticas recomendadas para a determinação de constituintes inorgânicos em medicamentos [60]. As impurezas elementares (ou impurezas inorgânicas) não apresentam efeito terapêutico e representam um risco à saúde devido à toxicidade inerente a determinados elementos. Ademais, podem catalisar reações de degradação do IFA, o que reduz a vida de prateleira do medicamento. Ainda, podem originar produtos de degradação tóxicos, motivos pelos quais é de extrema importância o monitoramento rigoroso destas impurezas em IFAs, excipientes e produtos acabados [61].

As impurezas elementares apresentam uma grande importância toxicológica, devido à capacidade desses elementos em reagir com sistemas biológicos, pela perda de um ou mais elétrons para a formação de cátions. Essas espécies são muito reativas e as células apresentam diversos possíveis ligantes, sendo a inibição de enzimas biologicamente críticas um mecanismo molecular relevante na toxicidade das impurezas elementares [62]. Além disso, esses elementos podem manifestar toxicidade por dano oxidativo, uma vez que muitos deles podem produzir alterações oxidativas de biomoléculas como proteínas ou mesmo DNA. Isso ocorre devido a capacidade de agir diretamente como centros catalíticos para reações de oxirredução com o oxigênio molecular ou outros oxidantes endógenos. Outro mecanismo de toxicidade é o mimetismo, em que elementos tóxicos se ligam a sítios de ligação reservados aos elementos essenciais. Um exemplo é o mecanismo de toxicidade para Cd, Cu e Ni que mimetizam Zn [9].

A diferença das impurezas elementares em relação a outros toxicantes consiste na ocorrência natural desses elementos, na impossibilidade de serem criados ou destruídos por atividades humanas, além de poderem produzir bioacumulação, que é o processo de absorção e retenção de substâncias químicas por organismos vivos. Portanto, a grande preocupação dessas impurezas inorgânicas em relação aos aspectos toxicológicos reside

no fato de não serem biodegradáveis e apresentarem a característica de bioacumulação [9].

As impurezas elementares de maior toxicidade para humanos incluem As, Cd, Pb e Hg. Arsênio em sua forma inorgânica apresenta um elevado potencial carcinogênico. Sua toxicidade aguda pode ser avaliada por meio de exame de urina e valores acima de 1 a 2 mg desse metalóide por litro de urina indica intoxicação aguda, cujos sintomas incluem febre, anorexia, hepatomegalia, arritmia cardíaca e falência cardíaca [9]. Já a toxicidade crônica pode culminar em danos hepáticos, neuropatia periférica, efeitos hematológicos e câncer. A toxicidade aguda por Cd é rara e causa irritação grave do epitélio gastrointestinal. A grande preocupação em relação a esse elemento é a toxicidade crônica, ou seja, uma longa exposição a baixos níveis que se correlacionam a danos renais, doenças pulmonares obstrutivas e cardiovasculares, bem como câncer. Chumbo é um elemento ubíquo, presente no ambiente e em todos os sistemas biológicos e seus efeitos tóxicos podem culminar em doenças graves devido a sua neurotoxicidade, nefrotoxicidade e efeitos cardiovasculares [62]. A forma mais tóxica relacionada ao Hg é o metilmercúrio que apresenta elevada neurotoxicidade; mas essa espécie não costuma ser encontrada em produtos farmacêuticos, motivo pelo qual o limite estabelecido no capítulo 232 da USP refere-se ao Hg inorgânico [11].

A avaliação de impurezas elementares em medicamentos apresenta grande relevância, uma vez que a contaminação pode ocorrer por diversas fontes [63]. Cromo, Co, Cu, Mo, Ni e V são elementos que comumente compõem tanques de reação e equipamentos utilizados na fabricação dos medicamentos e podem ser transferidos dessas superfícies para o produto [61,63]. Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru são muito utilizados como catalisadores em reações de síntese do IFAs; com isso, resíduos destes catalisadores podem estar presentes no produto acabado em níveis traço ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ou mesmo ultratraço ( $\text{ng L}^{-1}$ ) [61]. Por sua vez, elementos como As, Cd, Ni, Hg e Pb podem ser introduzidos no medicamento por meio da utilização de matérias-primas contaminadas na fabricação dos IFAs e excipientes que irão compor o medicamento [61].

O capítulo 232 da USP recomenda a realização de uma avaliação de risco para determinar os elementos que devem ser considerados e, portanto, avaliados, caso sejam intencionalmente adicionados ou não e segundo a via de administração do produto [11]. A primeira etapa para a realização da avaliação de risco consiste na identificação de todas as possíveis fontes de contaminação que incluem o IFA, excipientes, equipamentos e tanques utilizados na produção do medicamento e instalações. Uma vez que é permitida

a utilização de evidências da literatura e resultados de testes realizados pelos fornecedores de matérias primas na elaboração da avaliação de risco de medicamentos, um consórcio de indústrias farmacêuticas realizou um grande levantamento de dados da literatura sobre impurezas elementares em excipientes e criou uma base de dados com essas informações a fim de auxiliar os produtores de medicamentos na elaboração da avaliação de risco [64-66]. A literatura indica que as concentrações de impurezas elementares em excipientes farmacêuticos são geralmente baixas e quando utilizados nas proporções usuais na produção de medicamentos não costumam representar riscos em relação à contaminação do produto acabado [64-66].

No Brasil, uma severa contaminação elementar em medicamentos enfatizou a importância do estabelecimento de limites permitidos para impurezas elementares e do emprego de técnicas analíticas quantitativas para o controle de qualidade de medicamentos. No ano 2000, foi identificada uma contaminação por As e Pb em antimoniato de meglumina, medicamento injetável indicado para o tratamento de leishmaniose. A partir de outubro do mesmo ano, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) recebeu notificações de eventos adversos de severidade grave (abscessos estéreis, reações alérgicas e intensas dores musculares e nas articulações) em pacientes que estavam utilizando o medicamento. Após investigação epidemiológica, amostras dos lotes de antimoniato de meglumina que se correlacionaram a ocorrência dos eventos adversos foram encaminhadas para análises laboratoriais [67,68].

A FB 3ª edição, vigente no ano do incidente, e a farmacopeia internacional não possuíam informações científicas que estabelecessem parâmetros de qualidade publicadas sobre o antimoniato de meglumina, então foram utilizadas referências de LMPs de impurezas elementares para outros medicamentos injetáveis que constavam na FB. Foram determinadas concentrações de As e Pb nos lotes analisados com variações de 36 a 65 vezes (para As) e de 1,4 a 1,7 vezes (para Pb) acima do valor de referência. As altas concentrações dos elementos encontrados podem causar graves efeitos no organismo humano, como efeitos aditivos nos tecidos respiratórios e no sistema nervoso central, diminuição de leucócitos e hemácias, aumento no risco para o desenvolvimento de câncer, alterações severas no ritmo cardíaco, entre outros. Após esse evento, a FB passou a incluir o teste para impurezas elementares na monografia do antimoniato de meglumina com a utilização de técnicas espectrométricas [67,68].

Por outro lado, até o ano de 2010 o capítulo da USP que abordava o tema era o 231, publicado em 1905 e intitulado Metais pesados (*Heavy Metals*). O antigo capítulo

estabelecia um método colorimétrico baseado na reação de precipitação das impurezas elementares com íons sulfeto, cuja avaliação deveria ser realizada pela comparação visual das colorações da solução em análise com uma solução padrão [69]. O teste baseava-se na reação da tiocetamida, reagente fonte de íons sulfeto, com os elementos Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn que poderiam estar presentes na amostra, levando a precipitação dos sais formados [70]. O critério de aceitação era que a coloração desta solução não fosse mais intensa do que a da solução padrão de 10 mg kg<sup>-1</sup> de Pb [69].

As limitações relacionadas a este procedimento de análise eram diversas, o método era semiquantitativo e não apresentava seletividade e especificidade, uma vez que não era possível identificar os elementos presentes na amostra nem os quantificar. Além disso, a comparação visual deveria ser realizada imediatamente após a formação do precipitado e dependia da acuidade visual do analista; dessa forma, a subjetividade e o viés de interpretação dos resultados tornavam-se relevantes. Então, apesar da simplicidade e baixo custo, o teste abrangia uma pequena quantidade de elementos sem quantificar e identificar cada um deles e requeria a utilização de reagentes tóxicos [68,70,71]. Portanto, a necessidade da atualização das técnicas de análise e dos limites aceitáveis para impurezas elementares era evidente uma vez que os limites não eram totalmente fundamentados na toxicidade dos elementos e o método estabelecido pela USP por mais de 100 anos mostrava-se defasado em relação à evolução científica e tecnológica [72].

Com isso, no período de 2005 a 2010 a USP realizou um ciclo de revisões com o objetivo de promover atualização relacionada ao capítulo geral 231. E em 2008 realizou um workshop junto ao *U.S. Institute of Medicine* que reuniu especialistas em análises elementares e toxicologistas a fim de avaliar as diretrizes vigentes sobre impurezas elementares a serem controladas e técnicas de análises modernas mais apropriadas para esta determinação. Ainda no ano de 2008, a USP propôs a substituição do capítulo 231 pelos capítulos 232 e 233, visando acompanhar a evolução das técnicas analíticas, incluindo análises elementares quantitativas [72]. Em 2010 estes dois novos capítulos foram publicados, mas entraram em vigência apenas no ano de 2018 para assegurar a consonância com a versão final do guia Q3D (*Step 4*) do ICH, que trata de impurezas elementares [10,73].

### 3.3.1. Capítulos gerais 232 e 233 da USP

Diante da obsolescência do capítulo 231 referente à análise elementar e com o intuito de otimizar e padronizar tais análises em IFAs, excipientes e medicamentos, a USP publicou os capítulos gerais 232, intitulado Impurezas Elementares - Limites e 233, intitulado Impurezas Elementares – Procedimentos. O primeiro capítulo classifica as impurezas elementares, estabelece os limites aceitáveis para 24 elementos em medicamentos e fornece diretrizes para avaliar os resultados obtidos com as análises para averiguação da conformidade do produto. Por sua vez, o capítulo 233 estabelece as técnicas e procedimentos analíticos a serem empregados para a determinação dessas impurezas, bem como os critérios de validação do método analítico utilizado [11,12].

A primeira grande alteração implementada diz respeito à técnica de análise a ser empregada para a determinação de impurezas elementares. O método colorimétrico foi substituído por técnicas instrumentais espectrométricas, sendo sugeridas as técnicas ICP-OES e ICP-MS [12]. Além disso, o capítulo 232 estabelece a Exposição Diária Permitida (EDP) para 24 elementos, levando em consideração a via de administração do medicamento e a classificação da impureza, como apresentado na Tabela 1. As impurezas elementares são classificadas em três grupos, de acordo com a toxicidade e probabilidade de ocorrência nos medicamentos.

**Tabela 1.** Classificação das impurezas elementares e Exposição Diária Permitida (EDP, em  $\mu\text{g dia}^{-1}$ ) segundo a USP [11].

Elemento	Classe	EDP ( $\mu\text{g dia}^{-1}$ ) por via de administração		
		Oral	Parenteral	Inalatória
Cádmio (Cd)	1	5	2	2
Chumbo (Pb)	1	5	5	5
Arsênio (As)	1	15	15	2
Mercúrio (Hg)	1	30	3	1
Cobalto (Co)	2A	50	5	3
Vanádio (V)	2A	100	10	1
Níquel (Ni)	2A	200	20	5
Tálio (Tl)	2B	8	8	8
Ouro (Au)	2B	100	100	1
Paládio (Pd)	2B	100	10	1
Írídio (Ir)	2B	100	10	1
Ósmio (Os)	2B	100	10	1
Ródio (Rh)	2B	100	10	1
Rutênio (Ru)	2B	100	10	1
Selênio (Se)	2B	150	80	130
Prata (Ag)	2B	150	10	7
Platina (Pt)	2B	100	10	1
Lítio (Li)	3	550	250	25
Antimônio (Sb)	3	1200	90	20
Bário (Ba)	3	1400	700	300
Molibdênio (Mo)	3	3000	1500	10
Cobre (Cu)	3	3000	300	30
Estanho (Sn)	3	6000	600	60
Cromo (Cr)	3	11000	1100	3

A classe 1 reúne os elementos As, Cd, Hg e Pb, os quais apresentam elevada toxicidade e possuem uso limitado ou não são utilizados na fabricação de medicamentos, mas devido à toxicidade e natureza ubíqua requerem estudo de avaliação de risco

independente da via de administração [11,61]. A classe 2 reúne elementos que são geralmente considerados tóxicos para humanos segundo a via de administração e é subdividida em 2A e 2B, de acordo com a probabilidade de ocorrência dos elementos nos medicamentos. A subclasse 2A inclui Co, Ni e V, elementos cuja probabilidade de ocorrência é relativamente alta e requer estudo de avaliação de risco independente da via de administração. A subclasse 2B inclui Au, Ag, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se e Tl, abrangendo os elementos que apresentam probabilidade reduzida de ocorrência em medicamentos, devido à sua baixa abundância e baixo potencial de serem co-isolados com outros materiais. Finalmente, a classe 3 inclui Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb e Sn que apresentam toxicidade relativamente baixa pela via de administração oral. Portanto, possuem EDPs elevadas, em geral  $> 500 \mu\text{g dia}^{-1}$  [10,11].

Segundo o capítulo 233 da USP, os limites de concentração de cada elemento alvo são determinados pelo valor  $J$ , que é calculado por meio da divisão da EDP, específica para cada elemento, pela dose diária máxima (DDM) do medicamento analisado e multiplicado pelo fator de diluição empregado no método analítico (fator empregado considerando o preparo de amostra e as especificações de análise da técnica instrumental utilizada), como apresentado na equação (1) [12].

$$J = \frac{EDP \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{dia}}\right)}{DDM \left(\frac{\text{g}}{\text{dia}}\right) \times FD} \quad (1)$$

Os valores de  $J$  também são empregados para fins de validação do método analítico. A exatidão, por exemplo, é avaliada a partir de experimentos de adição e recuperação em que as adições devem ser realizadas nos níveis correspondentes a  $0,5J$  e  $1,5J$  e as recuperações são consideradas aceitáveis se estiverem na faixa de 70 a 150% dos valores adicionados.

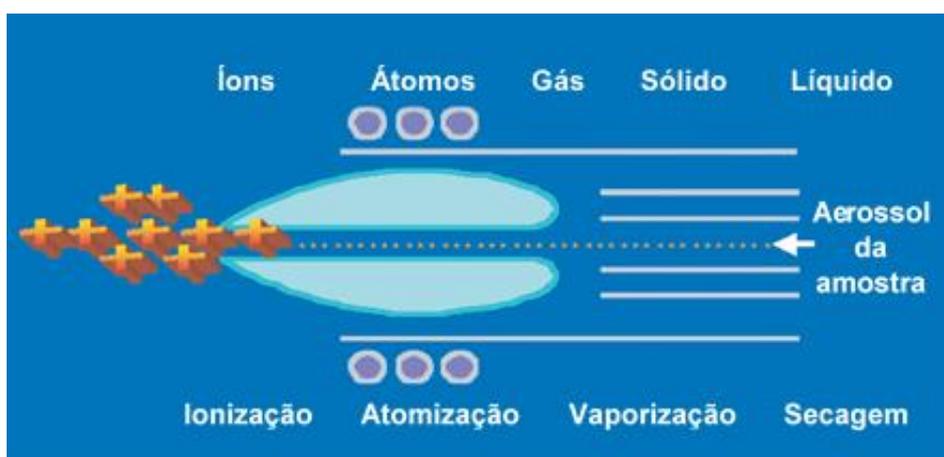
### 3.4. Determinação elementar por ICP-MS

Atualmente, a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente é a técnica mais adequada no âmbito das análises elementares. Trata-se de uma técnica espectrométrica de elevada detectabilidade para a determinação de elementos em níveis de traço e ultratraço em diferentes matrizes, sendo a mais adequada para análises elementares em IFAs, excipientes e medicamentos [8]. O ICP-MS é uma técnica

multielementar, que se destaca devido à elevada seletividade, baixos limites de detecção (LD), na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ , exatidão, precisão, ampla faixa linear, possibilidade de leitura isotópica e alta frequência analítica [13].

A técnica fundamenta-se na ionização das moléculas de interesse de modo a produzir íons em fase gasosa, os quais são subsequentemente submetidos a campos elétricos e/ou magnéticos até atingirem o detector. O processo de ionização pode ser realizado de diferentes formas, fundamentando-se na aplicação de energia para que as moléculas se tornem íons [74].

A fonte de energia para a ionização pelo ICP consiste em um plasma de argônio que pode atingir temperaturas de até 10000 K em determinadas regiões, energia térmica capaz de causar excitação e ionização da maioria dos elementos químicos [75]. As amostras são introduzidas majoritariamente no estado líquido e o sistema de introdução de amostras é composto por um nebulizador e pela câmara de nebulização. O nebulizador é responsável por gerar um fino aerossol a partir da amostra e a câmara de nebulização promove a seleção das menores gotículas para serem conduzidas até o plasma, a fim de melhorar a eficiência da ionização. As gotículas do aerossol que atingem o plasma passam pelo processo de eliminação de água (secagem), vaporização, atomização e ionização. Com isso, a amostra é transformada de um aerossol líquido, em partículas sólidas e, por fim, em um gás, como ilustrado na Figura 6 [72].



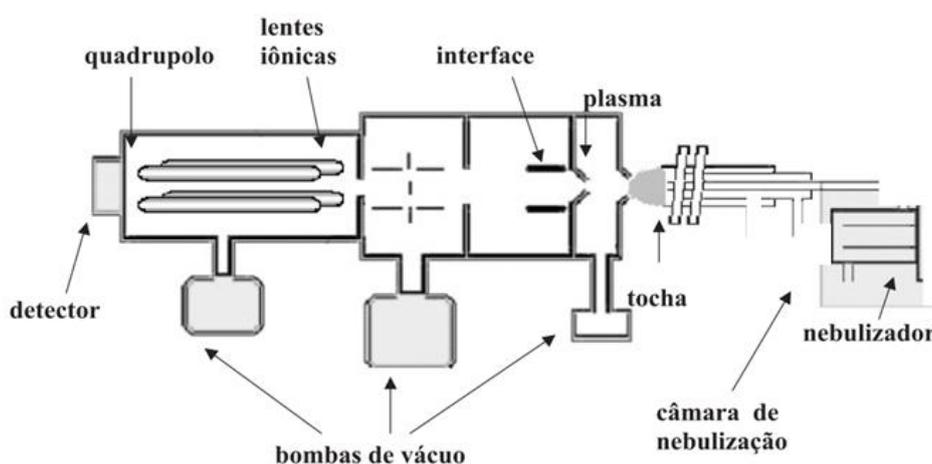
**Figura 6.** Formação de íons positivamente carregados no plasma [72].

Os íons gasosos gerados no plasma são conduzidos até o espectrômetro de massas que opera sob vácuo, enquanto a região do ICP funciona em pressão atmosférica. A região da interface tem como objetivo transportar eficientemente os íons com integridade

elétrica do plasma até o analisador de massas. Esta região consiste em dois ou três cones metálicos que possuem orifícios diminutos (entre 0,8 e 1,2 mm de diâmetro interno) e conduzem os íons até um sistema de focalização (lentes iônicas) que os direciona até o espectrômetro de massas [72].

O analisador de massas é a parte do espectrômetro de massas responsável por separar os íons de acordo com o valor individual de sua razão massa/carga, por meio da aplicação de campos elétricos, magnéticos ou pela combinação deles. Após a separação dos íons no analisador, eles são direcionados ao detector que gera o sinal correspondente ao registro da abundância dos íons em função da razão massa/carga. Existem diversos tipos de analisadores de massas, mas o mais frequentemente utilizado é o do tipo quadrupolo. A Figura 7 ilustra um equipamento de ICP-MS, que emprega um analisador deste tipo [74].

Apesar da alta detectabilidade, a técnica ICP-MS apresenta como principal limitação a ocorrência de interferências matriciais e espectrais (oriundas de íons isobáricos, dupla carga e/ou espécies poliatômicas) ocasionadas por óxidos, íons presentes na composição do plasma, da matriz ou dos reagentes utilizados na etapa de preparo de amostra. Tais interferências relacionadas à técnica podem representar desafios para o desenvolvimento de métodos de análise, especialmente para as amostras cujas matrizes são complexas [76].



**Figura 7.** Representação esquemática de um equipamento de ICP-MS destacando suas principais partes [77].

As interferências espectrais são aquelas em que são gerados íons poliatômicos, de dupla carga ou íons monoatômicos isobáricos, os quais possuem a mesma razão

massa/carga do analito de interesse, o que pode causar uma sobreposição dos seus sinais, fazendo com que a concentração do analito seja superestimada. As espécies interferentes poliatômicas podem advir de uma combinação de elementos presentes no gás utilizado para a formação do plasma, ácidos ou solventes presentes na amostra ou mesmo da matriz da amostra [78]. Por sua vez, as interferências matriciais correlacionam-se com as características intrínsecas da solução amostra e geralmente acontecem quando a composição da amostra difere da composição das soluções de calibração utilizadas para o preparo da curva analítica. Portanto, estas interferências acontecem a partir de diferenças entre as soluções das amostras e das referências nos quesitos eficiência de nebulização, formação das gotículas de aerossol, efeitos de transporte e ionização no plasma [76,79].

Para corrigir interferências poliatômicas nas medições por ICP-MS é utilizada a tecnologia de cela de colisão (TCC), que apresenta uma célula inserida antes do espectrômetro de massa. A célula pode ser preenchida com um gás inerte, geralmente He, que colide preferencialmente com espécies poliatômicas, portanto com diâmetro maior que o analito. Assim, as espécies/íons interferentes com baixas energias são rejeitadas pela discriminação de energia cinética (KED), e os íons do analito, que possuem maior energia cinética, são transmitidos ao analisador de massa e detectados livres de sobreposição de sinal analítico [72].

Por sua vez, considerando as interferências matriciais, uma variedade de métodos de calibração tem sido usada para corrigir efeitos de matriz para determinação elementar em produtos farmacêuticos usando ICP-MS. No entanto, a mais comumente empregada é a padronização interna. A curva de calibração empregando padronização interna é construída usando a mesma abordagem da calibração externa; no entanto, a curva é construída plotando a concentração do analito no eixo x com a razão sinal do analito dividido pelo sinal do padrão interno no eixo y. Para isso, é essencial que o elemento utilizado como padrão interno não esteja presente nas amostras, uma vez que esse é adicionado em concentração constante a todas as soluções de brancos, padrões e amostras. Desse modo, a eventual degradação do desempenho analítico devido a um desvio do instrumento ou possível variação na eficiência de introdução da amostra é compensada [73].

### 3.5. Preparo de amostra para determinação elementar

O preparo de amostras envolve operações químicas e físicas a fim de convertê-las em uma forma adequada para a introdução no instrumento de análise e para minimizar interferências na quantificação dos elementos de interesse. Trata-se de uma etapa de fundamental importância em um método analítico, uma vez que a análise direta (i.e. sem tratamento prévio) *in situ* possui uma aplicabilidade restrita. Particularmente, os métodos espectroanalíticos demandam, em sua maioria, procedimentos adequados de preparo de amostras visando a conversão de amostras sólidas em soluções representativas que possam ser introduzidas por um sistema adequado de introdução de amostra, por exemplo, a nebulização pneumática [80]

Considerando as diferentes características que medicamentos e produtos farmacêuticos podem apresentar, bem como o grande número de elementos de interesse, não existe um procedimento de preparo de amostra único que se aplique a todos os casos [79]. Os excipientes, IFAs e medicamentos geralmente possuem uma matriz complexa e variada, motivo pelo qual o procedimento de preparo de amostras deve ser criteriosamente selecionado [60]. O capítulo 233 da USP recomenda o preparo por dissolução em solventes aquosos ou orgânicos, de acordo com a solubilidade da amostra, para a obtenção de uma solução límpida. Quando a amostra não for solúvel em solventes aquosos e orgânicos, recomenda-se o preparo de solução indireta por meio de digestão em frasco fechado com a utilização de ácidos concentrados, por exemplo. [12].

Considerando as análises por ICP-MS, as amostras devem atender a determinadas características a fim de serem compatíveis com o instrumento de medida, entre elas a acidez residual (AR) e o total de sólidos dissolvidos. Recomenda-se que a AR esteja entre 1-2% v v<sup>-1</sup> para evitar efeitos indesejados na formação do aerossol e o desgaste químico de componentes do equipamento, como a tocha de quartzo os cones de amostragem. O total de sólidos dissolvidos também é relevante e idealmente deve estar abaixo de 0,1% m v<sup>-1</sup>, a fim de evitar o entupimento do nebulizador e a deposição de sais nos cones localizados na interface do equipamento de ICP-MS. Outro parâmetro de extrema importância é o teor de carbono solúvel residual (CSR), que também deve ser o menor possível, visando evitar interferências, como aquelas causadas por transferência de carga no plasma, que podem ser críticas para elementos como As, Hg, I, P, Se e Te, ou interferências espectrais causadas por espécies poliatômicas formadas com o carbono,

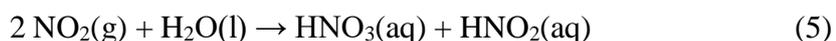
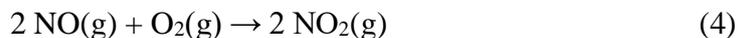
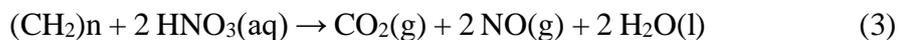
como  $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$  na determinação de cromo ao se monitorar o isótopo  $^{52}\text{Cr}^+$ , por exemplo [79].

De acordo com a literatura, o preparo de amostra para produtos farmacêuticos envolve desde a simples dissolução das amostras em soluções aquosas de ácidos minerais ou solventes orgânicos, ou ainda a aplicação de procedimentos mais sofisticados visando a decomposição da amostra, como a digestão usando aquecimento convencional, a combustão induzida por micro-ondas, e a mais comumente empregada, a digestão assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados. Além de fornecer baixos teores de CSR, a digestão em recipiente fechado tem claras vantagens em comparação com a digestão ácida convencional usando sistemas abertos, para decomposição de matrizes de amostras farmacêuticas. Como exemplos de vantagens citam-se melhor recuperação de elementos voláteis, menor risco de contaminação, menor volume de reagentes, melhor reprodutibilidade e uma operação relativamente mais segura [61].

Os medicamentos se apresentam em diferentes formas farmacêuticas, tais como soluções, suspensões, géis, cápsulas, comprimidos, sendo a solubilidade dos seus constituintes geralmente limitada. Uma consideração importante ao empregar técnicas analíticas que utilizam plasma acoplado indutivamente é o efeito que a matriz orgânica pode acarretar sobre o plasma, uma vez que elevada concentração de carbono pode gerar uma alteração no equilíbrio dos íons de modo a afetar o comportamento dos analitos. Com isso, a digestão empregando agentes oxidantes como  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e/ou complexantes como  $\text{HCl}$  se faz necessária para decompor a matéria orgânica e solubilizar resíduos inorgânicos presentes nestas amostras, a fim de liberar os analitos de interesse para a solução e minimizar potenciais efeitos de matriz no plasma. Considerando matrizes farmacêuticas, a utilização de misturas de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$  são amplamente utilizadas, sendo a água régia invertida ( $3\text{HNO}_3:1\text{HCl}$ ) a que apresenta melhores resultados [60,63].

Apesar da complexidade das amostras farmacêuticas, a presença de oxigênio e o gradiente de temperatura formado entre a fase gasosa e líquida no interior dos frascos de digestão viabilizam a regeneração do ácido nítrico, motivo pelo qual é possível a utilização de concentrações menores deste ácido, ou seja, utilização de ácidos diluídos. Além disso, o tempo necessário para a digestão assistida por radiação micro-ondas é reduzido quando comparado às digestões realizadas utilizando fontes de calor convencionais [60]. A utilização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  junto à mistura ácida otimiza o processo de digestão porque libera oxigênio e energia ao sistema. Quando a solução de ácido nítrico diluído promove a oxidação da matriz orgânica da amostra,  $\text{NO}$  é formado e este

composto é facilmente oxidado a  $\text{NO}_2$ . Os processos envolvidos na regeneração do ácido nítrico são demonstrados pelas equações abaixo [81].



Além das vantagens citadas, esta modalidade de digestão se mostra bastante promissora no aspecto ambiental, ao utilizar condições reacionais mais brandas e minimizar os resíduos gerados [79]. A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas usando  $\text{HNO}_3$  7,0 mol  $\text{L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi proposta por Gonzalez *et al.* para digestões completas de pomada de aciclovir e seus constituintes [82]. Pinheiro *et al.* avaliaram três soluções (3 $\text{HNO}_3$ :1 $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$  7,0 e 2,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ) para digestão assistida por micro-ondas de nove amostras de medicamentos variados. Os procedimentos de digestão propostos usando  $\text{HNO}_3$  7,0 e 2,0 mol  $\text{L}^{-1}$  foram adequados, mesmo quando sólidos remanescentes estavam presentes nos digeridos [73]. Entretanto, até o desenvolvimento do presente trabalho, não foram encontrados na literatura estudos que utilizassem a água régia invertida (3 $\text{HNO}_3$ :1 $\text{HCl}$ ) diluída.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

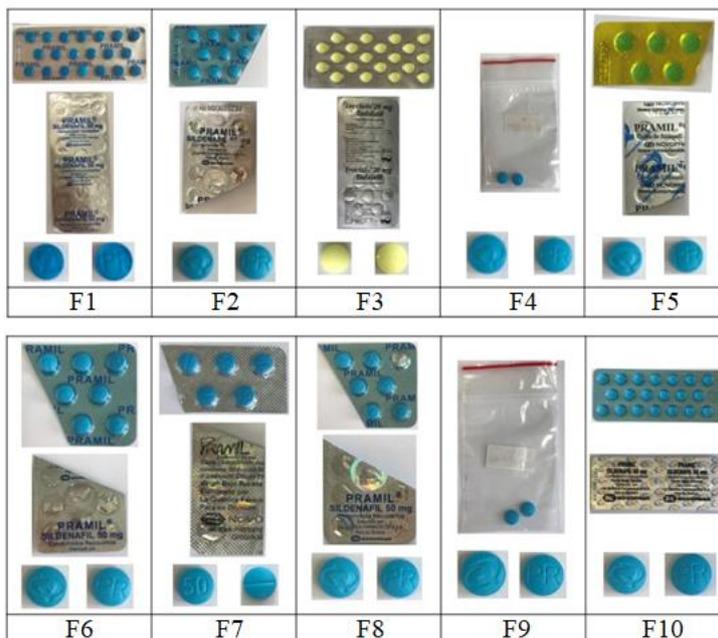
### **4.1. Amostras**

Seis amostras autênticas de comprimidos contendo 50 mg de SIL e 20 mg de TAD, com registros ativos na ANVISA, foram analisadas. A codificação, classificação e composição de cada medicamento está descrita na Tabela 2. Tais amostras foram adquiridas em drogarias na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Adicionalmente, foram analisados dez diferentes lotes de comprimidos de SIL e TAD com provável proveniência de falsificação ou contrabando. Tais amostras foram apreendidas e disponibilizadas pela PF e pela PCMG, os quais foram codificados de F1 a F10 (Figura 8). Todas as amostras apreendidas apresentavam-se rotuladas como Pramil 50 mg, cujo princípio ativo é sildenafil, exceto a amostra F3 rotulada como Erectalis 20 mg, cujo princípio ativo é tadalafila. As embalagens desses medicamentos, apresentadas na Figura 8, permitem concluir que as amostras apreendidas são medicamentos ilegais, uma vez que não possuem registro junto à ANVISA e, portanto, não podem ser comercializadas em território brasileiro.

**Tabela 2.** Amostras autênticas e suas composições.

<b>Código</b>	<b>Classificação</b>	<b>IFA/teor</b>	<b>Excipientes</b>
AM1	Referência	Sildenafil/50 mg	Celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, Opadry azul <sup>1</sup> , Opadry transparente <sup>2</sup>
AM2	Genérico	Tadalafila/20 mg	Lactose monidratada, hiprolose, croscarmelose sódica, laurilsulfato de sódio, celulose microcristalina, estearato de magnésio, hipromelose, triacetina, corante óxido de ferro amarelo, dióxido de titânio
AM3	Genérico	Sildenafil/50 mg	Celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico di-hidratado, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol, dióxido de titânio, corante laca azul FD&C n 2, dióxido de silício, talco
AM4	Genérico	Sildenafil/50 mg	Celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, dióxido de silício, álcool polivinílico, macrogol, dióxido de titânio, talco, azul de indigotina laca de alumínio
AM5	Genérico	Tadalafila/20 mg	Lactose monidratada, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, laurilsulfato de sódio, hiprolose, estearato de magnésio, hipromelose, triacetina, dióxido de titânio, óxido de ferro amarelo
AM6	Referência	Tadalafila/20 mg	Lactose monidratada, hiprolose, croscarmelose sódica, laurilsulfato de sódio, celulose microcristalina, estearato de magnésio, hipromelose, dióxido de titânio, triacetina, óxido de ferro amarelo, talco

<sup>1</sup>Opadry® azul: hipromelose, lactose, triacetina, índigo carmim alumínio laca e dióxido de titânio;<sup>2</sup>Opadry® transparente: hipromelose e triacetina



**Figura 8.** Imagens das amostras de medicamentos apreendidos disponibilizadas pela PF e PCMG. Adaptado de [83].

#### 4.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura (resistividade maior que  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) obtidas com sistema de purificação Arium mini da empresa Sartorius (Göttingen, Alemanha). Os frascos e vidrarias foram descontaminados em banho ácido ( $\text{HNO}_3$  10%  $\text{v v}^{-1}$ ) por 24 horas, em seguida enxaguados com água ultrapura e secos à temperatura ambiente em capela de fluxo laminar. Os experimentos foram realizados utilizando  $\text{HCl}$  fumegante 37% ( $\text{v v}^{-1}$ ),  $\text{HNO}_3$  65% ( $\text{v v}^{-1}$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% ( $\text{v v}^{-1}$ ), todos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ambos os ácidos foram previamente subdestilados em destilador de ácidos MLS Milestone (Soriso, Itália).

As soluções analíticas de calibração e os experimentos de adição e recuperação foram preparados a partir de diluições de alíquotas de solução estoque monoelementar contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V (Fluka, Suíça) preparadas em meio de  $\text{HNO}_3$   $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ . O elemento ítrio (Y) foi empregado como padrão interno e sua solução foi preparada como descrito anteriormente.

As concentrações analíticas utilizadas na curva de calibração foram: 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e  $20,0 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  preparadas em meio de água régia invertida 2%  $\text{v v}^{-1}$

(concentração ácida compatível com a acidez residual dos digeridos) para todos os elementos. Para corrigir efeitos matriciais, o padrão interno foi adicionado na concentração de  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  às soluções de calibração, brancos analíticos e amostras. Uma etapa adicional de limpeza do sistema de introdução de amostras, feita com  $\text{HCl } 0,06 \text{ mol L}^{-1}$ , foi acrescentada para contornar efeitos de memória que usualmente ocorrem para Hg. Segundo Louie *et al.*, os íons cloreto apresentam um efeito estabilizante frente aos íons Hg, evitando efeitos de memória em determinações por ICP-MS [84,85].

As concentrações analíticas utilizadas na curva de calibração para as determinações de carbono dissolvido residual foram 0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 e 0,1%  $\text{m v}^{-1}$ , preparadas em meio de  $\text{HNO}_3$   $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ , a partir de diluições de uma solução de carbono 0,1%  $\text{m v}^{-1}$ , preparada a partir de ácido oxálico diidratado (Carlo Erba, Brasil) [86].

### 4.3. Procedimento de preparo de amostra

As amostras foram trituradas com auxílio de almofariz e pistilo de ágata e pesadas em balança analítica (AUW220D, Shimadzu, Brasil). A digestão foi realizada em forno de micro-ondas (Ethos Lean, Milestone, Itália). Alíquotas de aproximadamente 0,1 g das amostras foram pesadas, transferidas para os frascos e digeridas em 5 mL de água-régia invertida 20%  $\text{v v}^{-1}$  ( $3\text{HNO}_3:1\text{HCl}$  concentrados) e 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%  $\text{v v}^{-1}$  em forno assistido por radiação micro-ondas seguindo o programa de aquecimento: 10 minutos de rampa até  $180^\circ\text{C}$  e 30 minutos de patamar sob  $180^\circ\text{C}$ . Posteriormente, os digeridos foram transferidos quantitativamente para frascos Corning graduados e avolumados em 25,0 mL com água ultrapura. Considerando a acidez residual e o teor de sólidos dissolvidos adequados para as amostras a serem analisadas por ICP-MS, uma diluição adicional de duas vezes foi realizada antes das análises por ICP-MS.

### 4.4. Otimização do procedimento de preparo de amostra

Para otimizar as condições empregadas para a digestão das amostras de comprimidos contendo SIL e TAD, realizou-se planejamento fatorial completo  $2^2$  com ponto central. Os fatores avaliados foram: (i) concentração da solução de  $3\text{HNO}_3:1\text{HCl}$   $\text{v v}^{-1}$  (10, 30 e 50%  $\text{v v}^{-1}$ ) e (ii) volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%  $\text{v v}^{-1}$  (0, 1 e 2 mL) e as respostas avaliadas foram: (i) a acidez residual (AR), (ii) o teor de carbono solúvel residual (CSR) após o preparo de amostra e (iii) o erro relativo (ER) das recuperações dos analitos obtidos

a partir de experimento de adição e recuperação, considerando as respostas normalizadas. A Tabela 3 apresenta os fatores e níveis estudados.

**Tabela 3.** Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central para a otimização do preparo de amostras.

<b>Fator</b>	<b>Nível baixo (-1)</b>	<b>Ponto central (0)</b>	<b>Nível alto (+1)</b>
Concentração de água régia invertida (% v v <sup>-1</sup> )	10	30	50
Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	0	1	2

Todos os experimentos foram realizados aleatoriamente e as análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software Statistica (StatSoft, EUA). A partir dos resultados obtidos, empregou-se a modelagem por mínimos quadrados para a construção do modelo matemático. A avaliação do modelo foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA). A otimização simultânea das respostas foi atingida com a utilização da função de desejabilidade proposta por Derringer e Suich [87].

#### **4.5. Instrumentação**

A determinação de Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V nas amostras de comprimidos de SIL e TAD foi realizada por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, Agilent 7700 series, Agilent Technologies, Japão), em modo padrão e com cela de colisão utilizando He 99,995% (Air Liquide, Brasil) como gás colisional. O nebulizador utilizado foi do tipo Mira Mist, câmara de nebulização (duplo passo) e tocha de quartzo. Os parâmetros do equipamento e os isótopos selecionados, assim como o modo de análise para cada analito, estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros instrumentais utilizados na quantificação dos analitos por ICP-MS.

Parâmetros	Condição instrumental
Potência de radiofrequência (kW)	1,55
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )	15
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,00
Vazão de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	1,05
Profundidade de amostragem (mm)	8,0
Vazão de He na célula de colisão (mL min <sup>-1</sup> )	4,5
Tempo de integração (s)	3,0
Nebulizador	Mira-Mist
Câmara de nebulização	Scott type – double pass
	Isótopos
Modo de análise	<p>“He-mode” <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>58</sup>Ni, <sup>63</sup>Cu, <sup>75</sup>As, <sup>103</sup>Rh</p> <p>“No gas-mode” <sup>7</sup>Li, <sup>59</sup>Co, <sup>82</sup>Se, <sup>98</sup>Mo, <sup>102</sup>Ru, <sup>105</sup>Pd, <sup>107</sup>Ag, <sup>112</sup>Cd, <sup>120</sup>Sn, <sup>123</sup>Sb, <sup>138</sup>Ba, <sup>189</sup>Os, <sup>193</sup>Ir, <sup>195</sup>Pt, <sup>197</sup>Au, <sup>202</sup>Hg, <sup>205</sup>Tl, <sup>208</sup>Pb</p>

#### 4.6. Validação do método analítico

A avaliação do desempenho analítico do método desenvolvido foi realizada de acordo com o guia de validação que consta no capítulo 233 da USP. A avaliação da exatidão foi feita a partir de experimentos de adição e recuperação em três níveis de adição (0,50; 1 e 5 µg L<sup>-1</sup>) e a precisão foi avaliada por meio da repetibilidade, a partir do desvio padrão relativo (DPR) de seis brancos fortificados nas concentrações 0,50; 1 e 5 µg L<sup>-1</sup>. As fortificações realizadas nesses experimentos foram feitas no momento do preparo de amostras, de modo que fossem submetidas a todas as etapas subsequentes do método. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LD) foram determinados a partir do desvio padrão obtido para a leitura de dez brancos analíticos (réplicas autênticas).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LD) foram calculados a partir do desvio padrão obtido para a leitura de dez brancos analíticos (réplicas autênticas) de acordo com as equações 6 e 7, respectivamente [88]. Os limites de detecção podem ser estimados pela equação (6):

$$LD = 3,3 s/b \quad (6)$$

Os limites de quantificação podem ser estimados pela equação (7):

$$LQ = 10 s/b \quad (7)$$

Em que:

s = desvio padrão da resposta dos brancos.

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

#### **4.7. Aplicação do método validado**

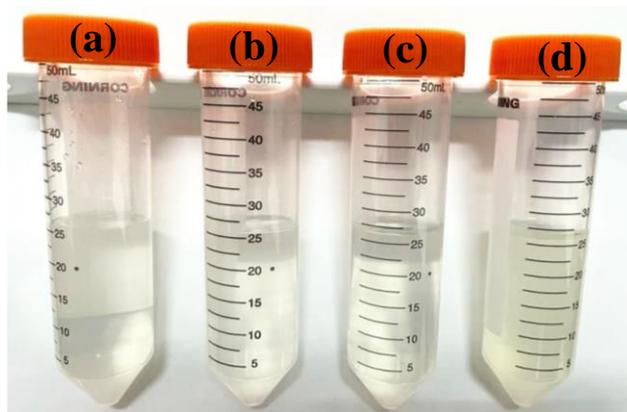
O método validado foi aplicado para a análise das amostras autênticas e apreendidas para a determinação elementar dos 24 analitos estabelecidos pelo capítulo 232 da USP. Mediante aos resultados, foi realizada uma análise comparativa do teor determinado para estas impurezas elementares nos dois tipos de amostras.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Otimização do procedimento de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas é um procedimento de preparo de amostras preconizado pelo capítulo 233 da USP e bastante consolidado na literatura para o preparo de amostras de medicamentos [12]. A utilização de água régia invertida como solução ácida para a digestão deste tipo de amostra também tem sido amplamente utilizada, uma vez que apresenta melhor desempenho frente a digestões utilizando apenas  $\text{HNO}_3$ , pois a mistura de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$  é composta por um ácido oxidante e outro complexante, respectivamente. Além disso, o  $\text{HCl}$  é preferencialmente utilizado para promover a dissolução dos elementos do grupo da platina (Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru) [7,74,89,90]. Por sua vez, a utilização de misturas ácidas diluídas confere vantagens em termos de segurança ocupacional e ambiental, além de requerer menor diluição dos digeridos anteriormente às análises por ICP-MS, o que possibilita um ganho em termos de detectabilidade.

Diante disso, preliminarmente foram testadas soluções de água régia invertida ( $3\text{HNO}_3:1\text{HCl}$ ) concentrada e diluídas nas proporções (i) 50, (ii) 25 e (iii) 12,5% v v<sup>-1</sup> para a digestão de comprimidos genéricos de TAD 20 mg, visando avaliar qual a menor concentração ácida que poderia ser empregada para a obtenção de uma digestão completa da amostra. A Figura 9 apresenta a comparação visual das soluções digeridas em cada concentração de água régia invertida.



**Figura 9.** Amostras de comprimidos de TAD 20 mg digeridos com diferentes concentrações de água régia invertida: **(a)**  $3\text{HNO}_3:1\text{HCl v v}^{-1}$  concentrada; **(b)**  $3\text{HNO}_3:1\text{HCl v v}^{-1}$  50%; **(c)**  $3\text{HNO}_3:1\text{HCl v v}^{-1}$  25%; **(d)**  $3\text{HNO}_3:1\text{HCl v v}^{-1}$  12,5%.

Como um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver um método para analisar amostras apreendidas de medicamentos, condição em que muitas vezes ocorre a apreensão de poucos comprimidos. Desta forma, optou-se por trabalhar com a massa mínima de amostra, suficiente para a realização da triplicata do preparo com massa de um comprimido de TAD (aproximadamente 0,35 g). A escolha da massa empregada no preparo baseou-se no estudo comparativo da digestão de amostras de medicamentos empregando 0,1 e 0,5 g utilizando digestão assistida por radiação micro-ondas e água régia invertida concentrada como solução digestora. Utilizando mistura de ácidos concentrados, os autores constataram que somente utilizando o procedimento empregando massa de 0,1 g, as digestões foram completas [7].

O experimento preliminar possibilitou verificar que digestões completas da amostra foram obtidas utilizando massa da amostra de 0,1 g e com as soluções digestoras de  $3\text{HNO}_3:1\text{HCl v v}^{-1}$  concentrada e nas proporções de 50 e 25%  $\text{v v}^{-1}$ . Somente a diluição de 12,5%  $\text{v v}^{-1}$  apresentou maior turbidez e material particulado em suspensão, sugerindo uma digestão parcial. Desse modo, partindo do resultado observado, um planejamento experimental foi aplicado visando otimizar as condições de digestão.

## 5.2. Planejamento experimental

O planejamento experimental visa otimizar as condições de realização dos experimentos, de modo a reduzir o tempo empregado, permitindo a máxima obtenção de informações acerca de um sistema em análise. Diante disso e dos resultados preliminares

anteriormente descritos, realizou-se um planejamento fatorial completo  $2^2$  com ponto central para otimizar as condições utilizadas para a digestão das amostras de medicamentos.

A acidez residual (AR) foi determinada por cálculo teórico, a partir da concentração ácida e do volume utilizado. No nível alto, a AR do digerido foi de  $10\% \text{ v v}^{-1}$ , no ponto central de  $6\% \text{ v v}^{-1}$  e no nível baixo de  $2\% \text{ v v}^{-1}$ . Uma diluição adicional de duas vezes (utilizando 2,5 mL da amostra digerida, 0,10 mL da solução de padrão interno e 2,4 mL de água ultrapura) foi realizada anteriormente às análises por ICP-MS. A AR foi selecionada como uma das respostas, uma vez que a concentração ácida utilizada na digestão influencia diretamente na sua eficiência; porém, a utilização de ácidos concentrados requer elevados fatores de diluição dos digeridos para a viabilização da introdução da amostra no equipamento (idealmente, entre 1 e  $2\% \text{ v v}^{-1}$ , a fim de preservar os componentes do ICP-MS), o que reduz a detectabilidade do método. Como as amostras farmacêuticas usualmente apresentam teores muito baixos dos elementos a serem determinados, é necessário desenvolver um método com elevada detectabilidade para viabilizar a quantificação desses analitos. Portanto, nesse estudo, buscou-se definir os níveis mais adequados dos fatores para produzir a menor resposta em termos de AR, de forma a obter uma digestão satisfatória das amostras, sem a necessidade de empregar elevados fatores de diluição ao submetê-las para a análise.

Por sua vez, o teor de CSR é relevante, uma vez que pode causar interferências devido à formação de íons poliatômicos com razão massa/carga igual à dos analitos de interesse. Além disso, a matéria orgânica demanda maior energia para ser atomizada e ionizada, o que pode ocasionar uma redução na disponibilidade de íons  $\text{Ar}^+$  no plasma, culminando em menor energia disponível para a ionização dos analitos. Como consequência, pode ocorrer supressão do sinal analítico; assim, espera-se que o teor de CSR seja o menor possível [79].

Finalmente, o ER das recuperações dos analitos foi selecionado como resposta, uma vez que este evidencia se os resultados obtidos a partir do ensaio de adição e recuperação são adequados, o que se correlaciona com a eficiência da digestão das amostras e exatidão da análise. Para isso, os experimentos do planejamento (Tabela 5) foram preparados sem e com a fortificação na concentração de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (considerando o digerido) dos 24 analitos (Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V) com o objetivo de determinar o ER das recuperações de cada um dos elementos

em cada experimento. Para tanto, as recuperações de cada analito em cada ensaio foram determinadas em porcentagem, segundo a equação a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

Em que:

$C_1$  = concentração do analito na amostra fortificada.

$C_2$  = concentração do analito na amostra não fortificada.

$C_3$  = concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

Com isso, foram obtidos 24 valores de recuperação para cada ensaio realizado. Em seguida, foram calculados os ER das recuperações de acordo com a equação 9 e normalizados a partir do valor máximo de ER para cada um dos 24 elementos. Então o valor máximo de ER referente a um determinado analito foi utilizado como divisor de cada um dos ER desse mesmo analito, de modo que os ER normalizados variassem até o valor 1.

$$ER (\%) = \frac{V_{medido} - V_{nominal}}{V_{nominal}} \times 100 \quad (9)$$

Em que:

$V_{medido}$  = Valor medido

$V_{nominal}$  = Valor nominal ou esperado

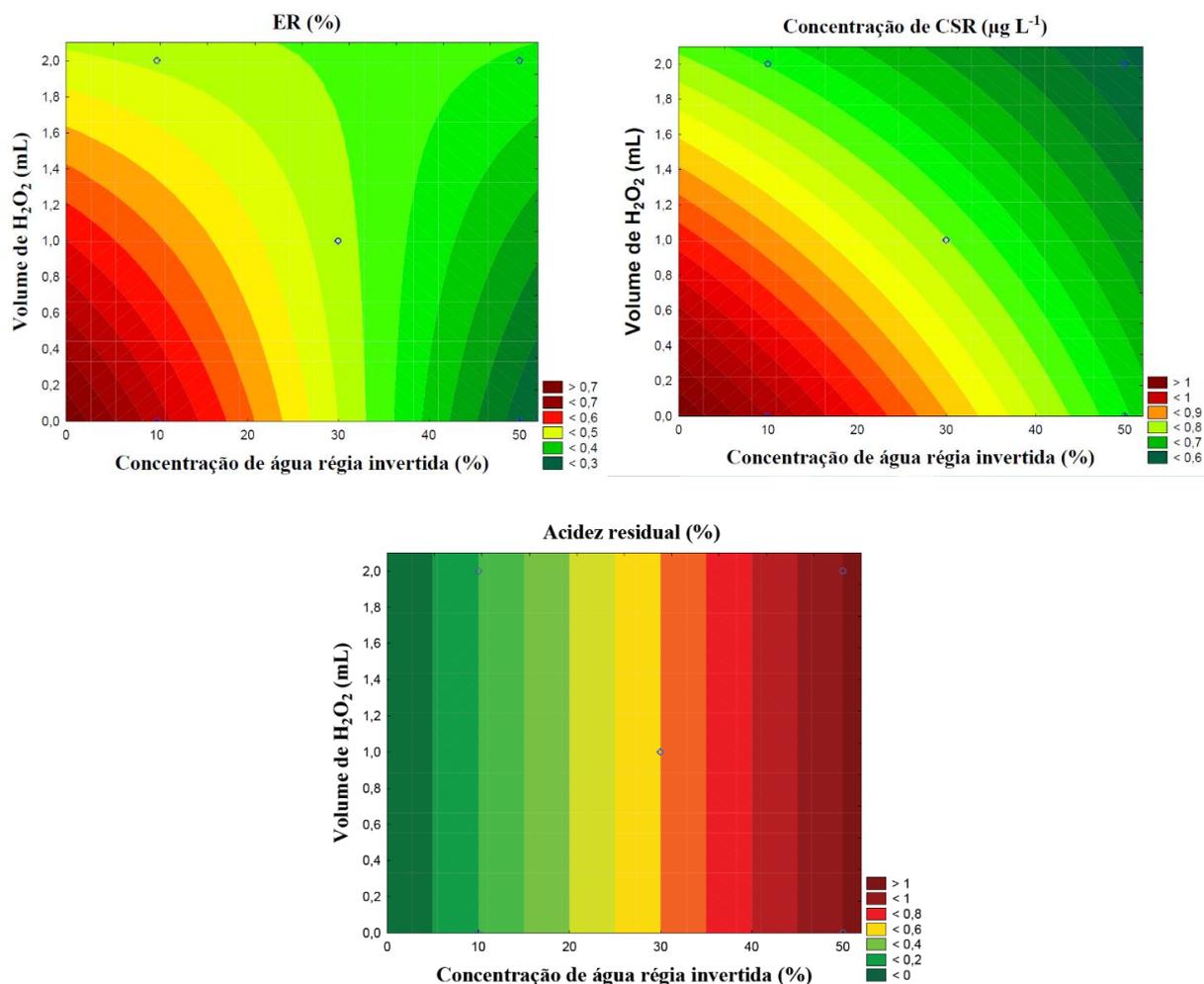
Como cada ensaio fornece múltiplas respostas, foi necessário unificá-las de modo a obter uma única resposta para cada ensaio. Para tanto, foi realizada a média aritmética dos ER normalizados dos 24 elementos, sendo assim obtida uma resposta média de ER (%) para cada ensaio realizado. A Tabela 5 apresenta as informações sobre o planejamento fatorial completo  $2^2$  com ponto central e os valores das três respostas normalizadas.

**Tabela 5.** Planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central para a otimização do preparo de amostra.

Ensaio	Concentração de água régia invertida (% v v <sup>-1</sup> )	Volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	ER (%) normalizada	Concentração de CSR (% m v <sup>-1</sup> ) normalizada	AR (% v v <sup>-1</sup> ) normalizada
1	1	1	0,39	0,58	1,00
2	1	-1	0,28	0,71	1,00
3	-1	1	0,43	0,72	0,20
4	-1	-1	0,60	1,00	0,20
5	0	0	0,38	0,89	0,60
6	0	0	0,64	0,66	0,60
7	0	0	0,51	0,87	0,60

Os resultados foram avaliados por ANOVA. A análise dos resultados mostrou que o modelo não apresentou falta de ajuste significativa ( $p > 0,05$ ), mas a regressão não apresentou significância estatística ( $p > 0,05$ ). Entretanto, é bem estabelecido na literatura que os principais fatores que se correlacionam à eficiência da digestão de amostras para análise por ICP-MS são as condições em que ela é realizada, com destaque para a solução ácida utilizada, como discutido anteriormente [73]. Além disso, a utilização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também impacta a eficiência porque promove a regeneração do HNO<sub>3</sub> no frasco de digestão, o que viabiliza a utilização de soluções ácidas menos concentradas [91].

O delineamento experimental proposto empregou um número reduzido de níveis e replicatas e a resposta de AR foi avaliada com a utilização de cálculos teóricos. Portanto, em todas as condições em que foi empregada solução ácida na mesma concentração, as respostas obtidas foram numericamente idênticas. Desse modo, conclui-se que essas questões podem ter contribuído para o resultado obtido acerca da significância da regressão. Com isso, optou-se por avaliar os gráficos de contorno de cada um dos fatores e respostas em estudo e trabalhar com a função de desejabilidade, com o objetivo de encontrar condições experimentais que viabilizassem a otimização simultânea das três respostas em estudo (Figura 9).



**Figura 10.** Gráficos de contorno dos fatores e respostas estudados no planejamento experimental.

Os gráficos de contorno apresentados na Figura 10 forneceram informações relevantes sobre as condições mais adequadas para a obtenção de uma melhor resposta. Uma vez que o objetivo consiste em minimizar as três respostas simultaneamente, buscou-se condições em que a resposta em questão estivesse nas regiões esverdeadas dos gráficos. Nos gráficos que avaliaram o ER e a concentração de CSR, observa-se que o maior volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mL) forneceu melhores respostas. Por sua vez, para a AR, apesar de o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correlacionar-se à regeneração do HNO<sub>3</sub>, de acordo com o gráfico não é observada influência na resposta a partir deste fator, fato que pode estar relacionado à determinação teórica da AR. A concentração de água régia invertida apresentou efeito similar para o ER e para a concentração de CSR, de modo que maiores concentrações forneceram melhores respostas. Para a AR, entretanto, observou-se um comportamento contrário, como esperado. Desse modo, a partir da análise dos três gráficos, pode-se

identificar que maior volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favoreceu as respostas e que as concentrações de água régia invertida entre 20 e 30% v v<sup>-1</sup> forneceram respostas satisfatórias na presença de 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

É importante ressaltar que o planejamento experimental foi aplicado com o intuito de obter uma condição de compromisso para as três respostas, visando o emprego da menor concentração ácida que promova uma digestão adequada da amostra. Nesse sentido, após avaliações iniciais anteriormente descritas, o método de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich, que define a função de desejabilidade [87], foi avaliada. Esse método tem como objetivo determinar as condições experimentais que assegurem conformidade com os critérios determinados para cada uma das respostas em estudo, de modo a prover uma condição de compromisso considerando todas as respostas simultaneamente. Isso é feito convertendo as múltiplas respostas em uma única, combinando as respostas individuais em uma função composta, seguida pela otimização [87,92].

Para isso, primeiramente, foram calculadas as desejabilidades individuais ( $d_i$ ) a partir das respostas obtidas experimentalmente. Como objetivou-se minimizar as três respostas (menor ER, AR e CSR), os cálculos foram realizados de acordo com a equação a seguir:

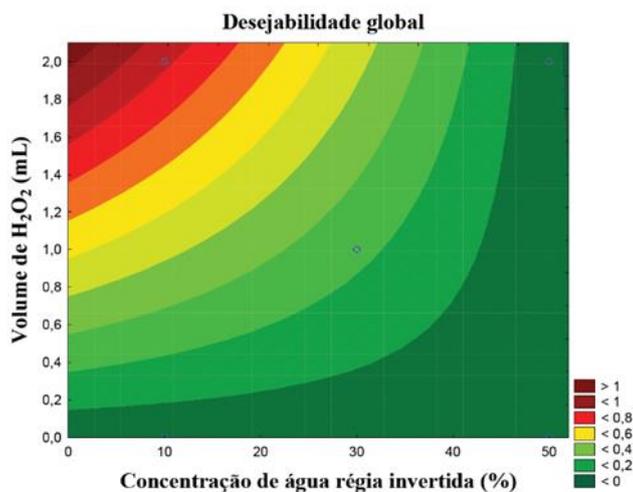
$$d_i = \left( \frac{y_{m\acute{a}x} - y_i}{y_{m\acute{a}x} - y_{m\acute{i}n}} \right)^{t=1} \quad \text{se } y_{m\acute{i}n} \leq y_i \leq y_{m\acute{a}x} \quad (10)$$

em que  $y_i$  é a resposta experimental,  $y_{m\acute{i}n}$  e  $y_{m\acute{a}x}$  são respectivamente a menor e maior resposta obtidas experimentalmente,  $t$  é o peso e quando é igual a 1 a função de desejabilidade linear.  $d_i$  assume valores restritos ao intervalo [0,1],  $d_i = 0$  representa uma resposta indesejável e  $d_i = 1$  representa uma resposta desejável.

Após determinar as desejabilidades individuais para cada resposta (AR, teor de CSR e ER das recuperações dos analitos de interesse), os valores de  $d_i$  foram combinados para a obtenção da desejabilidade global (D), que é determinada pela média geométrica das  $m$  desejabilidades individuais, segundo a equação que se segue:

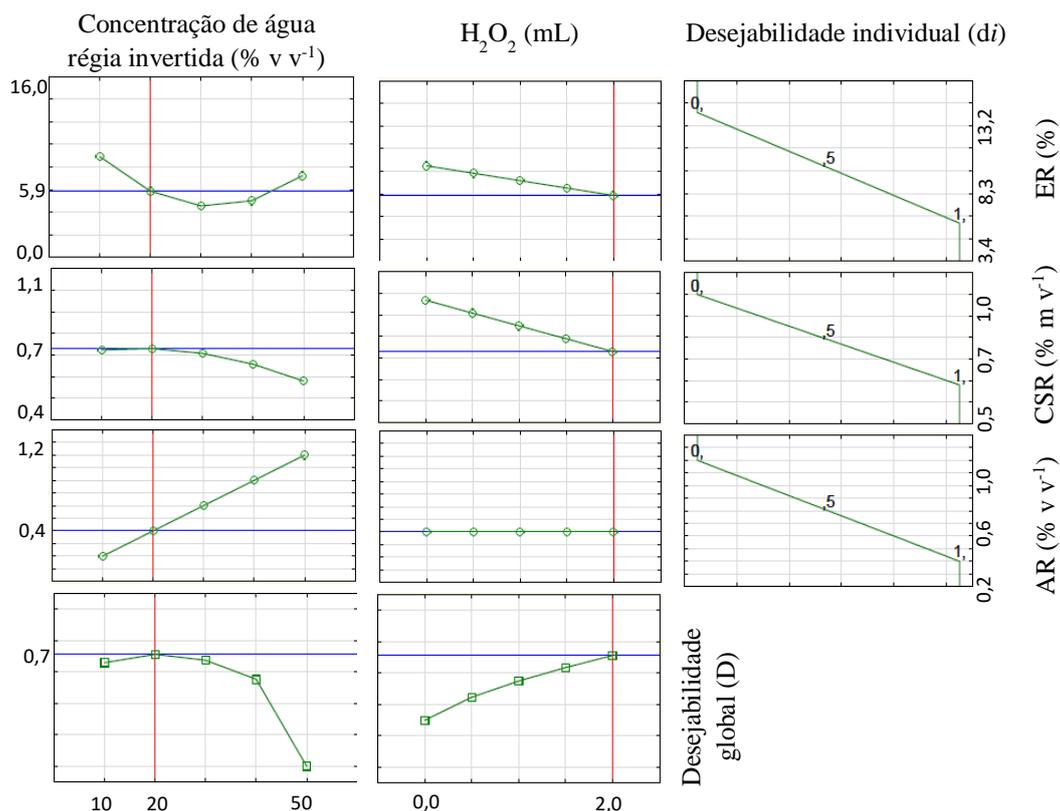
$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 d_m} \quad (11)$$

A desejabilidade global permite a otimização simultânea das respostas individuais para a obtenção de uma só resposta. As desejabilidades individuais e a global foram determinadas e os valores da última foram inseridos como uma resposta no planejamento experimental no software Statistica para avaliarmos como os fatores contribuem para a desejabilidade global, analisando o gráfico de contorno (Figura 11). Para o cálculo da desejabilidade global, todas as respostas foram ponderadas pelo mesmo peso.



**Figura 11.** Gráfico de contorno dos fatores e da resposta desejabilidade global.

Analisando o gráfico apresentado na Figura 11, concluiu-se que com maior volume de  $H_2O_2$  e concentrações de água régia invertida mais diluídas (até cerca de 20% v v<sup>-1</sup>), a resposta é maximizada. Nesse caso, o objetivo é maximizar a resposta para que a desejabilidade global se aproxime a 1, o que indica uma melhor otimização simultânea das 3 respostas. Os gráficos da função de desejabilidade, apresentados na Figura 12, mostram as respostas do algoritmo de otimização. As curvas demonstram como as respostas estudadas variam com cada fator ao mantermos fixos o nível do outro fator nos valores especificados.



**Figura 12.** Gráficos de desejabilidade para a otimização do processo de preparo de amostras com a utilização de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.

Os gráficos da Figura 12 fornecem as informações sobre as condições experimentais ótimas para se obter uma única resposta satisfatória, a desejabilidade global. Os três gráficos da última coluna mostram as  $d_i$  das três respostas, definidas de acordo com a equação 10. As linhas vermelhas verticais destacam as condições de máxima desejabilidade global, que chegou a 0,7 como destacado na Figura 12, a qual é obtida com uma concentração de 20%  $v v^{-1}$  de água régia invertida e volume de 2 mL de  $H_2O_2$ . Os pontos ótimos para o ER e CSR foram obtidos nos experimentos utilizando 2 mL. A concentração de água régia invertida afetou todas as respostas, para a variável ER, sendo que concentrações intermediárias forneceram melhor resposta. Já para a variável CSR, as concentrações de 10 a 20%  $v v^{-1}$  de  $3HNO_3:1HCl$  mantiveram a resposta constante e valores superiores a diminuíram, para AR o ponto de mínimo é dado pela menor concentração de água régia invertida. Todas as informações corroboram com o que foi obtido por meio dos gráficos de contorno. Nesse sentido, para que esses fatores fornecessem as três respostas satisfatórias simultaneamente, a condição ótima de

compromisso foi estabelecida em concentração de 20% v v<sup>-1</sup> de água régia invertida e volume de 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 5.3. Desempenho analítico

A avaliação de desempenho do método analítico foi realizada segundo o guia descrito no capítulo 233 da USP [12]. Primeiramente, o desempenho do equipamento ICP-MS foi avaliado para as determinações de Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V nas amostras, empregando os modos de operação padrão (sem gás de colisão) e com cela de colisão e discriminação por energia cinética (CC/KED). Nas análises realizadas utilizando CC/KED, a célula de colisão foi pressurizada com hélio na vazão de 4,5 mL min<sup>-1</sup>.

O uso da CC/KED viabiliza a redução das interferências poliatômicas, entretanto, seu uso implica em perda na detectabilidade. O modo de operação sem uso da cela de colisão, além de reduzir o custo da análise, por evitar a utilização do gás hélio, apresenta maior detectabilidade, uma vez que o sinal analítico é consideravelmente maior sem o uso da estratégia instrumental em questão para a correção de interferências espectrais [72].

Nesse sentido, experimentos de adição e recuperação foram realizados, visando a determinação do isótopo e modo de aquisição que melhor se adequasse à quantificação de cada analito. Padronização interna utilizando Y foi utilizada como estratégia de calibração. A utilização da padronização interna foi baseada no estudo anteriormente realizado por Pinheiro e colaboradores [73] acerca dos efeitos de matriz de 9 amostras de medicamentos analisadas segundo o preconizado pelos capítulos 232 e 233 da USP [11,12]. Os autores relataram que a padronização interna foi necessária para correção de efeitos matriciais associados à nebulização, transporte e/ou efeitos energéticos relacionados ao plasma de argônio, sendo Y o padrão interno que apresentou os melhores resultados nos ensaios de adição e recuperação [73]. De acordo com o guia de validação do capítulo 233 da USP, a linearidade é atestada quando os requisitos do ensaio de adição e recuperação forem atendidos [12].

Os parâmetros analíticos para a determinação dos 24 analitos estão apresentados na Tabela **Error! Reference source not found.**6. Os valores de LQ estão apresentados também em µg L<sup>-1</sup> para facilitar as considerações discutidas em relação aos experimentos

de adição e recuperação. A conversão de  $\mu\text{g L}^{-1}$  em  $\mu\text{g g}^{-1}$  foi realizada utilizando a equação 12:

$$\text{LQ } (\mu\text{g g}^{-1}) = \frac{\text{LQ (em } \mu\text{g L}^{-1}) \times \text{Volume final do digerido (mL)}}{\frac{\text{massa da amostra (g)}}{1000}} \quad (12)$$

**Tabela 6.** Figuras de mérito obtidas para a determinação de Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V em amostras de medicamentos por ICP-MS usando Y como padrão interno.

Isótopo	Modo de aquisição	Sensibilidade <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	LD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<sup>7</sup> Li	No gas	0,04900 ± 0,00003	1	0,008	0,05	0,027
<sup>51</sup> V	He	0,124 ± 0,002	0,9995	0,013	0,09	0,043
<sup>52</sup> Cr	He	0,154 ± 0,003	0,9990	0,100	0,23	0,117
<sup>58</sup> Ni	He	0,184 ± 0,002	0,9996	0,055	0,36	0,182
<sup>59</sup> Co	No gas	0,1210 ± 0,0005	0,9999	0,002	0,01	0,007
<sup>63</sup> Cu	He	0,239 ± 0,002	0,9998	0,035	0,30	0,152
<sup>75</sup> As	He	0,0220 ± 0,0002	0,9996	0,065	0,43	0,217
<sup>82</sup> Se	No gas	0,00100 ± 0,00004	0,9920	0,397	2,65	1,325
<sup>98</sup> Mo	No gas	0,0480 ± 0,0002	0,9999	0,039	0,19	0,094
<sup>102</sup> Ru	No gas	0,0570 ± 0,0001	1	0,003	0,02	0,009
<sup>103</sup> Rh	He	1,09 ± 0,01	0,9997	0,002	0,01	0,007
<sup>105</sup> Pd	No gas	0,0440 ± 0,0002	0,9999	0,008	0,05	0,026
<sup>107</sup> Ag	No gas	0,0220 ± 0,0003	0,9985	0,053	0,35	0,177
<sup>112</sup> Cd	No gas	0,0290 ± 0,0002	0,9998	0,002	0,01	0,007
<sup>120</sup> Sn	No gas	0,0590 ± 0,0005	0,9995	0,016	0,11	0,054
<sup>123</sup> Sb	No gas	0,0480 ± 0,0002	0,9999	0,011	0,07	0,036
<sup>138</sup> Ba	No gas	0,1620 ± 0,0003	1	0,046	0,31	0,155
<sup>190</sup> Os	No gas	0,0570 ± 0,0006	0,9993	0,047	0,31	0,157
<sup>193</sup> Ir	No gas	0,106 ± 0,008	0,9637	0,006	0,04	0,019
<sup>195</sup> Pt	No gas	0,0530 ± 0,0005	0,9995	0,006	0,04	0,020
<sup>197</sup> Au	No gas	0,0150 ± 0,0006	0,9893	0,036	0,24	0,120
<sup>202</sup> Hg	No gas	0,0190 ± 0,0005	0,9963	0,021	0,14	0,071
<sup>205</sup> Tl	No gas	0,1230 ± 0,0002	1	0,001	0,01	0,005
<sup>208</sup> Pb	No gas	0,0850 ± 0,0004	0,9999	0,008	0,05	0,027

<sup>a</sup>Coefficiente angular da curva analítica de calibração (contagens L s<sup>-1</sup>  $\mu\text{g}^{-1}$ )

Os LQs estimados na tabela 6 variaram de 0,005 (Tl) a 1,325 (Se)  $\mu\text{g g}^{-1}$ , enquanto os limites permitidos de cada uma das impurezas nos medicamentos estudados, de acordo com a Tabela 7, variaram de 16 a 35484  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Portanto, os resultados apresentados na

Tabela 6 estão adequados para a avaliação de impurezas elementares nos medicamentos de acordo com os limites estabelecidos pelo capítulo 232 da USP.

**Tabela 7.** Limites de concentração permitidos dos 24 elementos (em  $\mu\text{g g}^{-1}$  e em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) nos comprimidos contendo SIL e TAD segundo recomendações da USP [11].

Elementos	$J (\mu\text{g g}^{-1})$	$J (\mu\text{g L}^{-1})^*$	$0,5 J$	$1,5J$
Cd	16	32	16	48
Pb	16	32	16	48
Tl	26	52	26	77
As	48	97	48	145
Hg	97	193	97	290
Co	161	323	161	484
Au	323	645	323	968
Os	323	645	323	968
Ir	323	645	323	968
Pd	323	645	323	968
Pt	323	645	323	968
Rh	323	645	323	968
Ru	323	645	323	968
V	323	645	323	968
Ag	484	967	484	1452
Se	484	967	484	1452
Ni	645	1290	645	1936
Li	1774	3548	1774	5323
Sb	3871	7742	3871	11613
Ba	4516	9032	4516	13549
Cu	9677	19355	9677	29032
Mo	9677	19355	9677	29032
Sn	19355	38710	19355	58065
Cr	35484	70968	35484	106452

\*Considerando a diluição do preparo de amostras utilizado no método proposto.

### 5.3.1. Avaliação da exatidão

Diante da indisponibilidade de materiais certificados de referência para análises elementares em medicamentos, a exatidão do método foi avaliada a partir de experimentos de adição e recuperação em três níveis de adição (0,50; 1; 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para os 24 analitos, em duas amostras de comprimidos de marcas diferentes (AM2 e AM5). As adições foram realizadas em triplicatas antes da digestão ácida assistida por radiação micro-ondas nos três níveis de adição. Ítrio foi utilizado como padrão interno na concentração de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As recuperações foram calculadas de acordo com a equação 8.

O guia de validação descrito no capítulo 233 da USP recomenda que as adições sejam realizadas nos níveis de  $0,5J$  a  $1,5J$ , sendo consideradas aceitáveis se estiverem entre 70 e 150% [12]. Dessa forma, o limite de concentração ( $J$ ) permitido de cada analito, para os medicamentos em estudo nesse trabalho, foi calculado segundo a equação 1 e são apresentados na Tabela 7. A DDM recomendada de ambos os medicamentos (SIL e TAD) para o tratamento de disfunção erétil é de um comprimido ao dia. Na equação 1 a DDM utilizada é dada em gramas do comprimido, ou seja, considerando não apenas o IFA uma vez que as impurezas elementares podem advir tanto do IFA quanto dos excipientes. Os comprimidos de SIL 20 mg e TAD 50 mg apresentam massas semelhantes (em média 0,350 g por comprimido), portanto, para o cálculo do  $J$  foi realizada uma média dos pesos médios de ambos.

De acordo com as diretrizes da USP, os valores de  $J$  calculados para a construção da curva analítica de calibração e para os experimentos de adição e recuperação nos níveis de  $0,5$  a  $1,5J$  foram maiores do que a faixa linear compatível com a detectabilidade requerida para os objetivos desse trabalho. Nos experimentos iniciais, observou-se que os níveis de concentração dos analitos de interesse quantificados nas amostras foram muito inferiores aos valores limites devidamente calculados e apresentados na Tabela 7.

Portanto, visando a quantificação em nível traço (a fim de viabilizar a comparação das concentrações determinadas nas amostras autênticas e apreendidas), optou-se por utilizar uma faixa linear inferior (de  $0,05$  a  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  para todos os elementos) com o objetivo de quantificar com a máxima confiabilidade os níveis traço dos elementos alvo tornando-se possível discutir se as amostras apreendidas estão sujeitas a uma maior probabilidade de ocorrência de contaminação elementar. Desse modo, os experimentos de adição foram realizados nos níveis de adição ( $0,5$ ;  $1,0$  e  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) condizentes com a faixa linear utilizada para o desenvolvimento do método. Para Se foi necessário elevar os níveis de adição realizados ( $5$ ;  $10$  e  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ ), uma vez que as concentrações  $0,5$  e  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  estavam abaixo do LQ ( $2,65 \mu\text{g L}^{-1}$ ) obtido para esse elemento. Os resultados de recuperação estão apresentados na Tabela 8.

As recuperações obtidas para os 24 analitos de interesse estão dentro do critério de aceitação (recuperações entre 70 e 150%), com pequenas exceções para alguns níveis de adição investigados para os analitos Ag, Cu e Ni. As recuperações para Ni e Cu foram adequadas, mas o DPR de Ni no primeiro nível de adição está elevado para ambas as amostras analisadas. O mesmo problema ocorreu para Cu na AM2. Observa-se que o desvio elevado na adição de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para os analitos em questão pode estar associado

ao fato do LQ estimado para Ni ( $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e para Cu ( $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) estarem próximos ao valor adicionado, o que pode gerar uma variabilidade de resultados um pouco maior, visto que os LQs são calculados pelos sinais obtidos dos brancos analíticos (réplicas autênticas). Adicionalmente, Cu e Ni foram quantificados em modo usando cela de colisão, o que reduz a detectabilidade em comparação às determinações realizadas em modo padrão.

As recuperações de Ag na amostra AM2 se apresentaram acima dos limites preconizados, fato que pode ter decorrido de algum erro sistemático e pontual na análise dessa amostra, uma vez que os resultados para a amostra AM5 estão adequados. Outra possível explicação é a possibilidade de algum tipo de reação entre esse analito e algum outro analito ou componente da amostra.

**Tabela 8.** Resultados de recuperação para Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V por ICP-MS, com Y como padrão interno ( $\mu\text{L}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ , % recuperação e desvio padrão relativo)

Isótopo	Amostra	Valor adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valor determinado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)	DPR		
$^7\text{Li}$	AM2	0	$0,03 \pm 0,01$	-	-		
		0,5	$0,51 \pm 0,03$	96	6		
		1	$0,99 \pm 0,09$	96	9		
		5	$4,7 \pm 0,3$	94	6		
		0	$0,035 \pm 0,003$	-	-		
	AM5	0,5	$0,51 \pm 0,04$	95	8		
		1	$0,92 \pm 0,05$	89	5		
		5	$4,8 \pm 0,2$	96	4		
		$^{51}\text{V}$	AM2	0	$0,30 \pm 0,04$	-	-
				0,5	$0,74 \pm 0,04$	88	5
1	$1,16 \pm 0,09$			86	8		
5	$4,6 \pm 0,3$			86	7		
AM5	0		$0,10 \pm 0,01$	-	-		
	0,5		$0,6 \pm 0,1$	98	17		
	1		$1,15 \pm 0,05$	105	4		
$^{52}\text{Cr}$	AM2	5	$5,4 \pm 0,3$	105	6		
		0	$0,20 \pm 0,08$	-	-		
		0,5	$0,79 \pm 0,01$	117	1		
		1	$1,14 \pm 0,05$	93	4		
		5	$4,7 \pm 0,7$	89	15		
	AM5	0	$0,09 \pm 0,08$	-	-		
		0,5	$0,5 \pm 0,1$	81	20		
		1	$0,8 \pm 0,1$	70	13		
		5	$4,9 \pm 0,4$	96	8		

**Tabela 8.** Resultados de recuperação para Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V por ICP-MS, com Y como padrão interno ( $\mu\text{L}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ , % recuperação e desvio padrão relativo) (continuação).

Isótopo	Amostra	Valor adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valor determinado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação	DPR
$^{58}\text{Ni}$	AM2	0	$0,2 \pm 0,1$	-	-
		0,5	$0,8 \pm 0,2$	110	25
		1	$1,0 \pm 0,1$	77	10
		5	$4,6 \pm 0,6$	88	13
	AM5	0	$0,8 \pm 0,4$	-	-
		0,5	$1,2 \pm 0,4$	90	33
		1	$1,49 \pm 0,01$	73	1
		5	$4,6 \pm 0,3$	76	7
$^{59}\text{Co}$	AM2	0	$0,015 \pm 0,004$	-	-
		0,5	$0,55 \pm 0,01$	107	2
		1	$1,00 \pm 0,05$	99	5
		5	$4,7 \pm 0,4$	94	9
	AM5	0	$0,17 \pm 0,01$	-	-
		0,5	$0,66 \pm 0,01$	98	2
		1	$1,10 \pm 0,07$	93	6
		5	$5,0 \pm 0,3$	96	6
$^{63}\text{Cu}$	AM2	0	0	-	-
		0,5	$0,6 \pm 0,1$	116	17
		1	$0,94 \pm 0,07$	94	7
		5	$4,5 \pm 0,4$	90	9
	AM5	0	$0,003 \pm 0,005$	-	-
		0,5	$0,50 \pm 0,04$	99	8
		1	$0,77 \pm 0,03$	77	4
		5	$4,6 \pm 0,3$	92	7
$^{75}\text{As}$	AM2	0	$0,03 \pm 0,04$	-	-
		0,5	$0,66 \pm 0,05$	127	8
		1	$1,10 \pm 0,03$	107	3
		5	$5,6 \pm 0,4$	111	7
	AM5	0	$0,030 \pm 0,001$	-	-
		0,5	$0,5 \pm 0,1$	96	20
		1	$0,99 \pm 0,06$	105	6
		5	$4,9 \pm 0,2$	97	4
$^{82}\text{Se}$	AM2	0	0	-	-
		5	$4,28 \pm 0,04$	86	1
		10	$9 \pm 1$	88	11
	AM5	15	$13,8 \pm 0,7$	92	5
		0	0	-	-
		5	$4,4 \pm 0,3$	89	7
		10	$9,4 \pm 0,2$	94	2



0,5	0,91 ± 0,05	80	5
1	1,5 ± 0,2	97	13
5	7 ± 1	121	14

**Tabela 8.** Resultados de recuperação para Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V por ICP-MS, com Y como padrão interno ( $\mu\text{ L}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão, n = 3, % recuperação e desvio padrão relativo) (continuação).

Isótopo	Amostra	Valor adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valor determinado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação	DPR	
$^{112}\text{Cd}$	AM2	0	0	-	-	
		0,5	0,58 ± 0,07	116	12	
		1	0,92 ± 0,07	92	8	
	AM5	5	4,9 ± 0,3	99	6	
		0	0,004 ± 0,002	-	-	
		0,5	0,54 ± 0,01	107	2	
	$^{112}\text{Cd}$	AM2	1	0,96 ± 0,08	96	8
			5	5,0 ± 0,1	100	2
			0	0	-	-
AM5		0,5	0,58 ± 0,07	116	12	
		1	0,92 ± 0,07	92	8	
		5	4,9 ± 0,3	99	6	
AM2		0	0,004 ± 0,002	-	-	
		0,5	0,54 ± 0,01	107	2	
		1	0,96 ± 0,08	96	8	
$^{120}\text{Sn}$	AM5	5	5,0 ± 0,1	100	2	
		0	0	-	-	
		0,5	0,54 ± 0,03	109	6	
	AM2	1	0,97 ± 0,05	97	5	
		5	4,9 ± 0,4	98	8	
		0	0,03 ± 0,04	-	-	
	AM5	0,5	0,45 ± 0,04	84	9	
		1	0,87 ± 0,04	85	5	
		5	5,0 ± 0,3	100	6	
$^{123}\text{Sb}$	AM2	0	0	-	-	
		0,5	0,50 ± 0,02	99	4	
		1	0,95 ± 0,08	95	8	
	AM5	5	4,8 ± 0,3	96	6	
		0	0,009 ± 0,001	-	-	
		0,5	0,48 ± 0,01	93	2	
	AM2	1	0,95 ± 0,03	94	3	
		5	4,83 ± 0,09	96	2	
		0	0,19 ± 0,04	-	-	
$^{138}\text{Ba}$	AM2	0,5	0,76 ± 0,03	114	4	
		1	1,21 ± 0,03	103	2	

		5	5,2 ± 0,4	99	8
		0	0,15 ± 0,04	-	-
	AM5	0,5	0,77 ± 0,08	125	10
		1	1,22 ± 0,05	107	4
		5	5,2 ± 0,2	101	4

**Tabela 8.** Resultados de recuperação para Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V por ICP-MS, com Y como padrão interno ( $\mu\text{L}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ , % recuperação e desvio padrão relativo) (continuação).

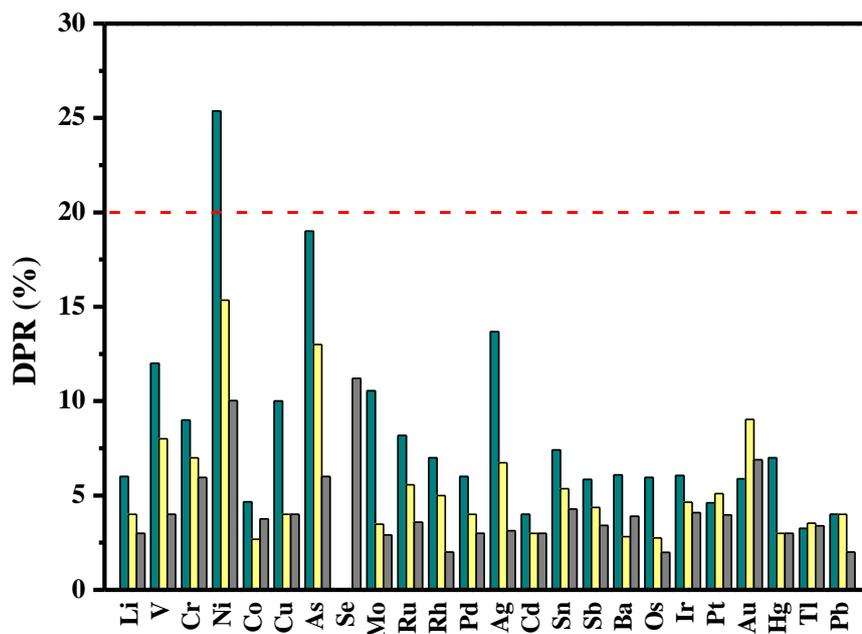
Isótopo	Amostra	Valor adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valor determinado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação	DPR
$^{190}\text{Os}$	AM2	0	0,010 ± 0,004	-	-
		0,5	0,47 ± 0,02	92	4
		1	0,93 ± 0,03	92	3
		5	4,70 ± 0,02	94	0,4
	AM5	0	0,012 ± 0,002	-	-
		0,5	0,52 ± 0,05	101	10
		1	1,03 ± 0,02	102	2
		5	5,0 ± 0,1	99	2
$^{193}\text{Ir}$	AM2	0	0,014 ± 0,003	-	-
		0,5	0,58 ± 0,05	112	9
		1	1,05 ± 0,06	103	6
		5	4,9 ± 0,3	98	6
	AM5	0	0,012 ± 0,002	-	-
		0,5	0,54 ± 0,02	106	4
		1	0,99 ± 0,05	99	5
		5	5,0 ± 0,2	100	4
$^{195}\text{Pt}$	AM2	0	0,00 ± 0,01	-	-
		0,5	0,56 ± 0,07	111	13
		1	1,02 ± 0,06	101	6
		5	4,9 ± 0,2	97	4
	AM5	0	0	-	-
		0,5	0,50 ± 0,04	100	8
		1	0,94 ± 0,02	94	2
		5	4,8 ± 0,2	96	4
$^{197}\text{Au}$	AM2	0	0	-	-
		0,5	0,41 ± 0,02	82	5
		1	0,71 ± 0,03	71	4
		5	4,3 ± 0,2	87	5
	AM5	0	0	-	-
		0,5	0,43 ± 0,03	85	7
		1	0,88 ± 0,07	88	8
		5	4,8 ± 0,1	96	2
$^{202}\text{Hg}$	AM2	0	0,02 ± 0,03	-	-
		0,5	0,49 ± 0,03	94	6
		1	0,96 ± 0,04	94	4

		5	$4,9 \pm 0,1$	97	2
		0	$0,003 \pm 0,005$	-	-
	AM5	0,5	$0,5 \pm 0,1$	108	20
		1	$1,03 \pm 0,07$	102	7
		5	$5,2 \pm 0,1$	104	2

**Tabela 8.** Resultados de recuperação para Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V por ICP-MS, com Y como padrão interno ( $\mu\text{ L}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ , % recuperação e desvio padrão relativo) (continuação).

Isótopo	Amostra	Valor adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valor determinado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação	DPR		
$^{205}\text{Tl}$	AM2	0	$0,02 \pm 0,01$	-	-		
		0,5	$0,53 \pm 0,04$	102	8		
		1	$0,97 \pm 0,04$	95	4		
		5	$4,7 \pm 0,3$	94	6		
		0	$0,019 \pm 0,007$	-	-		
	AM5	0,5	$0,51 \pm 0,03$	101	6		
		1	$0,93 \pm 0,05$	92	5		
		5	$4,8 \pm 0,2$	95	4		
		$^{208}\text{Pb}$	AM2	0	0	-	-
				0,5	$0,50 \pm 0,02$	100	4
1	$1,04 \pm 0,05$			104	5		
5	$4,9 \pm 0,4$			98	8		
AM5	0		$0,1 \pm 0,2$	-	-		
	0,5		$0,49 \pm 0,02$	80	4		
	1		$0,97 \pm 0,05$	88	5		
		5	$4,8 \pm 0,2$	95	4		

O estudo da precisão consistiu na avaliação da repetibilidade, a qual também foi avaliada a partir do DPR de seis brancos fortificados nas concentrações 0,50; 1 e  $5\ \mu\text{g L}^{-1}$  no momento do preparo de amostras. A Figura 13 demonstra que os resultados do estudo de repetibilidade foram satisfatórios.



**Figura 13.** Desvios padrões relativos para os elementos em três níveis de adição no estudo da repetibilidade. A linha vermelha tracejada representa o limite preconizado pela USP. (■) 0,50; (■) 1,0; e (■) 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

De acordo com a figura 13, todos os elementos em todos os níveis avaliados apresentaram-se dentro do limite de 20% de DPR, que é o limite sugerido pelo capítulo 233 da USP. Uma exceção foi o valor obtido para Ni no primeiro nível de adição ( $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), que apresentou DPR de 25% [12]. Para Se, não foi possível quantificar o primeiro e segundo níveis de adição. Os problemas relacionados a esses elementos se correlacionam ao LQ. Ni apresentou LQ igual a  $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$  e Se  $2,65 \mu\text{g L}^{-1}$ ; apresentando, portanto, LQs muito próximos a  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , o que explica o maior DPR nesse nível de adição, e o último elemento em questão apresenta LQ superior aos dois primeiros níveis de adição. Nos experimentos de adição e recuperação, as fortificações realizadas para Se foram acima do LQ e os resultados, tanto da recuperação quanto do DPR, se mostraram satisfatórios, como demonstrado na Tabela 8. É importante destacar que o limite de 20% de DPR, preconizado pela USP, se correlaciona aos valores estabelecidos com  $0,5J$ ;  $1J$  e  $1,5J$ , que foram calculados e constam na tabela 7. Entretanto, as concentrações avaliadas foram muito inferiores, a fim de atingir os objetivos desse trabalho. Ainda assim, os resultados do estudo de repetibilidade foram adequados.

#### 5.4. Determinação elementar nas amostras de comprimidos contendo SIL e TAD

A Tabela 9 apresenta os resultados da determinação de impurezas elementares nas amostras de comprimidos contendo SIL e TAD apreendidas pela PF e pela PCMG (F1 a F10) e nas amostras autênticas dos mesmos medicamentos (AM1 a AM6).

Foram quantificados 12 dos 24 elementos em estudo nesse trabalho: Li, V, Cr, Ni, Co, Cu, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba e Pb, sendo que os demais elementos apresentaram teores abaixo do LQ específico para cada analito. De acordo com a classificação das impurezas elementares do guia Q3D do ICH, dois dos elementos determinados nas amostras (Cd e Pb) são pertencentes à classe 1, que corresponde aos elementos de maior toxicidade para os humanos. Cobalto, V e Ni são pertencentes à classe 2A, que apresentam elevada probabilidade de ocorrência em produtos farmacêuticos e requerem avaliação de risco acerca de todas as possíveis fontes de contaminação e rotas de administração. Os demais elementos determinados pertencem à classe 3, os quais apresentam toxicidade oral relativamente baixa [10].

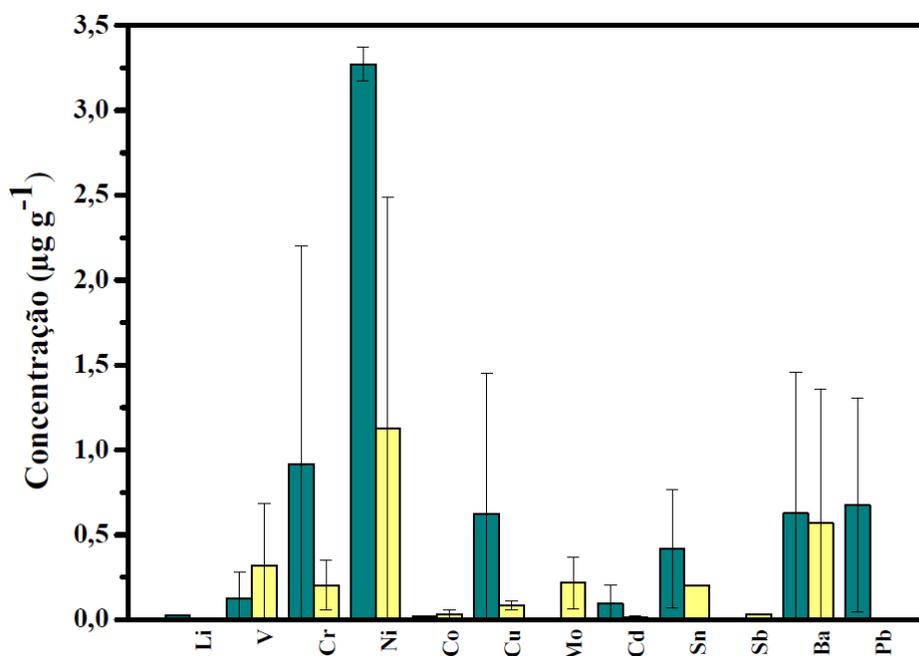
As fontes de contaminação por impurezas elementares em medicamentos são diversas, as quais podem advir dos excipientes e/ou do IFA empregados em sua fabricação, dos tanques de reação, dos equipamentos utilizados no processo de fabricação ou das embalagens primárias que acondicionam o produto acabado. Nesse último caso, pode acontecer a lixiviação desses contaminantes para o medicamento. Cromo, Cu, Co, Mo, Ni e V são elementos que comumente compõem tanques de reação e equipamentos e, portanto, podem ser transferidos dessas superfícies para o produto.

A menor concentração determinada foi para Cd na AM1 ( $0,006 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e a maior concentração para Ni na amostra F8 ( $6 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Comparando os resultados de concentração obtidos para os elementos alvos (Tabela 9) com os limites permitidos desses elementos para os medicamentos analisados destacados na Tabela 7, todos estão abaixo dos limites sugeridos no capítulo 232 da USP [11].





A Figura 14 representa os resultados médios de concentração dos elementos determinados nas amostras apreendidas e autênticas. Pode-se observar uma tendência das amostras apreendidas em apresentar concentrações, no geral, mais elevadas de impurezas elementares. As amostras apreendidas apresentaram concentrações de Cu, Cr e Ni cerca de 8, 4,5 e 3 vezes, respectivamente, superiores em relação às autênticas. Além disso, apenas as amostras apreendidas contêm Pb, elemento que compõe o grupo de classe 1, o qual apresenta maior toxicidade [10]. Apesar das concentrações determinadas estarem dentro do limite estabelecido pela USP, os teores de Pb determinados nessas amostras se mostram consideravelmente superiores aos teores de Pb anteriormente reportados na literatura para amostras de medicamentos [7,73,93,94].



**Figura 14.** Concentração média de Li, V, Cr, Ni, Co, Cu, Mo, Cd, Sn, Ba e Pb determinadas nas amostras: (■) apreendidas e (■) autênticas.

Apesar dos teores de impurezas elementares determinados estarem dentro dos limites especificados pelo capítulo 232 da USP, é importante destacar que essas impurezas podem advir de diversas fontes simultaneamente (não apenas de medicamentos), não são biodegradáveis e apresentam a característica de bioacumulação. Dessa forma, o indivíduo pode estar exposto ao mesmo elemento por fontes distintas, seja por utilizar outros medicamentos concomitantemente (procedimento particularmente frequente em pacientes idosos), seja por meio da alimentação, água ou mesmo exposição ocupacional. Além disso, para os cálculos dos limites para os 24 elementos foi

considerada a DDM de um comprimido, como estabelecido nas bulas de ambos os medicamentos para o tratamento de DE. Entretanto, nem sempre os pacientes seguem a DDM, podendo excedê-la, e conseqüentemente, tornar o aporte diário dessas impurezas superior.

Como esses elementos não possuem efeito terapêutico e não fazem parte da composição da formulação dos medicamentos, o que os caracteriza como impurezas, os seus teores idealmente devem se restringir ao mínimo possível, uma vez que a bioacumulação pode representar riscos associados a toxicidade crônica, a exemplo da toxicidade crônica relacionada a Cd, a qual se correlaciona a danos renais, doenças pulmonares obstrutivas, cardiovasculares e até mesmo câncer.

Portanto, fica evidente a importância do rigor ao atendimento às BPF de medicamentos segundo a legislação vigente, RDC nº 658/2022, bem como a realização de um controle de qualidade rigoroso para impurezas elementares a fim de assegurar que os níveis não ultrapassem os limites seguros à saúde. Observa-se que as amostras autênticas também apresentam, mesmo que no geral em menores concentrações, determinadas impurezas elementares e o monitoramento contínuo, lote a lote, se faz importante para continuar assegurando que esses elementos não representem riscos aos consumidores do produto.

## 6. CONCLUSÕES

A substituição do capítulo 231 da USP para a determinação de impurezas elementares (que permaneceu em vigor por mais de 100 anos e mostrava-se defasado em relação à evolução científica e tecnológica), pelos capítulos 232 e 233, representa um importante avanço para o controle de qualidade de excipientes, IFAs e medicamentos. Uma vez que as impurezas elementares passaram a ser classificadas de acordo com a toxicidade e a probabilidade de ocorrência em medicamentos e o método semiquantitativo foi substituído por técnicas instrumentais espectrométricas modernas (ICP-OES e ICP-MS) que viabilizam a identificação e quantificação multielementar em níveis traço. Dessa forma, é possível quantificar as impurezas elementares com confiabilidade e rastrear possíveis fontes de contaminação por um elemento específico, o que era inviável com o método preconizado pelo capítulo 231, o que aumenta a segurança relacionada ao consumo de medicamentos.

Dessa forma, a realização desse trabalho possibilitou o desenvolvimento, otimização das condições experimentais e validação de um método baseado na técnica de ICP-MS para determinação de 24 elementos (Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Tl e V) em amostras apreendidas e autênticas de comprimidos contendo SIL e TAD, de acordo com os requisitos dos capítulos 232 e 233 da USP.

O procedimento de preparo de amostra empregando digestão assistida por radiação micro-ondas e mistura ácida diluída pode ser considerado ambientalmente mais correto quando comparado com procedimentos utilizando ácidos concentrados. A utilização de água régia invertida 20% v v<sup>-1</sup> minimiza a geração de resíduos nocivos ao analista e ao meio ambiente, o que vai ao encontro aos princípios da química verde. Além disso, com apenas um comprimido apreendido (peso médio de 0,35 g) se faz possível a análise realizando o preparo da amostra em triplicata. Por outro lado, a amostragem de tamanho reduzido trás limitações em termos de representatividade.

A proposta desse trabalho foi mais ampla do que o preconizado pela USP e pelo guia Q3D do ICH, uma vez que nesses guias recomenda-se a elaboração de uma avaliação de risco relacionada às impurezas elementares e todos os elementos devem ser incluídos nessa avaliação de risco somente caso sejam intencionalmente adicionados, a exemplo dos elementos do grupo da platina que podem ser utilizados como catalisadores na síntese de determinados IFAs. Portanto, não é necessário que todos os 24 elementos sejam

determinados simultaneamente em todos os medicamentos produzidos. Como o trabalho visou rastrear a presença e quantificar mesmo em níveis extremamente baixos todos os elementos que constam nesses guias, o método foi desenvolvido considerando uma condição de compromisso uma vez que foram determinados 24 analitos simultaneamente.

Todas as amostras analisadas apresentaram teores de impurezas elementares abaixo do que é recomendado pelo capítulo 232 da USP. É importante destacar que as amostras apreendidas podem ser falsificadas ou contrabandeadas, caso sejam contrabandeadas elas podem ter sido submetidas a processos produtivos e controle de qualidade adequados em seus países de origem, mas por adentrarem ao Brasil por meios ilegais caracterizam-se como impróprias para o consumo. Além disso, a procedência dos excipientes e IFAs utilizados na fabricação dos medicamentos apreendidos pode ser adequada, caso sejam obtidos de fornecedores qualificados. Neste caso, por exemplo, apenas o processo produtivo e/ou as questões de regulamentação e registro seriam inapropriadas, caracterizando estes medicamentos como ilegais. Dessa forma, não necessariamente apresentariam parâmetros de qualidade tão inadequados. Entretanto, apesar de todas as amostras estarem de acordo com o preconizado, foi possível identificar que os teores de impurezas elementares nas amostras apreendidas em relação às autênticas demonstraram-se, no geral, superiores.

**REFERÊNCIAS**

- [1] LEONARDI, E.; MATOS, J. **Indústria farmacêutica tem crescimento acelerado**. Disponível em: <<https://ictq.com.br/industria-farmaceutica/1380-industria-farmaceutica-tem-crescimento-acelerado>> Acesso em: 25 jul. 2023
- [2] BRUNO, A. **Um setor maduro e em crescimento**. Disponível em: <<https://www.abrafarma.com.br/noticias/um-setor-maduro-e-em-crescimento>> Acesso em: 25 jul. 2023.
- [3] Pharmaceutical Security Institute (PSI). **Geographic Distribution**, 2021. Disponível em: < <https://www.psi-inc.org/geographic-distribution> > Acesso em: 01 mai.2023
- [4] Pharmaceutical Security Institute (PSI). **Therapeutic Categories**, 2021. Disponível em: < <https://www.psi-inc.org/therapeutic-categories>> Acesso em: 01.05.2023.
- [5] AMES, J.; SOUZA, D.Z. Falsificação de medicamentos no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, p.154–159, 2012.
- [6] HURTADO, R.L.; LASMAR, M.C. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, p. 891–895, 2014.
- [7] DA SILVA, C.S *et al.* Determination of As, Cd, Hg and Pb in continuous use drugs and excipients by plasma-based techniques in compliance with the United States Pharmacopeia requirements. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 138, p. 14–17, 2017.
- [8] RAO, R. N.; TALLURI, M.V.N.K An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 43, p. 1–13, 2007.
- [9] CASARETT. L. J.; DOULL, J. **Toxicology: The basic science of poisons**. 7 ed. Nova York: The MacGraw-Hill Companies Inc., 2008.
- [10] ICH, Guideline for elemental impurities Q3D, 2022. Disponível em: < [https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R2\\_Guideline\\_Step4\\_2022\\_0308.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R2_Guideline_Step4_2022_0308.pdf) > Acesso em: 15 fev. 2023
- [11] THE UNITED States Pharmacopeia. **Chapter 232 Elemental impurities – limits**. USP 40. 40 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2017.

- [12] THE UNITED States Pharmacopeia. **Chapter 233 Elemental impurities – procedures**. USP 40. 40 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2017.
- [13] GODOY, N. V. *et al.* Evaluating the total gold concentration in metallic nanoparticles with a high content of organic matter through microwave-assisted decomposition platform and plasma-based spectrometric techniques (ICP-MS and ICP OES). **Talanta**. v. 224, p. 1-7, 2021.
- [14] BRASIL, Lei nº 9677 de 02 de julho de 1998, **Altera dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos crimes contra a saúde pública, e dá outras providências**. . Brasília: Diário Oficial da União, 1998.
- [15] WHO. **Counterfeit drugs: Guidelines for the development of measures to combat counterfeit drugs**. World Health Organization: Genebra, 1999. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/65892>> Acesso em: 26 fev. 2023
- [16] DÉGARDIN, K.; ROGGO, Y.; MARGOT, P. Understanding and fighting the medicine counterfeit market. **Journal of Pharmarmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 87, p. 167–175, 2014.
- [17] BRASIL, Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976, **Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências**. Brasília: Diário Oficial da União, 1976.
- [18] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamento Falsificado - Especialistas discutem combate à pirataria**. Boletim informativo da ANVISA. v. 63, p. 6–8, 2006.
- [19] OFORI-PARKU, S.S. Fighting the global counterfeit medicines challenge: A consumer-facing communication strategy in the US is an imperative. **Journal of Global Health**. v. 12, p. 3-18, 2022.
- [20] SHIPALANA, P.; MATEMA, T.; VAN DER WESTHUIZEN, H. Counterfeit Pharmaceuticals: A Major Threat to Public Health. **Policy Insights**. v. 87, p. 1-16, (2020).
- [21] WHO. **Global Surveillance and Monitoring System for substandard and falsified medical products**. World Health Organization: Genebra, 2017.
- [22] WHO. **1 in 10 medical products in developing countries is substandard or falsified**. World Health Organization: Genebra, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/28-11-2017-1-in-10-medical-products-in-developing-countries-is-substandard-or-falsified>> Acesso em: 19 mai. 2023

- [23] WHO, **Substandard and falsified medical products**. World Health Organization: Genebra, 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/substandard-and-falsified-medical-products>> Acesso em: 19 mai. 2023.
- [24] WHO, **Guidance on testing of “suspect” falsified medicines**. World Health Organization: Genebra, 2018. Disponível em <<https://www.who.int/publications/m/item/trs1010-annex5>> Acesso em: 19 mai. 2023
- [25] WESTENBERGER, B.J. *et al.* Quality assessment of internet pharmaceutical products using traditional and non-traditional analytical techniques. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 306, p. 56–70, 2005.
- [26] NIH Consensus Conference. Impotence. **NIH Consensus Development Panel on Impotence**. JAMA. p. 83-90, 1993.
- [27] WESPES, E. *et al.* Diretrizes sobre disfunção sexual masculina: Disfunção erétil e ejaculação precoce (rápida). **European Urology**. v. 49, p. 1-5, 2009.
- [28] Morales, J.; Rolo, F. Epidemiologia da Disfunção Erétil Revisão da Literatura. **Acta Urológica Portuguesa**. v. 18, n. 3, p. 31-34, 2001.
- [29] FELDMAN, H.A. *et al.* Impotence and Its Medical and Psychosocial Correlates: Results of the Massachusetts Male Aging Study. **Journal of Urology**. v. 151, p. 54–61, 1994.
- [30] AYTAÇ, I.A.; MCKINLAY, J.B.; KRANE, R.J. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **British Journal of Urology International**. v. 84, p. 50–56, 1999.
- [31] AFIF-ABDO, J. Diagnóstico e tratamento da disfunção erétil. **Diagnóstico e Tratamento**. v.12, n. 4, p. 192-195, 2007.
- [32] DHIR, R.R. *et al.* Combination therapy for erectile dysfunction: an update review. **Asian Journal of Andrology**. v. 13 p. 382–390, 2011.
- [33] PUBCHEM Source Information. The PubChem Project. USA: National Center for Biotechnology Information. **Sildenafil**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sildenafil>> Acesso em: 27 mai. 2023
- [34] PUBCHEM Source Information. The PubChem Project. USA: National Center for Biotechnology Information. **Tadalafil**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tadalafil>> Acesso em: 27 mai. 2023
- [35] THE UNITED States Pharmacopeia. USP 42. 42 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019.
- [36] RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

- [37] GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- [38] GRESSER, U.; GLEITER, C.H. Erectile Dysfunction: Comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, Vardenafil and tadalafil review of the literature. **European Journal of Medical Research**. v. 7, n. 10, p. 435–446, 2002.
- [39] HAMET, P.; COQUI, J.F. Cyclic GMP binding and cyclic GMP phosphodiesterase in rat platelets. **Journal of cyclic nucleotide research**. v. 4, p. 281–190, 1978.
- [40] DONATO, M.A.M. *et al.* Além da disfunção erétil. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO**. v. 2, n. 2, p. 11–22, 2013.
- [41] GHOFRANI, H.A.; OSTERLOH, I.H.; GRIMMINGER, F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. **Nature Reviews Drug discovery**. V. 5, n.8 p. 689–702, 2006.
- [42] BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; PAGE, C.P. Phosphodiesterase inhibitors. **British journal of pharmacology**. v. 147, p. S252–S257, 2006.
- [43] WRIGHT, P.J. Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. **International journal of clinical practice**. v. 60, n. 8 p. 967–975, 2006.
- [44] BIFF, A. S. *et al.* Fisiopatologia, avaliação e tratamento da disfunção erétil: artigo de revisão. **Revista de Medicina**. v. 95, n. 1 p. 18–29, 2016.
- [45] GALIÈ, N. *et al.* Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension, **New England Journal of Medicine**. v. 353, n. 20, p. 2148–2157, 2005.
- [46] PIMENTA, R.C. A. *et al.* Rastreamento da hiperplasia prostática benigna. **Ciência ET Praxis**. v. 6, n. 12, p. 35–38, 2013.
- [47] NUNES, T. F.; ANDRADE, G. P. Embolização no tratamento da hiperplasia prostática benigna: onde estamos?. **Radiologia Brasileira**. v. 54, p. 5-6, 2021.
- [48] Averbeck, M.A. *et al.* Diagnóstico e tratamento da hiperplasia benigna da próstata. **Revista da AMRIGS**. v. 54, n. 4, p. 471–477, 2010.
- [49] CURRAN, M.P.; KEATING, G.M. Tadalafil, Drugs. **Drugs**. v. 63, p. 2203–2212, 2003.
- [50] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª ed., 2019.
- [51] PUGENS, A.M.; DONADUZZI, C.M.; MELO, E.B., Controle de qualidade total e equivalência farmacêutica de três apresentações de captopril. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 5, p. 32–45, 2008.

- [52] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Registro de novos medicamentos: saiba o que é preciso**, 2018. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/resultadodeZusca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=5062720&\\_101\\_type=content&\\_101\\_groupId=219201&\\_101\\_urlTitle=registro-de-novos-medicamentos-saiba-o-que-e-%2C%20a%20empresa%20interessada,do%20medicamento%20objeto%20do%20registro.](http://antigo.anvisa.gov.br/resultadodeZusca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5062720&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=registro-de-novos-medicamentos-saiba-o-que-e-%2C%20a%20empresa%20interessada,do%20medicamento%20objeto%20do%20registro.)> Acesso em: 11 dez. 2022
- [53] BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 658 de 30 de março de 2022. **Dispõe sobre as diretrizes gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**, Brasília: Diário Oficial da União, 2022.
- [54] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Conceitos e Definições**, 2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/medicamentos/conceitos-e-definicoes>> Acesso em: 7 jan. 2023
- [55] CONCEIÇÃO, J; MARQUES, H.M.C.; LOBO, J.M.S. A Farmacopeia Europeia: um livro oficial com cinquenta anos. **Acta Farmacêutica Portuguesa**. v. 8, n. 1, p. 17-38, 2019.
- [56] PIFFERI, G.; SANTORO, P.; PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. **II Farmaco**. v. 54, n. 1-2, p. 1-14, 1999.
- [57] BRASIL, Lei nº 6437 de 20 de agosto de 1977 , **Configura Infrações à Legislação Sanitária Federal, Estabelece as Sanções Respectivas, e Dá Outras Providências**. Brasília: Diário Oficial da União, 1977.
- [58] SANTOS, A.L. *et al.* **História da Ciência no Ensino: revisitando abordagens, inovando saberes**. 1 ed. Imprensa da Universidade de Coimbra, 2021.
- [59] ICH, Impurities in new drug substances Q3A, 2006. Disponível em: <<https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf>> Acesso em: 15. fev. 2023.
- [60] PINHEIRO, F.C.; NÓBREGA, J.A. An overview of sample preparation procedures for determination of elemental impurities in medicines. **Microchemical Journal**. v. 175, p.107189, 2017,
- [61] POHL, P. *et al.* Impact and practicability of recently introduced requirements on elemental impurities. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 101, p. 43–55, 2018.

- [62] CASARETT, L.J.; DOULL, J. **Fundamentos em toxicologia**. 2 ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2012.
- [63] 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.
- [64] BOETZEL, R. *et al.* An Elemental Impurities Excipient Database: A Viable Tool for ICH Q3D Drug Product Risk Assessment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.107, n. 9, p. 2335–2340, 2018.
- [65] TORRES, S. *et al.* ICH Q3D Drug Product Elemental Risk Assessment: The Use of An Elemental Impurities Excipients Database. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 111, p. 1421–1428, 2022.
- [66] LI, G. *et al.* Elemental Impurities in Pharmaceutical Excipients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 104, p. 4197–4206, 2015.
- [67] DA SILVA, J.J.B. Antimoniato de meglumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n. 1 p. 103–105, 2001.
- [68] BARIN, J.S. *et al.* Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**. v. 408, p. 4547–4566, 2016.
- [69] THE UNITED States Pharmacopeia. **Chapter 231 Heavy metals**. USP 38. 38 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015.
- [70] PERKINELMER, I.; SHELTON, C. **Implementation of USP New Chapters 232 and 233 on Elemental Impurities in Pharmaceutical Products**, 2014. Disponível em: < Implementation of USP New Chapters 232 and 233 on Elemental Impurities in Pharmaceutical Products> Acesso em: 22 nov. 2022
- [71] CHAHROUR O. *et al.* Development and validation of an ICP-MS method for the determination of elemental impurities in TP-6076 active pharmaceutical ingredient (API) according to USP 232/233. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 145, p.84–90, 2017.
- [72] THOMAS, R. J. **Practical Guide to ICP-MS**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. p. 73-90.
- [73] PINHEIRO, F.C.; NÓBREGA, J.A. Microwave-assisted sample preparation of medicines for determination of elemental impurities in compliance with United States Pharmacopeia: How simple can it be? **Analytica chimica acta**. v. 1065, p. 1–11, 2019.

- [74] LANÇAS, F.M. **Espectrometria de massas: fundamentos, instrumentação e aplicações**. 1 ed. Campinas: Átomo, 2019.
- [75] SKOOG, D.A. *et al.* **Fundamentos de química analítica**. 9 ed. São Paulo: Cengage, 2019.
- [76] GARCÍA-POYO, M.C. *et al.* Non-spectral interferences due to the presence of sulfuric acid in inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 105 p. 71–76, 2015.
- [77] GERVASIO, A.P.G. *et al.* Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. **Química Nova**. v. 26 p. 65–74, 2003.
- [78] LUM, T.S.; LEUNG, K.S.Y. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 31, n. 5, p. 1078–1088, 2016.
- [79] BIZZI, C.A. *et al.* Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 32, p.1448–1466, 2017.
- [80] KRUG, F.J.; ROCHA, F.R.P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2 ed. São Paulo. Sociedade Brasileira de Química, 2019.
- [81] GARITTA, J. *et al.* Microwave-Assisted Acid Digestion: Evaluation of Reaction Vessel Design and Performance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 32, p. 702–711, 2021.
- [82] GONZALEZ, M.H. *et al.* Determination of elemental impurities in acyclovir ointment and raw materials using microwave acid digestion (MW-AD) and ICP-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 28, p. 98–105, 2017.
- [83] REIS, N.F.A. **Métodos analíticos modernos para determinação de sildenafil e tadalafila em amostras de medicamentos e plasma humano**, 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.
- [84] LOUIE, H. *et al.* A study of techniques for the preservation of mercury and other trace elements in water for analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), **Analytical Methods**. v. 4, n. 2, p. 522-529, 2012.
- [85] AMARAL, C.D.B. *et al.* A novel strategy to determine As, Cr, Hg and V in drinking water by ICP-MS/MS. **Analytical Methods**. v. 7, p. 1215–1220, 2015.

- [86] AMARAL, C.D.B. *et al.* Determination of carbon in digested samples and amino acids by inductively coupled plasma tandem mass spectrometry, *Microchemical Journal*. v. 122, p. 29–32, 2015.
- [87] DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**. v. 12, p. 214–219, 1980.
- [88] INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial DOQ-CGCRE-008, revisão 09. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2020.
- [89] 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.
- [90] STOVING, C. *et al.* 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.
- [91] 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.
- [92] CANDIOTI, V.L. *et al.* Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**. v. 24, p. 123–138, 2014.
- [93] PINHEIRO, F.C.; BARROS, A.I.; NÓBREGA, J.A. Elemental impurities analysis in name-brand and generic omeprazole drug samples. **Heliyon**. v. 6, n. 2, 2020.
- [94] COELHO, J.S. **Impurezas inorgânicas em medicamentos: do preparo de amostra a determinação elementar por ICP-MS**, 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2016. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150564> > Acesso em: 22 nov. 2022