

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Igor Forattini Prates Carvalhais Noronha

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE ACORDO
COM OS CAPÍTULOS USP <232> E USP <233>**

Belo Horizonte

2023

UFMG/ICEX/DQ. 1.582
T.723

Igor Forattini Prates Carvalhais Noronha

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE ACORDO
COM OS CAPÍTULOS USP <232> E USP <233>**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientadora: Prof^a Dra. Clésia Cristina Nascentes

Coorientadora: Prof^a. Dra. Cláudia Carvalinho Windmöller

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

N852d
2023
T

Noronha, Igor Forattini Prates Carvalhais.
Desenvolvimento de método para determinação de impurezas elementares em medicamentos de acordo com os capítulos USP <232> e USP <233> [manuscrito] / Igor Forattini Prates Carvalhais Noronha. 2023.
140 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.
Coorientadora: Cláudia Carvalhinho Windmöller.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Bibliografia: f. 112-122.
Inclui apêndice e anexos.

1. Química analítica – Teses. 2. Preparação de amostra (Química) – Teses. 3. Espectrometria de massa – Teses. 4. Farmacopeia – Teses. 5. Medicamentos – Análise – Teses. 6. Medicamentos – Controle de qualidade – Teses. 7. Antidepressivos – Teses. 8. Fluorescência de raio X – Teses. I. Nascentes, Clésia Cristina, Orientadora. II. Windmöller, Cláudia Carvalhinho, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG
Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - IQEz**"Desenvolvimento de Método para Determinação de Impurezas Elementares em Medicamentos de Acordo com os Capítulos Usp <232> e Usp <233>"**

Igor Forattini Prates Carvalhais Noronha

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profs. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora
UFMGProfs. Cláudia Carvalhinho Windmöller - Coorientadora
UFMGProfs. Maria das Graças Andrade Korn
UFBAProf. Rafael Arromba de Sousa
UFJFProf. Christian Fernandes
UFMGProfs. Letícia Malta Costa
UFMG

Belo Horizonte, 11 de dezembro de 2023.

Documento assinado eletronicamente por **Letícia Malta Costa**, Professora do Magistério Superior, em 15/12/2023, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Clésia Cristina Nascentes**, Professora do Magistério Superior, em 18/12/2023, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Maria das Graças Andrade Korn**, Usuário Externo, em 19/12/2023, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Rafael Arromba de Sousa**, Usuário Externo, em 19/12/2023, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior, em 14/03/2024, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Cláudia Carvalhinho Windmoller, Professora do Magistério Superior, em 15/03/2024, às 07:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.343, 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, informando o código verificador 2882245 e o código CRC 89C518B0.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio, força, paciência, serei eternamente grato. Sem vocês, jamais teria chegado até aqui, se sou o que sou hoje, foi por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim.

Aos amigos, que me apoiaram nos momentos difíceis, e aqueles distantes, mas que estiveram presentes de coração, o meu muito obrigado.

Às prof. Clésia Cristina Nascentes e prof. Cláudia Carvalhinho Windmöller, por terem se disponibilizado a me orientar e por toda ajuda, colaboração, paciência e confiança em mim depositada nesse período.

Aos colegas do grupo de pesquisa LEAQUAA, muito obrigado pela parceria e pela amizade, a qual pretendo levar para a vida toda, em especial à Fernanda Pinheiro, pela ajuda e contribuição neste trabalho.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pela bolsa e demais investimentos neste projeto.

À UFMG e ao Departamento de Química, por me acolherem como membro desta grande equipe e possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM MEDICAMENTOS DE ACORDO COM OS CAPÍTULOS USP <232> E USP <233> - NORONHA, Igor Forattini Prates C.

Com a publicação dos capítulos da *United States Pharmacopeia*, USP <232> e <233>, diversos desafios surgiram em termos de determinação de impurezas elementares em medicamentos. Novos limites foram estabelecidos para 24 elementos, de acordo com o respectivo nível de toxicidade. Nesse contexto, o desenvolvimento de procedimentos de preparo de amostras eficientes assim como o emprego adequado de técnicas de análise sensíveis e seletivas se fazem necessário. Assim, diferentes misturas ácidas foram avaliadas para um método de digestão seguido por análise por ICP-MS, sendo o ácido nítrico na presença de peróxido apresentando recuperações entre 95 e 120% (com exceção da Ag e Pd) e DPR < 20% (exceto para o Pd) e, considerando suas vantagens frente ao uso de ácidos concentrados e/ou agentes complexantes, este foi validado e utilizado como um método de referência para o desenvolvimento de um novo método envolvendo micro extração. Para tal, amostras de multivitamínicos foram processadas pelo método de referência, e os resultados utilizados como comparação durante otimização do procedimento de micro extração proposto, em que foram avaliadas três misturas extratantes (HNO₃ diluído – MIX1, água régia invertida – MIX 2 e HNO₃ + HF – MIX3). O método utilizando MIX2 apresentou maiores RSDs que os demais, além de possíveis interferências, portanto apenas as misturas MIX1 e 3 foram validados segundo os capítulos USP 232 e 233, obtendo-se recuperações entre 85 e 120% (exceto Ag e Pd), DPR < 15% e limites de detecção abaixo das concentrações máximas permitidas de cada impureza para uma dose diária máxima de 10g/dia de medicamento. Por fim, o método desenvolvido foi aplicado na análise de 37 amostras de antidepressivos obtidos no comércio local e por doação realizada pela Polícia Federal e níveis de As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Pd, Sn e V foram detectados por ICP-MS, todos dentro dos limites estabelecidos pela USP 232.

Palavras-chave: preparo de amostra; ICP-MS; controle de qualidade; análise elementar; ultrassom; ICH

ABSTRACT

METHOD DEVELOPMENT FOR ELEMENTAL IMPURITIES DETERMINATION IN DRUGS ACCORDING TO USP 232 AND 233 CHAPTERS – NORONHA, Igor Forattini

Prates Carvalhais

After USP 232 and USP 233 publishing on the United States Pharmacopeia, new challenges have arisen in terms of elemental determination in pharmaceutical products. New limits were established for 24 elements, according to toxicity levels. In this context, efficient sample pretreatment methods applied with sensitive and selective instrumental analysis have become a trend in this research line. As so, a new method was developed using ultrasound assisted microextraction. To begin with it, a microwave assisted digestion using diluted nitric acid was validated, with recoveries ranging between 95 e 120% (except Ag and Pd) and RSD < 20% (except Pd). This method was applied to analyze multivitamin pills and the results were used as a reference to optimize the microextraction method, which was optimized according to the acid mixture used for extraction. Two mixtures were efficient: MIX 1 – diluted nitric acid; MIX 3 – nitric acid with hydrofluoric acid (9:1). Both mixtures were validated according to Chapter USP 233 with recoveries varying between 85 and 120% (except Ag and Pd), RSD < 15% and limits of detection below the maximum permitted concentration for a 10 g day⁻¹ dose drug. The MIX 3 validated method was then applied to analyze 37 samples of antidepressant obtained from local drug stores (with prescription) and federal police donation. Significant levels of Cd, Pb, As, Co, V, Ni, Pd, Ba, Cu, Sn and Cr were detected, but all of them were below the established limits.

Keywords: sample pre treatment; ICP-MS; quality control; elemental analysis; ultrasound; ICH

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Exposição diária permitida (EDP) em diferentes vias de administração para 24 elementos, classificados de acordo com suas toxicidades.....	24
Tabela 2 Concentração máxima permitida para impurezas elementares em componentes utilizados para produção de medicamentos e para o produto final, calculada a partir de uma DDM de 10 g/dia (Adaptado de (USP, 2018a))	25
Tabela 3 Propriedades físico-químicas de alguns ácidos utilizados para digestão de amostras (Adaptado de TODOLÍ; MERMET, 1999)	40
Tabela 4 Energia de ionização e grau de ionização estimado para alguns elementos (Adaptado de GRINDLAY et al., 2013).....	41
Tabela 5 Parâmetros instrumentais de análise de medicamentos por ICP-MS61	
Tabela 6 Misturas ácidas utilizadas em cada digestão realizada para medicamentos	62
Tabela 7 Valores de J estipulados para o método de digestão.....	64
Tabela 8 Valores de J estipulados para o método de micro extração.....	67
Tabela 9 Comparação de LDs e LQs determinados para os 24 elementos analisados nas três digestões realizadas com diferentes misturas ácidas e valores de J..	76
Tabela 10 Parâmetros obtidos para os 24 analitos quanto à linearidade.	78
Tabela 11 Limites de detecção e quantificação expressos em µg/L (instrumental) e µg/g (método), comparado com a concentração máxima permitida de acordo com a USP 232.	79
Tabela 12 Determinação de IEs em amostras de multivitamínicos por ICP-MS após digestão assistida por micro-ondas (expressos em µg g ⁻¹)	88

Tabela 13 Determinação de IEs em amostras de multivitamínicos por ICP-MS utilizando extração com ácido nítrico (MIX 1) assistida por ultrassom	92
Tabela 14 Determinação de IEs em amostras de multivitamínicos por ICP-MS utilizando extração com água régia invertida (MIX 2) assistida por ultrassom .	93
Tabela 15 Determinação de IEs em amostras de multivitamínicos por ICP-MS utilizando extração com ácido nítrico + HF (MIX 3) assistida por ultrassom	93
Tabela 16 Parâmetros de linearidade obtidos para ambas as misturas ácidas utilizadas na micro extração	98
Tabela 17 Limites de detecção e quantificação obtidos para as misturas ácidas utilizadas, comparadas com a concentração máxima permitida (CMP) na amostra, considerando uma dose diária de 10 g dia ⁻¹	99
Tabela 18 Determinação de IEs em 37 amostras de antidepressivo utilizando micro extração assistida por ultrassom – MIX 3.....	107
Tabela 19 Concentração máxima permitida dos elementos detectados nas amostras analisadas, considerando uma dose diária de aproximadamente 600 mg de medicamento.....	109

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Processo de cavitação ocasionado pela ação das ondas de ultrassom 33
- Figura 2** Representação esquemática de um sistema de US do tipo *cup horn* (Adaptado de TEIXEIRA et al., 2014)..... 35
- Figura 3** Esquema representativo de uma tocha geradora de plasma em um ICP-MS (Adaptado de AMMANN, 2008)..... 36
- Figura 4** Esquema representativo de um ICP-MS, ilustrando suas partes principais: (1) amostra em solução; (2) bomba; (3) nebulizador; (4) câmara de spray; (5) entrada de Ar para o plasma e refrigeração; (6) bobinas de indução/ tocha; (7) cone de amostragem; (8) skimmer; (9) lentes focalizadoras; (10) analisador de massas tipo quadrupolo; (11) detector tipo multiplicador de elétrons; (12) coletor de dados (Adaptado de NAGESWARA; KUMAR, 2007)..... 37
- Figura 5** Sistema de nebulização convencional em um ICP. Este consiste em um nebulizador concêntrico pneumático e uma câmara de spray com dupla passagem (Adaptado de TODOLI; VANHAECKE, 2005) 39
- Figura 6** Em cinza, elementos com maior probabilidade de formar íons duplamente carregados em um ICP (Adaptado de PUPYSHEV; SEMENOVA, 2001) 44
- Figura 7** Esquema de um arranjo em ICP-MS contendo uma célula de colisão/reação (Adaptado de TANNER et al., 1999). 49
- Figura 8** Esquema de um ICP-MS/MS atuando na remoção de interferente na determinação de $^{80}\text{Se}^+$ (Adaptado de SUGIYAMA; SHIKAMORI, 2015)..... 49
- Figura 9** Número de citações do termo "USP elemental impurities" em artigos de acordo com a base de dados *Web of Science* (Acesso em: 15/06/2023) 51

Figura 10 Principais técnicas de preparo de amostra utilizados para análise de impurezas elementares em medicamentos, baseado no review publicado por Pinheiro e Nóbrega (2022)	56
Figura 11 Principais técnicas de preparo de amostra utilizados para análise de impurezas elementares em medicamentos, baseado no review publicado por Pinheiro e Nóbrega (2022)	56
Figura 12 Programa de aquecimento utilizada na digestão das amostras no forno de micro-ondas.....	62
Figura 13 Digerido obtido na D1, com a utilização de quatro ácidos concentrados	69
Figura 14 Soluções resultantes após segunda digestão (D2) em meio contendo ácido nítrico diluído ($7,0 \text{ mol L}^{-1}$) na presença de peróxido de hidrogênio	70
Figura 15 Digerido obtido utilizando ácido concentrado (14 mol L^{-1}) na presença de peróxido de hidrogênio	71
Figura 16 Gráfico de barras com as recuperações para cada elemento alvo, destacando os limites de aceite de acordo com USP 233. (■) D1; (■) D2; (■) D3.	72
Figura 17 Espectro obtido por TXRF do sólido residual observado na amostra fortificada em D1. O Ga foi adicionado como padrão interno (1 mg/L).....	73
Figura 18 Espectro obtido por TXRF do sólido residual observado na amostra em D1. O Ga foi adicionado como padrão interno (1 mg/L).....	74
Figura 19 Desvios padrão relativos (DPR) para cada analito em cada digestão. A linha tracejada indica o limite aceite pela USP 233 (20%). (■) D1; (■) D2; (■) D3....	75
Figura 20 Amostras digeridas utilizando HNO_3 diluído na presença de H_2O_2 .	78

Figura 21 Estudo de adição e recuperação realizado em 3 níveis - (■) 0,5J; (■) 1J; (■) 1,5J (n = 3), no intuito de avaliar a exatidão do método de digestão. As linhas tracejadas indicam a faixa de aceite (70-150%).....	81
Figura 22 Recuperação obtida utilizando matriz digerida (■) e na ausência de matriz (■) na presença de diferentes concentrações de cloreto.	82
Figura 23 Estudo de possíveis interferentes na determinação de alguns isótopos de Cd. (■) 110 Cd; (■) 111 Cd; (■) 112 Cd; (■)113 Cd; (■) 114 Cd; (■) 116 Cd....	84
Figura 24 Recuperação obtida para as amostras fortificadas no nível 0,5J, 1J e 1,5J (n=3) para 24 IEs, utilizando ¹¹¹ Cd. (■) 0,5J; (■) 1J; (■) 1,5J. Linha tracejada representa o limite baixo estabelecido pelo Capítulo USP 233 para exatidão (70%).	85
Figura 25 Desvio padrão relativo (N=6, repetibilidade; N=12, precisão intermediária) obtidos para os 24 analitos no estudo de repetitividade, fortificados no nível J. (■) Repetibilidade; (■) Precisão intermediária.....	87
Figura 26 Processo simplificado do método de micro extração assistido por ultrassom proposto neste trabalho.....	90
Figura 27 Comparação dos resultados obtidos para amostra MV1. (■) Valor de referência; (■) Digestão; (■) MIX 1; (■) MIX 2; (■) MIX 3	94
Figura 28 Comparação dos resultados obtidos para amostra MV2. (■) Valor de referência; (■) Digestão; (■) MIX 1; (■) MIX 2; (■) MIX 3	95
Figura 29 Comparação dos resultados obtidos para amostra MV3. (■) Valor de referência; (■) Digestão; (■) MIX 1; (■) MIX 2; (■) MIX 3	95
Figura 30 Estimativa dos limites de detecção dos métodos de micro extração propostos, comparados com os limites obtidos pelo método de referência. (■) Digestão; (■) MIX 1; (■) MIX 2; (■) MIX 3.....	97

Figura 31 Estudo de recuperação com 3 níveis em triplicata (0,5 J; 1 J; 1,5 J) realizado utilizando o MIX 1. As linhas tracejadas indicam o intervalo de aceite proposto pelo Capítulo USP 233 (70-150%). (■) 0,5 J; (■) 1 J; (■) 1,5 J 100

Figura 32 Estudo de recuperação com 3 níveis em triplicata (0,5 J; 1 J; 1,5 J) realizado utilizando o MIX 3. A linha tracejada indica o intervalo de aceite proposto pelo Capítulo USP 233 (70%). (■) 0,5 J; (■) 1 J; (■) 1,5 J 101

Figura 33 Recuperações de Se em amostras de cloridrato de fluoxetina (CF). A linha tracejada indica o limite estipulado pelo Capítulo USP 233 (70%) 102

Figura 34 Recuperação de Pd obtida em 5 amostras de CF fortificadas após método de extração 103

Figura 35 Estudo de precisão a partir da (■) repetibilidade (n = 6) e da (■) precisão intermediária (n = 12) realizados no nível J utilizando o MIX 1. As linhas tracejadas representam os limites determinados pelo Capítulo USP 233 de 20% e 25%, respectivamente. 104

Figura 36 Estudo de precisão a partir da (■) repetibilidade (n = 6) e da (■) precisão intermediária (n = 12) realizados no nível J utilizando o MIX 3. As linhas tracejadas representam os limites determinados pelo Capítulo USP 233 de 20% e 25%, respectivamente. 105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AF – Amostra fortificada

CIM – Combustão induzida por micro-ondas

CMP – Concentração máxima permitida

COD – Carbono orgânico dissolvido

CRD – Carbono residual dissolvido

CT – Carbono total

D1 – Digestão 1

D2 – Digestão 2

D3 – Digestão 3

DDM – Dose diária máxima

DPR – Desvio padrão relativo

EDP – Exposição diária permitida

EI – Energia de ionização

EP – *European Pharmacopeia*

EUS – Extração assistida por ultrassom

FB – Farmacopeia Brasileira

FD – Fator de diluição

ICH – *International Council for Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

ICP-MS – Espectrometria de massas com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

ICP-OES – Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

IE – Impureza elementar

IFA – Insumo farmacêutico

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MS – Espectrometria de massas (do inglês, *Mass Spectrometry*)

MW – Micro-ondas (do inglês *Microwave*)

TXRF – Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (do inglês *Total X-ray Reflection Fluorescence*)

US – Ultrassom

USP – *United States Pharmacopeia*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Farmacopeias	20
1.1.1	USP <232> e USP <233>	23
1.2	Preparo de amostra	26
1.2.1	Digestão ácida assistida por micro-ondas (MW)	27
1.2.2	Extração assistida por ultrassom (EUS)	32
1.3	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) 35	
1.3.1	Interferências não-espectrais	38
1.3.2	Interferências espectrais	43
1.3.3	Estratégias para correção de interferências	46
1.4	Novos desafios impostos pela USP <232> E USP <233>	50
2	OBJETIVOS	58
2.1	Objetivo geral	58
2.2	Objetivos específicos	58
3	MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1	Reagentes	59
3.2	Amostras	59

3.3	Instrumentação	60
3.4	Método de digestão ácida assistida por micro-ondas	61
3.4.1	Avaliação de diferentes misturas ácidas na digestão de uma amostra de antidepressivo	61
3.5	Validação de método de digestão – Digestão D2	63
3.5.1	Preparo das amostras.....	63
3.5.2	Linearidade	63
3.5.3	Exatidão.....	64
3.5.4	Precisão.....	64
3.5.5	Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ).....	65
3.6	Microextração assistida por ultrassom	66
3.6.1	Otimização	66
3.6.2	Validação	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	Comparação entre diferentes misturas ácidas na digestão assistida por micro-ondas (MW) de comprimidos de CB	68
4.1.1	Aspecto dos digeridos.....	68
4.1.2	Avaliação da recuperação, precisão (DPR), e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) das misturas ácidas utilizadas	71
4.2	Validação do método de referência – Digestão D2.....	77

4.2.1	Digestão das amostras	77
4.2.2	Validação	78
4.3	Micro extração assistida por ultrassom	87
4.3.1	Otimização	87
4.3.2	Validação	98
4.4	Análise de antidepressivos utilizando o método de micro extração assistida por ultrassom	105
5	CONCLUSÕES	110
	REFERÊNCIAS	112
	ANEXO A – Composição e demais informações das amostras analisadas ...	123
	ANEXO B – Composição das amostras de multivitamínicos	134
	ANEXO C – Composição das amostras utilizadas na validação do método de referência	135
	ANEXO D – Artigo publicado	136
	APÊNDICE A – Testes t: Otimização do método de microextração	137

1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de qualquer produto destinado ao consumo é de extrema importância, tendo em vista possíveis efeitos tóxicos que contaminantes podem causar. Para medicamentos esta avaliação é ainda mais importante, sendo necessário um controle rigoroso, de modo a garantir que nenhuma substância estranha altere suas propriedades e/ou cause algum efeito indesejado ao paciente. Tal qualidade deve ser garantida desde a produção dos insumos farmacêuticos, excipientes, até o produto final (POHL *et al.*, 2018). Chumbo, Hg, Cd e As são considerados extremamente tóxicos em baixos níveis de exposição, sendo estes as maiores preocupações no controle de qualidade de medicamentos. Esses elementos apresentam efeitos neurológicos, hepáticos, cardiovasculares graves, além de serem carcinogênicos em casos de exposição crônica (MAITHANI *et al.*, 2019).

Até o início do século XXI, a determinação de impurezas inorgânicas em produtos farmacêuticos consistia em um método rudimentar, com baixas sensibilidade e seletividade, baseado na precipitação, inspeção visual e comparação da cor de uma solução amostra e um padrão (LEWEN *et al.*, 2004).

A partir dos desenvolvimentos dentro da área da química e da farmácia, várias rotas sintéticas distintas para fármacos começaram a ser utilizadas. Com isso, elementos que antes não eram comumente usados para a síntese ou extração de insumos farmacêuticos, passaram a fazer parte da rota de produção, como por exemplo os metais do grupo da platina, os quais são muito utilizados como catalisadores. (BALARAM, 2016).

Assim, considerando as possíveis consequências da ingestão de contaminantes inorgânicos na saúde dos consumidores, a *United States Pharmacopeia (USP)*, em consonância com *International Council for Harmonization (ICH)*, propôs novos capítulos em sua edição de 2010, recomendando técnicas modernas de análise elementar envolvendo plasma indutivamente acoplado, as quais possuem sensibilidade e detectabilidade adequada para atender aos limites estabelecidos pelas farmacopeias (PINHEIRO; BARROS; NÓBREGA, 2019). Tais capítulos se tornaram

mandatórios para as indústrias farmacêuticas desde 2018, abrindo um leque de possibilidades e desafios em termos de procedimentos de preparo de amostra e análise (KATAKAM; ABOUL-ENEIN, 2019).

1.1 Farmacopeias

Antes de chegarem ao consumidor, todos os medicamentos passam por diversos processos durante a produção, como reações de síntese, purificação, adição de excipientes, produção da forma farmacêutica, dentre outros. Todas estas etapas envolvem a manipulação de reagentes, solventes, catalisadores, recipientes, dentre outros fatores que podem contribuir na qualidade final do fármaco, podendo esses se tornarem fontes de contaminação por compostos orgânicos ou inorgânicos. Os critérios de controle de qualidade de medicamentos são determinados pelos órgãos responsáveis de cada país, seguindo diretrizes e recomendações estabelecidas nas farmacopeias, como a Farmacopeia Brasileira (FB), *European Pharmacopeia* (EP) e a *United States Pharmacopeia* (USP) (STØVING *et al.*, 2013).

A primeira edição da Farmacopeia Brasileira foi escrita por um único farmacêutico chamado Rodolpho Albino Dias da Silva, no início do século XX. Foi oficializada pelo governo federal em novembro de 1926, e se tornou referência obrigatória em agosto de 1929. Nesta primeira edição, o autor descrevia propriedades medicinais de plantas, algumas substâncias químicas e algumas preparações. Com a Segunda Guerra Mundial e a instalação de diversas indústrias multinacionais no país, deu-se início a produção em massa de medicamentos mais modernos, os quais exigiam um maior controle de qualidade, e assim foi publicada a segunda edição da FB, em 1959. Esta foi passando por pequenas revisões durante o decorrer dos anos, até que sua quinta edição foi publicada em 2010, a partir de uma análise criteriosa das edições anteriores, adicionando, removendo e substituindo textos e metodologias de acordo com a necessidade. Esta se tornou a referência central da farmacopeia brasileira, a qual apresenta metodologias baseadas nas maiores referências mundiais, consoante às mais respeitadas farmacopeias internacionais (BRASIL, 2010). Atualmente a Farmacopeia Brasileira está na 6ª edição, publicada em 2020, a qual é amplamente utilizada.

Uma das farmacopeias mais reconhecidas internacionalmente é a *United States Pharmacopeia*. A primeira edição foi escrita em 1820 por um grupo de médicos preocupados com a baixa qualidade dos medicamentos no país. Esta consistia em um guia sobre substâncias medicinais e algumas preparações. A morte de crianças devido à ingestão de medicamento para difteria contaminado com bactéria de tétano em 1905 revelou o quanto o controle de qualidade dos medicamentos vinha sendo falho, sendo muitas vezes ignorada a possibilidade de malefícios à saúde das pessoas. A USP publica então um padrão de qualidade para o fármaco, no intuito de assegurar sua segurança. A partir de 1906, todos os medicamentos comercializados nos Estados Unidos eram obrigados por lei a estarem nos padrões estabelecidos pela USP e com sua respectiva tradução em 1908, esta se tornou de conhecimento mundial, permitindo os cidadãos a terem uma maior confiabilidade nos medicamentos que consumiam. Não obstante, a *USP Convention* foi também uma das responsáveis por garantir a produção rápida de padrões de qualidade de insulina, após esta patente expirar em 1941, garantido o acesso deste medicamento à população. Foi também responsável pela qualidade dos padrões de penicilina durante a Segunda Guerra Mundial (1944), período de maior demanda deste antibiótico. Hoje, a USP é uma organização científica independente e sem fins lucrativos, cujos padrões de qualidade são reconhecidos por cerca de 140 países, e possui laboratórios próprios espalhados em todo mundo, inclusive no Brasil. (USP, 2020b). A *USP Convention* está sempre buscando firmar relações e colaborações com outras instituições internacionais, no intuito de construir confiança na produção de medicamentos ao redor do mundo (USP, 2020b).

Desde sua criação, o maior objetivo da USP é a saúde e a segurança da população, e hoje atua não só com medicamentos, mas também no setor de alimentos e suplementos alimentares. Desse modo, está sempre em atualização concomitante ao desenvolvimento científico, além de estar atenta às maiores necessidades em termos de controle de qualidade (USP, 2020a). Um tópico que vem sendo discutido atualmente é a presença de contaminantes inorgânicos em insumos farmacêuticos (IFA), excipientes e no produto acabado. Até o ano de 2010, a USP possuía um capítulo (USP <231>, *Heavy Metals*), publicado em 1905, em que descrevia um

método semi-quantitativo para a determinação de metais, baseado na precipitação dos mesmos com íons sulfeto. Contudo, tal método não apresenta seletividade nem especificidade, não sendo possível identificar quais elementos estavam presentes e nem suas respectivas concentrações (PERKINELMER; SHELTON, 2014). O teste consistia na dissolução (digestão ácida, combustão, solubilização) do produto em teste seguida da adição de um reagente como a tioacetamida, uma fonte de íons sulfeto, o qual levaria a precipitação de sais de Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb e Sn. A cor do precipitado era comparada com uma solução padrão de 10 mg/kg de Pb e assim verificado se o fármaco em questão estava dentro do critério de aceitação. (CHAHROUR *et al.*, 2017).

Como mencionado anteriormente, no processo de produção de medicamentos podem existir diversas fontes de contaminação por metais e metaloides. Arsênio, Cd, Ni, Hg, e Pb podem estar presentes nos reagentes e solventes utilizados durante a produção de IFAs e dos excipientes. Cromo, Cu, Mo, Ni e V são elementos comuns presentes nos materiais e equipamentos utilizados nas indústrias, e podem ser introduzidos nos produtos pelo contato do meio reacional com essas superfícies. Elementos do grupo da Pt (Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru) são frequentemente utilizados como catalisadores, sendo adicionados durante os processos de síntese e podendo ficar resíduos dos mesmos no medicamento pronto (POHL *et al.*, 2018). Viu-se a necessidade de um controle de qualidade mais eficiente em termos de composição inorgânica de fármacos, uma vez que a ingestão desses elementos pode causar intoxicações graves, além de poderem degradar o IFA, diminuindo a atividade do princípio ativo e o tempo de prateleira do medicamento. Ademais, tais elementos apresentam diferentes toxicidades, de modo que o conhecimento da composição inorgânica se faz de extrema importância (BARIN *et al.*, 2014; MAITHANI *et al.*, 2019).

Por tudo isso, durante vários anos, a USP <231> *Heavy Metals* já vinha sendo considerada obsoleta e estava em discussão. Assim, em 2010, dois novos capítulos foram publicados: USP <232> *Elemental Impurities – limits* e USP <233> *Elemental Impurities – procedures*. Em 2018, visando a harmonização com o guia de impurezas elementares Q3D do *International Council for Harmonization of Technical*

Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), estes dois novos capítulos se tornaram oficiais e mandatórios (HEYWARD *et al.*, 2018; THAYER, 2013).

1.1.1 USP <232> e USP <233>

Uma vez verificado o quão obsoleto estava a avaliação da presença de contaminantes inorgânicos em produtos farmacêuticos, diversas pesquisas passaram a ser feitas na área, avaliando os limites máximos para cada elemento de acordo com a respectiva toxicidade, além de diversos métodos de análise para estes analitos. (BARIN *et al.*, 2014).

O capítulo USP <232> mais atual traz a exposição diária permitida (EDP) para 24 elementos, considerando a via de introdução do medicamento, sendo esses separados por classes, de acordo com sua toxicidade e probabilidade de ocorrência no produto final (

Tabela 1) (USP, 2018a).

A classe 1 engloba os elementos com maior toxicidade e mais frequentemente encontrados como impurezas elementares, e, portanto, são os que apresentam os menores níveis de tolerância em termos de EDP. Além disso, devem estar inclusos em estudos de avaliação de risco, de acordo com as premissas da USP <232>, independente da via de administração do medicamento (POHL *et al.*, 2018). A classe 2 é subdividida em classe 2A e 2B, sendo os elementos da primeira com maior probabilidade de ocorrência que a segunda, e devem também ser considerados na avaliação de risco. Elementos do grupo 3 são relativamente menos tóxicos que os demais, apresentam maiores níveis de tolerância, mas devem ser avaliados quanto ao risco em caso de medicamentos de administração oral e parenteral (MAITHANI *et al.*, 2019).

Tabela 1 Exposição diária permitida (EDP) em diferentes vias de administração para 24 elementos, classificados de acordo com suas toxicidades

Elemento	Classe	EDP (Oral)/ $\mu\text{g dia}^{-1}$	EDP (Parenteral)/ $\mu\text{g dia}^{-1}$	EDP (Inalação)/ $\mu\text{g dia}^{-1}$
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 avaliação de risco consiste na comparação do teor da impureza elementar (IE) levando em conta a dose diária máxima (DDM) do fármaco e a EDP, segundo a expressão abaixo (USP, 2018a).

$$\text{EDP} \geq \text{teor da IE } (\mu\text{g/g}) \times \text{DDM } (\text{g/dia})$$

A partir dos valores de EDP, a USP <233> traz os limites de concentração (J), o qual é calculado a partir da Equação (1):

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

Como se percebe, o valor de J está relacionado com a EDP, assim como a dose diária máxima do medicamento (DDM) e o fator de diluição (FD) do método (PINHEIRO, BARROS, NÓBREGA, 2019; USP, 2018b). As concentrações máximas permitidas de

impurezas elementares (CMP, IE), considerando uma DDM de 10 g/dia, podem ser calculadas pela relação $\frac{EDP(\mu\text{g}/\text{dia})}{DDM(\text{g}/\text{dia})}$, e são mostradas na **Tabela 2**.

Tabela 2 Concentração máxima permitida para impurezas elementares em componentes utilizados para produção de medicamentos e para o produto final, calculada a partir de uma DDM de 10 g/dia (Adaptado de (USP, 2018a))

Elemento	Classe	CMP (Oral)/ $\mu\text{g g}^{-1}$	CMP (Parenteral)/ $\mu\text{g g}^{-1}$	CMP (Inalação)/ $\mu\text{g g}^{-1}$
Cádmio (Cd)	1	0,5	0,2	0,2
Chumbo (Pb)	1	0,5	0,5	0,5
Arsênio (As)	1	1,5	1,5	0,2
Merúrio (Hg)	1	3,0	0,3	0,1
Cobalto (Co)	2A	5,0	0,5	0,3
Vanádio (V)	2A	10,0	1,0	0,1
Níquel (Ni)	2A	20,0	2,0	0,5
Tálio (Tl)	2B	0,8	0,8	0,8
Ouro (Au)	2B	10,0	10,0	0,1
Paládio (Pd)	2B	10,0	1,0	0,1
Írídio (Ir)	2B	10,0	1,0	0,1
Ósmio (Os)	2B	10,0	1,0	0,1
Ródio (Rh)	2B	10,0	1,0	0,1
Rutênio (Ru)	2B	10,0	1,0	0,1
Selênio (Se)	2B	15,0	8,0	13,0
Prata (Ag)	2B	15,0	1,0	0,7
Platina (Pt)	2B	10,0	1,0	0,1
Lítio (Li)	3	55,0	25,0	2,5
Antimônio (Sb)	3	120,0	9,0	2,0
Bário (Ba)	3	140,0	70,0	30,0
Molibdênio (Mo)	3	300,0	150,0	1,0
Cobre (Cu)	3	300,0	30,0	3,0
Estanho (Sn)	3	600,0	60,0	6,0
Cromo (Cr)	3	1100,0	110,0	0,3

Desse modo, obtém-se os valores de J , os quais serão utilizados durante o procedimento de validação do método (USP, 2018a, b).

A USP sugere como técnicas de análise a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Estas necessitam, de maneira geral, que a amostra esteja em solução para ser introduzida nos equipamentos. Desta forma, a USP recomenda a introdução direta em caso de amostras líquidas, solubilização aquosa/ solvente, ou a digestão em sistema assistido por radiação micro-ondas com frascos fechados. O método utilizado deve ser avaliado quanto à exatidão, repetibilidade e

precisão intermediária, podendo ser também determinados os limites de detecção e quantificação, apesar de não ser uma exigência do capítulo, assim como a faixa linear (USP, 2018b).

1.2 Preparo de amostra

Como mencionado, as técnicas envolvendo plasma acoplado indutivamente (ICP-OES e ICP-MS) são as recomendadas para determinação de impurezas elementares em medicamentos segundo a USP. Mesmo com o avanço em termos de estratégias de introdução de amostras sólidas como o *laser ablation* e vaporização eletrotérmica, a maioria das aplicações para ICP necessita que a amostra seja solubilizada e introduzida por nebulização (BIZZI, C. A. *et al.*, 2017a).

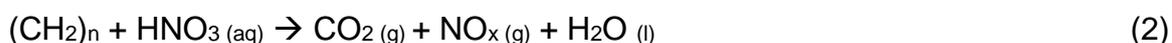
O preparo de amostra a ser utilizado está diretamente relacionada à natureza da matriz, assim como aos analitos a serem determinados e suas respectivas concentrações (FLORES, MORAES, 2014). Em alguns casos, o IFA ou o próprio medicamento já se encontram em fase líquida, ou pode ser facilmente solubilizado em solvente aquoso ou orgânico, e a USP <233> preconiza que a introdução direta pode ser realizada, após processos de diluição adequados e obtenção de uma solução límpida (USP, 2018b).

O preparo da amostra é uma etapa extremamente importante em um método analítico, e em se tratando de análise elementar, alguns pontos devem ser considerados. O medicamento final apresenta uma composição variada, composta por materiais orgânicos e inorgânicos, e possivelmente não serão completamente solúveis em um único tipo de solvente. Além disso, em se tratando de técnicas analíticas envolvendo ICP, a matriz orgânica pode causar alterações no comportamento do plasma, o que pode afetar os equilíbrios dos íons no meio. Desse modo, muitas vezes faz-se necessário o uso de agentes oxidantes e/ou complexantes, no intuito de decompor a matéria orgânica e solubilizar resíduos inorgânicos presentes na amostra, reduzindo assim possíveis efeitos da matriz sobre o plasma e liberando os analitos para a solução. Uma outra preocupação é a perda de analitos voláteis durante o processo de digestão em sistemas abertos (BALARAM, 2016).

1.2.1 Digestão ácida assistida por micro-ondas (MW)

Diversos podem ser os métodos utilizados para a digestão de uma amostra, sendo as características desta um fator a ser considerado na escolha do preparo a ser realizado. A digestão por via úmida em sistema fechado consiste na decomposição da matriz a elevadas temperaturas, utilizando para isso uma mistura oxidante a qual geralmente é composta por ácido nítrico concentrado com adição ou não de peróxido de hidrogênio e/ou outros ácidos (oxidantes ou complexantes) (BIZZI, C. A. *et al.*, 2017a).

O uso de HNO₃ vem se tornando comum devido às suas vantagens frente a outros ácidos como o perclórico, de elevada periculosidade. Além disso, é fácil de ser purificado e manuseado, apresentando também elevado poder oxidante, reagindo com a matéria orgânica de acordo com a equação (2) (BIZZI, C. A. *et al.*, 2017a; GONZALEZ *et al.*, 2009) :

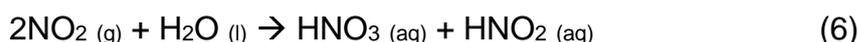
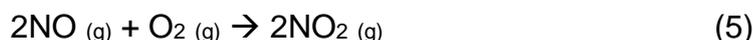
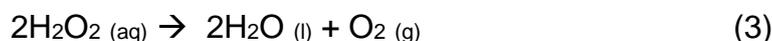


A realização da digestão em um sistema aberto apresenta a vantagem de não necessitar de equipamentos caros, porém apresenta riscos de contaminação pelo ar além de possíveis perdas de analitos por volatilização e a liberação de grandes quantidades de vapores tóxicos. A eficiência da digestão fica também limitada à temperatura associada ao ponto de ebulição do ácido utilizado, resultando em digestões incompletas para algumas amostras, uma vez que a reatividade desses agentes oxidantes é maior em temperaturas mais elevadas. Para o ácido nítrico (65%-68%), por exemplo, a temperatura não ultrapassa os 120 °C, sendo muitas vezes necessário a adição de ácido sulfúrico devido ao seu maior ponto de ebulição, o que pode resultar em maiores chances de contaminação. Ademais, íons sulfato são interferentes comuns nas análises de metais devido à formação dos respectivos sais e a maior viscosidade pode também interferir na introdução do digerido no instrumento de análise (FLORES, ÉRICO M.M. *et al.*, 2007; MATUSIEWICZ, 2016; MIRANDA; PEREIRA-FILHO; GOMES NETO, 2014).

Devido a tudo isso, o uso de sistemas fechados e o uso de aquecimento assistido por radiação micro-ondas vem rapidamente tomando espaço em laboratórios de análise. O uso de sistemas fechados gera um aumento na pressão interna do frasco reacional, elevando a temperatura de ebulição do HNO_3 , permitindo que maiores temperaturas sejam atingidas, melhorando a eficiência da digestão sem a necessidade de utilizar misturas com ácido sulfúrico ou de outro ácido oxidante como o perclórico, reduzindo também perdas por volatilização e a possibilidade de contaminação (CASTRO *et al.*, 2009; MATUSIEWICZ, 2009). Com relação ao aquecimento, a radiação MW promove o aquecimento mais uniforme da solução reagente, permitem melhor controle de temperatura, maior eficiência e taxa de aquecimento, se comparado ao aquecimento indutivo. Tais vantagens se devem à interação das ondas de MW diretamente com as moléculas/íons no meio reacional, gerando calor devido aos efeitos térmicos resultantes de uma polarização e da condução iônica e/ou de efeitos eletrostáticos que geram interações dipolo-dipolo entre as moléculas e as cargas no campo elétrico. O uso deste recurso foi possível graças ao desenvolvimento de materiais transparentes à radiação MW, como o Teflon® e o quartzo, de modo que frascos produzidos com tais materiais não absorvem a radiação, não sofrendo aquecimento e garantindo que toda a energia produzida na cavidade do forno seja absorvida apenas pela solução reagente (FLORES, ÉRICO MARLON DE MORAES, 2014; SOLANKI; PRAJAPATI; JANI, 2010).

Um dos desafios no desenvolvimento de métodos de digestão de amostras é conseguir condições mais brandas de reação, seguindo os princípios da química verde, sem reduzir a eficiência do processo. Pensando nisso, estudos envolvendo o uso de ácidos diluídos vêm sendo realizados para diversas matrizes, de modo a gerar menos resíduo, uma vez que menos diluições são necessárias tendo em vista a menor acidez no digerido final, maior poder de detectabilidade e menor consumo de reagentes (GONZALEZ *et al.*, 2009). Em um sistema fechado, durante o processo de digestão, ocorre a produção de gás NO_x que, ao reagir com O_2 presente na fase gasosa no frasco, regenera o HNO_3 , formando um ciclo de reações enquanto existir matéria orgânica e oxigênio no meio. Desse modo, a eficiência do processo não é afetada pela diluição do HNO_3 . Atualmente, existem frascos para sistemas de digestão

que permitem a introdução de gás oxigênio durante o processo, contudo a adição de peróxido de hidrogênio também funciona como fonte desse gás, tendo em vista a sua decomposição no meio. As equações 3, 4, 5 e 6 representam o ciclo reacional descrito (BIZZI, CEZAR A. *et al.*, 2014; GARITTA *et al.*, 2021).



Araújo e colaboradores (2002) avaliaram os efeitos do ácido diluído sobre a digestão assistida por MW de amostras de plantas. Estes observaram que concentrações mais altas de HNO_3 de fato promoveram uma melhor decomposição da matéria orgânica, porém mostraram que o uso de ácido diluído também forneceu uma decomposição satisfatória. Destacaram o fato de que a água, por ser um solvente fortemente polar, melhora a taxa de aquecimento do meio reacional, uma vez que consegue interagir mais com as ondas de MW pelos mecanismos mencionados anteriormente.

Estudos realizados por Bizzi e colaboradores (2014) avaliaram a digestão de amostras de leite em pó e fígado bovino quanto à concentração de HNO_3 e H_2O_2 , e mostraram que o uso do ácido diluído na presença de peróxido apresentou uma boa eficiência na decomposição da matéria orgânica. Os autores notaram também uma acidez relativamente maior na solução resultante quando utilizado H_2O_2 , indício de que de fato está ocorrendo a maior regeneração do HNO_3 . Além disso, afirmam que a concentração dos reagentes é um fator a ser otimizado, uma vez que acima de certos níveis, a eficiência permanece constante.

Considerando a grande variabilidade e complexidade de uma matriz para outra, trabalhos envolvendo desenvolvimento de métodos de preparo de amostra para análise elementar são de grande relevância na área. Além das supracitadas, o uso do ácido diluído também já foi avaliado para a decomposição de amostras de biodiesel, com adição de peróxido de hidrogênio (BARELA *et al.*, 2017), erva mate, sob pressão de O_2 (PARDINHO *et al.*, 2018), e suplementos alimentares, em que foi avaliado o uso

de apenas ácido diluído (PINHEIRO et al., 2019). Todos reforçam que o uso de HNO_3 diluído pode de fato substituir o uso de reagentes concentrados, colaborando assim com os princípios da química verde, além de fornecer mais segurança durante os procedimentos de preparo.

1.2.1.1 Eficiência da digestão

Em termos de solução resultante após o processo de digestão/ solubilização, é recomendado que a mesma apresente uma baixa acidez residual (menor que 10%), além de um teor de sólidos dissolvidos menor que 0,1%, evitando assim danos nas partes do instrumento e entupimentos no sistema de introdução de amostra. Além disso, níveis elevados de carbono orgânico dissolvido (COD) podem causar interferências no plasma, e assim é importante garantir a digestão completa da matriz orgânica da amostra. Por fim, a pureza dos reagentes deve ser observada, de modo a não introduzir no plasma espécies e/ou compostos capazes de interferir na análise a partir de reações químicas (BIZZI, C. A. *et al.*, 2017a).

Como já discutido, o uso de ácido diluído contribui para redução da acidez final, diminuindo a necessidade de elevados fatores de diluição para a amostra e, conseqüentemente, melhorando a sensibilidade do método (CASTRO *et al.*, 2009). A acidez residual pode ser determinada por métodos titulométricos (BIZZI et al., 2017).

O principal parâmetro utilizado para avaliação da eficiência da digestão é a determinação de COD, uma vez que teores de carbono dissolvido implicam em uma digestão incompleta da matriz, muitas vezes devido à estabilidade da estrutura orgânica e/ou formação de compostos estáveis durante as reações. A presença de COD pode resultar em interferências nas análises por técnicas de ionização por plasma, e, portanto, é um fator crucial a se pensar perante a proposição e execução de um método para decomposição de amostra (GOUVEIA *et al.*, 2001).

A determinação de carbono pode ser realizada a partir de análises por ICP-OES, utilizando a linha de emissão 193,091 nm. Para tal, é necessário o preparo de padrões de carbono, os quais podem partir, por exemplo, de ureia ou glicose (GOUVEIA *et al.*,

2001; KRUSHEVSKA *et al.*, 1992). Uma vez determinado os valores de carbono total para a amostra inicial (CT) e de COD após a digestão, pode-se calcular o teor de carbono residual dissolvido (CRD), a partir da equação (7), e a eficiência de decomposição da matéria orgânica (EDMO), pela equação (8). Em termos gerais, CRD fornece a porcentagem de carbono ainda existente na amostra e a EDMO é a porcentagem de matéria orgânica que foi de fato decomposta pelo processo (BIZZI, C. A. *et al.*, 2017a).

$$CRD = \frac{COD}{CT} \times 100 \quad (7)$$

$$EDMO = \frac{CT - COD}{CT} \times 100 \quad (8)$$

Em análises rotineiras, ou até mesmo devido à ausência de equipamento e/ou reagentes adequados para a determinação quantitativa do CRD, a eficiência da digestão pode ser avaliada qualitativamente por análise visual. Comumente, digeridos de cor límpida, sem a presença de resíduos sólidos, indicam que a decomposição foi satisfatória (BIZZI *et al.*, 2017a).

1.2.1.2 Outras misturas ácidas

Mesmo com todas as vantagens, o uso de aquecimento assistido por MW e HNO₃ diluído pode não ser suficiente para a decomposição da matriz de uma dada amostra. Matrizes inorgânicas, por exemplo, são comumente ricas em silicatos, óxidos, sulfatos, fosfatos etc., os quais não reagem com ácido nítrico, e assim a adição de ácidos complexantes como HF (reação com silicatos) e HCl podem se fazer necessários (BOTHÁ, 2020; ZACHARIADIS *et al.*, 2006).

Além de ser um ácido de elevada periculosidade, a adição de HF pode levar à formação de fluoretos insolúveis com alguns elementos, e seu excesso pode danificar partes de quartzo nos instrumentos de análise. Assim, este deve ser removido pela adição de ácido bórico (H₃BO₃), adicionando mais uma etapa ao processo, e mais uma fonte de possíveis contaminantes. Problemas com o uso de HCl envolvem a formação de cloretos voláteis com As, Hg, Sb, Se, e cloretos insolúveis como AgCl,

PbCl_2 e Hg_2Cl_2 . Uma outra abordagem é o uso da mistura de HCl com HNO_3 na proporção de 3:1 (água régia), formando um composto de elevado poder oxidante, conhecido como cloreto de nitrosila (NOCl), utilizado muito para decomposição de solos e sedimento (MÜLLER *et al.*, 2014).

1.2.2 Extração assistida por ultrassom (EUS)

Apesar de todas as vantagens da utilização do forno micro-ondas de cavidade, algumas vezes este pode não ser adequado. Muitas vezes a quantidade de amostra é mínima, não sendo suficiente para a digestão em micro-ondas. Além disso, a busca por métodos de preparo eficientes, com redução de resíduos e uso de menos reagentes e solventes, seguindo os princípios da química verde, é um dos desafios atuais na área de preparo de amostras (CABALEIRO; DE LA CALLE, 2014). Com isso, métodos de micro extração vem se destacando dentre os trabalhos relacionados, tendo em vista a redução significativa na quantidade de amostra e reagentes necessários, diminuindo também a geração de resíduos (ROCHA *et al.*, 2013).

Uma técnica que vem sendo explorada por pesquisadores é a micro extração assistida por ultrassom de baixa frequência (16-100 kHz), tendo em vista a mínima quantidade de amostra empregada (1-30 mg), além do baixo volume de solvente extrator utilizado (1-2 mL). Estas ondas mecânicas auxiliam na quebra de partículas sólidas, facilitando processos de solubilização, fusão e decomposição (MATUSIEWICZ, 2016; TELES *et al.*, 2021).

As primeiras aplicações de ondas de ultrassom na química datam da década de 20, quando os pesquisadores Richards e Loomis reportaram os efeitos de ondas sonoras de alta frequência em uma variedade de soluções, líquidos e sólidos (LINARES *et al.*, 1988). Por ser uma onda mecânica, ondas de US necessitam de um meio elástico para se propagar, a partir da oscilação das partículas presentes. Tal distúrbio, quando periódico, gera ciclos de compressão (pressão positiva), aproximando moléculas, e de expansão (pressão negativa), as afastando. Se a intensidade é suficiente, bolhas de gás (ou cavidades) são formadas durante esses ciclos, as quais expandem durante picos de pressão negativa e contraem nos picos de pressão positiva. Tal fenômeno

segue ocorrendo até que a cavidade atinja um extremo de instabilidade mecânica, sofrendo uma contração brusca e implodindo, gerando pontos de elevada temperatura (5000 K) e pressão (1000 atm). O crescimento e implosão dessas microbolhas é um fenômeno denominado cavitação, e encontra-se resumido na **Figura 1** (SEIDI; YAMINI, 2012; SORIA; VILLAMIEL, 2010).

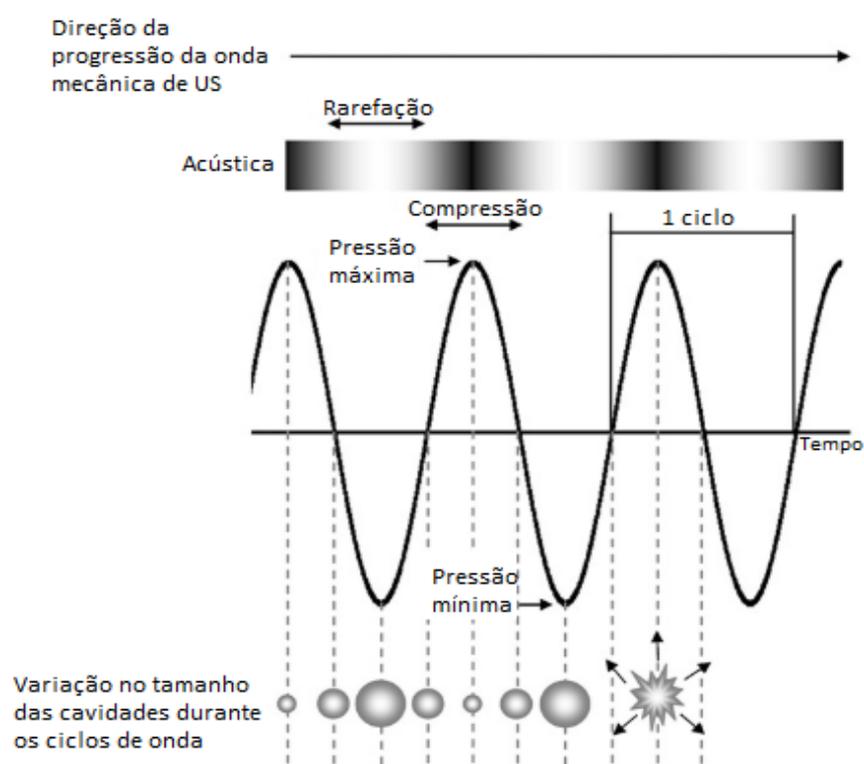


Figura 1 Processo de cavitação ocasionado pela ação das ondas de ultrassom

As condições geradas por esse fenômeno aumentam a solubilidade e difusão dos analitos para a solução, além de aumentar a exposição da superfície da amostra com o meio reacional pela constante geração de novas regiões oriundas de fragmentações causadas pelas ondas de US. Também já foi constatado um aumento do poder oxidante do extrator, que foi atribuído à formação de radicais livres na solução (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Dentre os equipamentos de ultrassom mais utilizados em laboratórios, estão o banho e a sonda, sendo que este último fornece uma cavitação mais eficiente, uma vez que as ondas são aplicadas em um ponto específico, dentro da solução, com mais

intensidade, enquanto o banho apresenta distribuição heterogênea das ondas ultrassônicas, que se dispersam mais no meio. Ambos operam em frequências fixas, porém o banho ultrassom apresenta mais variáveis a serem avaliadas para uma melhor eficiência da extração, como o volume e temperatura da água dentro do recipiente e a posição do frasco reacional (SEIDI; YAMINI, 2012).

Um outro aparelho de US disponível comercialmente, conhecido como *cup horn*, apresenta algumas vantagens frente aos citados anteriormente, como a possibilidade de preparar um número maior de amostras simultaneamente, pois gera uma distribuição uniforme das ondas de US, além de reduzir os riscos de contaminação, pois a sonda não entra em contato com as amostras e, muitas vezes a introdução da sonda metálica na solução pode levar à corrosão da mesma (DE LA CALLE *et al.*, 2009a). Na **Figura 2** é apresentado um esquema de aparelho de ultrassom do tipo *cup horn*. Nele, as amostras são colocadas em um copo de vidro preenchido com água em constante fluxo e a fonte de ultrassom fica localizado na base, promovendo uma melhor uniformidade das ondas no meio.

Em termos de aplicações em preparo de amostras para análise elementar, a micro extração assistida por US já foi utilizada em diversas matrizes como vegetais (FILGUEIRAS *et al.*, 2000; NASCENTES; KORN; ARRUDA, 2001; TELES *et al.*, 2021), alimentos (SORIA; VILLAMIEL, 2010), fertilizantes (TEIXEIRA *et al.*, 2014), tecido animal, solo, sedimento, dentre outras (DE LA CALLE *et al.*, 2009a), mostrando que a extração por US apresenta uma boa aplicabilidade nos mais diversos tipos de amostra.

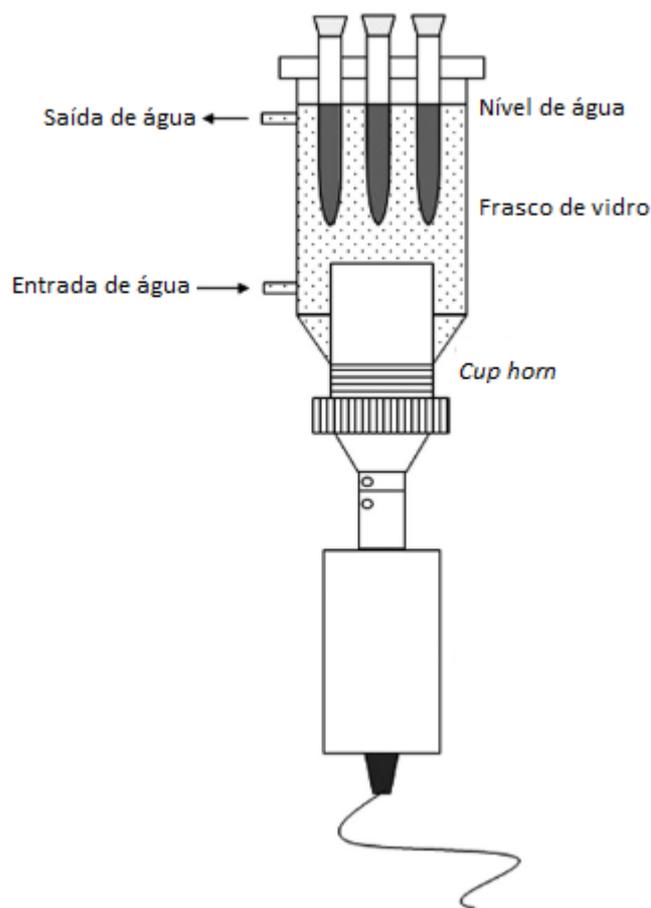


Figura 2 Representação esquemática de um sistema de US do tipo *cup horn* (Adaptado de TEIXEIRA et al., 2014)

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

Os capítulos 232 e 233 da USP fornecem direcionamentos para a determinação de impurezas elementares utilizando as técnicas com plasma (ICP-OES e ICP-MS) (USP, 2018a, b). Ambas as técnicas são multi elementares, porém, tendo em vista os baixos níveis exigidos pela USP, podendo chegar, dependendo do preparo da amostra, na ordem de partes por bilhão (ppb), o ICP-MS se torna uma técnica mais atrativa para essas análises, tendo em vista sua melhor seletividade, exatidão e limites de detecção extremamente baixos, o que permite maiores fatores de diluição durante o preparo de amostras. Além disso, o ICP-OES, para elementos presentes em níveis traço e ultra traço, sofre maior ocorrência de interferências espectrais durante a análise (GODOY et al., 2021; NAGESWARA RAO; KUMAR TALLURI, 2007).

O plasma é formado a partir da ionização de um gás, que, no caso, trata-se de argônio. Devido à elevada temperatura atingida, chegando próximo a 10000 K em determinadas regiões, tem-se energia necessária para quebra de ligações químicas, além da elevada densidade iônica no meio, melhorando a ionização dos elementos, e conseqüentemente a sensibilidade da técnica frente ao uso da atomização por chama (AMMANN, 2008). A seguir está representado um esquema de uma tocha de ICP (Figura 3).

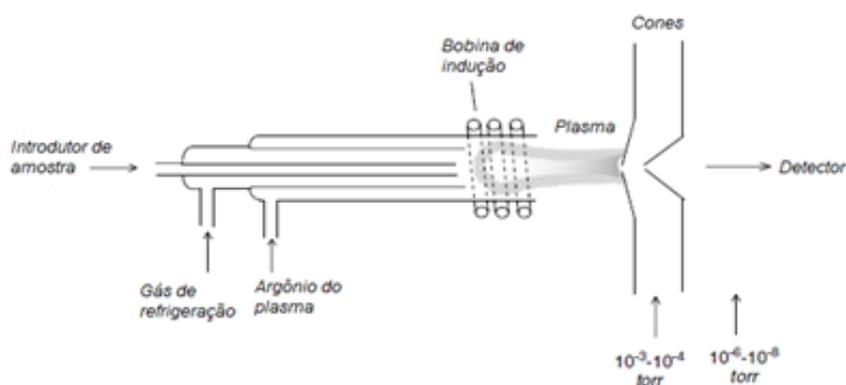


Figura 3 Esquema representativo de uma tocha geradora de plasma em um ICP-MS (Adaptado de AMMANN, 2008)

A tocha consiste em três tubos concêntricos de quartzo. O tubo mais interno conduz a amostra até o plasma, formado pelo argônio introduzido pelo tubo mais externo. Pelo tubo intermediário, é inserido gás para a refrigeração do sistema. Os íons formados no plasma são então direcionados para o cone de amostragem e skimmer, responsáveis pela transição entre a zona de pressão atmosférica e a de baixa pressão, formando um feixe de íons que é focalizado por diversas lentes internas e conduzido ao analisador de massas, geralmente do tipo *single quadrupole*. O analisador separa então os íons positivos pela razão massa/carga, cujos sinais são detectados e ampliados por um multiplicador de elétrons. Um esquema desse sistema está representado na **Figura 4** (NAGESWARA RAO; KUMAR TALLURI, 2007).

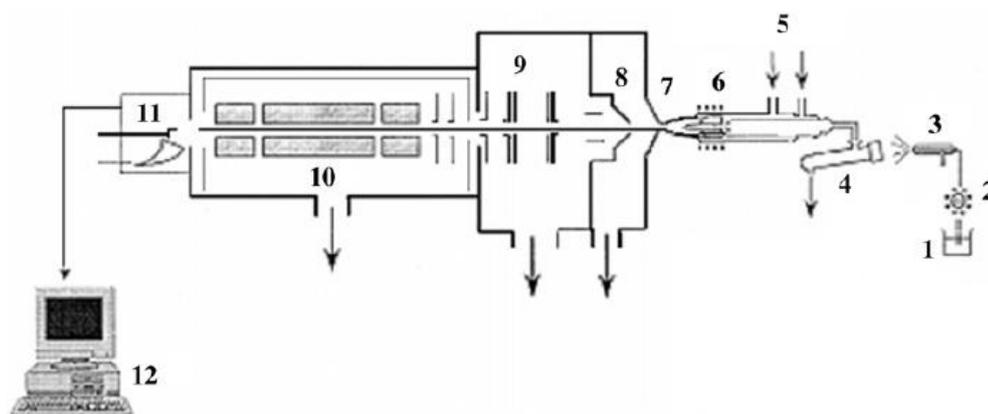


Figura 4 Esquema representativo de um ICP-MS, ilustrando suas partes principais: (1) amostra em solução; (2) bomba; (3) nebulizador; (4) câmara de spray; (5) entrada de Ar para o plasma e refrigeração; (6) bobinas de indução/ tocha; (7) cone de amostragem; (8) skimmer; (9) lentes focalizadoras; (10) analisador de massas tipo quadrupolo; (11) detector tipo multiplicador de elétrons; (12) coletor de dados (Adaptado de NAGESWARA; KUMAR, 2007)

Mesmo com todas as suas vantagens, esta técnica apresenta também algumas desvantagens, como o elevado custo de análise, tendo em vista o grande consumo de gás argônio, e a possibilidade de interferências espectrais e não espectrais (CADORE; MATOSO; SANTOS, 2008; DAMS; GOOSSENS; MOENS, 1995).

As interferências não espectrais estão relacionadas diretamente com a solução introduzida no equipamento, uma vez que suas características físico-químicas podem afetar o processo de transporte e nebulização da amostra, além de afetar o processo de ionização no plasma (DAMS; GOOSSENS; MOENS, 1995; GARCÍA-POYO *et al.*, 2015). Interferências espectrais são causadas pela formação de íons poliatômicos ou de dupla carga que possuem a mesma razão massa/carga dos analitos, ou até mesmo íons monoatômicos isobáricos. A composição da amostra é um fator significativo nesse tipo de interferência, pois diversas reações podem ocorrer no plasma, levando a formação desses íons poliatômicos (LUM; SZE-YIN LEUNG, 2016).

Estes efeitos podem causar o aumento ou a supressão de sinal do analito. Um preparo de amostras eficiente associado a estratégias instrumentais são alternativas para se

reduzir tais interferências (BARROS *et al.*, 2018; DAMS; GOOSSENS; MOENS, 1995; LUM; SZE-YIN LEUNG, 2016; TODOLÍ; MERMET, 1999).

1.3.1 Interferências não-espectrais

Uma vez sendo mais comum a introdução das amostras no ICP-MS por nebulização, estas precisam estar na forma de solução, e, para isso, um preparo de amostra adequado deve ser realizado. Como já discutido, esse preparo geralmente envolve a digestão utilizando uma mistura ácida oxidante e/ou complexante, a depender das características da matriz. Contudo, além da matriz, é necessário levar em consideração possíveis efeitos que o uso desses reagentes pode causar durante a análise, uma vez que as propriedades físico-químicas do digerido final podem resultar em interferências e/ou danos às partes do equipamento (BIZZI, C. A. *et al.*, 2017a).

1.3.1.1 Efeitos de transporte

Em comparação com água pura, soluções ácidas irão apresentar propriedades como densidade, viscosidade, tensão superficial e volatilidade bem distintas. Alterações nessas propriedades irão afetar o processo de transporte e nebulização da amostra, além da condução do aerossol na câmara de *spray* (TODOLÍ; MERMET, 1999).

Além das características físico-químicas da solução, o tipo de nebulizador e da câmara de *spray* também irão afetar o processo de nebulização. A **Figura 5** esquematiza o processo de formação da névoa em uma câmara de nebulização do tipo duplo passo (OLESIK *et al.*, 2021).

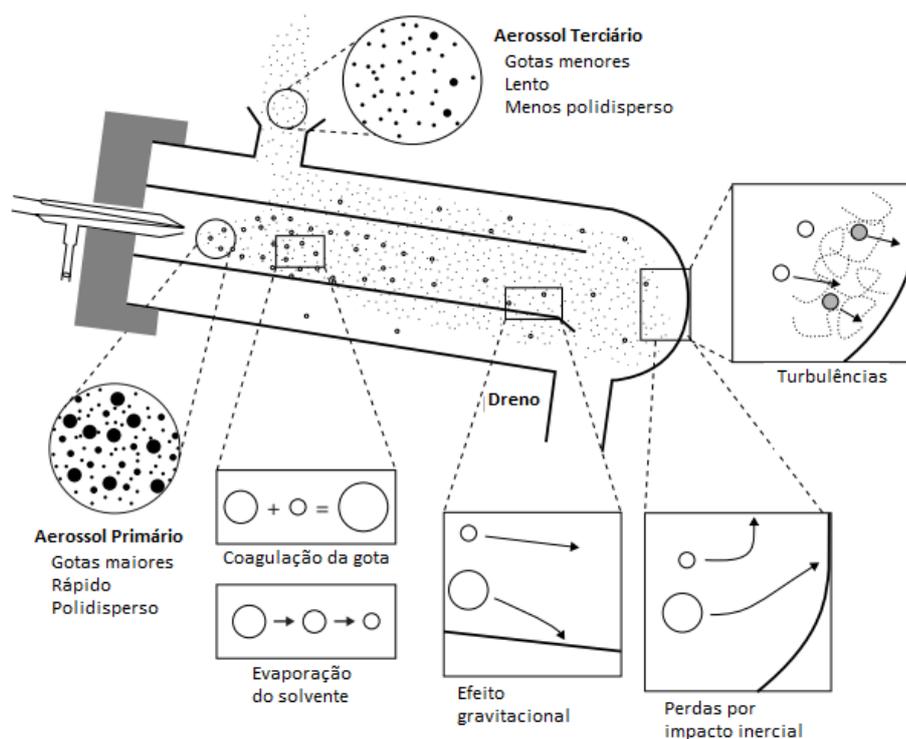


Figura 5 Sistema de nebulização convencional em um ICP. Este consiste em um nebulizador concêntrico pneumático e uma câmara de spray com dupla passagem (Adaptado de TODOLI; VANHAECKE, 2005)

Além do *design* do nebulizador e do fluxo do gás, o aerossol primário terá sua distribuição de tamanho de gotículas afetada pela viscosidade e tensão superficial do solvente, de modo que uma menor tensão superficial resulta em gotículas menores. O tamanho das gotículas do aerossol terciário será influenciado pela densidade e pela taxa de evaporação do solvente, este último diretamente relacionado com a pressão de vapor do mesmo (EVANS; GIGLIO, 1993). Estes efeitos podem ser diminuídos pelo uso de uma curva analítica feita a partir de uma matriz semelhante à matriz das amostras e pelo uso de padrões internos, elementos com características similares aos analitos em termos de massa e energia de ionização (DAMS; GOOSSENS; MOENS, 1995). É importante ressaltar que os fatores mencionados acima podem interferir também na eficiência de transporte do analito até o plasma, diminuindo a sensibilidade, e, portanto, é preciso ponderar o uso de reagentes viscosos, densos, pouco voláteis, sendo necessário otimizar também certos parâmetros instrumentais

(OLESIK *et al.*, 2021). A seguir é apresentada uma tabela com algumas propriedades de soluções de ácidos concentradas e diluídas (**Tabela 3**).

Tabela 3 Propriedades físico-químicas de alguns ácidos utilizados para digestão de amostras (Adaptado de TODOLÍ; MERMET, 1999)

Ácido	Concentração (% m/m)	Tensão superficial (mN m ⁻¹)	Viscosidade relativa à água	Densidade (g cm ⁻³)
Nítrico	4	72,15	1,014	1,022
Nítrico	30	68,75	1,397	1,180
Clorídrico	4	72,45	1,057	1,017
Clorídrico	30	65,75	1,896	1,149
Perclórico	4	71,18	0,879	1,018
Perclórico	30	68,57	1,170	1,207
Sulfúrico	4	75,21	1,083	1,029
Sulfúrico	30	75,29	2,250	1,122
Fosfórico	4	-	1,121	1,025
Fosfórico	30	-	2,995	1,180

Além das questões envolvendo o transporte do aerossol, um outro problema que pode ocorrer é a redução da temperatura no plasma devido à presença de teores elevados de solvente. Com isso, a ionização dos analitos pode ser afetada devido à formação de seus óxidos. Quedas de cerca de 400 K já foram relatadas com a introdução de HNO₃ 7,2 mol L⁻¹ (TODOLÍ; MERMET, 1999).

1.3.1.2 Efeitos de ionização

Além de efeitos de transporte, a eficiência da digestão também está relacionada à problemas envolvendo o processo de ionização. Diversos trabalhos já relataram alterações significativas nos sinais de diversos analitos quando na presença de carbono dissolvido na matriz. Pesquisas realizadas por Allain e colaboradores (1991) mostraram que os sinais pra Hg, As, Au e Se aumentaram em 600%, 240%, 325% e 250%, respectivamente, na presença de glicerol (1 mol L⁻¹ ou 36 g L⁻¹ de C). O aumento de sinal para esses analitos devido à presença de carbono na matriz foi também observado por Grindlay e colaboradores (2013). Além desse aumento, os

autores constataram também a supressão do sinal para elementos como Ba, Li, Mo, Pb, Mn, Co, Pd, Os, Pt, Cd e Zn.

Um dos mecanismos atribuídos à geração de íons no plasma acontece por meio de reações de transferência de carga entre os íons de Ar^+ e o analito M, de acordo com a equação (9) (FARNSWORTH *et al.*, 1999; GRINDLAY *et al.*, 2016; VAN DER MULLEN *et al.*, 1987).



Na equação (9), ΔE corresponde à diferença entre a energia de ionização do Ar e a soma das energias de ionização e excitação do analito M (FARNSWORTH *et al.*, 1999). Como consequência de um elevado teor de carbono dissolvido na matriz, resultado de uma digestão incompleta, pode ocorrer uma redução na população de íons Ar^+ disponíveis no plasma, uma vez que matéria orgânica demanda mais energia para ser atomizada/ ionizada. Desse modo, existe menos energia disponível para a ionização dos analitos, o que justificaria a supressão do sinal dos elementos supracitados. Grindlay e colaboradores (2013) mostraram uma redução de cerca de duas vezes no sinal dos íons de Ar^+ no plasma após aumentarem o teor de carbono de 0 para 30 g L⁻¹ na matriz.

Com relação ao aumento de sinal, este está relacionado às energias de ionização (EI) e excitação dos analitos destacados e ao fato de que estes elementos são considerados de difícil ionização (**Tabela 4**).

Tabela 4 Energia de ionização e grau de ionização estimado para alguns elementos (Adaptado de GRINDLAY *et al.*, 2013)

Elemento	Energia de ionização (eV)	Grau de ionização (%)
Ba	5,212	99
Li	5,392	100
In	5,786	99
Mo	7,092	98
Pb	7,417	97
Mn	7,434	95

Co	7,881	93
Pd	8,337	93
Os	8,438	78
Sb	8,608	78
Pt	8,959	62
Cd	8,994	85
Au	9,226	51
Zn	9,394	75
Se	9,752	33
As	9,789	52
S	10,360	14
Hg	10,438	38
I	10,451	29
P	10,487	33

A partir da **Tabela 4**, pode-se notar que os elementos Hg, As, Au e Se são os que apresentam maiores energias de ionização e menores graus de ionização calculados. Para que uma reação de transferência de carga ocorra, duas condições precisam ser respeitadas: a conservação do momento de *spin* do elétron e um ΔE (Eq. (9)) menor possível (CHAN; HIEFTJE, 2004; FARNSWORTH *et al.*, 1999).

As reações de transferência de carga ocorrem a partir da colisão entre as partículas no plasma. De acordo com a regra de Wigner, essa colisão é eficiente se o momento de *spin* do elétron é conservado (LEE; ENOS; BRENTON, 1991). Em termos de energias, é necessário que o analito possua um nível eletrônico com energia próxima à energia de ionização do Ar (15,76 eV) para que a transferência de carga seja eficiente. O mesmo deve ser aplicado para reações envolvendo carbono (11,26 eV). Tendo em vista o baixo grau de ionização dos elementos mencionados no plasma e a pequena diferença de EIs entre os mesmos e o C, quando existe uma quantidade de CRD significativo na matriz, reações de transferência de carga podem estar ocorrendo entre esses analitos (M) e íons de carbono (C^+ e CO^+ principalmente), gerando um aumento da população média de M^+ e conseqüentemente um aumento de sinal quando comparado às condições normais em meio aquoso. Considerando as menores energias de ionização dos demais elementos, estes são ionizados totalmente a partir de outros mecanismos (choque de elétrons, ionização de Penning), e esse

efeito de aumento de sinal não é observado devido às reações de transferência de carga (ALLAIN *et al.*, 1991; CHAN; HIEFTJE, 2004; FARNSWORTH *et al.*, 1999; GRINDLAY *et al.*, 2013).

1.3.2 Interferências espectrais

As interferências espectrais são aquelas em que ocorre a sobreposição de sinal entre os analitos e outros íons de mesma massa e/ou razão massa/carga (íons bivalentes), fazendo com que a concentração do elemento seja superestimada. Essas interferências podem ocorrer devido à presença de isótopos de diferentes elementos ($^{58}\text{Fe}^+$ e $^{58}\text{Ni}^+$, por exemplo), fenômeno conhecido como sobreposição isobárica, o que pode ser resolvido selecionando um isótopo diferente do analito, quando possível, ou a utilização de instrumentos de alta resolução. Esta é mais facilmente resolvida uma vez que já são conhecidos os diferentes isótopos de cada elemento, tornando este tipo interferência mais previsível (EVANS; GIGLIO, 1993; LUM; SZE-YIN LEUNG, 2016).

1.3.2.1 Interferências por íons de dupla carga

A formação de íons com dupla carga ocorre quando existem elementos com baixa segunda energia de ionização, geralmente abaixo de 15,76 eV, correspondente à primeira energia de ionização do Ar (PUPYSHEV; SEMENOVA, 2001; WILSCHEFSKI; BAXTER, 2019). Como mostrado na **Figura 6**, cerca de um terço dos elementos da tabela periódica apresentam uma tendência a formar íons bivalentes, fornecendo uma razão M^{2+}/M^+ [razão entre a intensidade do íon M (II) e do íon M (I)] significativa (PUPYSHEV; SEMENOVA, 2001).

1 H																	2 He	
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne	
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar	
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr	
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe	
55 Cs	56 Ba	57 La-Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn	
87 Fr	88 Ra	89 Ac-Lr																
			58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu		
			90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr		

Figura 6 Em cinza, elementos com maior probabilidade de formar íons duplamente carregados em um ICP (Adaptado de PUPYSHEV; SEMENOVA, 2001)

Uma vez que o analisador de massas irá detectar a razão massa/carga, a formação de íons duplamente carregados pode ser um problema, pois mesmo íons de massas diferentes podem sofrer sobreposição de sinal. Como exemplo tem-se o caso da determinação de Se na presença de Gd. O Gd geralmente é utilizado como reagente em exames clínicos por contraste. Em um estudo de caso realizado por Ryan e colaboradores (2014), ao analisar o plasma sanguíneo de um indivíduo, constataram um nível de $^{78}\text{Se}^+$ ($m/z = 78$) a níveis letais. Após informações de que o sujeito em questão havia sido submetido a um exame de ressonância magnética recentemente, concluíram que o nível de Se foi superestimado devido à formação de íons $^{156}\text{Gd}^{2+}$ ($m/z = 78$) durante a análise por ICP-MS.

A taxa de formação de íons bivalentes geralmente é checada antes das análises por ICP-MS a partir da introdução de uma solução *tuning*, utilizando como parâmetros íons de Ce ou Ba. A razão M^{2+}/M^+ considerada adequada deve ser $\leq 3\%$ (PUPYSHEV; SEMENOVA, 2001).

1.3.2.2 Interferências poliatômicas

Em se tratando das interferências poliatômicas, estas são as mais complicadas de lidar a depender do analito, tendo em vista que muitos já estão naturalmente presentes devido às características da técnica, como íons $^{80}\text{ArAr}^+$ formados no plasma. Sendo ^{40}Ar o isótopo mais abundante deste gás nobre, a análise de $^{80}\text{Se}^+$ é extremamente comprometida. Argônio apresenta também um isótopo ^{38}Ar , de modo que um dímero $^{78}[^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}]^+$ irá interferir também na determinação do isótopo $^{78}\text{Se}^+$ (WILSCHEFSKI; BAXTER, 2019).

Uma vez que a tocha se encontra à pressão atmosférica, a formação de íons poliatômicos a partir de elementos presentes no ar (N_2 , O_2) também pode ocorrer (VANHOE *et al.*, 1994). Como exemplos tem-se a formação de íons $^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, o qual pode interferir na determinação de $^{52}\text{Cr}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, isobárico do íon $^{56}\text{Fe}^+$ (LUM; SZE-YIN LEUNG, 2016).

Em termos de composição da matriz da amostra, é necessário um bom conhecimento do perfil elementar, pois assim é possível prever possíveis interferências e, se possível, trabalhar em estratégias para a sua redução. Alguns elementos são comuns em diversas matrizes orgânicas, como os cloretos (Cl^-), que apresenta dois isótopos: ^{35}Cl e ^{37}Cl . Uma das interferências mais críticas envolve a formação do íon $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, de mesma razão m/z que o íon $^{75}\text{As}^+$, dificultando a determinação desse analito quando na presença de elevadas concentrações de Cl^- no meio, tendo em vista que o As é monoisotópico (VANHOE *et al.*, 1994). A formação de óxidos e hidroxocomplexos também são possíveis interferentes, como o íon $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ e $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, os quais sobrepõem com os sinais de $^{53}\text{Cr}^+$ e $^{51}\text{V}^+$, respectivamente (D'ILIO *et al.*, 2011; VANHOE *et al.*, 1994). Nesses casos, é necessário também avaliar o uso de HCl como complexante durante o preparo de amostra, tendo em vista os elementos de interesse a serem analisados.

Considerando o preparo de amostra, é necessário reforçar a importância de se garantir uma digestão o mais eficiente possível, uma vez que a presença de CRD (carbono residual) pode também formar íons poliatômicos no plasma. Os principais

íons envolvendo carbono são CO^+ e COH^+ , compreendendo uma faixa de massa de 28-32 u.m.a. e interferindo nos isótopos de Si. Além desses, a formação de CO_2^+ ($m/z = 44$) pode interferir nas determinações de $^{44}\text{Ca}^+$ e ArC^+ , formando íons numa faixa de 48-53 a depender da combinação isotópica, interferindo nas análises de Ti^+ (isótopos 48 e 49) e Cr^+ (isótopos 52 e 53) (LUM; SZE-YIN LEUNG, 2016; VANHOE *et al.*, 1994).

Diversos outros elementos comumente presentes nas mais diversas matrizes também podem ser fontes de interferência. A presença de P, S, N, Ca, K, H entre outros também podem formar íons poliatômicos no plasma (**Quadro 1**) (LUM; SZE-YIN LEUNG, 2016; MCCURDY; POTTER; WOODS, 2006; VANHOE *et al.*, 1994).

Quadro 1 Principais espécies poliatômicas interferentes para alguns isótopos elementares (Adaptado de (MCCURDY; POTTER; WOODS, 2006)).

Isótopo	Principais espécies interferentes	Isótopo	Principais espécies interferentes
^{51}V	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, $^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}$	^{59}Co	$^{40}\text{Ar}^{18}\text{OH}$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}$
^{52}Cr	$^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}$, $^{37}\text{Cl}^{14}\text{NH}$	^{60}Ni	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}$
^{53}Cr	$^{36}\text{Ar}^{16}\text{OH}$, $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$, $^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{CH}$	^{61}Ni	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{OH}$, $^{38}\text{Ar}^{23}\text{Na}$, $^{23}\text{Na}^{37}\text{ClH}$
^{54}Fe	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}$, $^{40}\text{Ca}^{14}\text{N}$	^{63}Cu	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}$, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^{37}\text{Cl}$
^{55}Mn	$^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}$, $^{23}\text{Na}^{32}\text{S}$	^{64}Zn	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$, $^{32}\text{S}_2$, $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^{16}\text{O}$, $^{38}\text{Ar}^{12}\text{C}^{14}\text{N}$, $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}$
^{56}Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$	^{65}Cu	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2\text{H}$, $^{32}\text{S}_2\text{H}$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}$, $^{48}\text{Ca}^{16}\text{OH}$
^{57}Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{OH}$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{OH}$	^{66}Zn	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2$, $^{32}\text{S}^{34}\text{S}$, $^{33}\text{S}_2$, $^{48}\text{Ca}^{18}\text{O}$
^{58}Ni	$^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}$, $^{40}\text{Ca}^{18}\text{O}$, $^{23}\text{Na}^{35}\text{Cl}$	^{67}Zn	$^{32}\text{S}^{34}\text{SH}$, $^{33}\text{S}_2\text{H}$, $^{48}\text{Ca}^{18}\text{OH}$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{37}\text{Cl}$, $^{16}\text{O}_2^{35}\text{Cl}$
^{59}Co	$^{40}\text{Ar}^{18}\text{OH}$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}$	^{68}Zn	$^{32}\text{S}^{18}\text{O}_2$, $^{34}\text{S}_2$
^{60}Ni	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}$	^{69}Ga	$^{32}\text{S}^{18}\text{O}_2\text{H}$, $^{34}\text{S}_2\text{H}$, $^{16}\text{O}_2^{37}\text{Cl}$
^{61}Ni	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{OH}$, $^{38}\text{Ar}^{23}\text{Na}$, $^{23}\text{Na}^{37}\text{ClH}$	^{70}Zn	$^{34}\text{S}^{18}\text{O}_2$, $^{35}\text{Cl}_2$
^{63}Cu	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}$, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^{37}\text{Cl}$	^{71}Ga	$^{34}\text{S}^{18}\text{O}_2\text{H}$

1.3.3 Estratégias para correção de interferências

Durante as discussões prévias, algumas alternativas foram apresentadas no intuito de reduzir interferências não-espectrais e espectrais, como o uso de padrão interno e escolha de diferentes isótopos, quando disponível. Contudo, tais estratégias são

limitadas, uma vez que nem sempre um padrão interno irá se comportar exatamente como os analitos e muitos elementos possuem isótopos com baixa abundância, e outros ainda são monoisotópicos (EVANS; GIGLIO, 1993). Assim sendo, diversas propostas envolvendo abordagens instrumentais e não instrumentais podem ser encontradas na literatura.

Algumas dessas estratégias envolvem diretamente o preparo de amostra. Cairns e colaboradores (2011) utilizaram resina de troca catiônica para determinação de elementos do grupo da Pt em emissões de motores de veículos a *diesel*. Desse modo, conseguiram separar o analito da matriz, melhorando as análises. A extração de metais utilizando sistemas aquosos bifásicos é uma opção alternativa à extração por solvente ou ácidos, indo de encontro aos princípios da química verde, uma vez que este é composto majoritariamente por água e polímeros biodegradáveis (FONTANA *et al.*, 2015; KARMAKAR; SEN, 2019). Outros métodos de separação mais convencionais de extração líquido-líquido, extração sólido-líquido, precipitação, dentre outros também têm sido utilizados (WILSCHEFSKI; BAXTER, 2019). Todavia, é interessante ressaltar que tais abordagens podem reduzir a frequência analítica do método de análise, além de demandarem maior consumo de reagentes e aumentarem as chances de erros e contaminação das amostras (LUM; SZE-YIN LEUNG, 2016).

Nesse contexto, o uso de ácido nítrico diluído entra novamente como uma alternativa promissora, tendo em vista a obtenção de uma solução mais diluída, reduzindo assim possíveis interferências da matriz ácida e de outros componentes elementares da amostra. A aplicação desta abordagem juntamente com a compatibilização de matrizes em termos de acidez entre a curva analítica e amostra vem se mostrando eficaz (ARAÚJO *et al.*, 2002; BIZZI, C. A. *et al.*, 2017b; BIZZI, CEZAR A. *et al.*, 2011, 2014; DAMS; GOOSSENS; MOENS, 1995).

É possível também o uso de ferramentas matemáticas para a correção de interferências isobáricas. De maneira simplificada, as equações são construídas a partir da análise de um isótopo secundário do íon interferente e, a partir da abundância relativa, determina-se o sinal real do analito (WILSCHEFSKI; BAXTER, 2019).

Algumas estratégias instrumentais podem também ser aplicadas no intuito de se reduzir interferências. Como já mencionado, a introdução de uma solução *tuning* previamente à análise por ICP-MS já faz uma auto otimização do instrumento, de modo a reduzir a formação de óxidos e íons duplamente carregados. Isso é feito a partir de ajustes na potência de radiofrequência, distância do plasma dos cones de amostragem e fluxo de gás de nebulização (WILSCHEFSKI; BAXTER, 2019). Outros parâmetros instrumentais podem também ser otimizados, como a taxa de aspiração de amostra, que, juntamente com o gás de nebulização, pode ser utilizado para introduzir mais ou menos quantidade de amostra no plasma, podendo reduzir a quantidade de matriz e diminuindo seus efeitos (AGATEMOR; BEAUCHEMIN, 2011).

Alguns instrumentos de ICP-MS permitem também que seja feita uma diluição da névoa produzida na câmara de nebulização a partir da introdução de um gás diluente (Ar) na entrada da tocha. Com isso, tem-se também uma diminuição do teor de matriz que chega ao plasma, porém aumentando também os limites de detecção (LORENÇATTO; ARANTES DE CARVALHO; OLIVEIRA, 2020).

Atualmente, equipamentos de ICP-MS vem equipados com as chamadas células de reação/colisão (**Figura 7**). As células de colisão funcionam baseando-se no princípio de que após as colisões com moléculas de gás inerte (He), a energia cinética de íons atômicos diminui menos que a energia dos íons poliatômicos com a mesma massa. Uma barreira de potencial suficientemente alta impede que íons mais lentos cheguem ao detector, separando os analitos e diminuindo as interferências. Já nas células de reação, o analito reage com certo gás, geralmente H₂, O₂ ou NH₃, de modo a se obter um produto de massa diferente, sendo este então analisado, quando o analito reage, ou fazendo os íons poliatômicos reagirem, removendo o interferente isobárico (YAMADA, 2015).

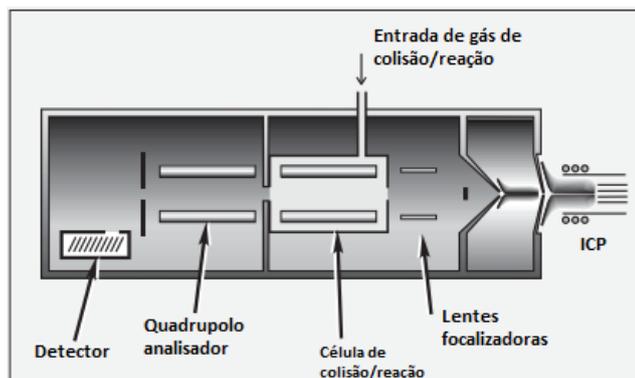


Figura 7 Esquema de um arranjo em ICP-MS contendo uma célula de colisão/reação (Adaptado de TANNER et al., 1999).

O desenvolvimento e aplicação da célula de reação/colisão possibilitou o acoplamento do ICP-MS com outro analisador de massas (ICP-MS/MS). Com isso, além de um aumento significativo na sensibilidade da técnica, uma maior seletividade também foi alcançada, tendo em vista a maior eficácia em eliminar interferentes (SUGIYAMA; SHIKAMORI, 2015). A seguir é apresentado um esquema de um sistema MS/MS, operando em dois modos, no intuito de remover a interferência de $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ na determinação de $^{80}\text{Se}^+$ (**Figura 8**)

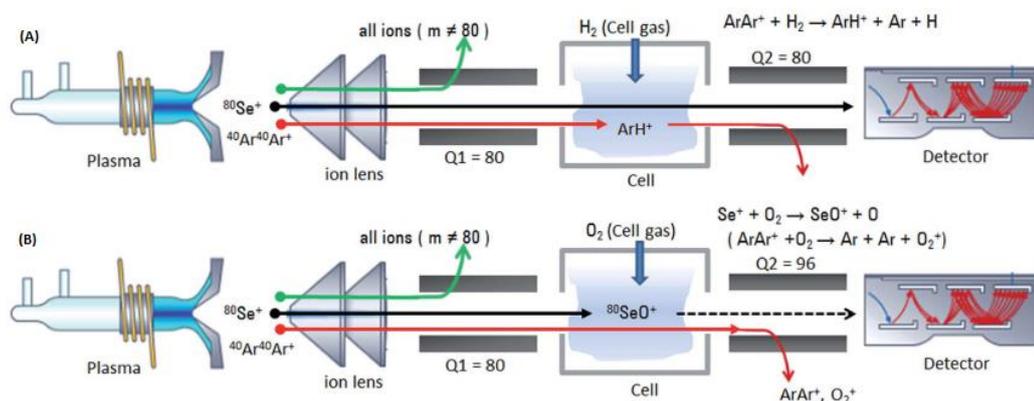


Figura 8 Esquema de um ICP-MS/MS atuando na remoção de interferente na determinação de $^{80}\text{Se}^+$ (Adaptado de SUGIYAMA; SHIKAMORI, 2015)

Nesse sistema, ambos os quadrupolos Q1 e Q2 são idênticos. O primeiro realiza a primeira separação de razão $m/z = 80$, direcionando o feixe de íons contendo analito ($^{80}\text{Se}^+$) e interferente ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$) para a célula de reação. Em (A), tem-se a reação do dímero $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ com H_2 , formando íons ArH^+ , de $m/z \neq 80$. Selecionando também m/z

= 80 em Q2, apenas os íons $^{80}\text{Se}^+$ chegarão ao detector (Método *on-mass*). Em (B), o analito reage com O_2 , formando um novo íon de $m/z = 96$ ($^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$). Seleccionando esta massa/carga em Q2, interferentes de $m/z = 80$ são excluídos e apenas o novo íon gerado para o analito é detectado (Método *mass-shift*) (SUGIYAMA; SHIKAMORI, 2015).

1.4 Novos desafios impostos pela USP <232> E USP <233>

A publicação dos novos capítulos da USP abriu diversas possibilidades dentro da área de preparo de amostras. Mesmo antes da publicação e conhecimento geral da USP <232> e <233>, em 2010, já se existiam pesquisas envolvendo a determinação de impurezas em medicamentos utilizando técnicas de ICP. Os métodos propostos pelas farmacopeias até então consistiam em testes semi-quantitativos, sem nenhuma especificidade, e a presença de “metais pesados” em fármacos já era uma preocupação, tendo em vista os possíveis efeitos tóxicos dos mesmos no organismo (NAGESWARA RAO; KUMAR TALLURI, 2007). Em seu trabalho publicado em 2004, 6 anos antes da publicação dos referidos capítulos da USP, Lewen e colaboradores (LEWEN *et al.*, 2004) propõem um método baseado na técnica de ICP-MS, avaliando diferentes solventes na solubilização de IFAs, para a determinação de elementos tóxicos, como Hg, As, Cd e Pb, além de alguns elementos do grupo da Pt, comumente utilizados como catalisadores na síntese dos princípios ativos. Os autores comparam os resultados obtidos pelo método proposto com o método de precipitação por sulfeto, o qual apresentou baixíssimas recuperações (<50%), enquanto o método de determinação por ICP-MS resultou em recuperações na faixa de 80-105% para todos os analitos. Desse modo, reforçam o quanto o método existente nas farmacopeias até então era ultrapassado e ineficaz, e concluem que, nesse contexto, faz-se necessário o uso de técnicas quantitativas, seletivas e sensíveis, tendo em vista os baixos níveis nos quais esses elementos tóxicos podem ser encontrados (LEWEN *et al.*, 2004).

Uma pesquisa pelos termos “USP elemental impurities” na base de dados do *Web of Science* fornece o gráfico de número de citações ao longo dos anos mostrado na

Figura 9. Como esperado, as primeiras menções tiveram início em 2011, pouco após a publicação dos novos capítulos, mostrando um aumento desse número com o passar dos anos.

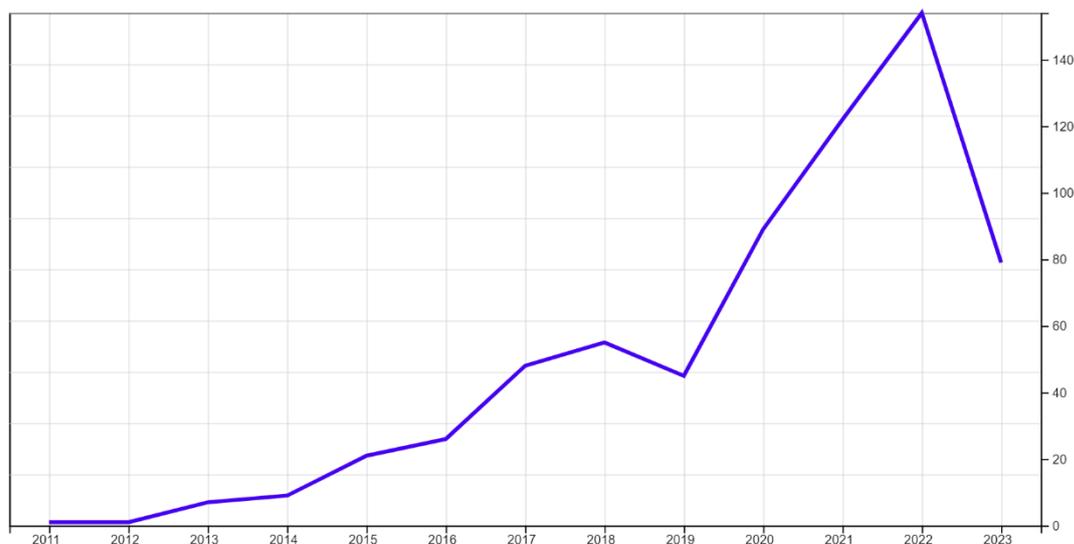


Figura 9 Número de citações do termo "USP elemental impurities" em artigos de acordo com a base de dados *Web of Science* (Acesso em: 15/06/2023)

Vanhaecke, van Hoecke e Catry (2012), propõem dois métodos de preparo de amostra seguidos pela análise por ICP-MS de IFAs orgânicos. Um dos métodos consistia em uma dissolução utilizando KBrO_3 0,009 mM em HNO_3 1% e análise direta (IFAs solúveis) e outro na digestão ácida com água régia assistida por micro-ondas (IFAs insolúveis). Os autores determinaram 18 analitos, dentre eles os 16 listados na USP <232> até então (As, Cd, Pb, Hg, V, Cr, Mn, Ni, Cu, Mo, Ru, Rh, Pd, Os, Ir e Pt) além de Fe e Zn. O instrumento de ICP-MS utilizado era equipado com uma célula de colisão-reação operada em conjunto com discriminante de energia cinética, e assim conseguiram determinar ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{56}Fe e ^{75}As com exatidão após eliminar seus interferentes poliatômicos. Para tal, utilizaram He como gás de colisão e H_2 como gás de reação. Os limites de detecção obtidos foram 10 vezes menores que os limites estabelecidos para medicamentos parenterais e uma recuperação entre 94-110% só foi obtida quando a calibração foi realizada por adição de padrão. Dentre os produtos

testados neste trabalho, todos apresentaram níveis abaixo do limite estabelecido pela USP.

Barin e colaboradores (2014) determinaram os metais tóxicos As, Cd, Hg e Pb em IFAs de carbamazepina (antiepilético), cloridrato de imipramina e cloridrato de amitriptilina (antidepressivos), compostos tricíclicos, por ICP-MS, avaliando diferentes métodos de digestão de amostra. A decomposição em mufla da amostra resultou em perdas significativas dos analitos por volatilização, não sendo, portanto, um método eficaz. A digestão assistida por micro-ondas com HNO₃ concentrado também foi avaliada, contudo uma digestão incompleta foi obtida, com resíduos sólidos alaranjados depositados nos frascos. Análises por ¹H RMN do precipitado mostraram indícios da adição de nitrogênio na cadeia cíclica de carbono, gerando um anel aromático muito estável e de difícil decomposição. Uma digestão completa só foi obtida com o uso de combustão induzida por micro-ondas (CIM) com HNO₃ diluído como solução coletora (CRD menor que 1%). A recuperação foi avaliada apenas para a CIM, pois foi a única que forneceu uma decomposição satisfatória da amostra, e ficou na faixa de 94-103% para todos os analitos.

Em 2015, Muller e colaboradores (MULLER *et al.*, 2015) compararam o método de digestão em micro-ondas convencional com a digestão em câmara de reação única (*single reaction chamber*, SRC) de IFAs de levodopa (doença de Parkinson), difosfato de primaquina (malária), cloridrato de propranolol (hipertensão) e sulfametoxazol (antibiótico). Foram avaliados também três reagentes na digestão: HNO₃ concentrado, água régia e água régia invertida, e os elementos Cd, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh e Ru foram determinados por ICP-MS no modo padrão e célula de reação dinâmica preenchida com amônia foi utilizada na determinação de ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵³Cr, ⁶³Cu e ⁶⁵Cu, eliminando assim seus interferentes poliatômicos. Arsênio e Hg foram determinados por geração de vapor acoplado ao ICP-MS. Na digestão assistida por micro-ondas convencional, foram testadas três massas para todos os IFAs, e apenas o ácido nítrico concentrado forneceu uma digestão sem resíduos sólidos para todos eles. Devido às maiores temperaturas atingidas no sistema de SRC, os autores notaram uma redução significativa nos teores de carbono residual nos IFAs estudados, utilizando também

apenas HNO_3 concentrado. O método foi então validado de acordo com a USP <233> para os analitos, exceto para Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru, os quais, segundo Muller, necessitam da presença de HCl para sua dissolução, e, portanto, para eles, o método foi validado utilizando água régia invertida. Todos os analitos apresentaram figuras de mérito satisfatórias, com exceção do Os, que apresentou uma recuperação acima de 160%, a qual foi atribuída a efeitos de memória.

A determinação do Os vem sendo um problema constante relatado na literatura. Chahrour e colaboradores (2017) e Pinheiro, Barros e Nóbrega (2019), ao contrário do que obteve o estudo apresentado anteriormente, aponta uma recuperação muito baixa desse elemento. Ambos atribuem essa perda à formação de compostos voláteis de óxidos de ósmio, sendo este perdido por volatilização durante a digestão. Os primeiros autores sugerem uma mistura de HCl 5% (v/v), ácido acético 0,1% (v/v), tioureia 0,076% (m/v) e ácido ascórbico 0,01% (m/v) como diluente para a solubilização de um IFA de antibiótico no intuito de estabilizar o Os. Segundo os autores, tal solução diluente foi eficiente não só para estabilização do Os, mas também de Pd e Hg, fornecendo uma exatidão e precisão satisfatória de acordo com os critérios da USP <233> para 15 elementos descritos na farmacopeia.

Mesmo com a baixa recuperação de Os, o trabalho de Pinheiro, Barros e Nóbrega (2019) traz observações relevantes para a área. De acordo com alguns trabalhos da literatura, a digestão incompleta de amostras pode ser um problema, uma vez que elementos podem ficar retidos no sólido formado, além do elevado teor de carbono dissolvido poder interferir nas análises envolvendo técnicas de ICP. Os autores então avaliaram a digestão de medicamentos assistida por micro-ondas utilizando HNO_3 diluído, gerando uma decomposição parcial das amostras, e concluíram não haver diferença estatística entre os resultados obtidos para esse preparo e aqueles para uma digestão completa da amostra, para a qual se fez necessário o uso de ácido nítrico mais concentrado ou água régia invertida. Além disso, apontam a eficiência no uso da célula de reação/ colisão na eliminação de interferentes e destacam as vantagens no uso do gás de diluição (modo HMI) para amostras com maior acidez e teor de sólidos dissolvidos, reduzindo assim a necessidade de maiores fatores de

diluição durante o preparo. Mais tarde, os autores publicaram um outro trabalho consistindo na aplicação desse método (digestão parcial com ácido nítrico diluído) na determinação de 23 IEs (exceto Os) em amostras de omeprazol, obtendo também resultados satisfatórios (PINHEIRO; BARROS; NÓBREGA, 2020).

No *website* da USP existem alguns guias técnicos envolvendo preparos de amostra em concordância com seu padrão de qualidade. Considerando a grande variabilidade em termos de matrizes de insumos farmacêuticos, um destes guias apresenta um procedimento de digestão o qual promete uma boa eficiência tanto para decomposição da matéria orgânica quanto inorgânica de medicamentos em concordância com os capítulos <232> e <233>. Este procedimento, no entanto, envolve o uso de uma mistura ácida concentrada de HNO₃, HCl, H₂SO₄ e HF (ZAIDI, 2019).

Por mais que os métodos de digestão e dissolução sejam considerados os mais eficientes no preparo desse tipo de matriz, estes ainda apresentam algumas desvantagens, como o uso de reagentes ácidos, geração de resíduos, baixa frequência analítica, além da introdução de possíveis contaminantes/ interferentes advindos de ácidos, peróxido, dentre outros. Com isso, a busca por métodos de análise mais simples, envolvendo o uso de menos reagentes, também vem crescendo nos últimos anos. Pluháček, Rucka e Maier (2019) utilizaram a técnica de *laser ablation* (LA) acoplada ao ICP-MS, permitindo a análise direta do comprimido sólido (GRAY, 1985). O método proposto pelos autores apresentou bons resultados para a determinação de Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, e Pt em produtos farmacêuticos sólidos fortificados em laboratório, com recuperações entre 83-118% e DPRs menores que 16%. Contudo, em se tratando de amostras reais, problemas como a falta de materiais de referência certificados e heterogeneidade das amostras são algumas desvantagens do uso do *laser ablation* na determinação de IEs em produtos farmacêuticos (PLUHÁČEK; RUČKA; MAIER, 2019).

Métodos de micro extração também vem se tornando de grande interesse devido à necessidade de uma quantidade mínima de amostra e reagentes. Aguiar e colaboradores (2017) desenvolveram e validaram um método para a determinação de

As, Cd, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Pd, Rh e V em IFAs de seis antibióticos e um antiparasitário utilizando micro extração assistida por ultrassom. O preparo foi realizado utilizando apenas 30 mg de amostra em 2 mL de HNO₃ 50% (v/v), sonificado por 2 min utilizando sistema de ultrassom de sonda com ponteira de titânio. As amostras fortificadas apresentaram uma recuperação na faixa de 70-101% para todas as amostras estudadas. Em seguida, foram analisados 7 IFAs por um método de referência utilizando digestão ácida assistida por micro-ondas e pelo método proposto. Um teste t foi aplicado ($\alpha=0,05$) e nenhuma diferença estatística foi observada, mostrando que de fato a extração assistida por ultrassom foi eficiente para estes analitos e amostras.

Considerando o grande número de analitos e os baixos níveis estipulados pela farmacopeia, o ICP-OES e ICP-MS são técnicas atrativas para a determinação de impurezas elementares, já que são técnicas sensíveis, multielementares e seletivas. Contudo, são técnicas que demandam um preparo de amostra eficiente, de modo a eliminar ou ao menos reduzir possíveis interferências causadas pela matriz (POHL *et al.*, 2018). Pinheiro e Nóbrega (2022) publicaram um *review* enumerando os principais procedimentos de preparo e análise utilizados para a determinação de IEs em produtos farmacêuticos. A seguir são apresentados dois gráficos (**Figura 10 e Figura 11**) que resumem procedimentos de preparo e as técnicas análise que vem sendo utilizadas, em função do número de trabalhos publicados.

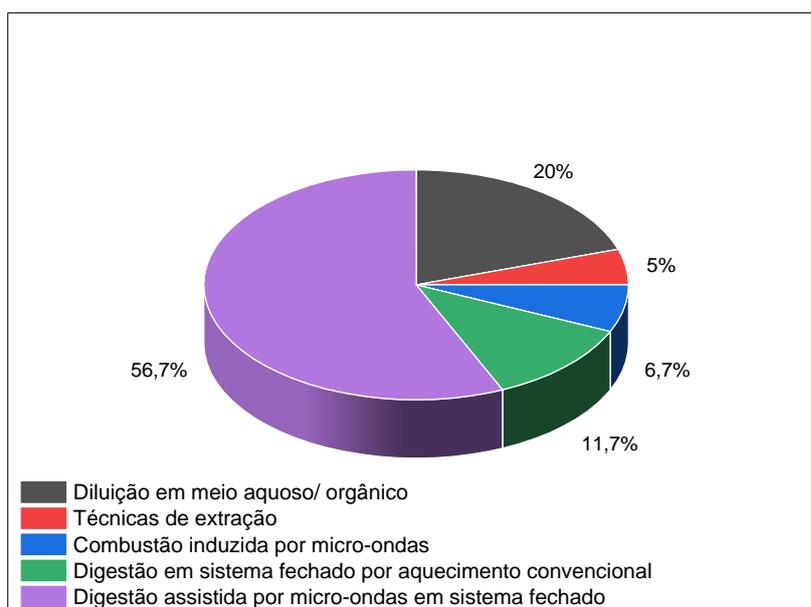


Figura 10 Principais procedimentos de preparo de amostra utilizados para análise de impurezas elementares em medicamentos, baseado no review publicado por Pinheiro e Nóbrega (2022)

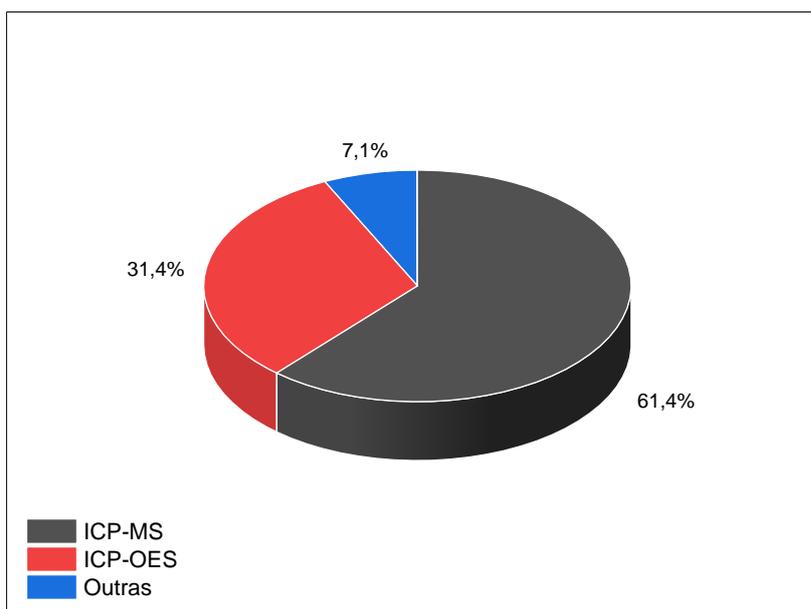


Figura 11 Principais técnicas analíticas utilizadas para a determinação de impurezas elementares em medicamentos, baseado no review publicado por Pinheiro e Nóbrega (2022)

Como pode-se perceber, de fato, o ICP-MS vem sendo a principal técnica utilizada na determinação de IEs, e um dos principais gargalos envolvendo essa determinação está no preparo de amostra. Métodos envolvendo digestão ainda são maioria, porém existe uma variabilidade enorme no que se trata da composição de um produto acabado e entre os próprios IFAs. Teores de matriz inorgânica (excipiente, IFA), concentração do princípio ativo e até a estrutura do mesmo são fatores que podem influenciar nessa digestão da amostra. Levando tudo isso em consideração, é comum que um mesmo procedimento de preparo de amostra não satisfaça dois medicamentos diferentes, sendo, portanto, uma linha de pesquisa importante dentro do setor de controle de qualidade de insumos farmacêuticos (GU *et al.*, 2021; MULLER *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar, validar e aplicar um novo método baseado na micro extração assistida por ultrassom para preparo das amostras de fármacos antidepressivos com quantificação por ICP-MS.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a eficiência de diferentes misturas ácidas na digestão de medicamentos na forma de comprimidos
- Validar um método de referência envolvendo digestão ácida

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Para as digestões, foram utilizados os ácidos HF 40% (m/m), H₂SO₄ 95-97% (m/m), HCl fumegante 37% (m/m), HNO₃ 65% (m/m) e H₂O₂ 30% (m/m), todos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para o preparo das curvas de calibração e fortificação das amostras, foram utilizadas 3 soluções de impurezas elementares de acordo com o ICH Q3D (oral) (Sigma-Aldrich, Buchs, Suíça). As composições de cada solução e as respectivas concentrações de cada elemento estão no **Quadro 2**.

Quadro 2 Composição e concentrações presentes nas 3 soluções de referência utilizadas neste trabalho

Standard 1 (ST1)			Standard 2 (ST2)			Standard 3 (ST3)		
Elemento	C/ mg kg ⁻¹	C/ mg L ⁻¹	Elemento	C/ mg kg ⁻¹	C/ mg L ⁻¹	Elemento	C/ mg kg ⁻¹	C/ mg L ⁻¹
Cd	4,68	5,00	Au	96,10	100,80	Li	53,10	54,90
Pb	4,68	5,00	Pd	96,10	100,80	Sb	115,90	119,90
As	14,05	15,00	Ir	96,10	100,80	Ba	135,30	139,90
Hg	28,11	30,01	Os	96,10	100,80	Mo	289,80	300,00
Co	46,80	50,00	Rh	96,10	100,80	Cu	289,90	300,00
V	93,70	100,00	Ru	96,10	100,80	Sn	580,00	599,00
Ni	187,40	200,10	Pt	96,10	100,80	Cr	1063,00	1099,00
Tl	7,49	8,00						
Se	140,50	150,00						
Ag	140,50	150,00						

Como padrões internos, foram utilizadas soluções estoque de Ga, Y, In e Dy 1000 mg L⁻¹ (Sigma-Aldrich, Buchs, Suíça)

Para o preparo das soluções e diluição das amostras foi utilizada água ultrapura (18,2 MΩ cm, Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.2 Amostras

37 amostras de comprimidos contendo fármacos antidepressivos foram analisados: bromidrato de citalopram (BC), n = 4; cloridrato de amitriptilina (CA), n = 2; cloridrato

de bupropiona (CB), n = 4; cloridrato de fluoxetina (CF), n = 5; cloridrato de nortriptilina (CN), n = 4; cloridrato de paroxetina (CP), n = 5; cloridrato de sertralina (CS), n = 8; cloridrato de venlafaxina (CV), n = 3; succinato de desvenlafaxina (SD), n = 1; oxalato de escitalopram (OE), n = 1 (Anexo A) Estas amostras foram obtidas a partir de doação pela Polícia Federal ou adquiridas em farmácias locais com receita médica em Belo Horizonte, MG. Para a avaliação das misturas ácidas para digestão, foi utilizado comprimidos de CB, pela sua maior quantidade. Para a validação do método de referência, foi utilizado um *pool* de amostras contendo cetorolaco de trometamina (CT) (anti-inflamatório) e SD (1:1), também pela quantidade limitada das amostras. Para a otimização e validação do método de microextração assistida por ultrassom, amostras de multivitamínicos (MV1, MV2 e MV3) (Anexo B) foram adquiridas no mercado local.

3.3 Instrumentação

As amostras foram previamente trituradas com pistilo e almofariz de ágata e em seguida moídas em moinho de bolas (CryoMill, Retsch, Haan, Alemanha), utilizando quatro bolas de teflon, numa frequência de 25 MHz por 10 min e pesadas em balança analítica (AUW220D, Shimadzu, São Paulo-SP, Brasil). A digestão foi realizada em forno de micro-ondas (Milestone, ETHOS, modelo 1) com rotor de capacidade para 10 frascos de alta pressão (modelo HPR 1000/10). Um sistema de ultrassom do tipo *cup horn* (Sonics VCX 505, Newtown, CT, USA) foi utilizado para o método de microextração. Centrifugações foram realizadas em centrífuga para microtubos a 12000 rpm por 5 min (QUIMIS, modelo 0222E24, Diadema, SP, Brasil).

As análises foram realizadas por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Agilent 7700 series, Agilent Technologies, Japão), equipado com célula de reação/colisão. 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 são mostrados na **Tabela 5**. Análises semiquantitativas foram realizadas por fluorescência de raios-x por reflexão total (TXRF) (PICOFOX S2, Bruker, Alemanha).

Tabela 5 Parâmetros instrumentais de análise de medicamentos por ICP-MS

Parâmetro	Condição instrumental
Potência RF ^a	1550 W
Fluxo do gás de arraste (<i>Carrier gas</i>)	1,09 L min ⁻¹ (<i>no gas</i>); 1,20 L min ⁻¹ (<i>He mode</i>)
RF da célula de colisão	190 V (<i>no gas</i>); 200 V (<i>He mode</i>)
Fluxo de He	4,7 mL L ⁻¹
Velocidade da bomba	0,5 rpm
Medições	
Varreduras	100
Replicatas	3
Resolução	<1
Isótopos	
“He-mode”	⁵¹ V, ⁵² Cr, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶³ Cu, ⁷⁵ As, ⁷⁶ Se, ⁷⁸ Se, ⁸² Se, ⁹⁵ Mo, ¹⁰¹ Ru, ¹⁰³ Rh, ¹⁰⁵ Pd, ¹⁰⁷ Ag, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁸ Sn, ¹²¹ Sb, ¹³⁷ Ba, ¹⁹⁰ Os, ¹⁹³ Ir, ¹⁹⁵ Pt, ¹⁹⁷ Au, ²⁰⁰ Hg, ²⁰⁵ Tl, ²⁰⁸ Pb
Modo de análise	(PIs) ⁸⁹ Y, ¹⁶² Dy
“No gas-mode”	⁷ Li

3.4 Método de digestão ácida assistida por micro-ondas

3.4.1 Avaliação de diferentes misturas ácidas na digestão de uma amostra de antidepressivo

Para avaliar as três misturas ácidas, cerca de 200 mg de amostra de CB foram pesados em tubos de PFA para digestão em forno de micro-ondas com cavidade, onde foram adicionados os respectivos reagentes conforme a mistura a ser estudada (**Tabela 6**). Uma triplicata de amostra (AmF) e uma duplicata de branco para controle (BrC), contendo apenas os reagentes da digestão, foram fortificadas com 20 µL de ST1, 20 µL de ST2 e 200 µL de ST3 (nível J). Após um período de 15 min de pré-digestão, os frascos foram fechados e levados para o forno de micro-ondas, cujo programa é mostrado na **Figura 12**.

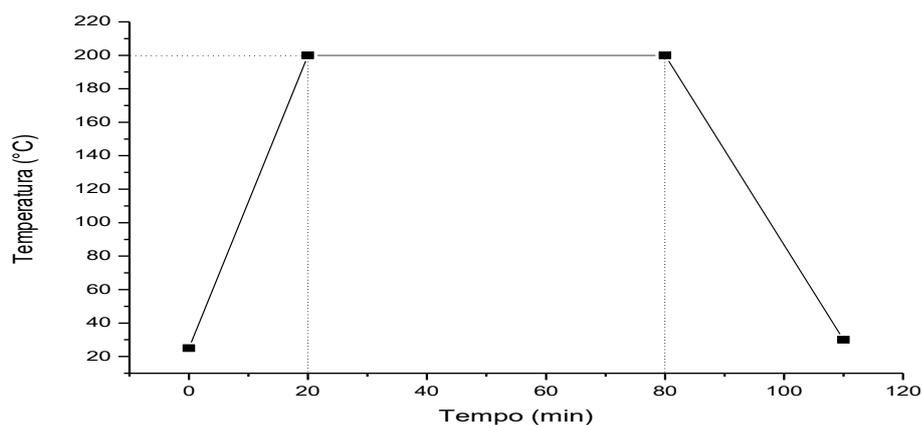


Figura 12 Programa de aquecimento utilizada na digestão das amostras no forno de micro-ondas

Os digeridos foram transferidos quantitativamente para frascos de polietileno de 50,0 mL e os volumes completados para os respectivos valores determinados para cada digestão. Previamente à análise, alíquotas foram novamente diluídas em microtubos utilizando diferentes fatores de diluição (**Tabela 6**), todas levadas a um volume final de 2,00 mL. Para o maior fator de diluição, os volumes foram completados utilizando solução acidificada de acordo com o teor ácido final obtido com o menor fator de diluição. Por fim, as soluções foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 min e levadas para análise por ICP-MS. Durante a análise, foi adicionada uma solução de padrão interno contendo os elementos ^{70}Ga , ^{89}Y , ^{115}In e ^{162}Dy na concentração de 10 $\mu\text{g/L}$. Esta foi introduzida a partir de um sistema em fluxo. Detalhes de cada digestão são mostrados na **Tabela 6**.

Tabela 6 Misturas ácidas utilizadas em cada digestão realizada para medicamentos

Digestão 1 (D1) ^{a,b}	Digestão 2 (D2) ^b	Digestão 3 (D3) ^b
<ul style="list-style-type: none"> • 2,0 mL H₂SO₄ • 1,0 mL HF • Aguardar 15 min • 4,0 mL HCl • 3,0 mL HNO₃ • Aguardar 15 min • Volume final: 50,0 mL • Alíquota diluída: 1 mL 	<ul style="list-style-type: none"> • 3,5 mL HNO₃ conc. • Aguardar 15 min • 3,5 mL água ultrapura • 1,0 mL H₂O₂ • Volume final: 25,0 mL • Alíquota diluída: 1 mL 	<ul style="list-style-type: none"> • 7,0 mL HNO₃ conc. • Aguardar 15 min • 1,0 mL H₂O₂ • Volume final: 25,0 mL • Alíquota diluída: 0,5 mL

^a Mistura ácida recomendada em publicação *online* no endereço eletrônico da USP

^b Para os analitos de ST3, devido aos maiores níveis, uma diluição de 100x de todos os digeridos foi realizada

Para a análise do sólido obtido em D1 por TXRF, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante vertido em outro frasco e o precipitado recolhido em microtubos. Em seguida, 10 mg do mesmo foram pesados em outro microtubo, onde se adicionou 20 μL de solução de Ga a 10 mg/L e o volume completado para 200 μL com água ultrapura. Por fim, 10 μL da suspensão foi aplicada em suportes de amostra de quartzo e levados para análise no equipamento, com fonte de Mo, a uma voltagem de 50 kV e corrente de 600 μA , durante 500 s.

3.5 Validação de método de digestão – Digestão D2

A validação do método de digestão foi realizada de acordo com o guia descrito no capítulo USP<233> da *United States Pharmacopeia* (USP, 2018b).

3.5.1 Preparo das amostras

Foram pesados 200 mg do *pool de medicamentos* em frascos de PFA para forno de micro-ondas, e realizou-se os procedimentos descritos para a digestão 2 (D2) – ácido nítrico diluído na presença de peróxido de hidrogênio.

Para avaliação das figuras de mérito, as amostras foram fortificadas previamente à digestão utilizando as soluções padrão ST1, ST2 e ST3. Digeridos foram avolumados para 25,0 mL e um fator de diluição de 2 vezes foi utilizado para análise dos elementos presentes em ST1 e ST2 e um fator de 50 vezes para os elementos contidos em ST3.

Foi adicionado uma solução de padrão interno contendo os elementos ^{89}Y e ^{163}Dy , com concentração final no digerido de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.5.2 Linearidade

As curvas de calibração foram construídas a partir de diluições das soluções ST1, ST2 e ST3 em ácido nítrico 7% v v⁻¹. Ao todo foram preparados 7 níveis de concentração, nos níveis 0, 0,5J, 0,75J, 1J, 1,25J, 1,5J e 1,75J. Os valores de J para cada elemento estão na **Tabela 7** a seguir. O modelo foi construído a partir do método dos mínimos quadrados ordinários e o coeficiente de determinação (R^2) foi calculado.

Tabela 7 Valores de J estipulados para o método de digestão

IE	J/ $\mu\text{g L}^{-1}$	IE	J/ $\mu\text{g L}^{-1}$
Cd	2,00	Rh	40,00
Pb	2,00	Ru	40,00
As	6,00	Se	60,00
Hg	12,00	Ag	60,00
Co	20,00	Pt	40,00
V	40,00	Li	8,80
Ni	80,00	Sb	19,20
Tl	3,20	Ba	22,40
Au	40,00	Mo	48,00
Pd	40,00	Cu	48,00
Ir	40,00	Sn	96,00
Os	40,00	Cr	176,00

3.5.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir de ensaios de adição e recuperação. Para isso, foram preparadas amostras fortificadas em 3 níveis (0,5J, J e 1,5J) cada nível em triplicata, sendo estas posteriormente digeridas e analisadas pelo método proposto. A recuperação foi então calculada a partir de (10):

(10)

$$\%Rec = \frac{C_{obt} - C_{am}}{C_{fort}} \times 100$$

Nesta equação, C_{obt} corresponde à concentração determinada após a análise, C_{am} é a concentração encontrada nas amostras sem fortificação e C_{fort} se refere à concentração fortificada.

3.5.4 Precisão

O estudo da precisão do método consistiu na avaliação da repetitividade (análises *intra dia*) e da precisão intermediária (análises *inter dias*)

A repetitividade foi avaliada a partir do desvio padrão relativo (DPR) de 6 amostras fortificadas no nível J e submetidas ao procedimento de digestão. Para a precisão intermediária, 6 amostras fortificadas também no nível J foram preparadas e analisadas uma semana após as 6 primeiras e o DPR foi calculado considerando os dois grupos (N=12).

3.5.5 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Para o cálculo dos LDs e LQs para cada elemento, foi utilizado o desvio padrão do sinal de 10 brancos analíticos de digestão, preparados de forma independente. A determinação dos limites da técnica foi feita a partir de (11).

(11)

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{b}$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b}$$

Nestas equações, s corresponde ao desvio padrão do sinal analítico de 10 brancos e b o coeficiente angular da equação linear respectiva a cada analito.

Para os limites do método, utilizou-se as expressões em (12).

(12)

$$LD_{metodo} = \left[(LD \times f_{diluição}) \times V_1 \right] / m_{amostra}$$

$$LQ_{metodo} = \left[(LQ \times f_{diluição}) \times V_1 \right] / m_{amostra}$$

Nestas equações, LD e LQ correspondem aos limites da técnica calculados anteriormente, $f_{diluição}$ é o fator de diluição utilizado, V_1 é o volume final do digerido em litros (L) e $m_{amostra}$ é a massa de amostra utilizada no método em gramas (g).

3.6 Microextração assistida por ultrassom

3.6.1 Otimização

Uma otimização univariada foi realizada no intuito de avaliar 3 misturas ácidas: ácido nítrico diluído ($2,87 \text{ mol L}^{-1}$) – MIX 1; água régia invertida ($3 \text{ HNO}_3:1\text{HCl}$) – MIX 2; e $\text{HNO}_3:\text{HF}$ ($9:1 \text{ v v}^{-1}$) – MIX 3. Cerca de 30 mg de 3 amostras de multivitamínico MV1, MV2 e MV3, previamente analisadas pelo método de referência validado, foram pesados individualmente em microtubos e 200 μL da mistura ácida concentrada foi adicionada, deixando reagir por 20 min. Para o MIX 3, 20 μL de HF foram adicionados, deixou-se reagir por 5 min, e em seguida 180 μL de HNO_3 foram adicionados, deixando reagir por mais 15 min. Após o tempo de reação, 800 μL de água ultrapura foi adicionado ($V_f = 1,0 \text{ mL}$) e levado para o sistema de ultrassom do tipo *cup horn* operando a 500 W e 20 kHz por 15 min. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi recolhido. Uma alíquota de 400 μL foi recolhida, solução de PI contendo ^{89}Y e ^{163}Dy foi adicionada (concentração final de 50 $\mu\text{g/L}$), o volume completado para 2,5 mL com água ultrapura e levada para a análise por ICP-MS. As concentrações obtidas para cada amostra em cada mistura foram comparadas com as concentrações obtidas na digestão para se determinar uma mistura extratante satisfatória.

3.6.2 Validação

Para a validação, cerca de 30 mg de amostra de MV3 (amostra em que foram encontrados níveis praticamente nulos dos analitos – “amostra branca”) foram pesados em microtubos e fortificados com ST1, ST2 e ST3 nos níveis 0,5J, 1J e 1,5J. Foram validados os métodos utilizando o MIX 1 e MIX 3, seguindo o mesmo procedimento descrito na otimização. A linearidade foi avaliada com 7 níveis de concentração, sendo eles 0, 0,3J, 0,4J, 0,8J, 1,3J, 1,7J e 2,1J (**Tabela 8**), preparados na mesma matriz ácida de cada mistura avaliada, a regressão foi calculada pelo método dos mínimos quadrados ordinários e o coeficiente de determinação (R^2) foi avaliado. A exatidão, precisão (intra e inter-dia), LD e LQ foram determinados utilizando o mesmo procedimento de validação para o método de referência. Padrões

internos e parâmetros instrumentais utilizados foram os mesmos descritos anteriormente.

Tabela 8 Valores de J estipulados para o método de micro extração

IE	J/ $\mu\text{g L}^{-1}$	IE	J/ $\mu\text{g L}^{-1}$
Cd	2,40	Rh	48,00
Pb	2,40	Ru	48,00
As	7,20	Se	72,00
Hg	14,40	Ag	72,00
Co	24,00	Pt	48,00
V	48,00	Li	13,20
Ni	96,00	Sb	28,80
Tl	3,84	Ba	33,60
Au	48,00	Mo	72,00
Pd	48,00	Cu	72,00
Ir	48,00	Sn	144,00
Os	48,00	Cr	264,00

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como discutido, a avaliação do procedimento de digestão de uma amostra previamente à análise é de extrema importância, tendo em vista as consequências que uma decomposição incompleta da matéria orgânica pode trazer às determinações por técnicas de ICP. No intuito de atender as normas da USP<232> e USP<233>, tal avaliação se torna ainda mais importante, considerando o grande número de analitos, suas baixas concentrações e variabilidade e complexidade das matrizes. Tudo isso faz com que o preparo de amostras de insumos farmacêuticos para a determinação de IEs se torne um desafio dentro da área da química analítica.

4.1 Comparação entre diferentes misturas ácidas na digestão assistida por micro-ondas (MW) de comprimidos de CB¹

4.1.1 Aspecto dos digeridos

A primeira digestão (D1) foi realizada utilizando uma mistura de ácidos concentrados constituída por HF, H₂SO₄, HCl e HNO₃, método sugerido em documento *online* publicado no *website* da *United States Pharmacopeia* (USP)(ZAIDI, 2019). A solução resultante do procedimento está representada na **Figura 13**.

¹ Devido à ausência de recursos analíticos (técnica instrumental, reagentes), as comparações dos digeridos foram feitas apenas de forma visual.

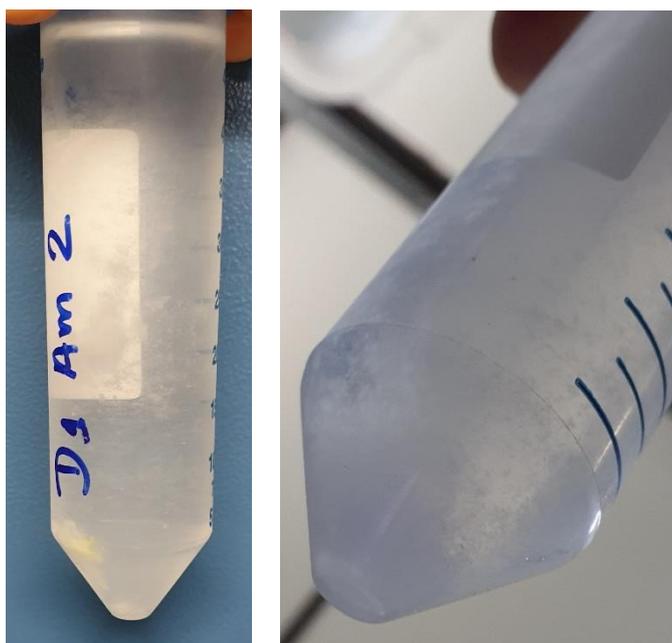


Figura 13 Digerido obtido na D1, com a utilização de quatro ácidos concentrados

Como pode ser observado, a solução apresenta-se incolor, indicando boa eficiência de decomposição da matéria orgânica da amostra (PINHEIRO; BARROS; NÓBREGA, 2019). Contudo, nota-se também a formação de um corpo de fundo branco, o que pode ser indício de possíveis resíduos inorgânicos, resultantes dos excipientes no comprimido, como o dióxido de silício, e/ou precipitação de sulfatos, cloretos e fluoretos com baixa constante de solubilidade.

A segunda digestão foi realizada utilizando HNO_3 diluído na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Segundo trabalho realizado por Araújo e colaboradores (2002), o ácido diluído pode ser mais eficiente na digestão de matéria orgânica, produzindo uma solução de acidez residual menor e, conseqüentemente, diminuindo a necessidade de se utilizar altos fatores de diluição para a redução da acidez.

A **Figura 14** mostra o digerido obtido após o processo de digestão utilizando ácido diluído.

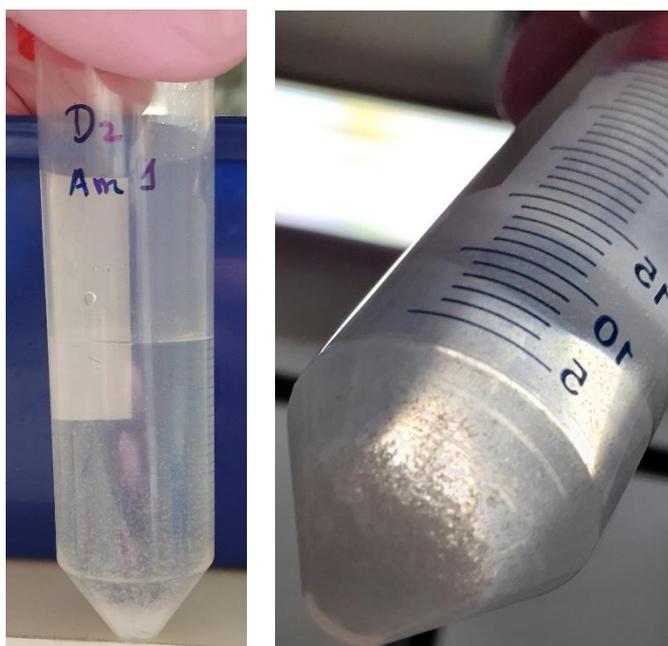


Figura 14 Soluções resultantes após segunda digestão (D2) em meio contendo ácido nítrico diluído ($7,0 \text{ mol L}^{-1}$) na presença de peróxido de hidrogênio

Uma solução semelhante obtida na D1 foi também obtida na D2, indicando que, a nível de decomposição de matéria orgânica, aparentemente esta última se mostrou tão eficiente quanto a anterior. Tal observação pode ser considerada um fator positivo para o preparo deste tipo de amostra, uma vez que o uso de ácidos concentrados implica em maior periculosidade para o analista, principalmente em se tratando de HF, e na necessidade de maiores fatores de diluição, o que resulta em maiores limites de quantificação para o método. Além disso, reduz a possibilidade de possíveis danos às partes internas do instrumento, além de diminuir a viscosidade da solução, minimizando erros sistemáticos durante a análise (FIALHO *et al.*, 2012).

Mesmo aparentando uma boa eficiência de decomposição da matéria orgânica, considerando a cor resultante da solução, ainda se nota um precipitado branco no fundo do tubo, semelhante àquele observado no digerido de D1. Contudo, considerando que em D2 não foram adicionados ácidos fontes de ânions geradores de sais insolúveis, tal precipitado de fato pode se tratar de resíduos inorgânicos, como silicatos presentes como excipiente e/ou de sais orgânicos insolúveis, não decompostos no processo.

Na 3ª digestão (D3) foi utilizado HNO_3 concentrado na presença de peróxido de hidrogênio. A solução resultante é mostrada na **Figura 15**:

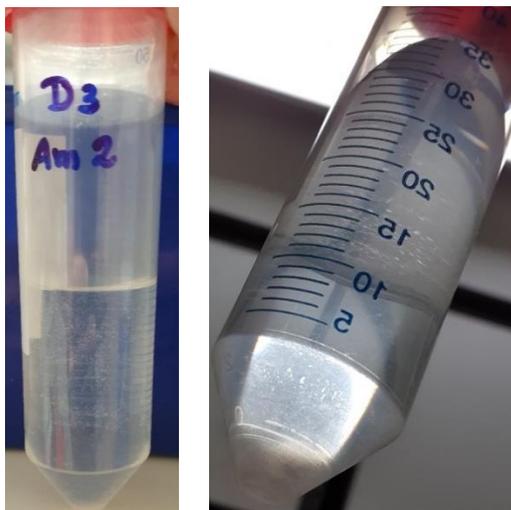


Figura 15 Digerido obtido utilizando ácido concentrado (14 mol L^{-1}) na presença de peróxido de hidrogênio

Com relação à cor da solução, assim como nas outras digestões, essa apresentou-se incolor, indicando também uma boa eficiência na decomposição da matéria orgânica. Além disso, nota-se uma menor formação de corpo de fundo, o que pode ser um indício de uma melhor decomposição dos excipientes, pelo uso do ácido nítrico concentrado.

A fim de uma melhor comparação dos procedimentos realizados, foram realizadas fortificações no intuito de comparar os desvios padrão relativos (DPR) e recuperações. Os resultados são mostrados a seguir.

4.1.2 Avaliação da recuperação, precisão (DPR), e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) das misturas ácidas utilizadas

Para a avaliação da exatidão e precisão, as amostras foram fortificadas no nível J de cada elemento alvo (*oral permitted daily exposure – EDP*)(USP, 2018a, b) ($n=3$), e a recuperação e desvio padrão relativos (DPR) foram calculados. Os resultados obtidos para a recuperação são mostrados na **Figura 16**:

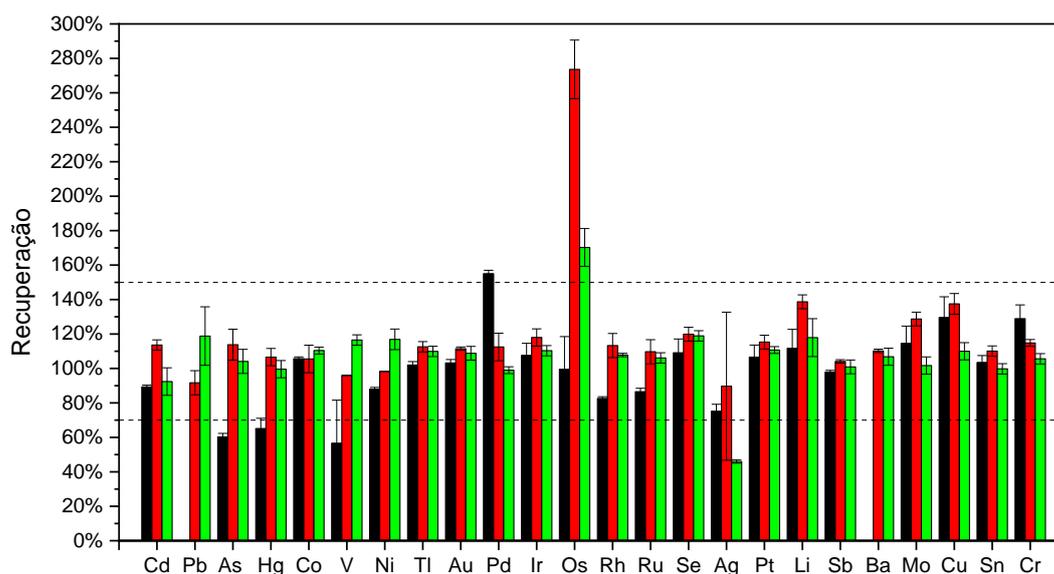


Figura 16 Gráfico de barras com as recuperações para cada elemento alvo, destacando os limites de aceite de acordo com USP 233. (■) D1; (■) D2; (■) D3.

Dentre as 3 misturas ácidas, a mistura contendo quatro ácidos concentrados não apresentou recuperações satisfatórias para alguns elementos, como As, Hg, V e Pd. Além disso, os elementos Pb e Ba não foram detectados nas amostras fortificadas. Uma possível explicação é a formação de sais insolúveis tendo em vista a presença de íons sulfato, cloreto e fluoreto, provenientes dos ácidos adicionados no meio reacional. Chumbo e Ba formam sais como o sulfato de bário ($pK_s = 9,97$) e fluoreto de chumbo ($pK_s = 7,48$)(DEAN, 1999), os quais podem estar presente no corpo de fundo observado no digerido final.

No intuito de verificar a presença desses dois elementos no precipitado, este foi analisado por fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF). Uma análise semiquantitativa foi realizada e o espectro obtido está representado na **Figura 17**:

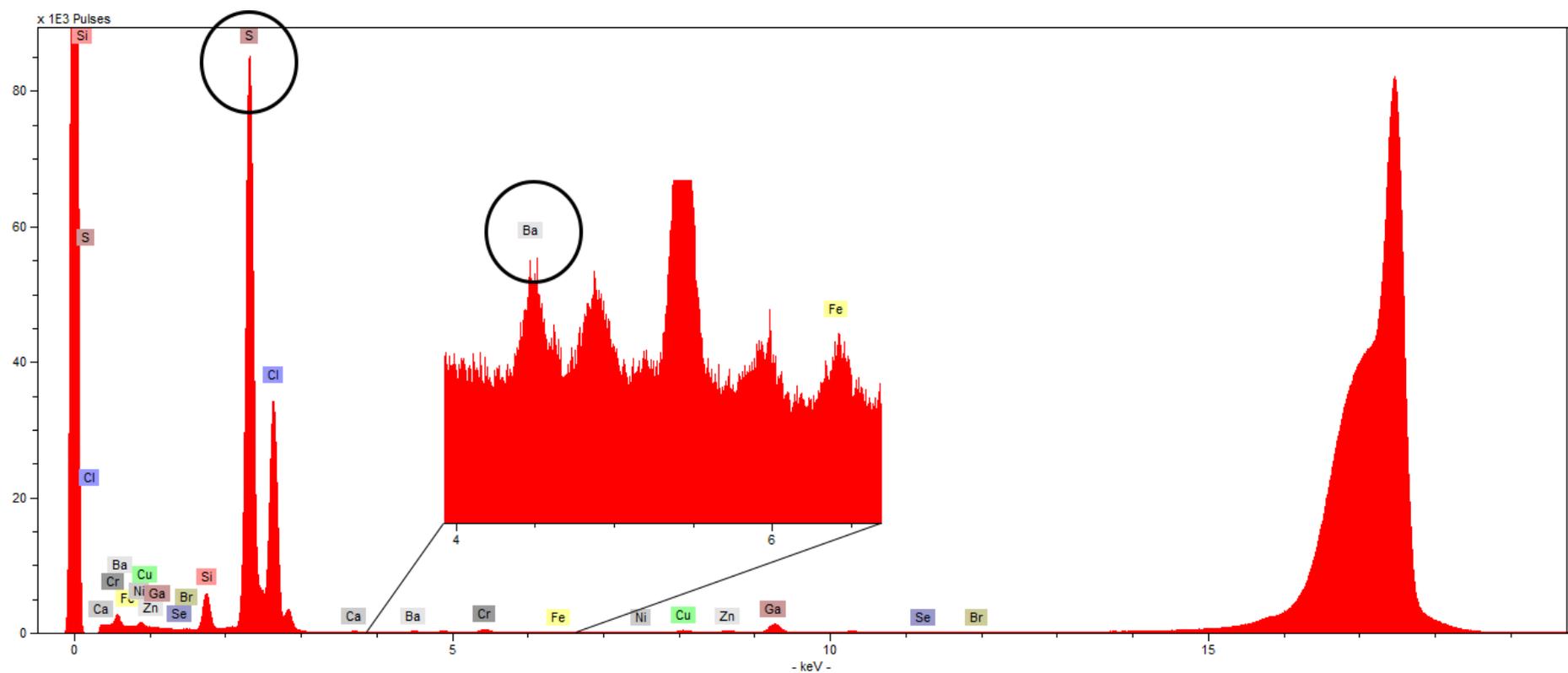


Figura 17 Espectro obtido por TXRF do sólido residual observado na amostra fortificada em D1. O Ga foi adicionado como padrão interno (1 mg/L)

Foi detectada a presença de Ba no precipitado na amostra fortificada, o que reforça a ideia de que este analito foi precipitado pela presença de algum ânion, provavelmente o sulfato, uma vez que seu sal de bário apresenta elevado pKs (9,97) e o enxofre também foi observado no espectro de TXRF do resíduo de D1, em alta concentração.

O Pb não foi detectado, porém tal fato pode estar relacionado à pequena concentração adicionada na fortificação (na ordem de $1 \mu\text{g L}^{-1}$), estando abaixo do limite de detecção do TXRF para este elemento.

Uma vez que o precipitado foi também observado na amostra sem fortificação, este foi analisado semiquantitativamente por TXRF, no intuito de se comparar o perfil elementar com o sólido obtido no digerido fortificado. O espectro obtido é mostrado na **Figura 18**:

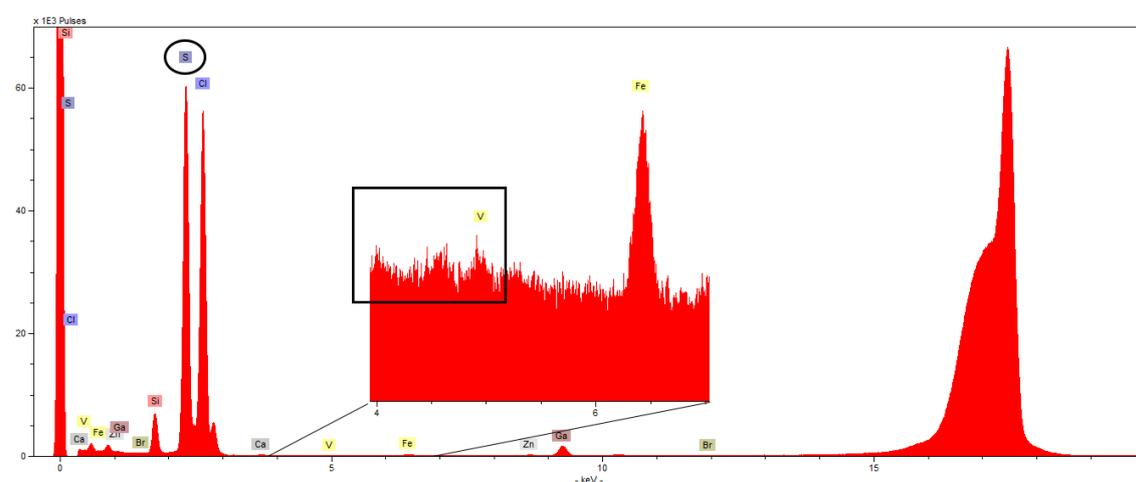


Figura 18 Espectro obtido por TXRF do sólido residual observado na amostra em D1. O Ga foi adicionado como padrão interno (1 mg/L)

A partir do espectro, pode-se perceber a ausência de Ba no sólido residual observado no digerido referente à amostra sem fortificação. Desse modo, pode-se concluir que, de fato, o Ba foi precipitado e por isso não foi detectado nas amostras fortificadas na D1.

Em se tratando das digestões D2 e D3, ambas apresentaram recuperações satisfatórias para praticamente todos os elementos. Apenas o Os apresentou limites superiores ao recomendado pela USP 233 (USP, 2018b), podendo estar ocorrendo

interferências do dímero ^{95}Mo - ^{94}Mo ou do hidreto $^1\text{H}^{188}\text{Os}$ (MassHunter®, Agilent) ou efeitos de memória (MULLER *et al.*, 2015), e a Ag que apresentou recuperações relativamente baixas, provavelmente devido às interferências envolvendo equilíbrios com íons cloreto (DEAN, 1999).

Para avaliação da precisão obtida para os diferentes procedimentos de digestão, o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado e plotado no gráfico mostrado na **Figura 19**, para cada analito:

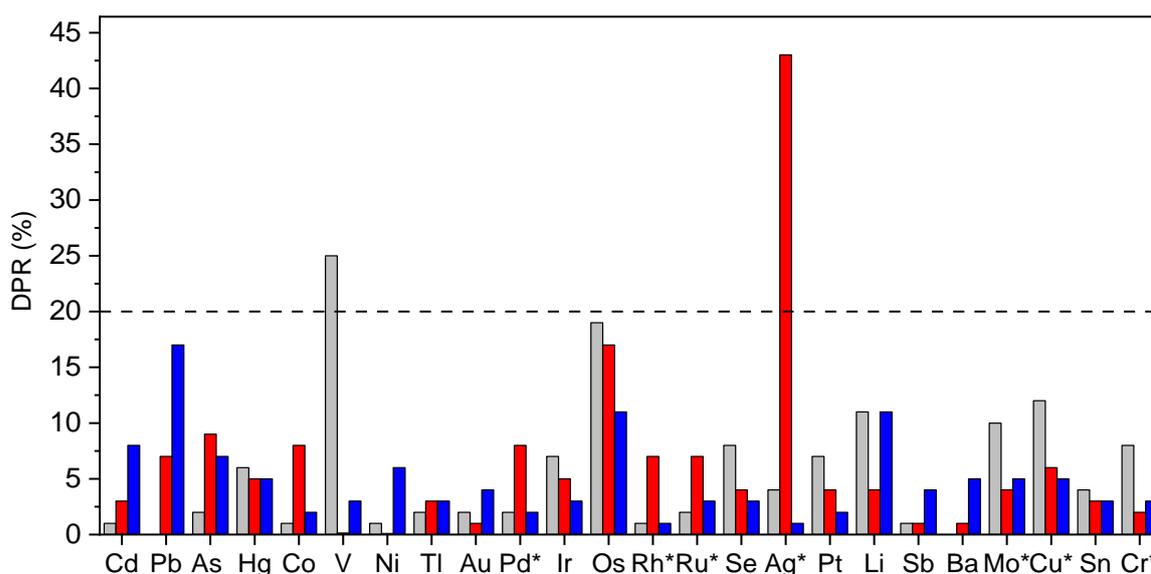


Figura 19 Desvios padrão relativos (DPR) para cada analito em cada digestão. A linha tracejada indica o limite aceito pela USP 233 (20%). (■) D1; (■) D2; (■) D3

De forma geral, os analitos apresentaram DPR abaixo do limite aceitável, indicando uma boa repetitividade em todas as digestões. Apenas a Ag, na digestão D2, apresentou um desvio elevado, podendo estar relacionado com possíveis equilíbrios, como já mencionado.

Foram também calculados os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), os quais foram comparados aos valores de J (administração oral) para cada elemento. Os resultados estão mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 9 Comparação de LDs e LQs determinados para os 24 elementos analisados nas três digestões realizadas com diferentes misturas ácidas e valores de J

Elemento	LD/ $\mu\text{g g}^{-1}$			LQ/ $\mu\text{g g}^{-1}$			J/ $\mu\text{g g}^{-1}$
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	
Cd	0,002	0,008	0,001	0,005	0,023	0,004	0,50
Pb	0,018	0,022	0,022	0,055	0,066	0,067	0,50
As	0,011	0,016	0,003	0,033	0,049	0,009	1,50
Hg	0,005	0,010	0,011	0,017	0,029	0,032	3,00
Co	0,002	0,002	0,007	0,007	0,006	0,022	5,00
V	0,027	0,008	0,029	0,081	0,025	0,086	10,00
Ni	0,236	0,749	0,151	0,714	2,271	0,458	20,00
Tl	0,002	0,0002	0,0003	0,007	0,001	0,001	0,80
Au	0,017	0,015	0,014	0,051	0,047	0,044	10,00
Pd	0,049	0,032	0,338	0,150	0,096	1,025	10,00
Ir	0,0003	0,001	0,002	0,001	0,002	0,005	10,00
Os	0,033	3,699	0,281	0,100	11,210 ^a	0,851	10,00
Rh	0,005	0,003	0,024	0,015	0,008	0,073	10,00
Ru	0,050	0,002	0,010	0,151	0,005	0,031	10,00
Se	0,092	0,029	0,094	0,280	0,089	0,285	15,00
Ag	0,072	0,004	0,038	0,218	0,011	0,114	15,00
Pt	0,0004	0,001	0,003	0,001	0,002	0,010	10,00
Li	0,029	0,005	0,009	0,087	0,017	0,027	55,00
Sb	0,029	0,001	0,019	0,088	0,003	0,057	120,00
Ba	ND	0,039	0,162	ND	0,118	0,492	140,00
Mo	0,171	2,103	0,227	0,520	6,371	0,687	300,00
Cu	12,082	1,352	0,708	36,613	4,097	2,147	300,00
Sn	0,016	0,007	0,080	0,050	0,020	0,244	600,00
Cr	0,447	0,113	0,032	1,354	0,342	0,097	1100,00

^aLQ acima do valor de J

De maneira geral, os limites foram satisfatórios para as três misturas ácidas utilizadas, considerando os valores de J. Contudo, alguns elementos apresentaram problemas, como o Ba, cuja curva de calibração não apresentou ajuste adequado devido à possível precipitação do mesmo na forma de sulfato em D1 e do Os, que apresentou um LQ superior ao seu valor de J em D2. Este último, observando o valor de concentração calculado para os brancos, notou-se que os valores decrescem à medida que estes foram sendo analisados, o que pode ser um indício de uma possível

contaminação no sistema de introdução de amostra, a qual foi sendo eliminada no decorrer da análise, corroborando com a ideia de um efeito de memória.

Os valores de LD e LQ variaram entre as digestões e analitos, mas de maneira geral, a mistura utilizada em D2 apresentou menores limites para um maior número de analitos, quando comparada às outras digestões. Com exceção do Os, o uso de ácido nítrico diluído se mostrou eficiente na digestão da amostra de comprimido, com boas recuperações e baixos desvios padrão. Além disso, gera um digerido com menor teor de acidez, necessitando de menores fatores de diluição, gerando menos resíduos, o que contribui para os princípios da química verde (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Considerando o que foi observado, o uso da digestão assistida por MW com utilização de ácido nítrico diluído na presença de peróxido de hidrogênio (D2) será utilizado como método de referência para o desenvolvimento de novos métodos neste trabalho.

4.2 Validação do método de referência – Digestão D2

4.2.1 Digestão das amostras

Tendo em vista a ausência de material de referência certificado e a variabilidade encontrada dentre as amostras (excipientes e princípios ativos), utilizou-se um *pool*, no intuito de se obter uma amostra mais representativa, os quais foram fortificados com soluções padrão. Levando em conta a pouca quantidade de amostra e a dificuldade em se obter antidepressivos comercialmente, uma vez que necessitam de prescrição médica, utilizou-se amostras grátis de um anti-inflamatório, doado por um representante comercial de uma farmacêutica, considerando a similaridade em termos de matriz inorgânica/ excipientes, juntamente com amostras de antidepressivo succinato de desvenlafaxina (SD1), na proporção de 1:1. A composição das amostras se encontra no Anexo C.

Após a digestão (**Figura 20**), notou-se uma solução final límpida, indicando boa eficiência de decomposição da matéria orgânica (PINHEIRO; BARROS; NÓBREGA, 2019). Percebe-se também a formação de um sólido branco, possível resíduo de material inorgânico oriundo dos excipientes utilizados nos comprimidos.

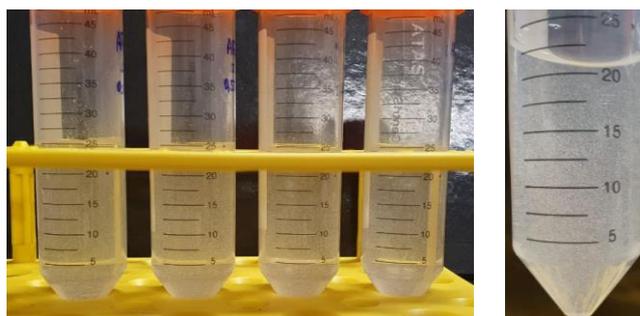


Figura 20 Amostras digeridas utilizando HNO₃ diluído na presença de H₂O₂

4.2.2 Validação

Segundo o capítulo USP<233> (USP, 2018b), as figuras de mérito a serem avaliadas são a exatidão, repetitividade (*intra dia*) e precisão intermediária (*inter dia*). De acordo com o guia, parâmetros como linearidade, LD e LQ serão válidos caso os resultados de exatidão estiverem dentro da faixa de aceite proposta. Contudo, no intuito de se ter uma melhor avaliação do método, a linearidade foi avaliada de acordo com o coeficiente de determinação (R^2) e os limites de detecção e quantificação foram determinados tanto para a técnica quanto para o método, de acordo com as Equações (11) e (12) descritas anteriormente. Importante ressaltar que os isótopos e padrões internos foram selecionados a partir das análises realizadas nos experimentos de avaliação de misturas ácidas. Os resultados estão representados na **Tabela 10** e **Tabela 11**.

Tabela 10 Parâmetros obtidos para os 24 analitos quanto à linearidade.

111 Cd / 115 In		208 Pb / 163 Dy		75 As / 89 Y		200 Hg / 163 Dy	
R^2	0,9917	R^2	0,9998	R^2	0,9937	R^2	0,9992
Inclinação	0,0477	Inclinação	0,5046	Inclinação	0,0108	Inclinação	0,0567
Intercepto	0,0109	Intercepto	0,0592	Intercepto	0,0037	Intercepto	0,0144
59 Co / 89 Y		51 V / 89 Y		60 Ni / 89 Y		205 Tl / 163 Dy	
R^2	0,9994	R^2	0,9996	R^2	0,9997	R^2	0,9983
Inclinação	0,1425	Inclinação	0,0549	Inclinação	0,0400	Inclinação	0,3785
Intercepto	-0,0366	Intercepto	-0,0273	Intercepto	0,0437	Intercepto	-0,0126
103 Rh / 89 Y		102 Ru / 89 Y		78 Se / 89 Y		107 Ag / 89 Y	
R^2	0,9999	R^2	0,9999	R^2	0,9865	R^2	0,9932
Inclinação	0,4873	Inclinação	0,1706	Inclinação	0,0005	Inclinação	0,0983
Intercepto	-0,1089	Intercepto	-0,0378	Intercepto	-0,0009	Intercepto	0,0248
197 Au / 163 Dy		105 Pd / 89 Y		193 Ir / 163 Dy		190 Os / 163 Dy	

R^2	0,9994	R^2	0,9997	R^2	0,9997	R^2	0,9984
<i>Inclinação</i>	0,3019	<i>Inclinação</i>	0,1025	<i>Inclinação</i>	0,4461	<i>Inclinação</i>	0,2428
<i>Intercepto</i>	-0,1730	<i>Intercepto</i>	-0,0128	<i>Intercepto</i>	4,3197	<i>Intercepto</i>	-0,3263
195 Pt / 163 Dy		7 Li		121 Sb / 89 Y		138 Ba / 89 Y	
R^2	0,9998	R^2	0,9996	R^2	0,9997	R^2	0,9995
<i>Inclinação</i>	0,1711	<i>Inclinação</i>	1398,0181	<i>Inclinação</i>	0,0067	<i>Inclinação</i>	0,0148
<i>Intercepto</i>	0,0090	<i>Intercepto</i>	420,5488	<i>Intercepto</i>	0,0002	<i>Intercepto</i>	-0,0011
98 Mo / 89 Y		63 Cu / 89 Y		118 Sn / 89 Y		52 Cr / 89 Y	
R^2	0,9997	R^2	0,9997	R^2	0,9996	R^2	0,9998
<i>Inclinação</i>	0,0110	<i>Inclinação</i>	0,0130	<i>Inclinação</i>	0,0049	<i>Inclinação</i>	0,0084
<i>Intercepto</i>	0,0002	<i>Intercepto</i>	0,0125	<i>Intercepto</i>	-0,0037	<i>Intercepto</i>	-0,0001

Tabela 11 Limites de detecção e quantificação expressos em $\mu\text{g/L}$ (instrumental) e $\mu\text{g/g}$ (método), comparado com a concentração máxima permitida de acordo com a USP 232.

Analito	LD		LQ		CMP¹
	$\mu\text{g/L}^2$	$\mu\text{g/g}^3$	$\mu\text{g/L}^2$	$\mu\text{g/g}^3$	$\mu\text{g/g}$
Cd	0,64	0,16	1,93	0,48	0,50
Pb	0,25	0,06	0,77	0,19	0,50
As	0,15	0,04	0,46	0,12	1,50
Hg	0,27	0,07	0,82	0,21	3,00
Co	0,12	0,03	0,36	0,09	5,00
V	0,03	0,01	0,10	0,03	10,00
Ni	1,11	0,28	3,37	0,84	20,00
Tl	0,004	0,001	0,01	0,003	0,80
Au	0,33	0,08	0,99	0,25	10,00
Pd	0,04	0,01	0,13	0,03	10,00
Ir	0,45	0,11	1,37	0,34	10,00
Os	3,13	0,78	9,49	2,37	10,00
Rh	0,03	0,01	0,10	0,02	10,00
Ru	0,15	0,04	0,47	0,12	10,00
Se	2,14	0,53	6,48	1,62	15,00
Ag	0,33	0,08	1,00	0,25	15,00
Pt	0,02	0,01	0,07	0,02	10,00
Li	0,06	0,39	0,19	1,18	55,00
Sb	0,05	0,30	0,15	0,91	120,00
Ba	0,09	0,57	0,28	1,72	140,00
Mo	0,10	0,62	0,30	1,89	300,00
Cu	0,15	0,92	0,45	2,80	300,00
Sn	0,10	0,64	0,31	1,95	600,00
Cr	0,06	0,35	0,17	1,06	1100,00

1 Concentração máxima permitida (dose diária de 10g/dia do medicamento)

2 LD e LQ instrumental

3 LD e LQ para o método

Em se tratando da linearidade, apenas o Se apresentou $R^2 < 0,99$, justificado pelo alto índice de interferências espectrais e a baixa sensibilidade para este analito, como mencionado anteriormente (JAGTAP; MAHER, 2016). Contudo, os resultados de recuperação e exatidão obtidos para este analito (Figura 24) foram satisfatórios logo, segundo descreve a USP 233, a linearidade do método está dentro da conformidade (USP, 2018b).

Os limites de detecção e quantificação, de forma geral, foram satisfatórios se comparados aos valores de CMPs estipulados pela USP 232 considerando uma dose diária de 10 g. Sendo assim, o método apresenta sensibilidade adequada para a detecção e quantificação de IEs em medicamentos, inclusive para doses diárias inferiores, uma vez que, nesses casos, as CMPs são maiores. Devido ao uso de um isótopo menos abundante, o limite de quantificação para Cd está um pouco acima do primeiro ponto da curva, tendo em vista a menor sensibilidade para este elemento. Contudo, o LQ para o método ainda está abaixo da CMP estabelecida para esta IE, logo, mesmo com menor sensibilidade, o método ainda é adequado para a determinação deste analito.

A seguir são apresentados os dados obtidos para o estudo da exatidão, em que a recuperação dos 24 elementos está representada na **Figura 21**.

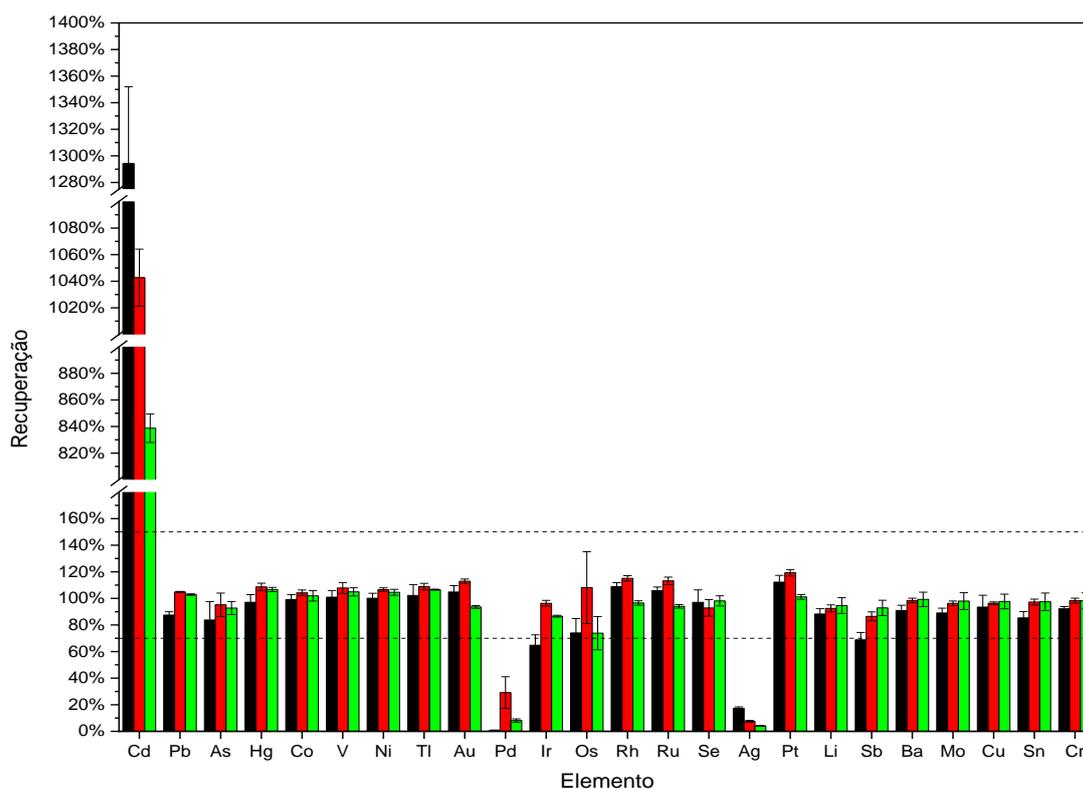


Figura 21 Estudo de adição e recuperação realizado em 3 níveis - (■) 0,5J; (■) 1J; (■) 1,5J (n = 3), no intuito de avaliar a exatidão do método de digestão. As linhas tracejadas indicam a faixa de aceite (70-150%).

Considerando o intervalo de aceite proposto pelo capítulo USP 233 (70-150 %), apenas 3 analitos apresentaram problemas críticos durante a validação. Foi obtida uma recuperação abaixo de 30% para a Ag e Pd, ao passo que para o Cd a concentração determinada após a digestão foi cerca de 130 vezes maior que o valor adicionado.

Os valores mais baixos para Ag foram também observados em experimentos anteriores, e podem ser justificados por possíveis equilíbrios envolvendo íons cloreto ($\beta_1=3,04$) (DEAN, 1999) presentes na composição dos fármacos utilizados nos experimentos.

Pensando nisso, foi realizado um experimento em que se manteve fixa a concentração de Ag (60 $\mu\text{g/L}$), e variou-se o teor de cloreto em solução. As soluções foram

preparadas utilizando uma matriz branca digerida (*pool* sem fortificação) (N=3 para cada amostra distinta) e para a curva analítica fez-se o uso de ácido nítrico 7% (v/v), a fim de corresponder à acidez final do digerido, e adicionou-se também uma concentração aproximada de 0,01 mol/L de HCl, no intuito de avaliar se a presença de cloreto na curva corrigiria os efeitos deste ânion na amostra. Fez-se também soluções de Ag em meio aquoso, com a mesma acidez do digerido, porém sem a matriz, com o objetivo de comparar e verificar alguma outra possível interferência da matriz na determinação deste analito. Na **Figura 22** se encontram os resultados obtidos em termos de recuperação.

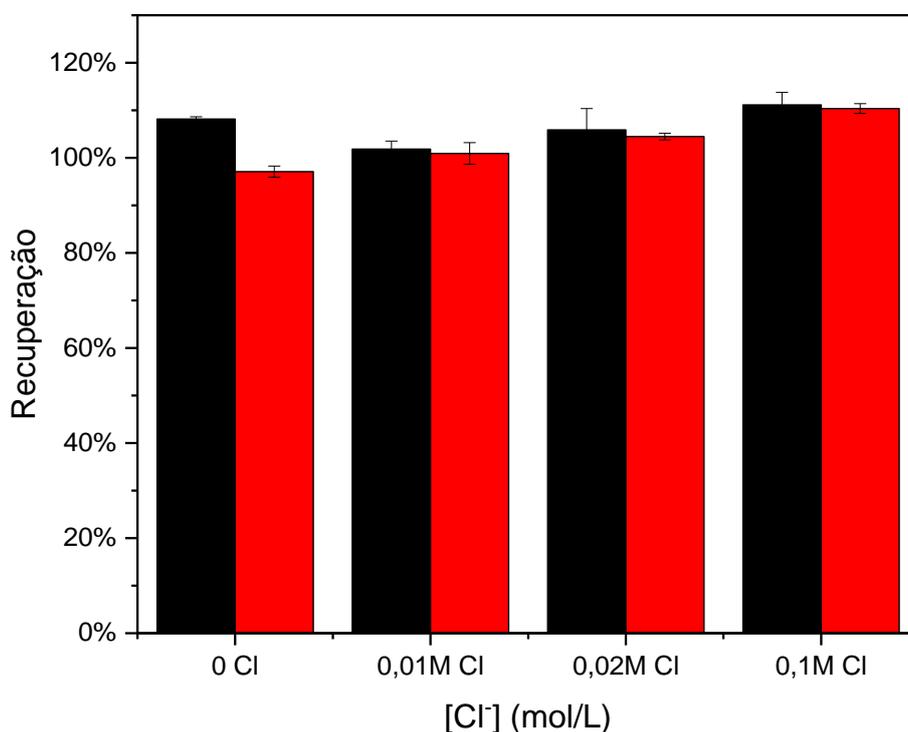


Figura 22 Recuperação obtida utilizando matriz digerida (■) e na ausência de matriz (■) na presença de diferentes concentrações de cloreto.

Como é possível perceber, não houve prejuízos na recuperação de Ag na presença de íons cloreto. Contudo, foi feita também a reanálise de uma amostra fortificada previamente à digestão, no nível J, e uma recuperação de $4,9 \pm 0,6$ % foi obtida,

mesmo utilizando uma curva contendo cloreto. A partir destes resultados, pode-se inferir que a Ag está envolvida em algum equilíbrio, possivelmente sendo precipitada durante o processo de digestão, diminuindo sua disponibilidade em solução.

Com relação ao Pd, alguns trabalhos já relataram fortes interações deste metal com matrizes silicatadas (BENCS *et al.*, 2003) e de medicamentos (CHAHROUR *et al.*, 2017). Uma vez que silicatos estão presentes como excipientes nos medicamentos utilizados como matriz e que a digestão realizada não foi completa (apresentou resíduos sólidos), tais fatores supramencionados podem ter sido a causa das baixas recuperações obtidas para esse analito.

No intuito de se obter maior sensibilidade para o Cd considerando as baixas concentrações a serem determinadas, utilizou-se inicialmente o isótopo ^{114}Cd devido sua maior abundância relativa (**Quadro 3**). Contudo, como já mencionado, as concentrações foram superestimadas, e podem estar relacionadas com interferências espectrais durante a análise por ICP-MS.

Quadro 3 Principais isótopos de Cd, suas respectivas abundâncias relativas e possíveis interferentes durante análise por ICP-MS [Adaptado de (KARUNASAGAR; ARUNACHALAM, 2001; MACHADO *et al.*, 2017; VRIJENS *et al.*, 2011)]

Isótopo	Abundância (%)	Interferente
$^{106}\text{Cd}^+$	1,25	$^{106}\text{Pd}^+$
$^{108}\text{Cd}^+$	0,89	$^{92}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{108}\text{Pd}^+$
$^{110}\text{Cd}^+$	12,5	$^{94}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}_2^+$
$^{111}\text{Cd}^+$	12,8	$^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{97}\text{Mo}^{14}\text{N}^+$, $^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{39}\text{K}^{16}\text{O}_2^+$, $^{79}\text{Br}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^{16}\text{O}_3^+$
$^{112}\text{Cd}^+$	24,1	$^{96}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2^+$, $^{112}\text{Sn}^+$, $^{96}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$, $^{94}\text{Zr}^{18}\text{O}^+$
$^{113}\text{Cd}^+$	12,2	$^{97}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{113}\text{In}^+$
$^{114}\text{Cd}^+$	28,7	$^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{114}\text{Sn}^+$, $^{81}\text{Br}^{16}\text{O}_2^+\text{H}^+$, $^{41}\text{K}_2^{16}\text{O}_2^+$
$^{116}\text{Cd}^+$	7,49	$^{116}\text{Sn}^+$

Existem inúmeras possibilidades de interferência, tanto por isótopos de mesma razão m/z , tanto por íons poliatômicos formados durante o processo de ionização no plasma. Trazendo para o contexto deste trabalho, pode-se dizer que, como principais interferentes na determinação de Cd, tem-se o óxido de molibdênio (MoO) e os diferentes isótopos de Sn, elementos também presentes na solução utilizada na fortificação para os experimentos de exatidão e precisão. De acordo com Kumata e

colaboradores (2020), é desejável que o nível de Mo não ultrapasse 100 vezes o nível de Cd presente na amostra, pois acima disso a sobreposição de sinal já se torna significativa. Uma vez que neste experimento a amostra fortificada no nível mais baixo (0,5J) apresentava uma razão Mo/Cd equivalente a 600, a probabilidade de que de fato esteja ocorrendo formação de MoO^+ , causando a superestimação do teor de Cd^+ é alta.

Foi então realizado um experimento semelhante ao realizado para a Ag, em que se fortificou a amostra branca digerida com $2 \mu\text{g/L}$ de Cd, variando a concentração de Mo, obtendo-se as razões Mo/Cd de 0, 50, 100, 300 e 600. Foi preparada também uma amostra branca fortificada com Cd $2 \mu\text{g/L}$ na presença apenas de Sn (8 mg L^{-1}), de modo a checar sua possível influência na determinação do analito em questão. Os resultados em termos de recuperação se encontram na **Figura 23**.

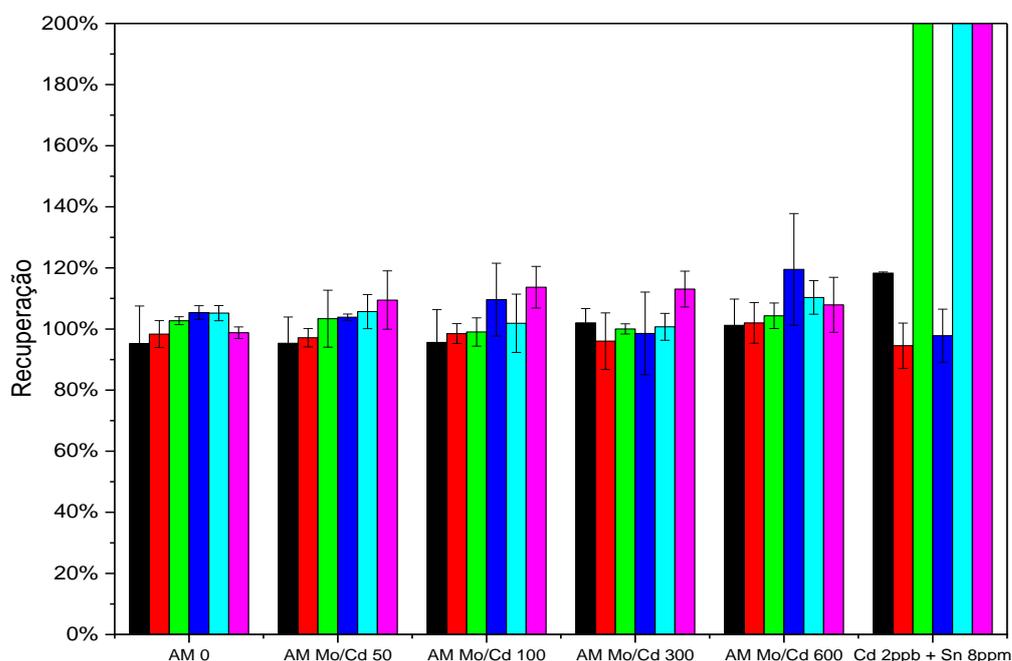


Figura 23 Estudo de possíveis interferentes na determinação de alguns isótopos de Cd. (■) 110 Cd; (■) 111 Cd; (■) 112 Cd; (■) 113 Cd; (■) 114 Cd; (■) 116 Cd

Percebe-se que a presença de Mo não está interferindo na determinação de Cd. A formação de óxidos de molibdênio pode estar sendo reduzida devido à realização de

uma otimização instrumental realizada previamente à análise, a qual condiciona a energia do plasma de modo a se ter uma menor taxa de formação possível desses interferentes. Além disso, o uso da célula de colisão nesses casos é essencial, uma vez que se trata de uma ferramenta poderosa na redução ou até eliminação de interferências poliatômicas (HATTENDORF; GÜNTHER, 2004).

Entretanto, a presença de Sn resultou em recuperações da ordem de 10000% para os isótopos ^{112}Cd , ^{114}Cd e ^{116}Cd , ou seja, as elevadas recuperações obtidas previamente na validação são resultantes da sobreposição de sinal dos isótopos menos abundantes do Sn (^{114}Sn), pois a concentração deste elemento presente no meio era relativamente muito maior que a concentração de Cd (cerca de 1000 vezes). Interferências isobáricas monoatômicas são relativamente mais complicadas de se corrigir, sendo uma das poucas opções o uso de outro isótopo do analito (LUM; SZE-YIN LEUNG, 2016). No caso, percebe-se que o isótopo ^{111}Cd não sofreu interferência pela presença do Sn e, portanto, será utilizado para os cálculos de validação, devido à sua maior abundância relativa frente aos isótopos ^{110}Cd e ^{113}Cd . Assim, após recalcular a recuperação para Cd, obteve-se o resultado apresentado na **Figura 24**.

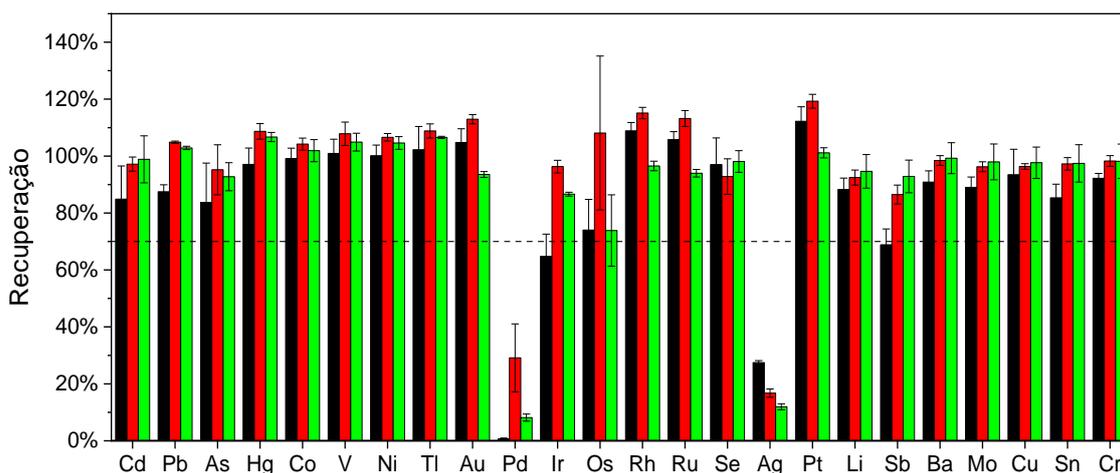


Figura 24 Recuperação obtida para as amostras fortificadas no nível 0,5J, 1J e 1,5J (n=3) para 24 IEs, utilizando ^{111}Cd . (■) 0,5J; (■) 1J; (■) 1,5J. Linha tracejada representa o limite baixo estabelecido pelo Capítulo USP 233 para exatidão (70%).

Em termos de precisão (**Figura 25**), apenas o Pd apresentou DPRs superiores aos limites estabelecidos pela USP 233. Tendo em vista as possíveis interações deste metal com os resíduos sólidos resultantes da digestão incompleta obtida, como citado anteriormente, variações significativas deste analito na solução final das replicatas independentes podem ter ocorrido.

Apesar de terem ficado dentro dos limites, o Os, a Ag e o Se apresentaram desvios relativamente mais elevados que os demais analitos. O Os está sujeito à formação de compostos voláteis na presença de agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, ácido nítrico) e, conseqüentemente, pode sofrer variações de sinal devido à efeitos de memória (NI *et al.*, 2020). A Ag, como já mencionado, pode estar em equilíbrio com íons Cl^- , causando variações na concentração de Ag^+ livre em solução a depender do deslocamento destes equilíbrios (DEAN, 1999). O Se apresenta como isótopo mais abundante o ^{80}Se , porém a determinação do mesmo por ICP-MS se torna um problema analítico, uma vez que este sofre forte interferência de dímeros $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ formados no plasma. Sendo assim, faz-se necessário a seleção de um isótopo menos abundante, aliado à estratégias instrumentais, como o uso da célula de colisão, o que reduz a sensibilidade para este elemento, afetando diretamente a precisão do método (JAGTAP; MAHER, 2016).

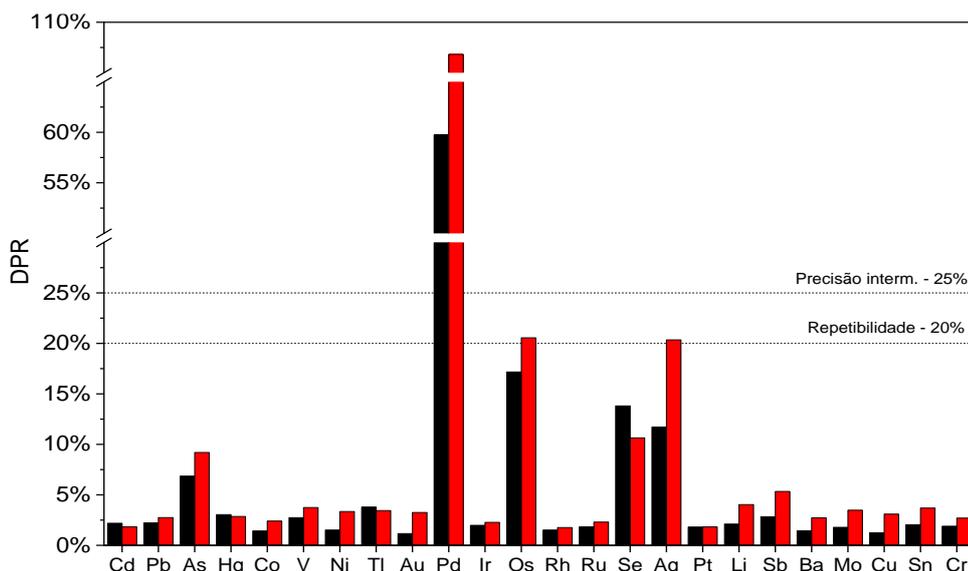


Figura 25 Desvio padrão relativo (N=6, repetibilidade; N=12, precisão intermediária) obtidos para os 24 analitos no estudo de repetitividade, fortificados no nível J. (■) Repetibilidade; (■) Precisão intermediária.

O método de digestão validado foi satisfatório para a maioria dos analitos, considerando as ressalvas e discussões realizadas. Sendo assim, este foi utilizado como método de referência para o desenvolvimento do método de microextração assistida por ultrassom.

4.3 Micro extração assistida por ultrassom

4.3.1 Otimização

Para dar início à otimização do método de micro extração assistida por ultrassom, utilizou-se comprimidos de multivitamínicos, os quais apresentavam em sua composição uma concentração conhecida de alguns elementos dispostos na USP 232 (**Quadro 4**) e matriz semelhante à de comprimidos de medicamentos. Por se tratar de um procedimento de extração, a otimização com amostras fortificadas não é o mais indicado. Os comprimidos foram previamente quebrados com almofariz e pistilo de ágata e triturados e homogeneizados utilizando moinho de bolas de Teflon.

Quadro 4 Teores de alguns elementos informados nos rótulos das amostras de multivitamínicos utilizados como referência

Código da amostra	Massa Comprimido (g)	µg/ comprimido				µg/ g			
		Se	Mo	Cu	Cr	Se	Mo	Cu	Cr
MV 1	1,5	34	45	900	18	22,67	30,00	600,00	12,00
MV 2	1,537	20	23	450	18	13,01	14,96	292,78	11,71
MV 3	0,9	34	-	-	-	37,78	-	-	-

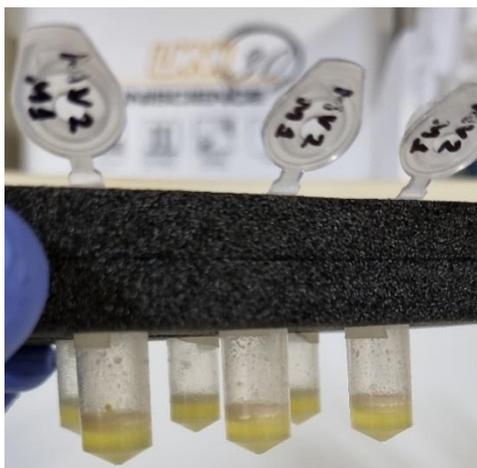
As amostras de multivitamínicos foram analisadas utilizando o método de referência validado anteriormente, utilizando digestão assistida por micro-ondas, com ácido nítrico diluído na presença de peróxido de hidrogênio. Os resultados se encontram na **Tabela 12**.

Tabela 12 Determinação de IEs em amostras de multivitamínicos por ICP-MS após digestão assistida por micro-ondas (expressos em µg g⁻¹)

	Cd	Pb	As	Hg	Co	V
MV 1	<LD	0,12 ± 0,03	<LD	<LD	0,74 ± 0,02	0,70 ± 0,08
MV 2	<LD	<LD	<LD	<LD	0,23 ± 0,06	<LD
MV 3	<LD	<LD	<LD	<LD	1,25 ± 0,07	<LD
	Ni	Tl	Au	Pd	Ir	Os
MV 1	4,87 ± 0,63	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
MV 2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
MV 3	1,20 ± 0,38	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Rh	Ru	Se	Ag	Pt	Li
MV 1	<LD	<LD	17,28 ± 5,08	<LD	<LD	<LD
MV 2	<LD	<LD	13,72 ± 2,29	<LD	<LD	<LD
MV 3	<LD	<LD	39,14 ± 1,63	<LD	<LD	<LD
	Sb	Ba	Mo	Cu	Sn	Cr
MV 1	<LD	1,93 ± 0,35	40,53 ± 3,74	722,11 ± 25,40	<LD	30,02 ± 2,49
MV 2	<LD	2,79 ± 0,07	13,34 ± 0,18	337,60 ± 3,45	<LD	11,95 ± 0,27
MV 3	<LD	1,49 ± 0,05	<LD	<LD	<LD	<LD

Como é possível notar, outros elementos listados na USP 232, além daqueles informados, foram encontrados nas amostras. Interessante destacar também o fato de que os elementos listados pelo fabricante foram determinados de forma satisfatória, com níveis superiores aos indicados. Contudo, de acordo com a legislação brasileira, valores superiores ao informado são permitidos para suplementos minerais, desde que se respeite os níveis de toxicidade (BRAZIL, [S.d.]).

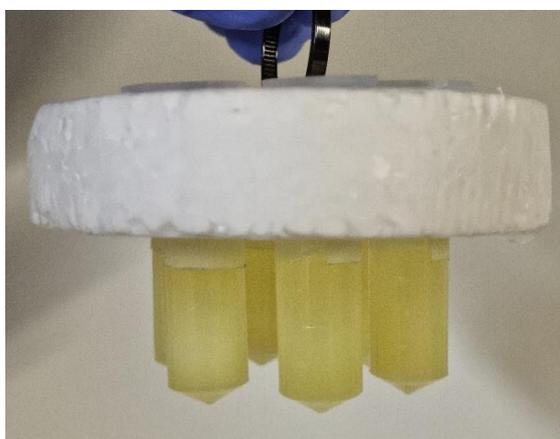
Dando início ao procedimento de microextração, fez-se uma otimização univariada do método, em que foram avaliadas três misturas ácidas: ácido nítrico diluído – $2,86 \text{ mol L}^{-1}$ (MIX 1); água régia invertida (MIX 2); ácido nítrico + ácido fluorídrico diluídos (9:1 – 18% e 2% v v⁻¹ respectivamente) (MIX 3). As 3 amostras de multivitamínico foram submetidas às 3 misturas. O programa do ultrassom foi o mesmo para todos os reagentes, assim como os demais procedimentos envolvidos, sendo estes baseados nos trabalhos de Teixeira e colaboradores (2014) e Aguiar e colaboradores (2017). A **Figura 26** ilustra algumas etapas do processo.



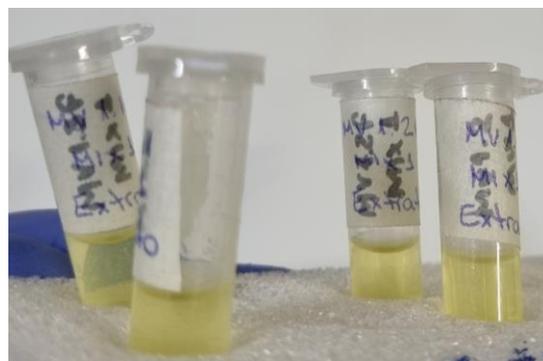
(1) Adição da mistura ácida



(2) Amostras diluídas e levadas ao sistema de ultrassom do tipo *cup horn*



(3) Amostras após o processo de extração



(4) Extrato final obtido após centrifugação

Figura 26 Processo simplificado do método de micro extração assistido por ultrassom proposto neste trabalho

Em (1) é possível notar a ação da mistura ácida sobre a matriz, a partir de reações envolvendo mudanças de cor e formação de gases. Durante a extração em (2), os efeitos das ondas de ultrassom são percebidos pela movimentação da amostra sólida no tubo de extração, efeitos que ficam ainda mais nítidos em (3), em que é possível perceber a redução no tamanho das partículas, as quais ficam em suspensão na

solução. Após centrifugação, obtém-se o extrato límpido mostrado em (4), o qual será diluído e levado para análise.

Os resultados obtidos para cada solução extratora são apresentados a seguir (**Tabela 13** – MIX 1,

Tabela 14 – MIX 2 e Tabela 15 – MIX 3).

Tabela 13 Determinação de IEs em amostras de multivitamínicos por ICP-MS utilizando extração com ácido nítrico (MIX 1) assistida por ultrassom

	Cd	Pb	As	Hg	Co	V
MV 1	0,03 ± 0,01	0,17 ± 0,01	<LD	<LD	1,09 ± 0,07	0,75 ± 0,04
MV 2	<LD	<LD	<LD	<LD	0,55 ± 0,02	0,45 ± 0,05
MV 3	<LD	<LD	<LD	<LD	1,4 ± 0,2	<LD
	Ni	Tl	Au	Pd	Ir	Os
MV 1	5,1 ± 0,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
MV 2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
MV 3	2,1 ± 0,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Rh	Ru	Se	Ag	Pt	Li
MV 1	<LD	<LD	18 ± 6	<LD	<LD	<LD
MV 2	<LD	<LD	17 ± 4	<LD	<LD	<LD
MV 3	<LD	<LD	33 ± 2	<LD	<LD	<LD
	Sb	Ba	Mo	Cu	Sn	Cr
MV 1	<LD	1,2 ± 0,2	32 ± 9	706 ± 38	<LD	26,5 ± 0,9
MV 2	<LD	2,8 ± 0,2	11,4 ± 0,9	319 ± 13	<LD	8,8 ± 0,4
MV 3	<LD	1,61 ± 0,03	<LD	<LD	<LD	<LD

Tabela 14 Determinação de IEs em amostras de multivitamínicos por ICP-MS utilizando extração com água régia invertida (MIX 2) assistida por ultrassom

	Cd	Pb	As	Hg	Co	V
MV 1	0,07 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,051 ± 0,006	<LD	1,05 ± 0,03	0,57 ± 0,02
MV 2	<LD	0,13 ± 0,06	<LD	<LD	0,62 ± 0,02	0,37 ± 0,05
MV 3	<LD	<LD	<LD	<LD	1,31 ± 0,06	<LD
	Ni	Tl	Au	Pd	Ir	Os
MV 1	3,6 ± 0,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
MV 2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
MV 3	1,7 ± 0,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Rh	Ru	Se	Ag	Pt	Li
MV 1	<LD	<LD	34 ± 2	<LD	<LD	<LD
MV 2	<LD	<LD	12,2 ± 0,8	<LD	<LD	<LD
MV 3	<LD	<LD	33 ± 1	<LD	<LD	<LD
	Sb	Ba	Mo	Cu	Sn	Cr
MV 1	<LD	0,992 ± 0,002	31 ± 6	633 ± 9	<LD	28 ± 3
MV 2	<LD	2,7 ± 0,2	12 ± 1	279 ± 2	<LD	8,5 ± 0,4
MV 3	<LD	1,58 ± 0,05	<LD	<LD	<LD	<LD

Tabela 15 Determinação de IEs em amostras de multivitamínicos por ICP-MS utilizando extração com ácido nítrico + HF (MIX 3) assistida por ultrassom

	Cd	Pb	As	Hg	Co	V
MV 1	0,19 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,09 ± 0,03	<LD	1,05 ± 0,09	0,91 ± 0,04
MV 2	0,18 ± 0,01	0,107 ± 0,001	<LD	<LD	0,67 ± 0,03	0,52 ± 0,04
MV 3	0,20 ± 0,02	0,06 ± 0,01	<LD	<LD	1,76 ± 0,04	
	Ni	Tl	Au	Pd	Ir	Os
MV 1	4,8 ± 0,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
MV 2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
MV 3	2,46 ± 0,05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	Rh	Ru	Se	Ag	Pt	Li
MV 1	<LD	<LD	42 ± 2	<LD	<LD	<LD
MV 2	<LD	<LD	13,8 ± 0,6	<LD	<LD	<LD
MV 3	<LD	<LD	39 ± 2	<LD	<LD	<LD
	Sb	Ba	Mo	Cu	Sn	Cr
MV 1	<LD	0,990 ± 0,004	<LD	759 ± 27	<LD	35 ± 3
MV 2	<LD	2,7 ± 0,1	<LD	348 ± 9	<LD	11,0 ± 0,3
MV 3	<LD	1,54 ± 0,04	<LD	<LD	<LD	<LD

A seguir são apresentados gráficos comparando os resultados obtidos nos quatro métodos e valor de referência (quando disponível) para cada amostra, a fim de uma melhor comparação.

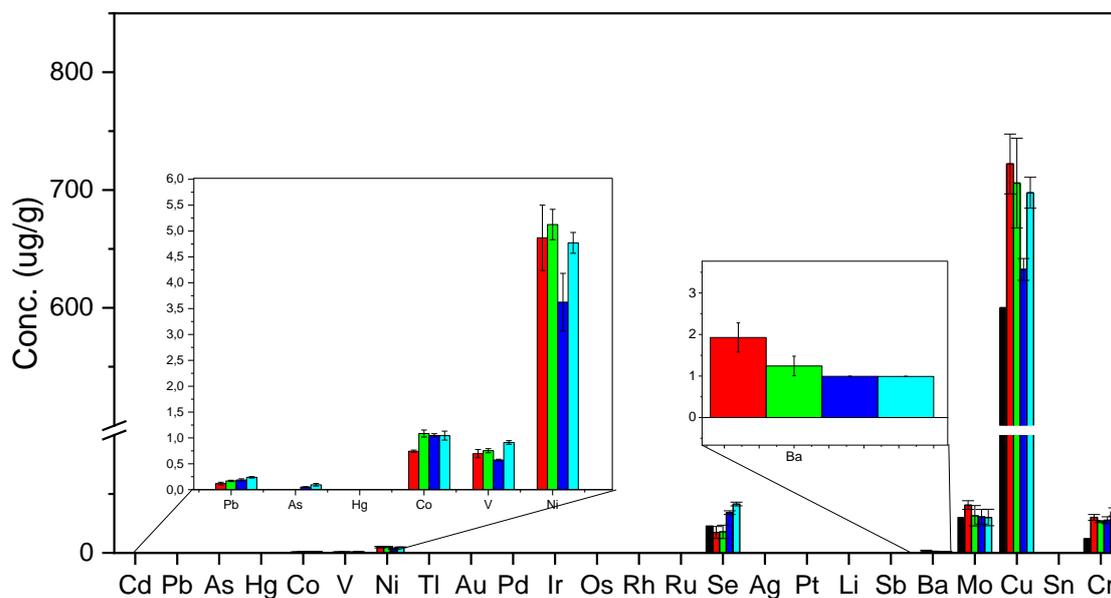


Figura 27 Comparação dos resultados obtidos para amostra MV1. (■) Valor de referência; (■) Digestão; (■) MIX 1; (■) MIX 2; (■) MIX 3

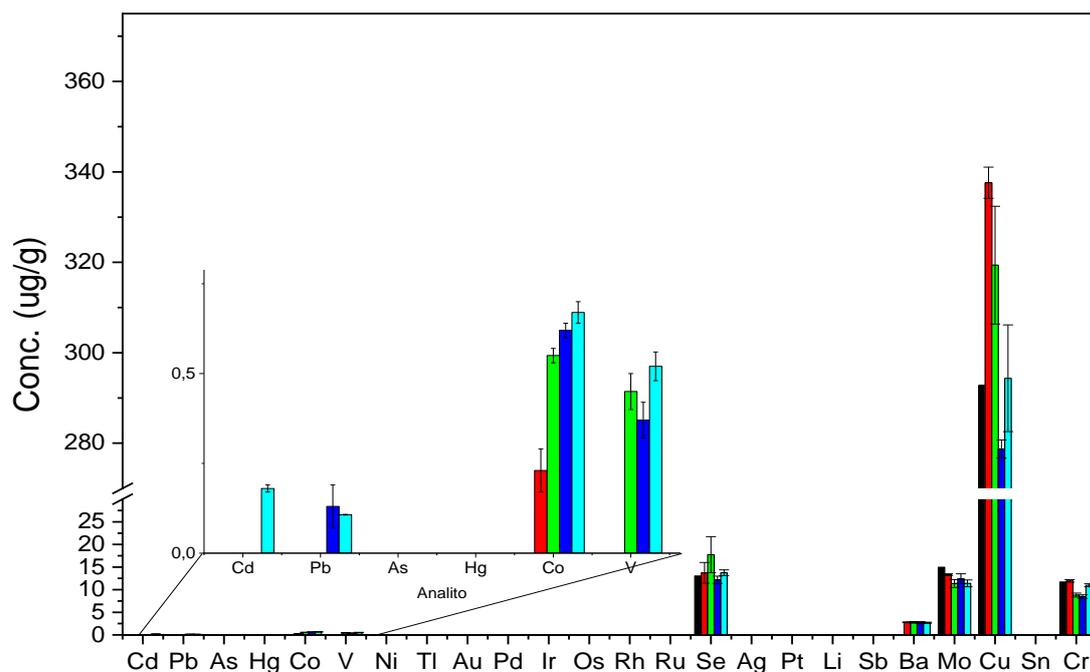


Figura 28 Comparação dos resultados obtidos para amostra MV2. (■) Valor de referência; (■) Digestão; (■) MIX 1; (■) MIX 2; (■) MIX 3

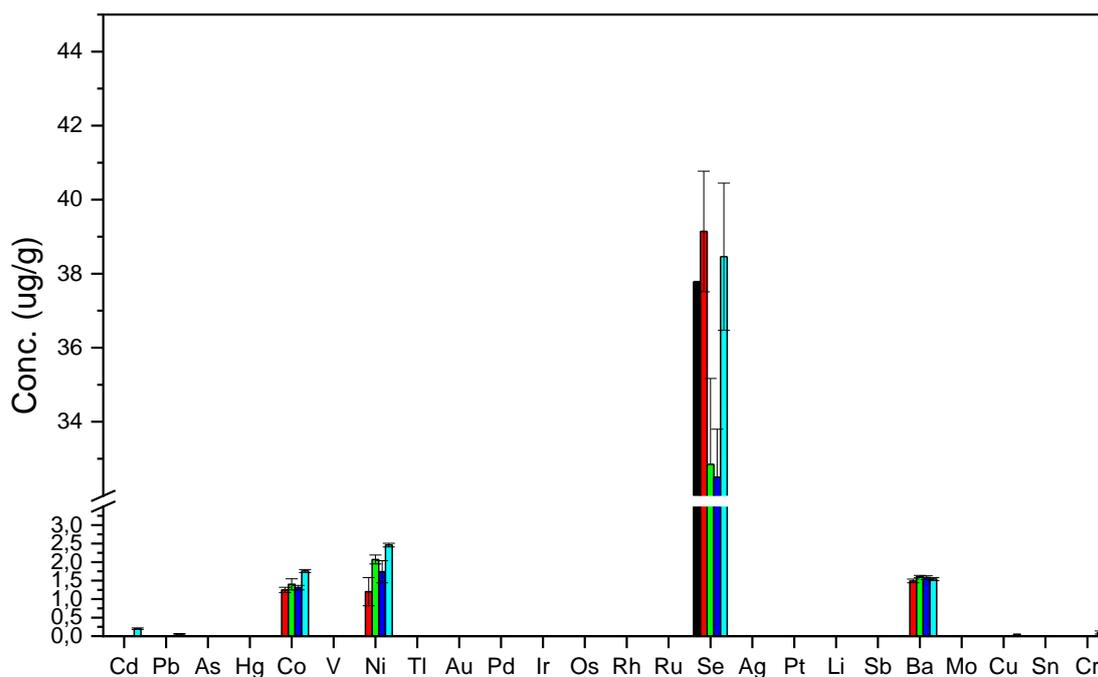


Figura 29 Comparação dos resultados obtidos para amostra MV3. (■) Valor de referência; (■) Digestão; (■) MIX 1; (■) MIX 2; (■) MIX 3

Uma análise visual dos resultados permite inferir que todos os métodos foram capazes de detectar os analitos presentes nas três amostras em estudo, com algumas exceções na digestão, a qual não forneceu limites suficientes para a quantificação de As, Pb e V em algumas amostras.

O uso de água régia invertida (MIX 2) forneceu resultados inferiores aos demais métodos para alguns analitos, como Cu, Ni e V, e considerando também possíveis perdas de outros analitos devido à equilíbrios envolvendo o ânion cloreto (DEAN, 1999), optou-se por não prosseguir os estudos utilizando o MIX 2.

Os resultados das extrações MIX 1 e MIX 3 foram comparados com os valores determinados pelo método de digestão de referência utilizando teste t ($\alpha = 0,05$) (ver Apêndice A). De modo geral, os resultados foram estatisticamente iguais, sendo a extração utilizando MIX 3 a que apresentou menores valores para variância.

A partir do desvio padrão de 6 replicatas de branco de procedimento foi feita uma estimativa dos limites de detecção para cada mistura, no intuito de se ter uma ideia da sensibilidade dos métodos e assim poder compará-los (**Figura 30**).

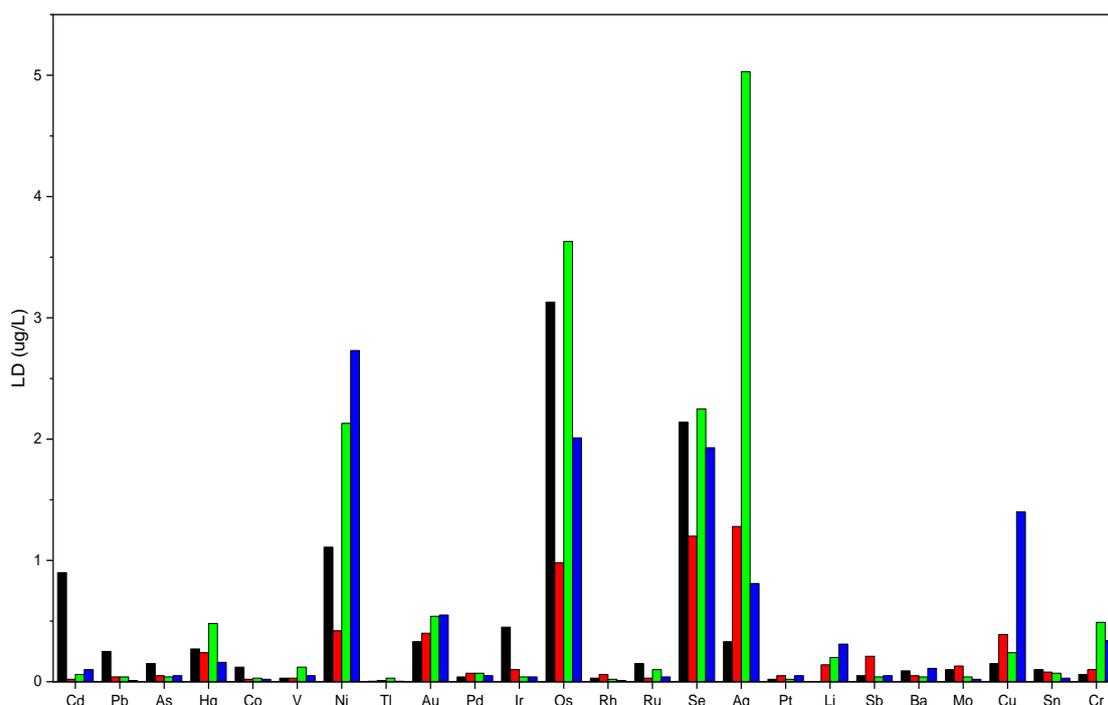


Figura 30 Estimativa dos limites de detecção dos métodos de micro extração propostos, comparados com os limites obtidos pelo método de referência. (■) Digestão; (■) MIX 1; (■) MIX 2; (■) MIX 3

É possível notar a baixa detectabilidade da digestão quando comparada ao método de micro extração. Para quase todos os analitos, principalmente aqueles do grupo 1, a digestão apresentou limites de detecção relativamente maiores que aqueles obtidos para o método proposto. Considerando a maior complexidade do procedimento de digestão, é plausível inferir que maiores são os riscos de contaminações, perdas e erros sistemáticos e/ou aleatórios durante o processo, acarretando maiores limites para este método (BIZZI, C. A. *et al.*, 2017a)

Tendo em vista as vantagens do uso de ácido nítrico diluído e levando em conta que a maior parte dos medicamentos acabados apresentam elevados teores de sílica em sua composição, optou-se por realizar a validação do método de microextração utilizando tanto o MIX 1 quanto o MIX 3. Desse modo, tem-se um método mais eficaz na extração envolvendo matrizes silicatadas e, na ausência desta, um método satisfatório sem uso de HF.

4.3.2 Validação

O método proposto foi validado de acordo com o Capítulo USP 233. Uma vez que foi observado a presença de poucos analitos na amostra MV3, esta foi utilizada como “matriz branca” nos experimentos de fortificação. Assim como o método de referência validado, linearidade, LD e LQ também foram avaliados, e estes estão apresentados a seguir (**Tabela 16** e **Tabela 17**)

Tabela 16 Parâmetros de linearidade obtidos para ambas as misturas ácidas utilizadas na micro extração

IE	MIX 1		MIX 3	
	R ²	Inclinação	R ²	Inclinação
Cd	0,9877	0,0279	0,9980	0,0247
Pb	0,9985	0,4167	0,9988	0,4115
As	0,9983	0,0109	0,9971	0,0104
Hg	0,9998	0,0454	0,9998	0,0471
Co	0,9998	0,1173	0,9981	0,1200
V	0,9998	0,0470	0,9986	0,0487
Ni	1,0000	0,0333	0,9987	0,0343
Tl	0,9982	0,3165	0,9999	0,3293
Au	0,9984	0,2410	0,9991	0,2565
Pd	0,9997	0,0958	0,9970	0,0943
Ir	0,9985	0,3664	1,0000	0,3802
Os	0,9967	0,1430	0,9997	0,1534
Rh	0,9999	0,4556	0,9988	0,4601
Ru	0,9998	0,1611	0,9993	0,1625
Se	0,9965	0,0004	0,9964	0,0004
Ag	0,9966	0,1104	0,9974	0,1008
Pt	0,9982	0,1376	0,9999	0,1449
Li	0,9933	374,6	0,9957	525,0
Sb	0,9991	0,0647	0,9993	0,0664
Ba	0,9999	0,1547	0,9975	0,1421
Mo	0,9999	0,1012	0,9993	0,1034
Cu	1,0000	0,0977	0,9987	0,0990
Sn	0,9998	0,0500	0,9989	0,0487
Cr	0,9999	0,0600	0,9988	0,0618

Tabela 17 Limites de detecção e quantificação obtidos para as misturas ácidas utilizadas, comparadas com a concentração máxima permitida (CMP) na amostra, considerando uma dose diária de 10 g dia⁻¹

IE	MIX 1		MIX 3		CMP/ µg g ⁻¹
	LD/ µg g ⁻¹	LQ/ µg g ⁻¹	LD/ µg g ⁻¹	LQ/ µg g ⁻¹	
Cd	0,004	0,012	0,005	0,015	0,5
Pb	0,003	0,010	0,025	0,076	0,5
As	0,010	0,029	0,023	0,070	1,5
Hg	0,064	0,195	0,037	0,113	3
Co	0,005	0,014	0,018	0,054	5
V	0,004	0,013	0,023	0,069	10
Ni	0,240	0,728	0,067	0,202	20
Tl	0,001	0,002	0,002	0,007	0,8
Au	0,112	0,340	0,096	0,292	10
Pd	0,006	0,019	0,045	0,137	10
Ir	0,039	0,120	0,022	0,067	10
Os	0,103	0,311	0,078	0,237	10
Rh	0,013	0,039	0,018	0,056	10
Ru	0,010	0,032	0,020	0,060	10
Se	0,512	1,55	0,477	1,45	15
Ag	0,139	0,422	0,245	0,743	15
Pt	0,011	0,033	0,014	0,041	10
Li	0,551	1,67	9,26	28,1	55
Sb	0,425	1,29	1,25	3,79	120
Ba	1,01	3,07	2,32	7,04	140
Mo	0,284	0,860	2,05	6,20	300
Cu	0,242	0,734	7,27	22,0	300
Sn	0,296	0,896	4,39	13,3	600
Cr	0,373	1,13	7,25	22,0	1100

Em termos de linearidade, todos os analitos em ambos os métodos apresentaram valores satisfatórios para o coeficiente de determinação ($R^2 > 0,99$), com exceção do ¹¹¹Cd quando MIX 1 foi utilizado, o que pode estar relacionado à menor sensibilidade deste isótopo devido sua menor abundância relativa (MACHADO *et al.*, 2017) ou

algum erro aleatório associado ao preparo e/ou análise. O ^{78}Se apresentou uma baixa sensibilidade, resultado das fortes interferências envolvendo dímeros de Ar no plasma, fazendo-se necessário o uso de um isótopo menos abundante, além de sofrer com a ação do gás de colisão utilizado (JAGTAP; MAHER, 2016). Apesar deste fato, os limites de quantificação para os elementos citados e para os demais analitos ficaram abaixo da CMP estipulada para uma DDM de 10 g/dia, o que implica nos limites mais baixos possíveis. Sendo assim, ambos os procedimentos propostos são adequados para detectar possíveis contaminações nos mais diversos produtos farmacêuticos.

Prosseguindo com os resultados da validação são apresentados abaixo os resultados obtidos nos estudos de exatidão para o MIX 1 (**Figura 31**) e MIX 3 (**Figura 32**), respectivamente.

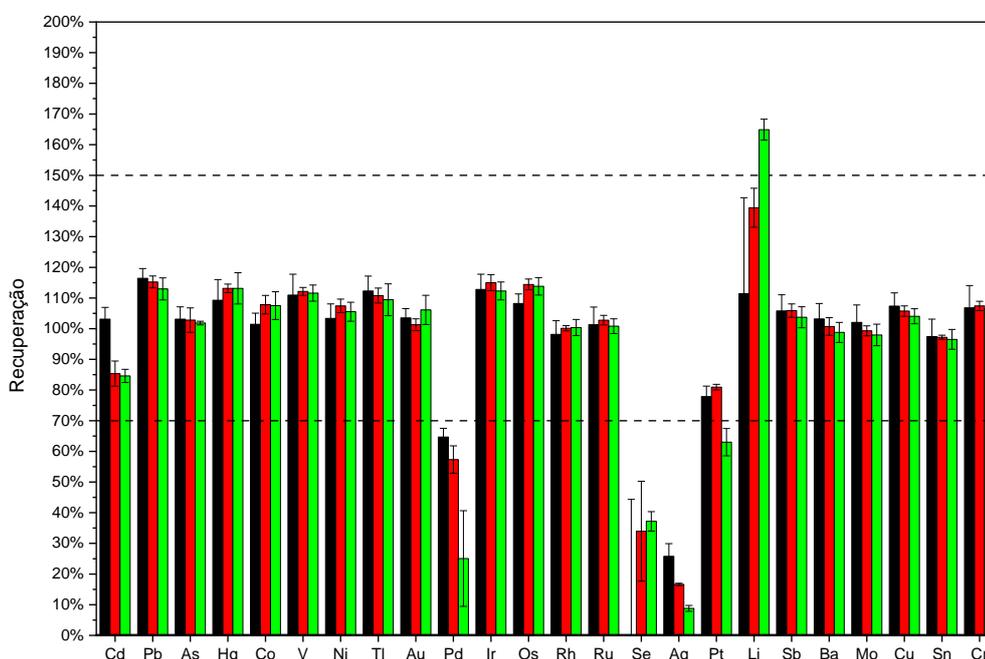


Figura 31 Estudo de recuperação com 3 níveis em triplicata (0,5 J; 1 J; 1,5 J) realizado utilizando o MIX 1. As linhas tracejadas indicam o intervalo de aceite proposto pelo Capítulo USP 233 (70-150%). (■) 0,5 J; (■) 1 J; (■) 1,5 J

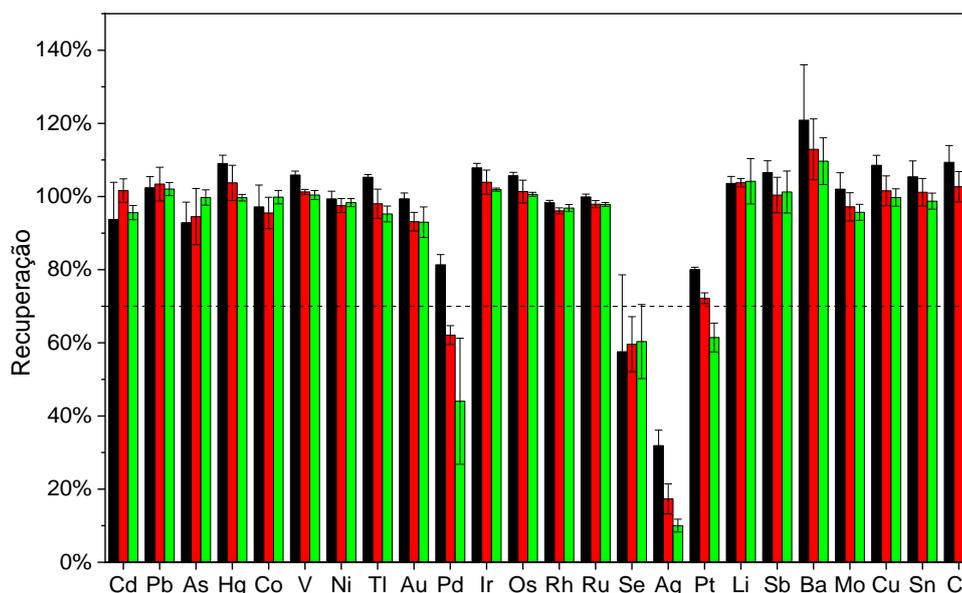


Figura 32 Estudo de recuperação com 3 níveis em triplicata (0,5 J; 1 J; 1,5 J) realizado utilizando o MIX 3. A linha tracejada indica o intervalo de aceite proposto pelo Capítulo USP 233 (70%). (■) 0,5 J; (■) 1 J; (■) 1,5 J

As recuperações para ambas as misturas ácidas foram semelhantes, porém com mais variações quando apenas ácido nítrico foi utilizado.

A baixa recuperação de Se está relacionada a um erro sistemático envolvendo o teor deste analito na amostra. Voltando aos resultados das análises pelo método de referência (Tabela 12), a amostra MV 3 apresentou uma concentração de Se de cerca de $40 \mu\text{g g}^{-1}$ – por se tratar de uma amostra de multivitamínico – nível relativamente maior que a quantidade adicionada desse elemento (cerca de $15 \mu\text{g g}^{-1}$). Desse modo, existe um erro associado ao desconto do valor da amostra branca, causando as baixas recuperações obtidas. No intuito de checar tal hipótese, foi realizado um novo estudo de recuperação, fortificando amostras de CF (fluoxetina) previamente analisadas utilizando o MIX 3, em que não foi detectado a presença de Se na composição. Este grupo de amostras foi selecionado por apresentar maior variação em termos de composição de excipientes, de modo a se fazer uma possível análise do efeito destes sobre os resultados. As recuperações são mostradas na **Figura 33**.

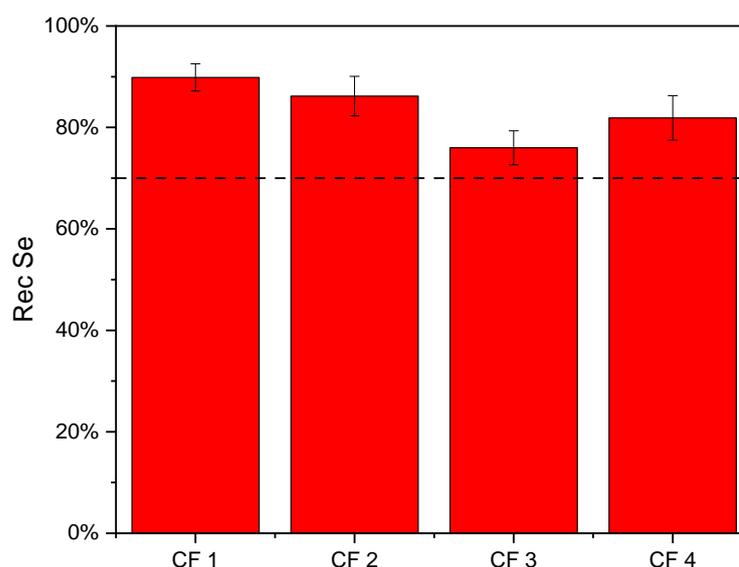


Figura 33 Recuperações de Se em amostras de cloridrato de fluoxetina (CF). A linha tracejada indica o limite estipulado pelo Capítulo USP 233 (70%)

Desse modo, foi possível corrigir o erro envolvendo a presença de Se na matriz inicialmente utilizada para os experimentos de validação.

Um ponto relevante a ser notado é a melhora na recuperação de Pd quando HF é utilizado, indicando uma possível redução da matriz silicatada, deslocando equilíbrios que disponibilizam o Pd em solução (BENCS *et al.*, 2003). Tal fato justifica o uso de pequenas quantidades de HF previamente à extração, numa concentração final aproximada de 0,15% v v⁻¹, teor relativamente pequeno se comparado à outros métodos envolvendo HF (AGUIAR *et al.*, 2017; BENDICHO *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2014). Além disso, outros trabalhos que utilizaram a técnica de US relataram melhores resultados com o uso deste ácido (DE LA CALLE *et al.*, 2009b). O gráfico a seguir (**Figura 34**) relaciona as amostras de CF mencionadas anteriormente com as respectivas recuperações de Pd após o procedimento de extração.

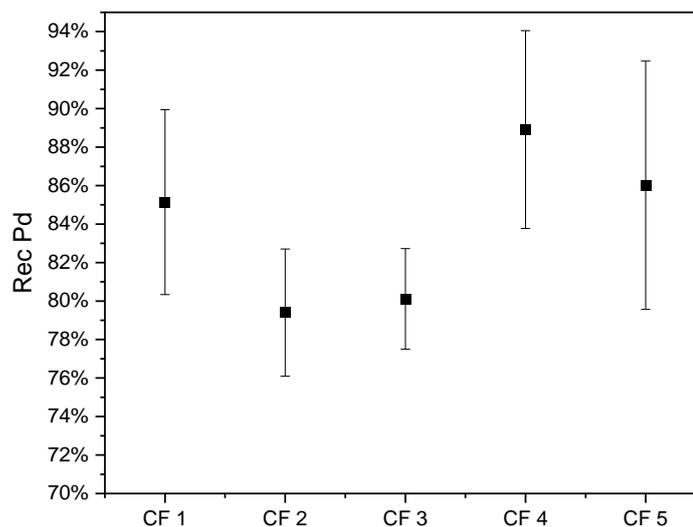


Figura 34 Recuperação de Pd obtida em 5 amostras de CF fortificadas após método de extração

Dentre as 5 amostras, apenas CF 2 e CF 3 apresentam certa quantidade de silicatos na composição, sendo estas as amostras cujas recuperações médias foram relativamente inferiores às demais. Com isso, pode-se inferir que existe de fato uma relação entre a presença de dióxido de silício e a redução de Pd disponível em solução, o que reforça a importância da ação de pequenas quantidades de HF numa etapa de pré-extração.

A Ag continua apresentando baixas recuperações como já percebido em experimentos anteriores. A hipótese de interferências envolvendo equilíbrios com íons cloreto foi investigada, porém esta não pareceu ser a razão da subestimação dos níveis deste elemento, levantando um questionamento de alguma possível precipitação do analito, possivelmente devido à presença de ácido nítrico diluído, deslocando equilíbrios que favorecem a diminuição desse analito em solução. Algumas outras hipóteses foram consideradas após notar um comportamento anormal também da Pt nos experimentos de microextração. Observando a composição das três soluções padrão utilizadas neste trabalho, percebe-se que Ag e Pt estão em soluções diferentes. Contudo, durante o preparo, as 3 soluções são misturadas para fortificação e preparo de uma curva de calibração única. Trabalhos já relataram algumas reações do tipo *redox* entre esses elementos as quais podem estar

ocorrendo, interferindo na determinação destes analitos, podendo estar mais evidente considerando a redução para escala micro (HUNYADI; MURPHY, 2009; WISNIEWSKA; YANG; ZIOLEK, 2019). Tais hipóteses precisam ser investigadas mais a fundo.

A Figura 35 e Figura 36 a seguir resumem os resultados dos estudos de precisão utilizando o MIX 1 e MIX 3, respectivamente.

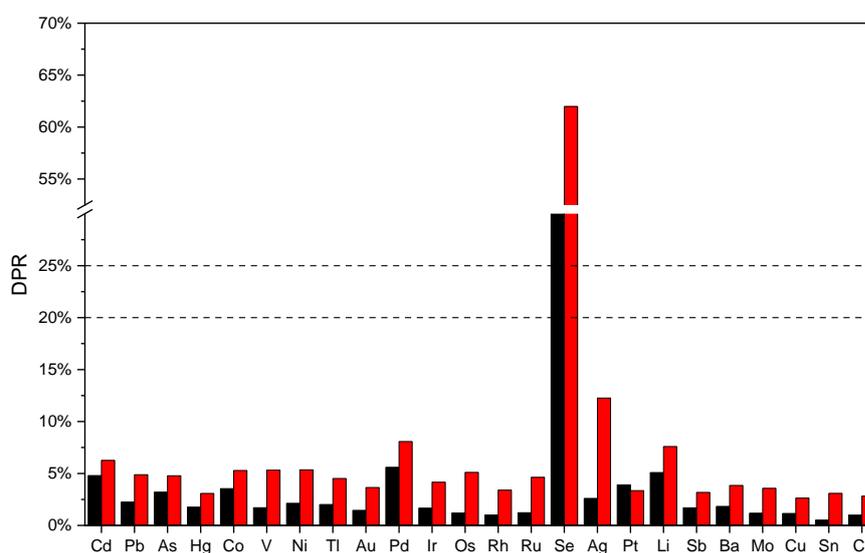


Figura 35 Estudo de precisão a partir da (■) repetibilidade (n = 6) e da (■) precisão intermediária (n = 12) realizados no nível J utilizando o MIX 1. As linhas tracejadas representam os limites determinados pelo Capítulo USP 233 de 20% e 25%, respectivamente.

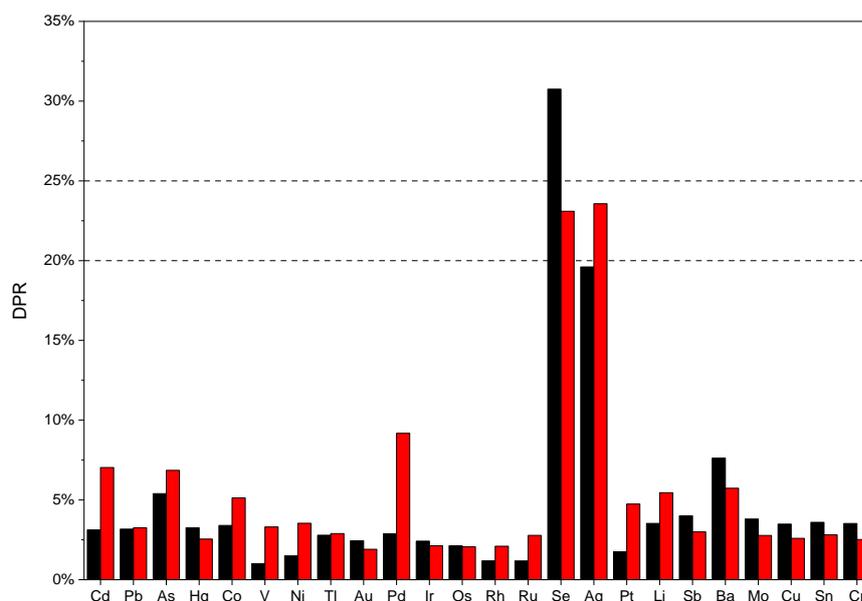


Figura 36 Estudo de precisão a partir da (■) repetibilidade (n = 6) e da (■) precisão intermediária (n = 12) realizados no nível J utilizando o MIX 3. As linhas tracejadas representam os limites determinados pelo Capítulo USP 233 de 20% e 25%, respectivamente.

De modo geral, os resultados foram satisfatórios para todos os analitos, com exceção do Se e da Ag, pelas razões já discutidas anteriormente.

O desenvolvimento de um método em escala micro tem se tornado atrativo dentro da química analítica, considerando vantagens como a mínima geração de resíduos e pouco uso de reagentes e amostra. O método proposto neste trabalho se mostrou eficiente na determinação de 23 dos 24 analitos listados no capítulo USP 232, considerando as discussões realizadas. Sendo assim, este foi aplicado na determinação de IEs em amostras reais.

4.4 Análise de antidepressivos utilizando o método de micro extração assistida por ultrassom

Após a validação do método proposto, este foi aplicado na análise de 37 amostras de antidepressivos. O uso desta classe de medicamentos vem crescendo nos últimos anos, consequência do aumento do número de diagnósticos de distúrbios mentais na sociedade (BOBBILI *et al.*, 2022). Por se tratar de uma classe de fármacos de uso

diário que pode se prolongar por anos, produtos contaminados podem levar a casos de intoxicação crônica, causando diversos problemas de saúde. Assim, faz-se necessário um olhar crítico sobre a qualidade dos produtos acabados que chegam ao consumidor. Considerando que a maioria das amostras apresentavam dióxido de silício como excipiente, foi utilizado o MIX 3 ($\text{HNO}_3 + \text{HF}$) como solução ácida, e cada amostra foi analisada em triplicata. Amostras codificadas como AA N.1, AA N.2, etc., representam amostras iguais de um mesmo laboratório, porém de lotes diferentes. A seguir são mostrados os resultados obtidos para as amostras analisadas (**Tabela 18**).

Tabela 18 Determinação de IEs em 37 amostras de antidepressivo utilizando micro extração assistida por ultrassom – MIX 3

Sample	Cd µg/g	Pb µg/g	As µg/g	Co µg/g	V µg/g	Ni µg/g	Pd µg/g	Ba µg/g	Cu µg/g	Sn µg/g	Cr µg/g
BC 1	0,0078±0,0008	<LD	<LD	0,16±0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,051±0,009	<LD
BC 2	0,0092±0,0009	0,029±0,005	0,016±0,002	0,164±0,003	<LD	0,36±0,03	<LD	<LD	<LD	0,035±0,006	0,22±0,03
BC 3	<LD	<LD	<LD	0,179±0,008	<LD	0,13±0,01	<LD	0,99±0,03	<LD	<LD	0,56±0,06
BC 4	<LD	0,0106±0,0006	<LD	0,15±0,01	<LD	<LD	0,024±0,005	0,21±0,02	<LD	0,019±0,004	<LD
CA 1	0,021±0,003	0,0363±0,004	<LD	<LD	0,58±0,05	0,14±0,03	<LD	0,22±0,02	<LD	0,16±0,02	0,76±0,07
CA 2	0,00527±0,00004	<LD	<LD	<LD	0,046±0,008	<LD	<LD	<LD	0,10±0,01	<LD	<LD
CB 1	<LD	<LD	<LD	<LD	0,022±0,004	0,84±0,06	<LD	<LD	0,21±0,02	<LD	0,17±0,03
CB 2	0,008±0,001	0,34±0,01	<LD	<LD	<LD	1,5±0,1	<LD	<LD	0,18±0,01	0,24±0,03	1,24±0,04
CB 3.1	<LD	<LD	<LD	<LD	0,045±0,006	<LD	<LD	<LD	0,38±0,06	<LD	0,30±0,04
CB 3.2	0,0085±0,0007	0,016±0,003	<LD	<LD	0,036±0,004	<LD	<LD	<LD	<LD	0,21±0,03	0,45±0,04
CF 1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,11±0,02	<LD	<LD	<LD	0,066±0,007
CF 2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,047±0,003	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
CF 3	0,0066±0,0009	<LD	<LD	<LD	0,19±0,01	0,17±0,01	<LD	0,46±0,04	<LD	<LD	0,32±0,03
CF 4	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,133±0,009
CF 5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,21±0,04	<LD	<LD	<LD	<LD	0,62±0,01
CN 1.1	0,0058±0,0005	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,24±0,03	<LD	<LD
CN 1.2	0,00523±0,00003	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,020±0,004	<LD
CN 2	0,007±0,001	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
CN 3	0,006±0,001	<LD	<LD	<LD	0,0076±0,0009	<LD	<LD	<LD	<LD	0,011±0,002	<LD
CP 1.1	0,029±0,003	0,089±0,004	0,084±0,004	<LD	0,047±0,005	<LD	<LD	1,9±0,2	<LD	<LD	0,22±0,03
CP 1.2	0,025±0,005	0,08±0,01	0,08±0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	1,47±0,06	<LD	0,019±0,003	0,23±0,02
CP 2	0,0070±0,0006	0,047±0,006	0,09±0,01	<LD	0,127±0,004	<LD	<LD	0,80±0,03	0,31±0,06	<LD	<LD
CP 3	0,0060±0,0006	<LD	<LD	<LD	0,025±0,005	<LD	<LD	<LD	0,12±0,02	<LD	<LD

CP 4	<LD	0,138±0,006	0,021±0,002	<LD	<LD	<LD	0,039±0,003	0,33±0,03	0,25±0,01	<LD	0,40±0,03
CS 1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	1,1±0,1	0,40±0,06	0,127±0,009	0,17±0,02
CS 2	0,020±0,002	0,057±0,007	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,29±0,04	<LD	<LD
CS 3	<LD	0,014±0,002	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,29±0,03
CS 4	0,012±0,002	0,033±0,006	<LD	<LD	0,08±0,01	<LD	<LD	<LD	0,183±0,005	0,029±0,005	0,23±0,02
CS 5	<LD	<LD	<LD	<LD	0,17±0,02	<LD	<LD	<LD	0,11±0,02	0,13±0,02	0,158±0,001
CS 6	0,0070±0,0008	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
CS 7	<LD	0,0052±0,0002	<LD	<LD	0,027±0,003	<LD	<LD	<LD	0,133±0,003	<LD	<LD
CS 8	0,006±0,001	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,15±0,02	0,030±0,003	0,094±0,01
CV 1	<LD	<LD	<LD	<LD	0,0114±0,0003	0,38±0,07	<LD	<LD	0,16±0,02	0,46±0,06	<LD
CV 2	<LD	0,018±0,001	<LD	0,17±0,03	<LD	3,4±0,1	<LD	<LD	0,186±0,008	0,42±0,03	0,27±0,04
CV 3	0,010±0,002	0,10±0,01	0,028±0,005	0,049±0,004	0,149±0,007	0,80±0,04	<LD	<LD	<LD	<LD	1,17±0,03
SD 1	0,006±0,001	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,09±0,01	<LD	<LD
OE 1	0,007±0,001	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,096±0,005	<LD	<LD

Dos 24 elementos dispostos no Capítulo USP 232, foram detectados Cd, Pb, As, Co, V, Ni, Pd, Ba, Cu, Sn e Cr nas amostras disponíveis. Considerando uma dose diária aproximada de 600 mg, pode-se calcular, a partir da Equação (1), a concentração máxima permitida, mostrada na **Tabela 19**.

Tabela 19 Concentração máxima permitida dos elementos detectados nas amostras analisadas, considerando uma dose diária de aproximadamente 600 mg de medicamento

Elemento	CMP (ug/g)
Cd	8
Pb	8
As	25
Co	83
V	167
Ni	333
Pd	167
Ba	2333
Cu	5000
Sn	10000
Cr	18333

Percebe-se que em nenhuma das amostras foi encontrado níveis de impurezas elementares acima dos limites determinados pelo Capítulo USP 232, indicando um controle de qualidade eficiente para estes produtos.

Observando amostras equivalentes de lotes diferentes, é possível notar um certo padrão nas concentrações de alguns elementos, levando a crer que existe uma provável fonte de contaminação na linha de produção destes insumos farmacêuticos. Tal fato é observado, por exemplo, nas amostras CP 1.1 e CP 1.2, em que as concentrações de Cd, Pb, As, Ba e Cr estão bem próximas.

5 CONCLUSÕES

Por cerca de 100 anos, um procedimento antiquado foi utilizado na identificação de impurezas elementares em medicamentos. Reconhecendo a necessidade de um maior rigor no controle de qualidade, e os avanços tecnológicos na instrumentação analítica que permitiram o desenvolvimento de técnicas sensíveis e seletivas, capazes de detectar contaminantes em níveis extremamente baixos, a USP publicou dois capítulos regulamentando a presença de impurezas elementares em medicamentos. A USP <232> e a USP <233> trouxeram também diversos desafios em termos de preparo de amostra e técnicas instrumentais. A elevada sensibilidade tem seus benefícios, contudo vários obstáculos também surgem, e que precisam ser superados, de modo a garantir que produtos de qualidade cheguem ao consumidor. Várias lacunas precisam ser estudadas e assim serem preenchidas da melhor forma, fornecendo resultados confiáveis respeitando os princípios da química verde. Métodos envolvendo a digestão ácida das amostras vem sendo mais utilizados dentro da área. Este trabalho avaliou a ação de diferentes reagentes no processo, e mostrou que o mais simples, como o uso de ácido nítrico diluído, pode ser tão eficiente (ou até mais) quanto o uso de ácidos concentrados, carregando também os benefícios de seguir os princípios da química verde. Numa tentativa de reduzir ainda mais a geração de resíduos e o uso de reagentes perigosos, procedimentos miniaturizados vem ganhando espaço dentro da química analítica. Pensando nisso, este trabalho desenvolveu um método simples, econômico, rápido e sensível para a determinação de impurezas elementares em medicamentos, constituído por uma micro extração assistida por ultrassom. O uso de pouquíssimas quantidades de amostra e reagente demandam baixos fatores de diluição, contribuindo também para reduzir a geração de resíduos, os quais apresentam baixos níveis de acidez. Além disso, o sistema de ultrassom do tipo *cup horn* é de baixo consumo de energia, fácil manuseio e com boa frequência analítica, comparado por exemplo a um sistema de digestão, reduzindo assim custos de análise e economizando energia elétrica. As figuras de mérito avaliadas foram satisfatórias e o método foi aplicado com sucesso em amostras de antidepressivo, sendo este, portanto, uma alternativa eficaz no controle de qualidade em termos de contaminações inorgânicas em medicamentos. A aplicação do método

proposto em amostras reais mostrou que existe de fato um controle rigoroso da qualidade dos produtos farmacêuticos, uma vez que todas as impurezas inorgânicas detectadas estavam abaixo dos níveis estipulados pela farmacopeia americana.

REFERÊNCIAS

- AGATEMOR, Christian; BEAUCHEMIN, Diane. Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 706, n. 1, p. 66–83, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.027>>.
- AGUIAR, Giovanna de Fátima Moreno *et al.* A Fast Ultrasound-assisted Extraction Sample Preparation for Multi-elemental Determination of Contaminants in Pharmaceutical Ingredients by ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, v. 38, n. 6, p. 165–173, 2017.
- ALLAIN, Pierre *et al.* Signal Enhancement of Elements Due to the Presence of Carbon-Containing Compounds in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 14, p. 1497–1498, 1991.
- AMMANN, Adrian A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 42, p. 419–427, 2008.
- ARAÚJO, Geórgia C.L. *et al.* Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 57, n. 12, p. 2121–2132, 2 dez. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854702001647?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 fev. 2020.
- BALARAM, V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – Status, challenges and moving frontiers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 80, p. 83–95, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615300042>>.
- BARELA, P. S. *et al.* Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS. *Fuel*, v. 204, p. 85–90, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.05.028>>.
- BARIN, Juliano S. *et al.* Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: A critical study of digestion methods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 29, n. 2, p. 352–358, 15 fev. 2014. Disponível em: <www.rsc.org/jaas>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- BARROS, Ariane I. *et al.* Aerosol dilution as a simple strategy for analysis of complex samples by ICP-MS. *Talanta*, v. 178, n. September 2017, p. 805–810, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.024>>.
- BENCS, Laszlo *et al.* Methods for the determination of platinum group elements originating from the abrasion of automotive catalytic converters. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 58, p. 1723–1755, 2003.

BENDICHO, C. *et al.* *Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* [S.l.: s.n.], jan. 2012

BIZZI, C. A. *et al.* Microwave-assisted digestion methods: Towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 32, n. 8, p. 1448–1466, 2017a.

BIZZI, Cezar A. *et al.* Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 29, n. 2, p. 332–338, 2014.

BIZZI, Cezar A. *et al.* Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 66, n. 5, p. 394–398, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2011.04.013>>.

BIZZI, Cezar A. *et al.* Microwave-assisted oxidation of organic matter using diluted HNO₃ under O₂ pressure: Rationalization of the temperature gradient effect for acid regeneration. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 9, p. 1673–1681, 2017.

BOBBILI, Sireesha Jennifer *et al.* A situational analysis of primary health care centers in Brazil: challenges and opportunities for addressing mental illness and substance use-related stigma. *Primary Health Care Research and Development*, v. 23, 1 jul. 2022.

BOTHA, Angelique. A comparison of different calibration strategies for the trace analysis of soil samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Metrologia*, v. 57, n. 6, 2020.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Farmacopeia Brasileira*. 5a. ed. [S.l.]: Editora Fiocruz, 2010. v. 1. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>.

BRAZIL. *Ordinance No. 31, of January 13, 1998.* . [S.l.]: Diário Oficial da União. , [S.d.]

CABALEIRO, Noelia; DE LA CALLE, Inmaculada. Miniaturized alternatives to conventional sample preparation techniques for solid samples. *Miniaturization in Sample Preparation*, n. i, p. 308–415, 2014.

CADORE, Solange; MATOSO, Érika; SANTOS, Mirian Cristina. *A espectrometria atômica e a determinação de elementos metálicos em material polimérico. Química Nova.* [S.l.]: scielo. , 2008

CAIRNS, Warren R.L. *et al.* The use of cation exchange matrix separation coupled with ICP-MS to directly determine platinum group element (PGE) and other trace element emissions from passenger cars equipped with diesel particulate filters (DPF). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 399, n. 8, p. 2731–2740, 2011.

CASTRO, Jacira T. *et al.* A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*, v. 78, n. 4–5, p. 1378–1382, 2009.

CHAHROUR, Osama *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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.045>>.

CHAN, George C.Y.; HIEFTJE, Gary M. Experimental evidence of state-selective charge transfer in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 59, n. 7, p. 1007–1020, 2004.

DAMS, Richard F.J.; GOOSSENS, Jan; MOENS, Luc. Spectral and non-spectral interferences in inductively coupled plasma mass-spectrometry. *Mikrochimica Acta*, v. 119, n. 3–4, p. 277–286, 1995.

DE LA CALLE, Inmaculada *et al.* Analytical evaluation of a cup-horn sonoreactor used for ultrasound-assisted extraction of trace metals from troublesome matrices. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 64, n. 9, p. 874–883, 2009a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2009.07.004>>.

DEAN, John A. Electrolytes, electromotive force and chemical equilibrium. *LANGE'S HANDBOOK OF CHEMISTRY*. 15. ed. [S.l.]: MCGRAW-HILL, INC, 1999. p. 8.6-8.17.

D'ILIO, Sonia *et al.* Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: Still a challenge? A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 698, n. 1–2, p. 6–13, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.04.052>>.

EVANS, E. Hywel; GIGLIO, Jeffrey J. Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. A review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 8, n. 1, p. 1–18, 1993.

FARNSWORTH, Paul B. *et al.* Experimental studies of charge transfer reactions between argon and the third row metals calcium through copper in the inductively coupled plasma. *Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy*, v. 54, n. 14, p. 2143–2155, 1999.

FIALHO, L.L. *et al.* Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? *Talanta*, v. 98, p. 272–276, 2012.

FILGUEIRAS, A. V. *et al.* Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 53, n. 2, p. 433–441, 2000.

FLORES, Érico Marlon de Moraes. *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*. 1st. ed. Amsterdam: Elsevier, 2014.

FLORES, Érico M.M. *et al.* Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels - A brief overview and recent applications. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 62, n. 9, p. 1051–1064, 2007.

FONTANA, Danilo *et al.* Materials recovery from waste liquid crystal displays: A focus on indium. *Waste Management*, v. 45, p. 325–333, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.043>>.

GARCÍA-POYO, M. Carmen *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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2014.11.003>>.

GARITTA, Julia A. *et al.* Microwave-Assisted Acid Digestion: Evaluation of Reaction Vessel Design and Performance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 32, n. 4, p. 702–711, 2021.

GODOY, Naiara 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, n. October 2020, p. 1–7, 2021.

GONZALEZ, Mário H. *et al.* Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. *Talanta*, v. 79, n. 2, p. 396–401, 2009.

GOUVEIA, Sandro T. *et al.* Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. *Analytica Chimica Acta*, v. 445, n. 2, p. 269–275, 2001.

GRAY, Alan L. Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry. *The Analyst*, v. 110, n. 5, p. 551–556, 1985.

GRINDLAY, Guillermo *et al.* A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 86, p. 42–49, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2013.05.002>>.

GRINDLAY, Guillermo *et al.* Carbon-, sulfur-, and phosphorus-based charge transfer reactions in inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 115, p. 8–15, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0584854715002621>>.

GU, Xiao *et al.* Development of a sample preparation method for accurate analysis of 24 elemental impurities in oral drug products by ICP-MS according to USP/ICH guidelines. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 36, n. 3, p. 512–517, 2021.

HATTENDORF, Bodo; GÜNTHER, Detlef. Suppression of in-cell generated interferences in a reaction cell ICP-MS by bandpass tuning and kinetic energy discrimination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 19, n. 5, p. 600–606, 2004.

HEYWARD, James *et al.* The Value of U.S. Pharmacopeial Standards: A Review of the Literature. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 107, n. 10, p. 2611–2617, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354918303368>>.

HUNYADI, Simona E.; MURPHY, Catherine J. Synthesis and characterization of silver-platinum bimetallic nanowires and platinum nanotubes. *Journal of Cluster Science*, v. 20, n. 2, p. 319–330, ago. 2009.

JAGTAP, Rajani; MAHER, William. *Determination of selenium species in biota with an emphasis on animal tissues by HPLC-ICP-MS*. *Microchemical Journal*. [S.l.]: Elsevier Inc. , 1 jan. 2016

KARMAKAR, Rajib; SEN, Kamalika. Aqueous biphasic extraction of metal ions: An alternative technology for metal regeneration. *Journal of Molecular Liquids*, v. 273, p. 231–247, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.036>>.

KARUNASAGAR, D; ARUNACHALAM, J. Determination of cadmium by inductively coupled plasma mass spectrometry-reduction of molybdenum oxide interferences by addition of acetonitrile. *Analytica Chimica Acta*. [S.l.: s.n.], 2001.

KATAKAM, Lakshmi Narasimha Rao; ABOUL-ENEIN, Hassan Y. Elemental Impurities Determination by ICP-AES / ICP-MS: A review of Theory, Interpretation of Concentration Limits, Analytical Method Development Challenges and Validation Criterion for Pharmaceutical Dosage Forms. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 16, n. 4, p. 392–403, 2019.

KRUSHEVSKA, Antoaneta *et al.* Determination of the residual carbon content by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after decomposition of biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 7, n. 6, p. 845–850, 1992.

KUMATA, Hidetoshi *et al.* Elimination of interfering molybdenum oxyanion with an anion-exchange monolithic spin tip (AXTip) for precise determination of cadmium in human urine by ICP-MS. *Talanta Open*, v. 2, 1 dez. 2020.

LEE, A. R.; ENOS, C. S.; BRENTON, A. G. Collisional excitation of CO: a study of the wigner spin rule. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, v. 104, n. 1, p. 49–62, 1991.

LEWEN, Nancy *et al.* A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, n. 4, p. 739–752, 2004.

LINARES, P. *et al.* Analytical sonochemistry: A review. *Journal of Automatic Chemistry*, v. 10, n. 2, p. 88–94, 1988.

LORENÇATTO, Rodolfo; ARANTES DE CARVALHO, Gabriel Gustinelli; OLIVEIRA, Pedro Vitoriano. Direct analysis of liquid drugs by inductively coupled plasma mass spectrometry using aerosol dilution. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 35, n. 10, p. 2179–2190, 2020.

LUM, Tsz Shan; SZE-YIN LEUNG, Kelvin. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 31, n. 5, p. 1078–1088, 2016.

MACHADO, Raquel C. *et al.* Complex samples and spectral interferences in ICP-MS: Evaluation of tandem mass spectrometry for interference-free determination of cadmium, tin and platinum group elements. *Microchemical Journal*, v. 130, p. 271–275, 1 jan. 2017.

MAITHANI, M. *et al.* Elemental impurities in pharmaceutical products adding fuel to the fire. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 108, p. 104435, 1 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230019301990?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 mar. 2020.

MATUSIEWICZ, Henryk. New technology for in situ visualization, monitoring and controlling microwave chemical reaction progress using a focused microwave high pressure-temperature closed-vessel digestion system. *Analyst*, v. 134, n. 7, p. 1490–1497, 2009.

MATUSIEWICZ, Henryk. Sample Decomposition Techniques in Inorganic Trace Elemental Analysis BT - Handbook of Trace Analysis: Fundamentals and Applications. In: BARANOWSKA, IRENA (Org.). Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 75–122. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19614-5_5>.

MCCURDY, E.; POTTER, D.; WOODS, G. Unmatched Removal of Spectral Interferences in ICP-MS Using the Agilent Octopole Reaction System with Helium Collision Mode. p. 1–8, 2006.

MIRANDA, Kelber; PEREIRA-FILHO, Edenir Rodrigues; GOMES NETO, José Anchieta. A new closed-vessel conductively heated digestion system: Fostering plant analysis by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 29, n. 5, p. 825–831, 2014.

MULLER, Aline 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, 1 maio 2015.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014010066?via%3Dihub>>. Acesso em: 1 mar. 2020.

MÜLLER, Edson Irineu *et al.* Wet Digestion Using Microwave Heating. *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*. 1st. ed. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 415.

NAGESWARA RAO, R.; KUMAR TALLURI, M. V.N. 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, n. 1, p. 1–13, 2007.

NASCENTES, Clésia C.; KORN, Mauro; ARRUDA, Marco A.Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal*, v. 69, n. 1, p. 37–43, 2001.

NI, Wenshan *et al.* Simultaneous determination of ultra-trace Au, Pt, Pd, Ru, Rh, Os and Ir in geochemical samples by KED-ICP-MS combined with Sb-Cu fire assay and microwave digestion. *Microchemical Journal*, v. 158, 1 nov. 2020.

OLESIK, John W. *et al.* Further insight into analyte transport processes and water vapor, aerosol loading in ICP-OES and ICP-MS. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 176, n. November 2020, p. 106038, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.106038>>.

PARDINHO, Renan B. *et al.* Determination of toxic elements in yerba mate by ICP-MS after diluted acid digestion under O₂ pressure. *Food Chemistry*, v. 263, n. January, p. 37–41, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.112>>.

PERKINELMER, Inc; SHELTON, CT. Implementation of USP New Chapters <232> and <233> on Elemental Impurities in Pharmaceutical Products. *PerkinElmer*, p. 1–6, 2014. Disponível em:

<http://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/WHT_Implementation-of-USP-232-233.pdf>.

PINHEIRO, Fernanda C; BARROS, Ariane I; NÓBREGA, Joaquim A. Elemental impurities analysis in name-brand and generic omeprazole drug samples. *Heliyon*, v. 6, n. 2, p. e03359, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844020302048>>.

PINHEIRO, Fernanda C.; BARROS, Ariane I.; NÓBREGA, Joaquim A. Microwave-assisted sample preparation of medicines for determination of elemental impurities in compliance with United States Pharmacopeia: How simple can it be? *Analytica Chimica Acta*, v. 1065, p. 1–11, 2019.

PINHEIRO, Fernanda C.; NÓBREGA, Joaquim A. An overview of sample preparation procedures for determination of elemental impurities in medicines. *Microchemical Journal*, p. 107189, jan. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X22000170>>.

PINHEIRO, Fernanda Costa *et al.* Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 174, p. 471–478, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.018>>.

PLUHÁČEK, Tomáš; RUČKA, Michael; MAIER, Vítězslav. A direct LA-ICP-MS screening of elemental impurities in pharmaceutical products in compliance with USP and ICH-Q3D. *Analytica Chimica Acta*, v. 1078, p. 1–7, 31 out. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701930710X?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 mar. 2020.

POHL, Pawel *et al.* *Impact and practicability of recently introduced requirements on elemental impurities. TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. [S.l.]: Elsevier B.V. . Acesso em: 18 jan. 2021. , 1 abr. 2018

PUPYSHEV, A. A.; SEMENOVA, E. V. Formation of doubly charged atomic ions in the inductively coupled plasma. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 56, n. 12, p. 2397–2418, 2001.

ROCHA, Diogo L. *et al.* Greening sample preparation in inorganic analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 45, p. 79–92, 2013.

RYAN, J.B. *et al.* Falsely elevated plasma selenium due to gadolinium contrast interference: a novel solution to a pre-analytical problem. *Pathology*, v. 46, p. S57–S58, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/01.PAT.0000443526.86990.ca>>.

SEIDI, Shahram; YAMINI, Yadollah. Analytical sonochemistry; Developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques. *Central European Journal of Chemistry*, v. 10, n. 4, p. 938–976, 2012.

SOLANKI, Himanshu K.; PRAJAPATI, Vipul D.; JANI, Girish K. Microwave technology-A potential tool in pharmaceutical science. *International Journal of PharmTech Research*, v. 2, n. 3, p. 1754–1761, 2010.

SORIA, Ana Cristina; VILLAMIEL, Mar. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 21, n. 7, p. 323–331, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>>.

STØVING, Celina *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, n. 2013, p. 209–214, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.007>>.

SUGIYAMA, Naoki; SHIKAMORI, Yasuyuki. Removal of spectral interferences on noble metal elements using MS/MS reaction cell mode of a triple quadrupole ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 30, n. 12, p. 2481–2487, 2015.

TANNER, Scott D *et al.* Theory, Design and Operation of a Dynamic Reaction Cell for ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, v. 20, n. 2, p. 45–78, 1999.

TEIXEIRA, Leonel Silva *et al.* Fast determination of trace elements in organic fertilizers using a cup-horn reactor for ultrasound-assisted extraction and fast sequential flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 119, p. 232–239, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.018>>.

TELES, Vânia de Lourdes G. *et al.* Identification of Metabolites in Basil Leaves by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging after Cd Contamination. *ACS Agricultural Science & Technology*, v. 1, n. 1, p. 21–28, 2021.

THAYER, Ann M. Trace Metals Debate. *Chemical & Engineering News Archive*, v. 91, n. 33, p. 10–13, 2013.

TODOLI, José L; VANHAECKE, Frank. *Liquid Sample Introduction and Electrothermal Vaporisation for ICP-MS: Fundamentals and Applications. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, Wiley Online Books. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781444305463.ch5>>. , 9 set. 2005

TODOLÍ, José Luis; MERMET, Jean Michel. Acid interferences in atomic spectrometry: Analyte signal effects and subsequent reduction. *Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy*, v. 54, n. 6, p. 895–929, 1999.

USP. The United States pharmacopeia, chapter 232: elemental impurities - limits. *United States Pharmacopoeia*. [S.l: s.n.], 2018a. v. 40. p. 1–3.

USP. The United States pharmacopeia, chapter 233: elemental impurities - procedures. *United States Pharmacopoeia*. [S.l: s.n.], 2018b. p. 1–5.

USP, United States Pharmacopeia Convention. *About USP*. Disponível em: <<https://www.usp.org/about>>. Acesso em: 7 abr. 2021a.

USP, United States Pharmacopeia Convention. *Building trust for 200 years: A timeline of USP*. Disponível em: <<https://www.usp.org/200-anniversary/usp-timeline>>. Acesso em: 30 ago. 2020b.

VAN DER MULLEN, J. A.M. *et al.* On the charge transfer in an inductively coupled argon plasma. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 42, n. 9, p. 1039–1051, 1987.

VANHAECKE, F.; VAN HOECKE, K.; CATRY, C. Optimization of sample preparation and a quadrupole ICP-MS measurement protocol for the determination of elemental impurities in pharmaceutical substances in compliance with USP guidelines. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 27, n. 11, p. 1909–1919, 2012.

VANHOE, Hans *et al.* Spectral Interferences Encountered in the Analysis of Biological Materials by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry *. v. 9, n. March, 1994.

VRIJENS, Jan *et al.* Spectral interferences in the analysis of cadmium in human blood by ICP-MS: Comparison between high resolution sector field ICP-MS and quadrupole ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 26, n. 9, p. 1819–1826, set. 2011.

WILSCHEFSKI, Scott C.; BAXTER, Matthew R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clinical Biochemist Reviews*, v. 40, n. 3, p. 115–133, 2019.

WISNIEWSKA, Joanna; YANG, Chia Min; ZIOLEK, Maria. Changes in bimetallic silver – platinum catalysts during activation and oxidation of methanol and propene. *Catalysis Today*, p. 89–96, 1 ago. 2019.

YAMADA, Noriyuki. Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 110, p. 31–44, 2015.

ZACHARIADIS, G. *et al.* Optimized microwave-assisted decomposition method for multi-element analysis of glass standard reference material and ancient glass specimens by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, v. 68, n. 5, p. 1448–1456, 2006.

ZAJDI, Kahkashan. *Technical Guidance for the Preparation and Analysis of Pharmaceutical Materials for Compliance with Elemental Impurities — Limits (232)*. Disponível em: <https://online.uspnf.com/uspnf/document/2_GUID-7AA87A6D-12F4-45A0-8C7F-66EA786C0D20_10101_en-US?source=Quick%20Search&highlight=Technical%20Guidance%20for%20the%20Preparation%20and%20Analysis%20of%20Pharmaceutical%20Materials%20for%20Compliance%20with%20Elemental%20Impurities%20>. Acesso em: 3 nov. 2019

ANEXO A – Composição e demais informações das amostras analisadas

Cód.	P.A./TEOR	EXCIPIENTES	NOME COMERCIAL	LOTE	VALIDADE		
	Cloridrato de paroxetina/ 10mg	fosfato de cálcio dibásico	Pondera®	536236	out/19		
		celulose microcristalina					
		croscarmelose sódica					
CP1.1		dióxido de silício					
CP1.2		estearato de magnésio				565830	mai/20
		Hipromelose					
		Macrogol					
		dióxido de titânio					
		óxido de ferro amarelo					
	Bromidrato de citalopram/ 20mg	amido de milho	Città®	555329	mar/20		
		lactose					
		celulose microcristalina					
		crospovidona					
		croscarmelose sódica					
		estearato de magnésio					
		óleo vegetal hidrogenado					
		Hipromelose					
		Macrogol					
		dióxido de titânio					
OE1	Oxalato de escitalopram/ 10mg	povidona	Reconter®	17E1014	mai/19		

		lactose monoidratada			
		celulose microcristalina			
		croscarmelose sódica			
		estearato de magnésio			
		Hipromelose			
		Macrogol			
CS1	Cloridrato de sertralina/ 25mg	Fosfato de cálcio dibásico	-	540583	dez/19
		hiprolose			
		carmelose sódica			
		amidoglicolato de sódio			
		estearato de magnésio			
		celulose microcristalina			
		dióxido de titânio			
		Hipromelose			
		Macrogol			
		talco			
CB1	Cloridrato de bupropiona/ 150mg	cloridrato de cisteína monoidratado	Zetron XL®	18H0239	jul/20
		álcool polivinílico			
		dióxido de silício			
		beenato de glicerila			

		etilcelulose			
		hiprolose			
		povidona			
		sebacato de dibutila			
		copolímero de ácido metacrílico e metacrilato de etila			
		citrato de trietila			
CF1	Cloridrato de fluoxetina/ 20mg	amido pré-gelatinizado	Genérico	MG5730	nov/09
CV1	Cloridrato de venlafaxina/ 150mg	celulose microcristalina	Efexor® XR	42834	fev/10
		Hipromelose			
		etilcelulose			
		tinta branca Tek-Print			
		óxido de ferro amarelo			
		óxido de ferro vermelho			
		dióxido de titânio			
		Gelatina			

CV2	Cloridrato de venlafaxina/ 150mg	glóbulos de açúcar	Venlift OD	B9867004	fev/10
		Hipromelose			
		dióxido de silício			
		talco			
		etilcelulose			
BC2	Bromidrato de Citalopram/ 20mg	Celulose microcristalina	Genérico	MH2748	abr/10
		lactose			
		estearato de magnésio			
		dióxido de silício			
		Hipromelose			
		dióxido de titânio			
		silicato de magnésio			
		Macrogol			
CA1	Cloridrato de amitriptilina/ 75mg	fosfato de cálcio dibásico	Genérico	-	
		lactose monoidratada			
		amido de milho			
		celulose microcristalina			
		dióxido de silício			
		ácido esteárico			
		estearato de magnésio			
		hidroxipropil metil celulose			
		hidroxipropil celulose			
		talco			
		dióxido de titânio			

		laca de amarelo sunset			
CF2	Cloridrato de fluoxetina/ 10mg	amido	Fluxene	131147 (PF)	40238
		dióxido de silício			
CF3	Cloridrato de fluoxetina/ 20mg	celulose microcristalina	Verotina	8A1600	jan/10
		fosfato de cálcio dibásico			
		povidona			
		talco			
		estearato de magnésio			
		dióxido de silício			
		croscarmelose sódica			
		Macrogol			
		dióxido de titânio			
ácido 2-(dimetilamino) etilmetacrilatocobutilmetacrilato					
CF4	Cloridrato de fluoxetina/ 20mg	celulose microcristalina	Daforin	85698	abr/09
		croscarmelose sódica			
		estearato de magnésio			
		óleo vegetal hidrogenado			
		etilcelulose			
		Hipromelose			
		Macrogol			
		dióxido de titânio			
cloreto de metileno					
CF5	Cloridrato de fluoxetina/ 10mg	celulose microcristalina	Daforin	120288	out/09
		estearato de magnésio			
CB2	Cloridrato de bupropiona/ 150mg	celulose microcristalina	Genérico	146190	fev/11

		cloridrato de cisteína monoidratado			
		álcool polivinílico			
		estearato de magnésio			
		etilcelulose			
		povidona			
		Macrogol			
		copolímero de ácido metacrílico e metacrilato de etila			
		citrato de trietila			
		dióxido de silício			
		celulose microcristalina			
		povidona			
		carbômer 71G			
CB3.1		Hipromelose		2H5489	mai/23
CB3.2	Cloridrato de bupropiona/ 150mg	cloridrato de cisteína monoidratado	Bupium XL	2I8308	jun/23
		estearato de magnésio			
		ftalato de hipromelose			
		talco			
		Macrogol			
CV3	Cloridrato de venlafaxina/ 75mg	Sacarose	Genérico	135757	mar/03
		amido			
		talco			
		Hipromelose			
		etilcelulose			
		triacetina			
CP2	Cloridrato de paroxetina/ 20mg	Lactose	Benepax	804128	abr/10
		celulose microcristalina			
		fosfato de cálcio dibásico			

		amidoglicolato de sódio			
		estearato de magnésio			
		hidroxipropilmetil celulose			
		polietilenoglicol			
		dióxido de titânio			
CP3	Cloridrato de paroxetina/ 30mg	fosfato de cálcio dibásico	Pondera®	133276	abr/10
		celulose microcristalina			
		croscarmelose sódica			
		dióxido de silício			
		estearato de magnésio			
		Hipromelose			
		Macrogol			
		dióxido de titânio			
		corante laca azul brilhante			
CP4	Cloridrato de paroxetina/ 40mg	fosfato de cálcio dibásico	Pondera®	130376	fev/10
		amidoglicolato de sódio			
		dióxido de silício			
		estearato de magnésio			
		Hipromelose			
		Macrogol			
		dióxido de titânio			
		sicovit laca indigotina			
CN1.1	Cloridrato de nortriptilina/ 10mg	estearato de magnésio	Genérico	152674	abr/11
CN1.2		amido		142043	out/10
CN2	Cloridrato de nortriptilina/ 50mg	(bula não encontrada)	Nortrip	1346015	jul/06
CN3	Cloridrato de nortriptilina/ 50mg	amido	Pamelor	Z0067	mai/10
		dimeticona			

SD1	Succinato de desvenlafaxina monoidratado/ 100mg	Celulose microcristalina	Genérico	LBKP01708	dez/22
		Hipromelose			
		dióxido de silício			
		talco			
		estearato de magnésio			
		álcool polivinílico			
		dióxido de titânio			
		Macrogol			
		óxido de ferro vermelho			
		óxido de ferro amarelo			
		BC3			
celulose microcristalina					
lactose monoidratada					
copovidona					
dióxido de silício					
croscarmelose sódica					
estearato de magnésio					
Hipromelose					
dióxido de titânio					
polissorbato 80					
Macrogol					
BC4	Bromidrato de Citalopram/ 40mg	lactose monoidratada	Procimax	7B6310	nov/09
		celulose microcristalina			
		croscarmelose sódica			
		dióxido de silício			
		estearato de magnésio			
		Macrogol			
		Hipromelose			

		corante amarelo crepúsculo LA			
	Cloridrato de sertralina/ 100mg	fosfato de cálcio dibásico	Genérico	133168	mai/10
		hiprolose			
		carmelose sódica			
		celulose microcristalina			
		amidoglicolato de sódio			
		estearato de magnésio			
		dióxido de titânio			
		hipromelose			
		macrogol			
		talco			
CS3	Cloridrato de sertralina/ 50mg	fosfato de cálcio dibásico	Assert	135030	jun/10
		hiprolose			
		carmelose sódica			
		celulose microcristalina			
		amidoglicolato de sódio			
		estearato de magnésio			
		dióxido de titânio			
		hipromelose			
		macrogol			
		talco			
CS4	Cloridrato de sertralina/ 100mg	talco	Genérico	42458	ago/09
		amidoglicolato de sódio			
		celulose microcristalina			
		fosfato de cálcio dibásico di-hidratado			
		estearato de magnésio			
		dióxido de silício			

		macrogol			
		dióxido de titânio			
		álcool polivinílico			
CS5	Cloridrato de sertralina/ 50mg	fosfato de cálcio dibásico diidratado	Zoloft	70472001E	nov/10
		hiprolose			
		estearato de magnésio			
		celulose microcristalina			
		amidoglicolato de sódio			
		hipromelose			
		macrogol			
		dióxido de titânio			
		polissorbato 80			
CS6	Cloridrato de sertralina/ 25mg	croscarmelose sódica	Tolrest	800818	fev/11
		celulose microcristalina			
		amido			
		lactose monoidratada			
		povidona			
		dióxido de silício			
		estearato de magnésio			
		hipromelose			
		macrogol			
		dióxido de titânio			
CS7	Cloridrato de sertralina/ 50mg	croscarmelose sódica	Tolrest	0801879A	abr/10
		amido			
		lactose monoidratada			
		dióxido de silício			
		estearato de magnésio			
		hipromelose			
		macrogol			

		dióxido de titânio			
		corante amarelo FDC n° 6 laca de alumínio			
CS8	Cloridrato de sertralina/ 75mg	croscarmelose sódica	Tolrest	8033453	jul/11
		amido			
		lactose monoidratada			
		dióxido de silício			
		estearato de magnésio			
		hipromelose			
		macrogol			
		dióxido de titânio			
		óxido férrico amarelo			
CA2	Cloridrato de amitriptilina/ 12,5mg + clordiazepóxido 5mg	lactose monoidratada	Limbitrol	3877	dez/10
		amido			
		talco			
		estearato de magnésio			
		cápsula de gelatina			
		corante azul brilhante FDC n° 01			
		corante amarelo FDC n° 6			
		dióxido de titânio			
		óxido férrico amarelo			

ANEXO B – Composição das amostras de multivitamínicos

MV1 – Beta caroteno, tiamina, riboflavina, piridoxina, cianocobalamina, ácido ascórbico, colecalciferol, acetato DL-alfa-tocoferol, fitomenadiona, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, carbonato de cálcio, óxido cúprico, fumarato ferroso, picolinato de cromo, iodeto de potássio, óxido de magnésio, sulfato de manganês, molibdato de sódio, nicotinamida, selenato de sódio, óxido de zinco, polivinilpirrolidona, álcool etílico, talco micronizado e corante amarelo crepúsculo INS 110

MV2 – Fosfato dibásico de cálcio anidro, carbonato de cálcio, óxido de magnésio, ácido ascórbico, fumarato ferroso, acetato de DL-alfa-tocoferol, niacina, óxido de zinco, pantotenato de cálcio, betacaroteno, sulfato de manganês monoidratado, biotina, acetato de vitamina A, vitamina D, vitamina K, cloridrato de piridoxina, riboflavina, monitrato de tiamina, sulfato de cobre anidro, ácido fólico, cianocobalamina, cloreto hexaidratado de cromo, molibdato de sódio, selenato de sódio, iodeto de potássio e estearato de magnésio. Agente de massa: etilcelulose. Antiumectante dióxido de silício. Estabilizantes: celulose microcristalina, croscarmelose sódica e hidroxipropilmetilcelulose. Corante: dióxido de titânio, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina. Umectante triacetina. Lubrificante: estearato de magnésio

MV3 – Ácido ascórbico, sulfato ferroso, vitamina E, nicotinamida, sulfato de zinco, sulfato de manganês, d-pantotenato de cálcio, acetato de vitamina A, selenito de sódio, loridrato de tiamina, riboflavina, cloridrato de piridoxina, ácido fólico, vitamina D3, cianocobalamina e corante licopeno. Antiumectante dióxido de silício, estabilizantes celulose microcristalina e croscarmelose sódica, revestimento (agente de corpo etilcelulose, estabilizante hidroxipropilmetilcelulose, umectante triacetina, corante inorgânico dióxido de titânio e corantes azul brilhante e indigotina).

ANEXO C – Composição das amostras utilizadas na validação do método de referência

Cód.	P.A./TEOR	EXCIPIENTES
SD1	Succinato de desvenlafaxina monoidratado/ 100mg	Celulose microcristalina
		Hipromelose
		dióxido de silício
		talco
		estearato de magnésio
		álcool polivinílico
		dióxido de titânio
		Macrogol
		óxido de ferro vermelho
		óxido de ferro amarelo
TC1	Trometamol cetorolaco/ 10mg (anti inflamatório)	Lactose
		Sorbitol
		Carmelose sódica
		sucralose
		butil-hidroxianisol
		crospovidona
		dióxido de silício
		estearato de magnésio
aroma de limão		

ANEXO D – Artigo publicado

Talanta 271 (2024) 125604



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta



A new ultrasound-assisted microextraction for elemental impurities determination in tablets by ICP-MS according to USP chapters 232 and 233

Igor Forattini Prates C. Noronha, Fernanda C. Pinheiro, Clésia C. Nascentes*

Department of Chemistry, ICEX, Federal University of Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cup horn
ICP-MS
Sample preparation
Tablets
Quality control

ABSTRACT

Along with the United States Pharmacopeia (USP) chapters 232 and 233 regarding elemental impurities in pharmaceutical products, new challenges have been imposed in terms of sample preparation procedures prior to inductively coupled plasma mass spectrometry analysis, considering the matrix complexities. As so, a new microextraction procedure assisted by ultrasound using a cup-horn sonoreactor, minimal reactants, and sample was proposed and validated according to USP. The procedure was optimized with samples of milled tablets and 3 different acid mixtures (HNO_3 , $3\text{HNO}_3:1\text{HCl}$, and $9\text{HNO}_3:1\text{HF}$) and it was compared with microwave-assisted acid digestion. In the validation step, recoveries ranging from 85 to 120 % and RSD below 10 % were obtained for 22 analytes (except Ag and Pt) with satisfactory linearity and good sensitivity. The method was then applied for 37 samples of antidepressants, which presented trace levels of As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Pd, Sn, and V.

APÊNDICE A – Testes t: Otimização do método de microextração

Co					
	<i>MIX 1</i>	<i>DIG</i>		<i>MIX 3</i>	<i>DIG</i>
Média	1,085017144	0,743310275	Média	1,045501066	0,743310275
Variância	0,004660694	0,000502826	Variância	0,007458285	0,000502826
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	0,00258176		Variância agrupada	0,003980555	
Hipótese da diferença de média	0		Hipótese da diferença de média	0	
Graus de liberdade	4		gl	4	
Stat t	8,23647537		Stat t	5,866175149	
P(T<=t) bi-caudal	0,001184863		P(T<=t) bi-caudal	0,004216508	
t crítico bi-caudal	2,776445105		t crítico bi-caudal	2,776445105	
V					
	<i>MIX 1</i>	<i>DIG</i>		<i>MIX 3</i>	<i>DIG</i>
Média	0,753430643	0,695863185	Média	0,912817685	0,695863185
Variância	0,001571329	0,006375959	Variância	0,001247171	0,006375959
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	0,003973644		Variância agrupada	0,003811565	
Hipótese da diferença de média	0		Hipótese da diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	1,118479969		Stat t	4,303904519	
P(T<=t) bi-caudal	0,325994792		P(T<=t) bi-caudal	0,012606625	
t crítico bi-caudal	2,776445105		t crítico bi-caudal	2,776445105	

Ni					
	MIX 1	DIG		DIG	MIX 3
Média	5,125657085	4,869365227	Média	4,869365227	4,77161713
Variância	0,086157166	0,399310997	Variância	0,399310997	0,040666125
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	0,242734081		Variância agrupada	0,219988561	
Hipótese da diferença de média	0		Hipótese da diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	0,637110937		Stat t	0,255243028	
P(T<=t) bi-caudal	0,558691357		P(T<=t) bi-caudal	0,811122311	
t crítico bi-caudal	2,776445105		t crítico bi-caudal	2,776445105	
Ba					
	DIG	MIX 1		DIG	MIX 3
Média	1,92687365	1,24338983	Média	1,92687365	0,98990729
	4	2		4	2
Variância	0,12461453	0,05482970	Variância	0,12461453	1,97406E-05
Observações	6	7	Observações	6	3
	3	3		3	3
Variância agrupada	0,08972212		Hipótese da diferença de média	0	
Hipótese da diferença de média	2		gl	2	
gl	0		Stat t	4,59690869	
Stat t	4			0,04420814	
	2,79462861		P(T<=t) bi-caudal	2	
Stat t	6		t crítico bi-caudal	4,30265273	
P(T<=t) bi-caudal	0,04907965				
t crítico bi-caudal	2,77644510				
	5		OBS: Variâncias foram estatisticamente diferentes		

Cr					
	<i>DIG</i>	<i>MIX 1</i>		<i>MIX 3</i>	<i>DIG</i>
Média	30,01931972	26,48270884	Média	34,79081235	30,01931972
Variância	6,20499957	0,725637394	Variância	11,72615194	6,20499957
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	3,465318482		Variância agrupada	8,965575754	
Hipótese da diferença de média	0		Hipótese da diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	2,326812191		Stat t	1,95168981	
P(T<=t) bi-caudal	0,080532897		P(T<=t) bi-caudal	0,122718947	
t crítico bi-caudal	2,776445105		t crítico bi-caudal	2,776445105	
Mo					
	<i>DIG</i>	<i>MIX 1</i>		<i>DIG</i>	<i>MIX 3</i>
Média	40,53096366	31,50272159	Média	40,53096366	29,98642018
Variância	13,95891726	74,43036946	Variância	13,95891726	48,75304138
Observações	3	3	Observações	3	2
Variância agrupada	44,19464336		Variância agrupada	25,55695863	
Hipótese da diferença de média	0		Hipótese da diferença de média	0	
gl	4		gl	3	
Stat t	1,663274801		Stat t	2,28488223	
P(T<=t) bi-caudal	0,171590812		P(T<=t) bi-caudal	0,106456006	
t crítico bi-caudal	2,776445105		t crítico bi-caudal	3,182446305	

Cu					
	<i>DIG</i>	<i>MIX 1</i>		<i>DIG</i>	<i>MIX 3</i>
Média	722,1085389	705,8877901	Média	722,1085389	697,6781839
Variância	644,9648837	1445,994271	Variância	644,9648837	171,9879522
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	1045,479578		Variância agrupada	408,4764179	
Hipótese da diferença de média	0		Hipótese da diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	0,61441067		Stat t	1,480443752	
P(T<=t) uni-caudal	0,286085635		P(T<=t) uni-caudal	0,106431455	
t crítico uni-caudal	2,131846786		t crítico uni-caudal	2,131846786	
P(T<=t) bi-caudal	0,572171269		P(T<=t) bi-caudal	0,212862911	
t crítico bi-caudal	2,776445105		t crítico bi-caudal	2,776445105	