



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Câmpus de São José do Rio Preto

JÉSSICA SILVA COELHO

**IMPUREZAS INORGÂNICAS EM MEDICAMENTOS: DO PREPARO DE  
AMOSTRA A DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR ICP-MS**

São José do Rio Preto  
2016

JÉSSICA SILVA COELHO

**IMPUREZAS INORGÂNICAS EM MEDICAMENTOS: DO PREPARO DE  
AMOSTRA A DETERMINAÇÃO ELEMENTAR POR ICP-MS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez  
Co-orientadora: Dr. Ana Rita de Araújo Nogueira

São José do Rio Preto  
2016

Coelho, Jéssica Silva.

Impurezas inorgânicas em medicamentos: do preparo de amostra a determinação elementar por ICP-MS / Jéssica Silva Coelho. -- São José do Rio Preto, 2016

92 f. : il., grafs., tabs.

Orientador: Mario Henrique Gonzalez

Coorientador: Ana Rita de Araújo Nogueira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química ambiental. 2. Medicamentos - Análise. 3. Contaminantes inorgânicos. 4. Farmacopeia 5. Química farmacêutica. I. Gonzalez, Mario Henrique. II. Nogueira, Ana Rita de Araújo. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 615.07

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE UNESP -  
Câmpus de São José do Rio Preto

JÉSSICA SILVA COELHO

IMPUREZAS INORGÂNICAS EM MEDICAMENTOS: DO PREPARO DE  
AMOSTRAS A DETERMINAÇÕES ELEMENTARES POR ICP-MS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Mario Henrique Gonzalez  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Profa. Dra. Jozi Godoy Figueiredo  
UCS- Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
30 de novembro de 2016

Dedico aos meus pais, Eraldo e Edneia e à minha irmã Julia, por sempre me apoiarem e acreditarem na minha capacidade de enfrentar os obstáculos e realizar todos os meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela oportunidade de realizar este sonho, por me guiar e me dar forças para continuar mesmo frente às dificuldades, e por possibilitar que eu aprendesse e evoluísse a cada dia.

A toda minha família, principalmente aos meus pais Eraldo e Edneia por todo o esforço realizado, apoio e amor incondicional em todos os momentos de minha vida, à minha irmã Julia, e meus avós Angélica e José Liz da Silva e Maria Aparecida e Ildfonso Coelho.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Mario Henrique Gonzalez por toda dedicação, paciência, disponibilidade, apoio, e também por todo conhecimento compartilhado. E, acima de tudo, pelo carinho, compreensão e amizade que foram muito importantes para a conclusão dessa jornada.

À minha co-orientadora Dr. Ana Rita de Araújo Nogueira e à EMBRAPA Pecuária Sudeste pelo apoio a esse projeto disponibilizando seus laboratórios e equipamentos, além de seus conhecimentos.

À Clarice D. B. Amaral, Caroline S. da Silva e Andrea Oliveira pelo auxílio nas análises de carbono total e residual, e pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus amigos e amigas do Grupo de Inovação em Química Analítica Verde – GIQAV, especialmente ao Luan Viana, Bruna Cassante, Felipe Tomasello, Ana Paula R. Santana, Nathalia Ferreira e Luciano Oliveira pela amizade, apoio, auxílio e companheirismo.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Estudos e Ciências Ambientais – LECA e aos professores Profa. Dra. Márcia Cristina Bisinoti e Prof. Dr. Altair Benedito Moreira, pela disponibilidade do laboratório.

A todos os meus amigos, especialmente Carlos Polaquini, Jessika Rossi, Natânia Ferreira, Monica Sanção, Renan Datorre e Samantha Souza por todos esses anos de amizade incondicional, pelos conselhos, por me apoiar e alegrar a minha vida.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**MUITÍSSIMO OBRIGADA!**

*“Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que não se veem.”*

*Hebreus 11:1.*

*“Porém como dizem as Escrituras Sagradas: O que ninguém nunca viu nem ouviu, e o que jamais alguém pensou que podia acontecer, foi isso o que Deus preparou para aqueles que o amam.”*

*I Coríntios 2:9.*

## RESUMO

O Brasil possui um mercado farmacêutico promissor e em crescimento, promovendo uma busca por medicamentos de alta qualidade. Órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, a Farmacopeia Norte Americana (USP), a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) e a Agência de Medicina Europeia (EMA) no âmbito internacional descrevem legislações para garantir a qualidade dos medicamentos, além do controle e monitoramento de contaminantes, principalmente elementos potencialmente tóxicos. O principal objetivo do trabalho foi o desenvolvimento e otimização de métodos de preparo de amostras aplicado a medicamentos e seus insumos visando a determinação de impurezas inorgânicas por Espectrometria de Massas Acoplada ao Plasma Induzido (ICP-MS). Foram estudadas amostras de Aciclovir pomada e seus excipientes e de comprimidos de Omeprazol genérico e similar. Um método de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) foi otimizado por planejamento fatorial para amostras de Aciclovir e sua eficiência foi avaliada pela análise dos teores de carbono residual (RCC). Para avaliação da exatidão do método foram avaliadas as recuperações dos elementos adicionados às amostras antes da MW-AD ficando entre 95,1 e 126%, e após a etapa de digestão onde a variação foi na faixa 85,6 a 132%, com exceção do Cr. Os limites de detecção (LD) obtidos foram em  $\text{ng L}^{-1}$  na faixa de 0,2 para  $^{75}\text{As}^+$  e de 91 para  $^{58}\text{Ni}^+$ . As determinações de  $^{75}\text{As}^+$ ,  $^{65}\text{Cu}^+$ ,  $^{52}\text{Cr}^+$ ,  $^{58}\text{Ni}^+$ ,  $^{208}\text{Pb}^+$ , e  $^{51}\text{V}^+$  variaram de  $2,3 \pm 0,8$  para  $^{75}\text{As}^+$  até  $3446 \pm 47$  para  $^{52}\text{Cr}^+$  em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . As amostras de Omeprazol genérico e similar foram decompostas em dois programas de aquecimento na MW-AD e suas eficiências de digestão avaliada para estas matrizes. As recuperações de As, Cd, Hg e Pb foram de 75,6 a 130,0% nestas amostras. Os LD's foram menores que  $0,07 \text{ ng L}^{-1}$ . As determinações de  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{208}\text{Pb}^+$  variaram de 0,013 a  $0,171 \mu\text{g g}^{-1}$  e 0,134 e  $0,154 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente;  $^{202}\text{Hg}^+$  e  $^{111}\text{Cd}^+$  estão abaixo dos LD para ambos os métodos. O desenvolvimento de um método de extração ácida assistida por ultrassom (UAE) aplicado às amostras de omeprazol foi avaliado através de um planejamento fatorial e indicou ser uma alternativa promissora que emprega menores volumes de reagentes, menor tempo de extração, maior frequência analítica, sendo um método limpo colaborando para o desenvolvimento da química verde gerando desta forma menores volumes de resíduos químicos.



**Palavras chaves:** Preparo de Amostra; Contaminantes Inorgânicos; ICP-MS; Farmacopeia; Medicamentos.

## ABSTRACT

Brazil has a promising and growing pharmaceutical market promoting a search for high quality medicines. Agencies such as the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) in Brazil, the United States Pharmacopeia (USP) and Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicine Agency (EMA) in the international scope describe legislation to ensure the quality of medicines in addition to control and monitoring of inorganic contaminants, especially potentially toxic inorganic elements. The main objective were the development and optimization of sample preparation methodologies applied to medicines and their manufacture products in order to determine inorganic impurities by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). Acyclovir ointment and excipients, Omeprazole tablets similar and generic samples were studied. A microwave acid digestion (MW-AD) method was optimized for a factorial design for samples of acyclovir and their effectiveness assessed by analysis of residual carbon content (RCC). In determining the method of accuracy, with the exception of Cr, the recoveries of the elements added to the samples prior to MW-AD were between 95.1 and 126%, and after the digestion step ranged from 85.6 to 132%. The limits of detection (LOD) were obtained from  $\text{ng L}^{-1}$  order of 0.2 to  $^{75}\text{As}^+$  and 91 for  $^{58}\text{Ni}^+$ . Measurements of  $^{75}\text{As}^+$ ,  $^{65}\text{Cu}^+$ ,  $^{52}\text{Cr}^+$ ,  $^{58}\text{Ni}^+$ ,  $^{208}\text{Pb}^+$  and  $^{51}\text{V}^+$  presented a wide range varying from  $2.3 \pm 0.8$  to  $^{75}\text{As}^+$  up  $3446 \pm 47$  to  $^{52}\text{Cr}^+$  in  $\text{g kg}^{-1}$ . Omeprazole samples were decomposed in two heating programs MW-AD and their efficiencies digestion measured for these matrices. Recoveries of As, Cd, Hg and Pb ranged from 75.6 to 130.0% in these samples. LD's were less than  $0.07 \text{ ng L}^{-1}$ . Measurements of  $^{75}\text{As}^+$  and  $^{208}\text{Pb}^+$  ranged from 0.013 to 0.171  $\text{ug g}^{-1}$  and 0.134 to 0.154  $\text{ug g}^{-1}$ , respectively;  $^{202}\text{Hg}^+$  and  $^{111}\text{Cd}^+$  are below the LD for both methods. Development of a method of ultrasound acid extraction (UAE) applied to omeprazole samples was evaluated using a factorial design and showed to be a promising alternative which employs smaller volumes of reagents, smaller extraction time, higher sample throughput being a method clean contributing to the development of green chemistry thus generating smaller volumes of chemical waste.

**Palavras chaves:** Sample Preparation; Inorganics Contaminants; ICP-MS; Pharmacopoeia; Medicines.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fórmula estrutural do omeprazol .....	28
<b>Figura 2</b> – Fórmula estrutural do aciclovir .....	29
<b>Figura 3</b> - Sistema de um espectrômetro de massas acoplado ao plasma induzido. ....	39
<b>Figura 4</b> - Estrutura do ICP-MS com tecnologia célula universal UCT™ .....	41
<b>Figura 5</b> – Estruturas químicas das amostras: (a) o aciclovir - API; (b) metilparabeno; (c) edetato dissódico; (d) cera. ....	51
<b>Figura 6</b> - Diagrama de Pareto obtido do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) de tratamento de amostra de aciclovir pomada por MW-AD.....	57
<b>Figura 7</b> - Gráficos das curvas de calibração de faixa linear de 0,1 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos elementos (a) V, (b) Cr, (c) Ni, (d) Cu, (e) As e (f) Pb. ....	59
<b>Figura 8</b> - Gráfico dos teores de carbono residual (RCC) das amostras de omeprazol tratadas por dois métodos de MW-AD. ....	71
<b>Figura 9</b> – Gráficos das curvas de calibração de faixa linear de 0,1 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos elementos (a) As, (b) Cd, (c) Pb e (d) Hg.....	74
<b>Figura 10</b> - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial ( $2^3$ ) do tratamento da amostra de omeprazol por UAE (% As).....	80
<b>Figura 11</b> - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) de tratamento de amostra de omeprazol por UAE (% Cd).....	81

**Figura 12** - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) de tratamento de amostra de omeprazol por UAE (% Hg) ..... 81

**Figura 13** - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) de tratamento de amostra de omeprazol por UAE (% Pb) ..... 82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Limites de exposição diária permitida ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) por via oral, parental e inalação, propostas pela USP e ICH. ....	30
<b>Tabela 2</b> – Toxicidade e classificação carcinogênica de As, Cd, Hg, Pb, Cr, Ni, Cu e V... 37	37
<b>Tabela 3</b> - Interferentes poliatômicos comuns.....	40
<b>Tabela 4</b> – Porcentagens de recuperação aceitáveis com relação à concentração de analito. ....	45
<b>Tabela 5</b> - Configurações instrumentais e parâmetros de aquisição de dados do ICP-MS para modo KED e modo padrão. ....	52
<b>Tabela 6</b> - Planejamento fatorial completo $2^3$ em dois níveis avaliados para cada variável estudada na etapa de tratamento de amostra de aciclovir pomada por MW-AD (n = 2 para cada condição experimental avaliada).....	53
<b>Tabela 7</b> – Teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio total (% , média $\pm$ desvio padrão, n=3) em amostras dos constituintes do Aciclovir antes do tratamento MW-AD.....	55
<b>Tabela 8</b> - Planejamento fatorial completo $2^3$ em dois níveis avaliados para cada variável estudada na etapa de tratamento de amostra de aciclovir pomada por MW-AD (n = 2 para cada condição experimental avaliada). ....	55
<b>Tabela 9</b> - Teores de carbono residual de amostras tratadas de aciclovir pomada e constituintes após tratamento otimizado de MW-AD .....	57
<b>Tabela 10</b> - Limites de detecção em $\text{ng. L}^{-1}$ dos elementos V, Cr, Ni, Cu, As e Pb para as amostras de aciclovir. ....	60

<b>Tabela 11</b> - Valores de concentração e recuperação para amostras aciclovir fortificadas quantificados por ICP-MS (média ± desvio padrão, n = 3).....	61
<b>Tabela 12</b> – Determinação de V, Cr, Ni, Cu, As e Pb ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ , média ± desvio padrão, n=3) em pomada aciclovir e seus constituintes por ICP-MS operando em modo padrão. ....	62
<b>Tabela 13</b> - Relação dos excipientes mais comuns do medicamento omeprazol. ....	65
<b>Tabela 14</b> - Configurações instrumentais e parâmetros de aquisição de dados do ICP-MS para o modo padrão. ....	66
<b>Tabela 15</b> - Planejamento fatorial completo $2^3$ em dois níveis avaliados para cada variável estudada na etapa de tratamento de amostra de omeprazol por extração ácida assistida por ultrassom (n = 2 para cada condição experimental avaliada).....	68
<b>Tabela 16</b> – Teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio totais das amostras de omeprazol determinados por analisador elementar antes de MW-AD (n= 3, média ± desvio padrão). 70	70
<b>Tabela 17</b> - Tratamento estatístico aplicado aos valores de RCC dos métodos de MW-AD. Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes. ....	71
<b>Tabela 18</b> - Limites de detecção e quantificação ( $\text{ng L}^{-1}$ ) dos elementos As, Cd, Hg e Pb para os amostras de omeprazol tratadas por MW-AD em dois métodos diferentes.....	73
<b>Tabela 19</b> - Tratamento estatístico aplicado aos valores de LD e LQ dos métodos de MW-AD. Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes. ....	73
<b>Tabela 20</b> - Valores de concentração e recuperação para amostras omeprazol enriquecidas, quantificados por ICP-MS (média ± desvio padrão, n = 3).....	75

<b>Tabela 21</b> - Tratamento estatístico aplicado aos valores de recuperação dos analitos (%) dos métodos de MW-AD. Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes. ....	76
<b>Tabela 22</b> - Determinação de As, Cd, Hg e Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão, n=3) em amostras de omeprazol tratadas MW-AD em dois métodos diferentes por ICP-MS operando em modo padrão. ....	78
<b>Tabela 23</b> - Planejamento fatorial completo $2^3$ em dois níveis avaliados para cada variável estudada na etapa de tratamento de amostra de omeprazol por extração ácida assistida por ultrassom (n = 2 para cada condição experimental avaliada). ....	79



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**As** - Arsênio

**API** - Ingredientes Farmacêuticos Ativos

**Cd** - Cádmio

**Cr** - Cromo

**Cu** - Cobre

**DCB** - Denominação Comum Brasileira

**EDP** – Exposição diária permitida

**EMA** - Agência de Medicina Europeia

**FDA** - Administração de Alimentos e Medicamentos

**Hg** - Mercúrio

**IARC** - Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer

**ICH** - Conferência Internacional sobre Harmonização de Requerimentos Técnicos para o Registro de Farmacêuticos para Uso Humano

**ICP OES** - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado

**ICP-MS** - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado

**IUPAC** - União Internacional de Química Pura e Aplicada

**KED** - Discriminação por Energia Cinética

**LD** - Limite de Detecção

**LQ** - Limite de Quantificação

**MW-AD** - Digestão Ácida Assistida por Radiação Micro-Ondas

**Ni** - Níquel

**Pb** - Chumbo

**PFA** - perfluoroalcoxi

**PP** - Polipropileno

**RCC** - teor de carbono residual

**TCC** - teor de carbono total

**UAE** - Extração Ácida Assistida por Ultrassom

**UCT** - Universal Cell Technology™

**USP** - Farmacopeia Norte Americana

**V** - Vanádio

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>25</b>
2.1.    MEDICAMENTOS .....	26
2.2.    LEGISLAÇÕES .....	29
<b>2.2.1.    Capítulo Geral 232 da USP: Impurezas Elementares - Limites</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.2.    Capítulo Geral 233 da USP: Impurezas Elementares - Procedimentos</b>	<b>31</b>
2.3.    PREPARO DAS AMOSTRAS .....	31
<b>2.3.1.    Digestão Ácida Assistida por Radiação Micro-Ondas (MW-AD)</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.2.    Extração Ácida Assistida por Ultrassom (UAE)</b> .....	<b>35</b>
2.4.    METAIS .....	36
2.5.    ICP-MS .....	38
2.6.    VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....	42
<b>2.6.1.    Especificidade</b> .....	<b>42</b>
<b>2.6.2.    Linearidade</b> .....	<b>42</b>
<b>2.6.3.    Intervalo</b> .....	<b>43</b>
<b>2.6.4.    Precisão</b> .....	<b>43</b>
<b>2.6.5.    Limite de Quantificação</b> .....	<b>44</b>
<b>2.6.6.    Limite de Detecção</b> .....	<b>44</b>
<b>2.6.7.    Exatidão</b> .....	<b>45</b>
<b>2.6.8.    Robustez</b> .....	<b>46</b>
<b>3 - OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
3.1.    OBJETIVOS GERAIS .....	48
3.2.    OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
<b>4 - ACICLOVIR</b> .....	<b>49</b>
4.1.    AMOSTRAS .....	50
4.2.    INSTRUMENTAÇÃO, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	51
4.3.    OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA POR DIGESTÃO ÁCIDA ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS (MW-AD) .....	53

4.1.	PREPARO DE AMOSTRA por MW-AD .....	54
4.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
<b>4.2.1.</b>	<b>Otimização do Método de Preparo de Amostra por MW-AD.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.2.</b>	<b>Validação do Método de Determinação de V, Cr, Ni, Cu, As e Pb por ICP-MS .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.3.</b>	<b>Determinação de V, Cr, Ni, Cu, As e Pb por ICP-MS .....</b>	<b>62</b>
4.3.	CONCLUSÃO.....	63
<b>5 - OMEPRAZOL.....</b>		<b>64</b>
5.1.	AMOSTRAS .....	65
5.2.	INSTRUMENTAÇÃO, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	65
5.3.	PREPARO DE AMOSTRA .....	67
<b>5.3.1.</b>	<b>Digestão Ácida Assistida por Radiação Micro-ondas (MW-AD).....</b>	<b>67</b>
<b>5.3.2.</b>	<b>Extração Ácida Assistida por Ultrassom (UAE).....</b>	<b>67</b>
5.4.	DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Pb E Hg POR ICP-MS .....	69
5.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
<b>5.5.1.</b>	<b>Digestão Ácida Assistida por Radiação Micro-ondas (MW-AD).....</b>	<b>69</b>
5.5.1.1.	Otimização do Método de MW-AD .....	69
5.5.1.2.	Validação do Método de Determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS.....	72
5.5.1.3.	Determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS .....	77
<b>5.5.2.</b>	<b>Extração Ácida Assistida por Ultrassom (UAE).....</b>	<b>78</b>
5.5.2.1.	Otimização do Método de UAE .....	78
5.6.	CONCLUSÃO.....	83
<b>9 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>		<b>84</b>
<b>10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>86</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

---

Atualmente o Brasil ocupa o sexto lugar no ranking mundial do mercado farmacêutico e a tendência de crescimento econômico do setor indica que a partir de 2018 o país possa ascender à segunda colocação, sendo que o território nacional conta com empresas importantes do ramo e com altos faturamentos (PINTO e BARREIRO, 2013; GUIA 2015 INTERFARMA). Segundo o Portal Brasil (2013) com a criação da lei que permite a produção de genéricos o setor expandiu ainda mais. No cenário mundial o mercado farmacêutico também é promissor, segundo a PricewaterhouseCoopers (2013), em 2011 as vendas totais do varejo farmacêutico foram de US\$ 25,8 bilhões e segundo o Guia Interfarma (2015), o mercado farmacêutico mundial poderá alcançar cerca de US\$ 1,25 trilhão em 2018. Além disso, em 2016 o Brasil superou os 24 bilhões de dólares em vendas no mercado total, que inclui genéricos (SINDUSFARMA, 2016).

Conseqüentemente, com a expansão desse mercado há um aumento na busca por maior qualidade dos medicamentos. Segundo Correa (2003), essa busca e o interesse pela qualidade são bastante acentuados, tanto por parte dos consumidores quanto dos profissionais de saúde. Para garantir a qualidade na produção de medicamentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que é o órgão responsável pela autorização das atividades das empresas e pelo controle sanitário dos insumos farmacêuticos no Brasil, também elabora normas para o controle da qualidade. Além das legislações e normas prescritas pela ANVISA, há também a Farmacopeia Brasileira, e as principais legislações em contexto internacional como, os capítulos da Farmacopeia Norte Americana (USP), os guias da Conferência Internacional sobre Harmonização de Requerimentos Técnicos para o Registro de Farmacêuticos para Uso Humano (ICH) / Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) e também a Farmacopeia Europeia e a Agência de Medicina Europeia (EMA).

O controle de qualidade e o monitoramento de contaminantes inorgânicos, em especial os metais tóxicos, são rígidos e de suma importância. As legislações nacionais e internacionais especificam a quantidade limite, o controle e a determinação destes elementos químicos, incluindo procedimentos analíticos e validações de métodos. A contaminação por impurezas inorgânicas em medicamentos pode ser proveniente de várias fontes e fases do processo de fabricação, desde as matérias-primas por representarem o

início da cadeia produtiva, os ingredientes farmacêuticos ativos (API), os excipientes, entre outros, sendo encontrados em produtos intermediários e no produto final a ser comercializado (RAO e TALLURI, 2007).

Recentemente a USP, tem dado bastante destaque aos capítulos gerais 231: Metais Pesados; 232: Impurezas Elementares – Limites; e 233: Impurezas Elementares – Procedimentos. Em janeiro de 2015, publicou uma nota anunciando planos para estabelecer o dia 1 de janeiro de 2018 como a nova data de aplicação do Capítulo Geral 232 e também 2232: Contaminantes Elementares em Suplementos Alimentares. O novo prazo tem a finalidade de alinhar a aplicação do capítulo de forma mais estreita ao guia de qualidade ICH Q3D: Guia para Impurezas Elementares (USP - NOTICE OF INTENT TO REVISE JANUARY 14, 2015). Juntamente com a USP, a EMA e a Farmacopeia Europeia substituirão seus testes para metais tóxicos existentes nas monografias da farmacopeia quando uniformizar-se aos requisitos do ICH Q3D sendo a previsão para esta implementação em dezembro de 2017 (ELDER, 2016).

O capítulo 231 da USP é considerado obsoleto, pois propõe a determinação de limites de metais tóxicos por precipitação com o íon sulfeto; um método semi-quantitativo, pouco sensível, e que foi proposto há mais de 100 anos, mas por apresentar baixo custo é ainda utilizado em indústrias farmacêuticas (THAYER, 2013; USP, 2013). Porém, esse método não é adequado para garantir o controle de níveis traços dos elementos potencialmente tóxicos como os limites indicados pelo capítulo 232, que possam estar presentes nos fármacos, matérias-primas e até mesmo no produto acabado. Logo, se faz necessário substituir esse método por técnicas mais sensíveis e com excelentes parâmetros de desempenho, como ICP OES e ICP-MS que são propostos no capítulo 233 (BALARAM, 2016). Na literatura é encontrado estudo que identificam as limitações do procedimento proposto no capítulo 231 em comparação com o ICP-MS na determinação de baixos níveis de impurezas elementares em produtos farmacêuticos (WANG, et. al., 2000).

Metais potencialmente tóxicos como arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni) e vanádio (V) podem ser introduzidos no corpo humano por diversas fontes de exposição, como os alimentos, o ar atmosférico ou pela água consumida. Além disso, as inovações tecnológicas nas ciências farmacêuticas e

médicas tem aumentado significativamente a ingestão destes elementos tóxicos, que impõe riscos de problemas graves à saúde mesmo que em pequenas concentrações. Um exemplo é o uso de catalisadores e reagentes metálicos para a produção de APIs, como ferro, prata e ouro contidos em agentes antimicrobianos; contrastes de imagem com bário, gadolínio, ferro, manganês e sódio, lítio em medicamentos para doença psicótica, ou até mesmo agentes de quimioterapia à base de platina (BALARAM, 2016). E também, excipientes como manitol, lactose e gelatina também são sintetizados por catalizadores metálicos (ELDER, 2016). Além desse fato, elementos como o arsênio, mercúrio e chumbo são considerados mais tóxicos principalmente por apresentarem caráter acumulativo (RAO e TALLURI, 2007).

Assim, há uma grande importância nos trabalhos relacionados a estes capítulos da USP, por estarem em período de revisões e alterações, e principalmente por haver uma crescente busca em pesquisas químicas e farmacêuticas para o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de impurezas inorgânicas. Portanto, este trabalho dispõe de um estudo de métodos de preparo de amostra que sejam eficientes às diferentes matrizes estudadas (medicamento em pomada e sólido), e a determinação de impurezas inorgânicas por ICP-MS, visando o provimento de dados à indústria farmacêutica que busca adaptações às novas exigências dos órgãos reguladores.



## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. MEDICAMENTOS

Segundo a ANVISA (2010) os medicamentos são produtos criados com o propósito de diagnosticar, prevenir, amenizar sintomas das doenças e também curá-las. Seu efeito é devido a uma ou mais substâncias, contidas no produto, cujas características terapêuticas são comprovadas cientificamente e são chamadas fármacos, drogas ou princípios ativos.

Há uma diferença entre medicamento e remédio. Os remédios seriam todo e qualquer tipo de cuidado realizado para amenizar ou curar dores, doenças, sintomas ou mal-estar. Seriam exemplos os chás caseiros, massagens, exercícios, medicamentos, entre outros. Os medicamentos por sua vez são substâncias químicas produzidas em farmácias ou indústrias com extremo rigor e controle para satisfazer às especificações e normas de segurança, qualidade e eficácia, tanto nas etapas de pesquisa e desenvolvimento até a produção e comercialização, podendo ser sintéticos ou extraídos de plantas medicinais (medicamentos fitoterápicos) (ANVISA, 2010).

Os medicamentos podem ser administrados por diferentes vias, as mais comuns são denominadas enteral, parental e percutânea. A via enteral é aquela cujo medicamento entra em contato direto com o trato gastrointestinal, por meio das vias oral, retal ou nasogástrica. A via parental é quando o medicamento é administrado por injeções subcutâneas, intramusculares ou intravenosas. A percutânea por sua vez são os métodos de administração por inalação, sublingual - embaixo da língua, ou tópica – na pele, como adesivos e pomadas (CLAYTON et. al., 2012).

Existem vários tipos de medicamento que são comercializados, como os de referência, os similares, os genéricos, entre outros, e há uma diferença entre eles. Segundo a ANVISA (2016) o medicamento de referência é:

Um produto inovador, registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente por ocasião do registro, conforme a definição do inciso

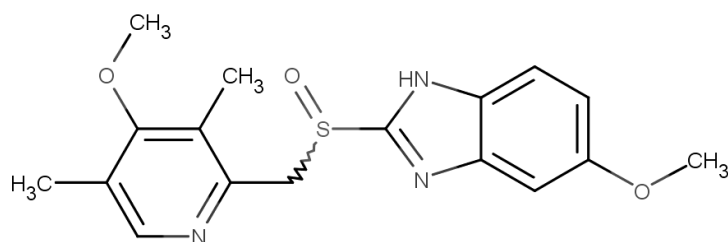
XXII, artigo 3º, da Lei n. 6.360, de 1976 (com redação dada pela Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999).

Os medicamentos similares e genéricos são baseados nos medicamentos de referência e seus fabricantes tem a obrigatoriedade de apresentar à ANVISA seus testes de biodisponibilidade relativa e equivalência farmacêutica, como descrito na Resolução RDC 134/2003 e Resolução RDC 133/2003, para similares e na lei de criação dos genéricos, a Lei 9.787/99, de 10/02/1999. Os medicamentos similares são aqueles que possuem todas as características do medicamento de referência, como princípios ativos, concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica; podem ter somente características com relação à forma do produto, excipientes, veículo e embalagens diferentes do medicamento de referência. Para ambos, medicamento genérico ou similar é obrigatório apresentar estudos de biodisponibilidade relativa e equivalência farmacêutica para o registro no órgão federal responsável (ANVISA, 2016).

Os medicamentos genéricos são iguais aos de referência, a mesma qualidade, princípio ativo, dose, via de administração, posologia, eficácia terapêutica e segurança, porém não possui nome comercial e sim a denominação química de acordo com a Denominação Comum Brasileira (DCB). O medicamento de referência pode ser substituído pelo genérico pelo farmacêutico responsável (ANVISA, 2010).

Os medicamentos avaliados neste projeto foram escolhidos por serem administrados em diferentes formas: um medicamento em comprimido (Omeprazol), e um medicamento em pomada (Aciclovir).

Nos anos 2010 e 2011 o omeprazol esteve no ranking dos dez medicamentos genéricos mais vendidos no Brasil (PFARMA, 2012). O omeprazol é denominado, segundo as regras da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) como 6-Metoxi-2-[[[4-metoxi-3,5-dimetil-2-piridinil]metil]sulfinil]-1H-benzimidazol e sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 1 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

**Figura 1** – Fórmula estrutural do omeprazol

FONTE: adaptado de FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010

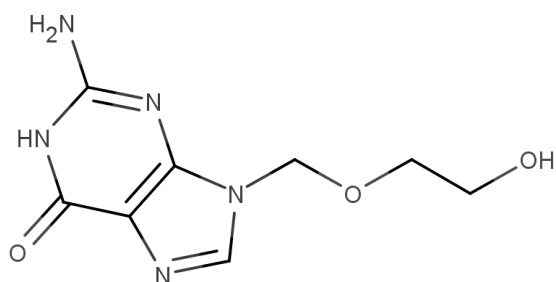
É indicado para redução da secreção de ácido nos casos de patologias como a ulceração péptica gástrica ou duodenal, esofagite de refluxo e a Síndrome de Zollinger-Ellison, sendo também eficiente na prevenção de danos gastroduodenais causados por quimioterapias, úlceras provocadas por anti-inflamatórios não esteroides e também no tratamento de eliminação da *Helicobacter pylory* (RANG, et. al., 2004; MURAKAMI, 2009). O refluxo gastresofágico e a doença péptica são problemas comuns em crianças e adultos, em lactantes e crianças podem provocar desde de uma simples irritabilidade até vômitos, já as doenças causadas pela *Helicobacter pylory* e úlceras gástricas e duodenais são mais comuns em adultos enquanto as crianças dispostos à gastrite e duodenite. Quando há diagnostico de infecção por *Helicobacter pylory* em crianças o tratamento diminui o risco de desenvolver úlcera péptica ou cancro gástrico quando adultos (ZIMMERMANN et. al., 2001).

O omeprazol é um agente inibidor da secreção ácida gástrica, age nas bombas de próton inibindo a enzima  $H^+K^+ATPase$  que é responsável pelas etapas finais da produção de ácido no estômago (ACHE, 2016). Substitui até hoje o primeiro inibidor de bomba de prótons – benzimidazol. Não é ativo em pH neutro por ser uma base fraca, é acumulado nos canalículos das células parietais (ambiente ácido) sendo assim ativado (RANG, et. al., 2004). O seu mecanismo de ação é específico e seletivo, a inibição enzimática ocorre com a protonação da molécula de omeprazol que se transforma em sulfenamida ou ácido sulfênico, que se liga irreversivelmente à  $H^+K^+ATPase$  (MURAKAMI, 2009).

O medicamento aciclovir é indicado para o tratamento de infecções, na pele e mucosas, causadas pelo vírus *Herpes simplex*, inclusive herpes genital inicial ou regular.

Possui efeitos positivos no tratamento do Herpes zoster, na dor e na ocorrência de neuralgia pós-herpética (dor relacionada ao Herpes zoster). Segundo as regras da IUPAC, o aciclovir é denominado, como 2-Amino-1,9-diidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purin-6-ona e sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 2 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

**Figura 2** – Fórmula estrutural do aciclovir



FONTE: adaptado de FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010

Esse antiviral de estrutura semelhante ao nucleosídeo 2-desoxiguanosina tem como mecanismo de ação a inibição da reprodução do vírus (RHEIN, 2013; MERCK, 2014). O ativo aciclovir é seletivamente modificado em monofosfato pela timina quinase viral, em seguida as quinases das células do hospedeiro transformam o monofosfato em trifosfato, este então é um forte inibidor da enzima DNA polimerase viral, e a cadeia de nucleotídeos é interrompida, ou seja, inibi a replicação do DNA viral (RANG, et. al., 2004; RHEIN, 2013).

Geralmente os efeitos indesejáveis são mínimos, sendo relatadas inflamações locais quando administrado por injeção intravenosa em caso de derramamento da solução, e também disfunção renal. Além disso, pode haver náusea e cefaleia e, dificilmente, encefalopatia (RANG, et. al., 2004).

## 2.2. LEGISLAÇÕES

### 2.2.1. Capítulo Geral 232 da USP: Impurezas Elementares - Limites

O capítulo 232 da USP (2013) estabelece limites de concentrações de impurezas inorgânicas nos componentes dos fármacos e excipientes dos medicamentos considerando uma dose diária máxima de 10 g do medicamento por dia. Além de limites de exposição diária permitida (EDP) às impurezas baseada em uma pessoa de 50 kg; esses limites são estabelecidos para cada um dos elementos e em cada uma das vias de administração (via oral, injetada ou inalada) considerando os casos de exposição crônica. E descreve a toxicidade das impurezas com base na biodisponibilidade. Dos 15 elementos elencados neste capítulo, os que apresentam os valores mais restritivos, ou seja, de maior toxicidade, são o arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg); tanto nas concentrações em fármacos e excipiente quanto nos limites de exposição diária, e em cada uma das três vias de administração. Para exemplificar, a Tabela 1 mostra os limites de exposição diária por via oral, parental e inalação permitida, propostos pela USP e ICH, para alguns elementos.

**Tabela 1-** Limites de exposição diária permitida ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) por via oral, parental e inalação, propostas pela USP e ICH.

Classificação ICH/Q3D	Elemento	Dose diária Oral EDP <sup>1</sup> ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )		Dose diária Parental EDP <sup>1</sup> ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )		Dose diária Inalação EDP <sup>1</sup> ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )	
		USP <sup>2</sup>	ICH <sup>3</sup>	USP <sup>2</sup>	ICH <sup>3</sup>	USP <sup>2</sup>	ICH <sup>3</sup>
<i>Classe 1 - Alto risco à saúde quando administrados por qualquer via</i>	As	1,5	15	1,5	15	2,0	1,9
	Cd	0,5	5,0	0,2	6,0	2,0	3,4
	Pb	0,5	5,0	0,5	5,0	5,0	5,0
	Hg	3,0	40	0,3	4,0	1,0	1,2
<i>Classe 2a - Alto risco dependendo da via de administração</i>	V	10	120	1,0	12	1,0	1,2
	Ni	20	600	2	60	5,0	6,0
<i>Classe 3 – Toxicidade relativamente baixa</i>	Cu	300	1300	30	130	30	13
	Cr	1100	11000	110	1100	3,0	2,9

Fonte: adaptado de THAYER, 2013.

<sup>1</sup> EDP – Exposição diária permitida baseada em pessoas de 50 kg. O ajuste de peso assume um valor arbitrário de 50 kg para ambos os sexos. Esse peso relativamente baixo assume um fator de segurança adicional para pesos padrão de 60-70 kg que são mais usados nesse tipo de cálculo.

<sup>2</sup> USP – U.S. Pharmacopeial Convention, USP 39 –NF 34, 2016.

<sup>3</sup> ICH - Conferência Internacional sobre Harmonização de Requerimentos Técnicos para o Registro de Farmacêuticos para Uso Humano, lista de julho de 2013.

### **2.2.2. Capítulo Geral 233 da USP: Impurezas Elementares - Procedimentos**

O capítulo 233 da USP (2013) cita possíveis métodos de preparo de amostras de acordo com o estado e matriz da amostra. São eles: dissolução simples, dissolução aquosa direta, dissolução orgânica direta, dissolução indireta e digestão por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas; sendo este último, o método mais indicado no capítulo 233, por minimizar a perda de elementos voláteis. Neste trabalho foram adotados o método de digestão assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) e extração ácida assistida por ultrassom (UAE) (dissolução indireta). Este capítulo ainda descreve dois procedimentos para a determinação dos níveis de impurezas: o primeiro procedimento é a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e o segundo, que será utilizado neste trabalho é a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

### **2.3. QUÍMICA VERDE**

Com a necessidade de discussões sobre a prevenção do meio ambiente em 1992 vários chefes de Estado se reuniram no Rio de Janeiro para a realização da ECO92 e para a elaboração do documento denominado de Agenda 21 e foi a partir daí que o termo Desenvolvimento Sustentável começou a ser discutido (SILVA, et. al., 2005). Esse termo é definido como o desenvolvimento industrial que satisfaz suas necessidades desde que as gerações futuras não sejam prejudicadas ao satisfazerem suas próprias necessidades (LENARDÃO, et. al., 2003).

Os processos químicos geralmente são ressaltados pelo seu potencial poluidor, principalmente por que a grande maioria das atividades envolvem substâncias tóxicas, os resíduos. Esses resíduos podem ser adequadamente destinados à tratamentos, à reciclagem e reutilização e até mesmo à incineração (SILVA, et. al., 2005). Porém esse conceito poderia ser facilmente revertido se houvesse uma precaução com a poluição como utilizar e

desenvolver técnicas e metodologias que reduza ou suprima o uso e a produção de substâncias que sejam perigosas à saúde humana e meio ambiente. Ora, esse é o conceito de Química Verde (MELCHERT, et al., 2012). E para que a química verde pudesse ser implementada com sucesso foram elaborados doze princípios que segundo Prado (2003), são:

1. **Prevenção:** é melhor evitar a produção de resíduos do que tratá-los depois;
2. **Economia de átomos:** as sínteses devem garantir a máxima inserção dos átomos das matérias-primas no produto final;
3. **Produtos menos perigosos:** sempre que possível utilizar e gerar nos processos químicos substâncias menos tóxicas.
4. **Produtos seguros:** o desenvolvimento do produto deve garantir sua finalidade e também sua segurança com relação à toxicidade.
5. **Diminuição de solventes e auxiliares:** sempre que praticável não utilizar solventes, agentes de separação e etc.
6. **Eficiência energética:** conduzir os procedimentos em temperatura e pressão ambiente para diminuir o consumo de energia e evitar o impacto econômico e ambiental.
7. **Uso de fontes renováveis:** para evitar danos à fontes não-renováveis.
8. **Redução de derivados:** agentes bloqueadores, proteção e modificação requerem reagentes adicionais nos processos e seu uso desnecessário por gerar resíduos.
9. **Catálise:** com o uso de catalisadores nos processos químicos são mais rápidos e mais vantajosos.
10. **Desenvolvimento de compostos degradáveis:** garantir que os compostos desenvolvidos não sejam permanentes ou persistentes no ambiente.



11. **Análise em tempo real para a prevenção da poluição:** devem ser desenvolvidas metodologias para que seja possível o monitoramento e controle de substâncias tóxicas, antes que essas sejam produzidas.
12. **Química segura para prevenção de acidentes:** substâncias escolhidas para o desenvolvimento da atividade química devem ser seguras para evitar acidentes como explosões e incêndios.

Segundo Tucker e Faul (2016) a indústria farmacêutica tem praticado a química verde tanto na pesquisa, no desenvolvimento e produção dos medicamentos, e para garantir o desempenho das empresas nessa tarefa foram criados rankings e índices como Dow Jones e o Índice de Sustentabilidade do Pacífico. O sucesso de algumas empresas em termos de sustentabilidade é garantido pela implementação de uma cultura, cujas equipes que são capacitadas são lideradas por uma gestão que apoia a educação e conscientização dos funcionários de que a química verde é um benefício coletivo; e também investem em tecnologia e desenvolvimento.

#### 2.4. PREPARO DAS AMOSTRAS

Com as recentes exigências da USP e ICH a serem implementadas referentes a impurezas inorgânicas, a indústria farmacêutica esta buscando a melhor maneira de analisar suas amostras; além disso, as técnicas de tratamento de amostras não são modificadas há anos (LEWEN, 2016). O preparo de amostra é uma das etapas mais importantes e crítica de qualquer procedimento analítico. É também a etapa mais onerosa e que demanda o maior tempo de uma sequência analítica. Os métodos de preparo de amostra podem variar de amostra para amostra (LEWEN, 2016).

Nas determinações em ICP-MS essa etapa requer um cuidado ainda maior, pois a técnica é severamente afetada por interferências. Segundo Evans e Giglio (1993), o método mais utilizado e também o passo mais importante para superar as interferências espectrais e matriciais é o pré-tratamento, ou preparo da amostra, para separar o analito da matriz.

A avaliação dos parâmetros de desempenho dos métodos de preparo de amostra permitirá aferir e averiguar questões sobre a exatidão e precisão, e relacionar os distintos métodos entre si. E assim, prosseguir para proposição destas metodologias para este grupo de amostras.

#### **2.4.1. Digestão Ácida Assistida por Radiação Micro-Ondas (MW-AD)**

A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MW-AD) em frascos fechados é claramente vantajosa quando comparada à digestão ácida usual em sistemas abertos. Em MW-AD há uma menor contaminação, minimização dos volumes de reagentes, os procedimentos são mais reprodutíveis e um melhor ambiente de trabalho (RAO e TALLURI, 2007). Em análises de medicamentos, a MW-AD é mais apropriada devido à volatilidade de alguns dos metais na digestão (Hg, Cd e As), principalmente quando estes metais apresentam-se com limites de detecção em níveis muito baixos (RAO e TALLURI, 2007). Outra vantagem é que em medicamentos com princípios ativos refratários ou com estruturas moleculares complexas, principalmente que contenham anéis aromáticos, a MW-AD apresenta grande eficiência em relação aos demais processos de digestão (BARIN et al., 2014).

Os materiais que absorvem a radiação micro-ondas podem sofrer um aumento de sua temperatura, pois a radiação interage com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando a elevação da temperatura devido a dois principais mecanismos: migração iônica e rotação de dipolos; causados pela alternância elevada do campo eletromagnético. Por haver influências dos dipolos das moléculas na absorção da radiação micro-ondas, se faz necessário o uso de ácidos ou misturas de ácidos. Pois, as características dielétricas dos líquidos faz com que as amostras sejam aquecidas, podendo isso causar uma extensiva corrente de convecção térmica que destruirá as barreiras superficiais das amostras, ficando assim expostas aos ácidos contidos na solução ocasionando a decomposição da amostra. A temperatura dos ácidos coordenam as reações e a pressão dentro do frasco reacional é produzida pelas pressões parciais do ácido, água e gases da decomposição (ARRUDA e SANTELLI, 1997).

O ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado é uma solução extratora muito utilizada na literatura. Esta solução quando aquecida em sistemas fechados, têm como principal produto de decomposição o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ). E quando as soluções de  $\text{HNO}_3$  são diluídas, o óxido nitroso ( $\text{NO}$ ) é o produto de decomposição principal. O  $\text{NO}$  reage em atmosfera oxidante, formando  $\text{NO}_2$ , que reage com água produzindo o  $\text{HNO}_3$  e o  $\text{HNO}_2$ . Esses ácidos nitrosos são decompostos, e formam  $\text{NO}$  novamente, ocasionando uma reação em cadeia, sendo essa, portanto, uma possível explicação para a obtenção de resultados satisfatórios na aplicação de  $\text{HNO}_3$  diluído em decomposições assistidas por radiação micro-ondas (GONZALEZ et. al., 2009). Também é possível encontrar na literatura soluções extratoras de  $\text{HNO}_3$  combinado com agentes oxidantes complementares como  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BENDICHO et. al., 2011).

#### **2.4.2. Extração Ácida Assistida por Ultrassom (UAE)**

Os métodos de preparo de amostra que utilizam ultrassom para determinações em espectrometria atômica são encontrados na literatura. Mas, o número de métodos de UAE ainda é muito pequeno quando comparado com micro-ondas (KRUG, 2008). Estes métodos são considerados verdes, quando comparados com métodos clássicos, principalmente por empregar baixo tempo de extração e concentrações de reagentes pequenas, resultando em economia de energia e consumo de reagentes. E a proposição de um método verde e de baixo custo pode possibilitar um aumento da produtividade (BENDICHO et. al., 2011). Além disso, pode ser empregado para uma variedade de amostras: sólidas, líquidas e heterogêneas. Comparado ao método por micro-ondas é geralmente mais simples e mais seguro por não precisar de elevadas temperaturas e pressões (CAPOTE e CASTRO, 2007). Também, pode ser vantajoso por diminuir os procedimentos de tratamento de amostras sólidas para análises traços de orgânicos e inorgânicos e também para análises de especiação. Ademais, a probabilidade de contaminações e perdas de analitos é pequena (BENDICHO et. al., 2011).

Segundo Krug et. al. (2008), os ultrassons são ondas mecânicas que se propagam em meios materiais com ciclos contínuos de compressão e rarefação. As frequências baixas

tem maior potência que alteram os meios expostos à radiação acarretando em agitação, cavitação, microfluxos, microgotas e aquecimento. De acordo com Bendicho et.al. (2011), o ultrassom pode produzir extração, digestão e também decomposição de materiais sólidos devido a alguns fatores: as elevadas temperaturas geradas nas microbolhas produzidas pelo fenômeno de cavitação em meio líquido, provocam o melhoramento da solubilidade e difusividade do analito presente na partícula; as altas pressões promovidas pela implosão das microbolhas ampliam a permeação do solvente na amostra; e a formação de radicais oxidantes, como  $\text{OH}^\bullet$ , e  $\text{H}_2\text{O}_2$  favorecem a oxidação de matriz orgânica.

## 2.5. METAIS

A evolução da natureza e do homem está diretamente relacionada à presença dos metais no meio ambiente, e sua influência sobre processos bioquímicos nos seres vivos é comprovada por diversas pesquisas (RÜBENSAM, 2004). Mas, os ciclos biogeoquímicos foram desequilibrados por ações antropogênicas, um exemplo dessa influência são os registros dos níveis de chumbo em amostras de gelo da Groenlândia, que mostraram que após a Revolução Industrial houve um aumento significativo e que estes níveis só começaram a diminuir após 1970, com a retirada gradual de aditivos antidetonantes com chumbo na gasolina, (SHIBAMOTO e BJELDANES, 2014).

Além disso, a conclusão dos ciclos biogeoquímicos acontece com a sedimentação desses metais na crosta terrestre, porém este é um processo lento e a extração e as ações humanas são muito mais rápidas. Logo, a permanência destes metais no meio ambiente causa efeitos adversos à saúde humana e ao ecossistema (SPIRO e STIGLIANI, 2009).

Os metais fazem parte de vários processos do metabolismo dos seres vivo. Alguns processos incluem os elementos em seus sistemas bioquímicos essenciais, e outros podem causar danos a saúde por não apresentar função biológica relevante (VALLS E LORENZO, 2002). Além disso, alguns metais que são considerados essenciais em doses elevadas são tóxicos, por exemplo, o ferro e o cobre (BRYRNS e PENNING, 2012).

Os efeitos tóxicos variam entre os metais, bem como suas vias de exposição e classificação de carcinogenicidade. Para exemplificar a variação de toxicidade que os metais possuem na Tabela 2 estão mostrados os elementos estudados nesse trabalho (IARC, 2016; KLEIN e COSTA; LAGERKVIST e OSKARSSON; ELLINGSEN, et. al., 2007).

**Tabela 2** – Toxicidade e classificação carcinogênica de As, Cd, Hg, Pb, Cr, Ni, Cu e V.

Metal	Fonte Comum de Exposição	Vias Comuns de Exposição	Absorção	Sistemas mais Sensíveis a Toxicidade	Classificação de Carcinogenicidade (IARC)
As	Água potável	Inalação	-	CV <sup>a</sup> , pele, múltiplos outros	Grupo 1 - carcinogênico para humanos
		Ingestão	~90%		
Cd	Ocupacional, alimentos e tabaco	Inalação	~1,5 - 5%	Renal, respiratório	Grupo 1 - carcinogênico para humanos
		Ingestão	~10%		
Hg	Ar e alimentos (peixes)	Inalação	~70-80%	SNA <sup>b</sup> e renal	MetilHg <sup>+</sup> : Grupo 2B - possivelmente carcinogênico para humanos. Hg <sup>0</sup> e Hg <sub>2</sub> <sup>+</sup> : Grupo 3 - não classificável
Pb	Tintas, solo e ambientes empoeirados	Ingestão	~20%	SNC <sup>c</sup> , sangue, CV e renal	Grupo 2A - provavelmente carcinogênico para humanos
		Inalação	~90%		
Cr	Alimentos, água potável, ocupacional	Ingestão	< 10%	Respiratório	Cr <sup>+6</sup> : Grupo 1 - carcinogênico para humanos – pulmões
		Inalação	50-85%		
Ni	Ar, alimentos, tabaco e ocupacional	Inalação	20% (30% depositado no pulmão)	Respiratório e pele	Compostos solúveis: Grupo 1 - carcinogênico para humanos. Ni <sup>0</sup> : Grupo 2B - possivelmente carcinogênico para humanos.
		Ingestão	5%		
Cu	Alimentos, água potável, ocupacional	Ingestão	12 – 79%	TGI <sup>d</sup> , sangue, renal, respiratório, fígado	Grupo 3 - não classificável
		Inalação	-		
V	Alimentos, ar e água potável	Inalação	~25%	Respiratório	Grupo 2B - possivelmente carcinogênico para humanos.
		Ingestão	2-5%		

<sup>a</sup> CV: Cardiovascular; <sup>b</sup> SNA: Sistema Nervoso Autônomo; <sup>c</sup> SNC: Sistema Nervoso Central; <sup>d</sup> TGI: Trato Gastrointestinal.

Fonte: adaptado de BRYRNS e PENNING, 2012.

## 2.6. ICP-MS

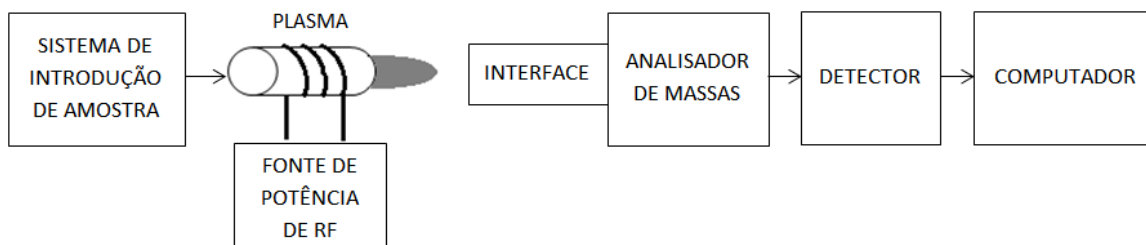
O uso do ICP-MS em determinações de metais tóxicos, além de ser recomendado pelas farmacopeias, vem ganhando espaço nas pesquisas e nos laboratórios de indústrias farmacêuticas. Cassap (2011) relatou as vantagens do uso do ICP OES e ICP-MS para determinações de impurezas de elementos traços em medicamentos. Os parâmetros de desempenho como seletividade, sensibilidade, robustez, precisão e frequência analítica são excepcionalmente melhorados quando comparados com os métodos gravimétricos baseados em precipitação. Os benefícios de um ICP-MS acoplado a um sistema de autodiluição e autocalibração foi avaliado para a determinação de elementos tóxicos em medicamentos. Os autores descrevem que este sistema é eficiente para a demanda do mercado farmacêutico por alta frequência analítica em seus laboratórios de qualidade (DAVIDOWSKI et. al., 2012; RAO e TALLURI, 2007). Porém, mesmo sendo uma técnica de alta sensibilidade e com capacidade multielementar, tem grande suscetibilidade a interferências e são essas caracterizadas como espectrais e matriciais (TAVARES, 2013).

O ICP-MS foi introduzido pelo mercado consumidor na década de 80, e hoje são mais de 11000 equipamentos instalados pelo mundo, de vários modelos e várias marcas. O âmbito de aplicação do ICP-MS é muito amplo: 80% das análises realizadas por essa técnica são nas áreas ambiental, geológica, semicondutores, biomédica e campos de aplicação nucleares. Essa técnica é usada para determinar até 70 elementos simultaneamente, e oferece limites de detecção baixos, na escala de ppm (parte por milhão) e extremamente baixos em sub-ppt (parte por trilhão) (BATSALA, et. al., 2012; THOMAS, 2013).

O ICP-MS é composto por um sistema de introdução de amostra, sistema de atomização, uma interface, analisador de massa e o detector, representado na Figura 3. A amostra é aspirada por num sistema de introdução de amostra composto por uma bomba peristáltica com fluxo de 1mL/min, é pulverizada em nebulizadores e as partículas de menor tamanho são separadas na câmara de nebulização e transportadas para a tocha do plasma. O plasma é produzido por uma alta radiofrequência aplicada ao gás argônio e o plasma atinge temperaturas próximas de 10000 K. Essa alta temperatura é capaz de ionizar

os átomos da amostra e esses íons são transportados para o analisador de massas (THOMAS, 2013).

**Figura 3** - Sistema de um espectrômetro de massas acoplado ao plasma induzido.



Fonte: da autora, 2015. (Adaptado de SKOOG, 2006).

Nessa etapa de transporte há um problema, onde o ICP está em pressão atmosférica e o analisador de massas no vácuo ( $\sim 10^{-6}$  torr). Logo, a interface que é constituída por cones de amostragem e skimmer, tem a função de garantir que uma fração considerável dos íons produzidos seja transportada para o analisador de massas (PERKINELMER, 2011). No analisador de massas o analito é separado dos demais íons por meio de sua razão massa/carga ( $m/z$ ), e esses íons de interesse são transportados para o detector. No detector esses íons produzem um sinal elétrico que é processado por um sistema de tratamento de dados em um computador e, em seguida, convertido em concentração do analito, baseado na curva de calibração (THOMAS, 2013).

A grande desvantagem nas determinações por ICP-MS são as interferências, que podem ser espectrais ou matriciais. As interferências espectrais estão diretamente relacionadas com os íons e suas propriedades, como por exemplo, as causadas por íons óxidos, íons de dupla carga e íons poliatômicos. Quanto às interferências matriciais, qualquer concomitante presente em elevadas concentrações pode levar a interferências; espécies iônicas formadas no plasma que possuem a mesma razão  $m/z$  que o íon do analito (SKOOG, 2006). Portanto, as interferências são função do analito, da matriz, das condições de operação e características do instrumento. Soluções com altos teores de sólidos dissolvidos causam deposição no cone de amostragem, o que diminui o diâmetro do orifício reduzindo o sinal gradualmente. Elementos facilmente ionizáveis causam supressão da

ionização do analito, bem como amostras com íons muito pesados em relação ao analito que podem causar efeito de carga espacial (EVAN e GIGLIO, 1993; TAVARES, 2013).

Existem algumas estratégias para evitar tais interferências como otimização dos métodos de preparo de amostra, equações de correção, tecnologia de plasma frio e também o estudo dos modos de operação do aparelho, o modo KED (discriminação por energia cinética) e o padrão (THOMAS, 2013).

O modo KED - modo de colisão com discriminação por energia cinética faz uso da tecnologia célula universal (Universal Cell Technology™ - UCT) a célula consiste em um quadrupolo ou até mesmo um hexapolo com radiofrequência constante, logo não há separação por massas neste dispositivo, é localizada antes do quadrupolo analisador de massas como mostra a Figura 4 (THOMAS, 2013). Esse modo de operação é usado para suprimir os interferentes poliatômicos, alguns desses interferentes mais comuns estão mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3 - Interferentes poliatômicos comuns**

<b>Analito</b>	<b>Interferente Poliatômico</b>
$^{51}\text{V}$	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$
$^{52}\text{Cr}$	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$ ; $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}$ ; $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$
$^{75}\text{As}$	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$

Fonte: adaptado de PerkinElmer, 2011

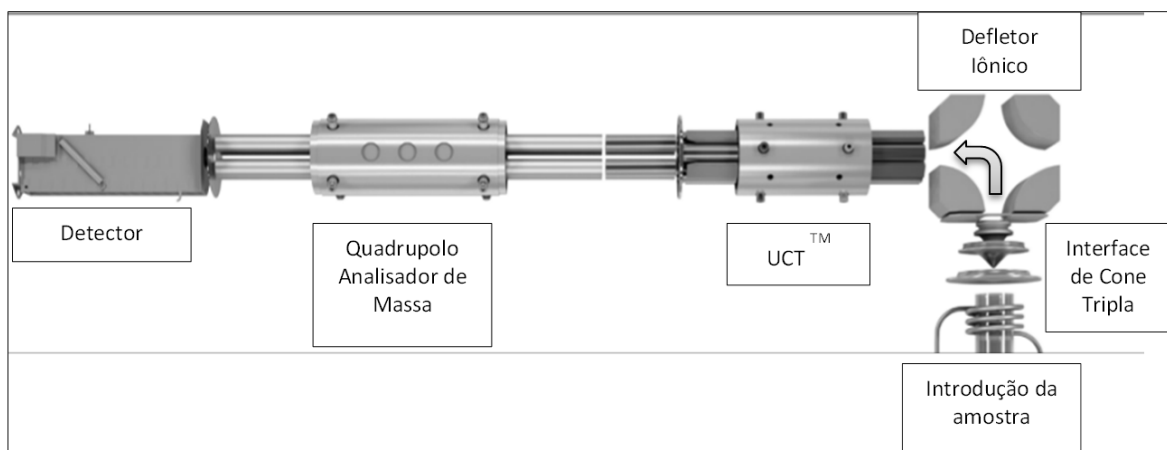
O princípio de operação do KED leva em consideração que o íon interferente é maior que o analito, com isso um gás inerte, como o hélio, é introduzido na célula no sentido contrário do feixe iônico, o qual possui tanto o analito quanto o interferente. Logo como os interferentes poliatômicos são maiores, estes colidem com as moléculas do gás, com isso a quantidade de energia cinética dos interferentes diminui e não conseguem ultrapassar uma barreira de energia potencial localizada no final da célula de colisão



(PERKINELMER, 2011, YAMADA, 2015). O modo KED apresenta boa precisão e menores limites de detecção, porém pode haver perda da sensibilidade (THOMAS, 2013).

O modo padrão permite que o instrumento trabalhe com a célula desativada, evitando a diminuição de sensibilidade normalmente encontrada no modo KED. Para elementos que não exigem correção de interferência, o modo padrão pode fornecer sensibilidade igual à do modo colisão ou reação quando operados corretamente (THOMAS, 2013).

**Figura 4** - Estrutura do ICP-MS com tecnologia célula universal UCT™



Fonte: adaptado de PerkinElmer, 2011

Muller et. al. (2015) realizou um intenso controle de interferentes em seu estudo de determinação de impurezas elementares em APIs (princípios ativos) por ICP-MS. Também, propôs métodos de digestão assistida por radiação micro-ondas, e concluiu que seus métodos foram adequados para as determinações por ICP-MS, podendo ser utilizados em análises de rotina no controle de qualidade das indústrias farmacêuticas.

## 2.7. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Validar um método é assegurar por meio de análises e evidências objetivas que as especificações foram atendidas, ou seja, confirmar que o método é apropriado para o uso proposto e garantir a credibilidade dos resultados. É imprescindível estabelecer meios e critérios objetivos para comprovar, por meio da validação, que os métodos experimentais acarretam a resultados confiáveis e condizentes à qualidade projetada (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011). O principal objetivo da validação de um método analítico é garantir que as mensurações de análises futuras sejam suficientemente próximas ao desconhecido valor verdadeiro do analito contido na amostra (GONZALEZ e HERRADOR, 2007).

O Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA - Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 indica que para testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas os parâmetros de desempenho a serem avaliados são: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão e robustez. Estes parâmetros também são recomendados no capítulo 233 da USP.

### 2.7.1. Especificidade

Esse parâmetro é determinado para garantir que o método é capaz de medir o analito mesmo na presença de interferentes, como impurezas e produtos de degradação. Segundo a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos das amostras com amostras contaminadas com concentrações conhecidas de vários interferentes. Além disso, devem ser realizadas análise com amostras de referência certificada no método estudo e os resultados obtidos comparados com métodos já validados (INMETRO, 2011).

### 2.7.2. Linearidade

Segundo o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA - Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 a linearidade é:

A capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

É expressa pelo coeficiente de correlação (R) e seu critério mínimo aceitável é de  $R=0,99$ .

### **2.7.3. Intervalo**

Todo método analítico possui um intervalo de concentrações do analito no qual pode ser aplicado e deve estar entre o limite de quantificação superior e inferior. Para a determinação de impurezas os limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo, o alcance do nível de impureza esperado deve ser de até 120% do limite máximo estabelecido. Se os analitos apresentam toxicidade ou efeitos farmacológicos adversos, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados ao nível de impurezas presentes (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

### **2.7.4. Precisão**

Segundo o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA - Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 a precisão é constada quando os resultados verificados pelas diversas medidas de uma serie de alíquotas obtidas de uma mesma amostra são próximos entre si. A precisão é dada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade é dada pela concordância dos resultados da análise de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra, em diferentes concentrações do intervalo, realizadas num curto espaço de tempo, pelo mesmo analista e instrumentação. Deve ser verificada em triplicada para três concentrações da faixa de trabalho: baixa, média e alta; ou no mínimo seis medidas a 100% da concentração do ensaio (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011). A precisão intermediária é dada pela concordância dos resultados obtidos no mesmo laboratório, porém em dias, analistas e equipamentos diferentes (ANVISA, 2003). E a reprodutibilidade segundo a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA é descrita como sendo:

A concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

É expressa pela equação abaixo, em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

$$DRP = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

### 2.7.5. Limite de Quantificação

Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão admissíveis sob as condições experimentais definidas. O LQ é expresso pela seguinte equação, segundo a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA:

$$LQ = 10 \frac{S_b}{b} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde **S<sub>b</sub>** é o desvio padrão de 10 medidas do branco e **b** é o coeficiente angular da reta da curva de calibração.

### 2.7.6. Limite de Detecção

O Limite de Detecção (LD) é a concentração mais baixa que pode ser detectada, com certeza, acima da concentração do branco. O LD é dado pela seguinte equação, segundo a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA:

$$LD = 3 \frac{S_b}{b} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde **S<sub>b</sub>** é o desvio padrão de 10 medidas do branco e **b** é o coeficiente angular da reta da curva de calibração.

### 2.7.7. Exatidão

Em um método analítico a exatidão é usada para determinar o quão próximo do resultado verdadeiro estão resultados obtidos por este método estudado. Pode ser determinado pelo resultado de amostras de referências certificadas ou por ensaio de adição de padrão, que consiste em adicionar uma concentração conhecida do analito e calcular a porcentagem de sua recuperação. Neste caso a exatidão é dada pela seguinte equação, segundo a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA:

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ Experimental \times 100}{Concentração\ teórica} \quad \text{Equação (4)}$$

Segundo Gonzalez e Herrador (2007), a literatura traz porcentagens de recuperação que são aceitáveis em função da concentração de analito, como mostrado na Tabela 4. Porém, segundo o capítulo 233 da USP fica definido como critérios de aceitação para recuperações, valores de 70 a 150% obtidos a partir de amostras replicadas.

**Tabela 4** – Porcentagens de recuperação aceitáveis com relação à concentração de analito.

<b>Unidade</b>	<b>Faixa de recuperação (%)</b>
1 ppm	80 -110
100 ppb	80 – 110
10 ppb	60 – 115
1 ppb	40 – 120

Adaptado de GONZALEZ E HERRADOR, 2007

### **2.7.8. Robustez**

A determinação da robustez de um método analítico indica a sua capacidade em suportar pequenas variações das condições analíticas, indicando assim que o método é de uso confiável. Por exemplo, para métodos de preparo de amostras farmacêuticas é indicado que os parâmetros estudados na robustez sejam estabilidade das soluções analíticas e o tempo de extração (ANVISA, 2003).

Por fim, tendo em vista um mercado em crescimento, o olhar do setor farmacêutico está ainda mais voltado para a qualidade dos medicamentos e as novas alterações das legislações relacionadas a elementos potencialmente tóxicos. Assim, o trabalho propõe métodos de preparo de amostra para a determinação de contaminantes inorgânicos em amostras farmacêuticas utilizando a técnica de ICP-MS, abrangendo as novas exigências dos órgãos regulamentadores como a USP e fornecendo informações para o monitoramento dessas impurezas para que a qualidade dos medicamentos seja garantida.

## 3 - OBJETIVOS

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVOS GERAIS**

Este projeto visa o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras em matrizes farmacêuticas para a determinação de impurezas inorgânicas por ICP-MS baseado nas legislações internacionais vigentes visando a química verde.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Desenvolver método de preparo de amostra por MW-AD para o produto final do medicamento aciclovir e para as matérias-primas empregadas na sua fabricação.

Desenvolver e comparar métodos por MW-AD e UAE para amostras do medicamento omeprazol genérico e similar.

Otimizar e desenvolver metodologias para a determinação de impurezas inorgânicas por ICP-MS, nos modos de operação padrão e KED visando a remoção dos principais interferentes matriciais.



## 4 - ACICLOVIR

---

## 4. ACICLOVIR

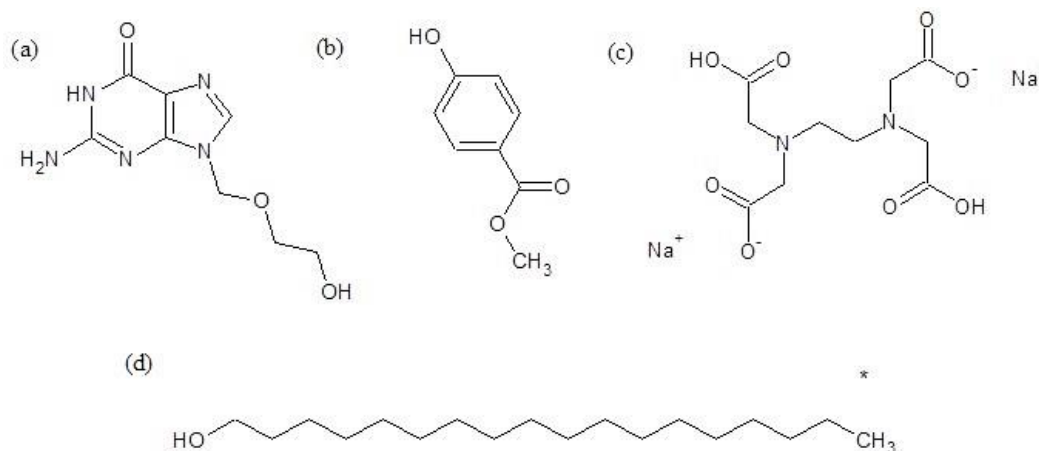
Neste capítulo foi estudado o produto final e as matérias-primas usadas no medicamento aciclovir pomada, pois são as possíveis fontes de contaminação durante o processo de produção. Além disso, o estudo buscou estabelecer um método de preparo de amostra eficiente para esta matriz por MW-AD, bem como designar metodologia para a determinação de contaminantes inorgânicos por ICP-MS nesta matriz. A partir deste estudo um trabalho foi publicado: GONZALEZ, M H. ; SILVA, C. S. DA ; AMARAL, C. D. B. ; BIANCHI, S. R. ; OLIVEIRA, L. H. B. DE ; COELHO, J. S. ; OLIVEIRA, A. ; NOGUEIRA, A. R. A.. Determination of Elemental Impurities in Acyclovir Ointment and Raw Materials Using Microwave Acid Digestion (MW-AD) and ICP-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20160151>, 2016.

### 4.1. AMOSTRAS

Foi estudado o medicamento Aciclovir em pomada, que é usado para tratamento de herpes. As amostras analisadas foram a pomada (produto final) e alguns excipientes. Dentre os excipientes comuns do produto estão o aciclovir micronizado (API), edetato dissódico di-hidratado, metilparabeno, cera emulsificante, vaselina líquida, propilenoglicol e glicerol. Para o estudo foram escolhidos excipientes com estruturas diferentes a fim representar melhor o produto final, e são os seguintes: aciclovir micronizado (aciclovir - API), metilparabeno, edetato dissódico e cera. Estas amostras foram adquiridas em farmácia comercial na cidade de São Carlos, São Paulo, Brasil. Na Figura 5 estão demonstradas as estruturas químicas das amostras estudadas.

Todas as amostras foram liofilizadas em frascos de vidro ligados ao sistema de vácuo do liofilizador, o qual operou a  $-195^{\circ}\text{C}$  durante 80 h, e depois guardadas a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 5** – Estruturas químicas das amostras: (a) o aciclovir - API; (b) metilparabeno; (c) edetato dissódico; (d) cera.



#### 4.2. INSTRUMENTAÇÃO, REAGENTES E SOLUÇÕES.

Todas as vidrarias, frascos e tubos utilizados nos procedimentos foram lavados com detergente livre de metais (Extran), descontaminados e desmineralizados em banho de HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) durante 24 horas. Todas as soluções e diluições foram preparadas com água deionizada purificada em sistema Milli-Q® (18.2 Ω cm, Millipore, EUA).

As amostras de aciclovir foram preparadas em um sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas com tubos fechados de perfluoroalcoxi (PFA), Ethos 1600, Milestone, Itália, com sensor de temperatura interno; o procedimento foi realizado na Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos, SP, Brasil.

O teor de carbono total (TCC) foi determinado por analisador elementar CHNS/O 2400 Series II, PerkinElmer, EUA. E para o teor de carbono residual (RCC) foi empregada espectrometria de emissão atômica acoplada ao plasma induzido ICP OES, VistaPro, Varian, Mulgrave, Austrália. Os parâmetros instrumentais adotados foram: frequência do gerador de 40 MHz; potência de RF de 1,3 kW; taxa de fluxo de gás plasma 15 L min<sup>-1</sup>; 1,5 L min<sup>-1</sup> a taxa de fluxo de gás auxiliar; 0,9 L min<sup>-1</sup> vazão de gás nebulizador; câmara de nebulização ciclônica; nebulizador concêntrico; 0,8 mL min<sup>-1</sup> vazão amostra; e os

comprimentos de onda de emissão de análise (nm) C (I), 193,025. Essas análises foram realizadas na Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos, SP, Brasil..

As determinações de V, Cr, Ni, Cu, As e Pb foram executadas empregando um espectrômetro de massa acoplado ao plasma induzido (ICP-MS) modelo NexION 300 ICP-MS, Perkin Elmer, EUA, operando em modo padrão e modo KED, executadas na Universidade Estadual Paulista (UNESP) de São José do Rio Preto, SP, Brasil. As condições de operação ICP-MS encontram-se resumidas na Tabela 5.

**Tabela 5** - Configurações instrumentais e parâmetros de aquisição de dados do ICP-MS para modo KED e modo padrão.

<b>Configurações instrumentais</b>	
Potência de Radiofrequência	1600W
Fluxo de gás do Plasma	18 L min <sup>-1</sup>
Fluxo de gás auxiliar	1,2 L min <sup>-1</sup>
Fluxo de gás do nebulizador	1,01 mL min <sup>-1</sup>
<b>Modo KED<sup>a</sup></b>	
Lente de entrada	-3,00 V
Lente de saída	-32,00 V
CRO <sup>b</sup>	0,00
QRO <sup>c</sup>	-15.00 V
<b>Parâmetros de aquisição de dados</b>	
Varreduras / leitura	50
Leitura / repetições	2
Repetições	3
Tempos de permanência	25 s
Canal de Gás	He
RPq <sup>d</sup>	0,25-0,50
Taxa de fluxo de Hélio	2,0-6,0 mL min <sup>-1</sup>
Faixa de calibração	0,1 – 15 µg L <sup>-1</sup>

<sup>a</sup>KED: Discriminação Energia Cinética; <sup>b</sup>CRO: Haste de Células Compensados; <sup>c</sup>QRO: Haste de Quadrupolo Compensados; <sup>d</sup>RPQ: Parâmetros de Ajuste Banda Dinâmica de Quadrupolo.

O ácido nítrico concentrado (Carlo Erba, Itália) e peróxido de hidrogénio 30% (m/m) de (Mallinckrodt, México) foram empregados no preparo da amostra. O biftalato de potássio anidro (Synth, Diadema, Brasil) foi usado para preparar a curva de calibração de carbono nas determinações do RCC. A curva de calibração analítica foi preparada por diluições em série de soluções-estoque de referência analítica para a análise ICP-MS

contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de As, Cr, Cu, Ni, Pb e V (Fluka, Buchs, Suíça) em uma solução contendo 1% v/v de HNO<sub>3</sub>. Gás Argônio (99,999%) e Hélio (99,9999%) foram fornecido pela White Martins (Sertãozinho, SP, Brasil), usado para a geração de plasma, nebulização e também como gás auxiliar no ICP-MS.

#### 4.3. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA POR DIGESTÃO ÁCIDA ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS (MW-AD)

Com o propósito de maximizar a eficiência da digestão das amostras foi aplicado um planejamento fatorial na amostra do produto final (pomada aciclovir) por essa conter todos os excipientes. As variáveis independentes foram: 1) potência radiação – 900 e 1200 W; 2) temperatura – 160 e 200 °C e 3) concentração de ácido nítrico – 2,0 e 7,0 mol L<sup>-1</sup>. A seleção de níveis baixo e alto para cada uma das variáveis estudadas foi baseada na literatura (SOUZA et al, 2008). As condições de cada experimento do planejamento fatorial estão apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6** - Planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> em dois níveis avaliados para cada variável estudada na etapa de tratamento de amostra de aciclovir pomada por MW-AD (n = 2 para cada condição experimental avaliada)

Experimento	Replicata	Potência (W)	Temperatura (°C)	Ácido nítrico (mol L <sup>-1</sup> )
1	1	900	160	7,0
2	1	1200	160	7,0
3	1	900	200	7,0
4	1	1200	200	7,0
5	1	900	160	14,0
6	1	1200	160	14,0
7	1	900	200	14,0
8	1	1200	200	14,0
9	2	900	160	7,0
10	2	1200	160	7,0
11	2	900	200	7,0
12	2	1200	200	7,0
13	2	900	160	14,0
14	2	1200	160	14,0
15	2	900	200	14,0
16	2	1200	200	14,0

As eficiências dos tratamentos propostos no planejamento foram avaliadas pela comparação do teor de carbono total (TCC) e pelo teor de carbono residual (RCC). O TCC presente nas amostras foi determinado antes do tratamento da amostra por analisador elementar; e o RCC das amostras tratadas foi determinado por ICP OES de acordo com Gouveia et al (2001). De acordo com as melhores condições obtidas pelo planejamento fatorial seguiu o tratamento das amostras

#### 4.1. PREPARO DE AMOSTRA POR MW-AD

Foram pesados aproximadamente 200 mg de amostra e colocados nos tubos digestores de PFA, em seguida foram adicionados em cada tubo 6,0 mL de HNO<sub>3</sub> 50% (7,0 mol L<sup>-1</sup>) e 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Os tubos foram levados ao forno micro-ondas e iniciou-se o programa de digestão, que consistiu no aquecimento por 20 minutos para atingir a temperatura de 160°C e 20 minutos de aquecimento mantendo 160°C, e depois 20 minutos de resfriamento, sendo aplicada uma potência de radiação de 900 W; a temperatura durante o processo foi controlada por um sensor de temperatura interno. As soluções obtidas foram diluídas quantitativamente para 14 mL com água ultrapura. A diluição adicional foi realizada para garantir a 1% m/v de sólidos dissolvidos em cada amostra, como requerido para análises em ICP-MS. O procedimento foi realizado em triplicata, incluindo os brancos.

#### 4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.2.1. Otimização do Método de Preparo de Amostra por MW-AD

Os valores obtidos dos teores carbono, hidrogênio e nitrogênio total das amostras dos constituintes do Aciclovir determinados por analisador elementar, antes do tratamento por MW-AD são apresentados na Tabela 7. Os teores de carbono total variaram de 32 a 72% e a cera foi o constituinte que apresentou os maiores valores de carbono total.

**Tabela 7** – Teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio total (% , média  $\pm$  desvio padrão, n=3) em amostras dos constituintes do Aciclovir antes do tratamento MW-AD.

<b>Amostras de medicamento</b>	<b>C/%</b>	<b>H/%</b>	<b>N/%</b>
<i>Edetato dissódico</i>	32,3 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,1	7,7 $\pm$ 0,02
<i>Aciclovir-API</i>	38,3 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,5	29,7 $\pm$ 0,1
<i>Cera</i>	72,0 $\pm$ 0,9	4,6 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,08
<i>Metilparabeno</i>	65,5 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,04

O planejamento fatorial completo  $2^3$  foi aplicado em pomada aciclovir com o objetivo de determinar as condições mais adequadas de tratamento de amostra, para que essas sejam aplicadas na etapa de tratamento de cada amostra estudada. Na Tabela 8 estão apresentados os valores de RCC obtidos por ICP OES para todas as condições de tratamento das amostras avaliadas; a avaliação do parâmetro RCC fornece uma boa estimativa para avaliar a eficiência do tratamento da amostra otimizado (GONZALEZ et al, 2011).

**Tabela 8** - Planejamento fatorial completo  $2^3$  em dois níveis avaliados para cada variável estudada na etapa de tratamento de amostra de aciclovir pomada por MW-AD (n = 2 para cada condição experimental avaliada).

<b>Experimento</b>	<b>Replicata</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Ácido nítrico (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>RCC (%)</b>
1	1	900	160	7,0	9
2	1	1200	160	7,0	10
3	1	900	200	7,0	17
4	1	1200	200	7,0	13
5	1	900	160	14,0	10
6	1	1200	160	14,0	10
7	1	900	200	14,0	12
8	1	1200	200	14,0	13
9	2	900	160	7,0	8
10	2	1200	160	7,0	8
11	2	900	200	7,0	15
12	2	1200	200	7,0	14
13	2	900	160	14,0	9
14	2	1200	160	14,0	10
15	2	900	200	14,0	11
16	2	1200	200	14,0	13

A variação de RCC foi de 8 a 17%, os menores valores foram obtidos nas condições aplicadas aos experimentos 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 e 14, respectivamente com RCC de 9, 10, 10, 10, 8, 8, 9 e 10 %, porém dentre esses valores foram escolhidas as condições mais brancas, ou seja, temperatura e potência menores para preservar o tempo de vida útil do equipamento e concentração de ácido menor para minimizar o consumo de reagente. Na verdade, as eficiências de decomposição oferecidas pela utilização de soluções mais diluídas de ácido cria condições favoráveis para a regeneração de ácido nítrico na presença de água e de oxigênio, que é responsável pelo melhoramento dos processos de decomposição (GONZALEZ et al, 2011).

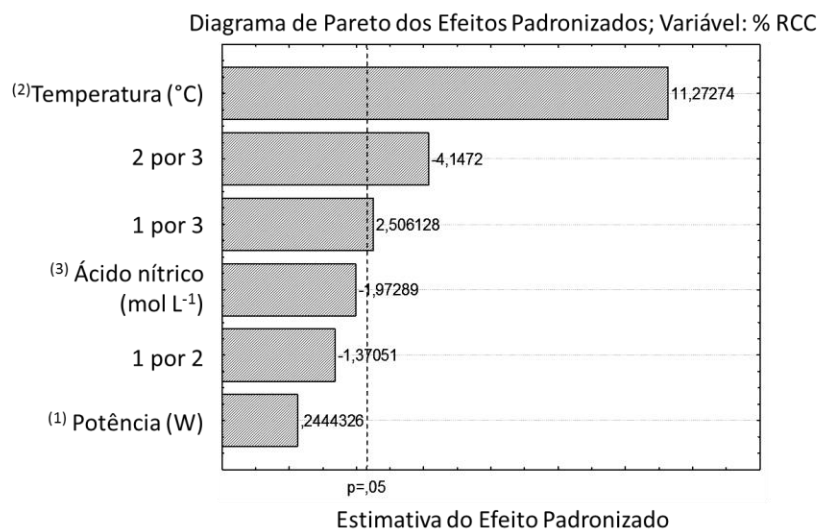
Logo, a potência de radiação de micro-ondas de 900 W, a temperatura aplicada de 160°C, associadas com uma concentração de ácido nítrico de 7,0 mol L<sup>-1</sup> foram as condições de reação que promoveu a decomposição mais adequada da matriz de medicamento estudada (RCC cerca de 8%).

Aplicando o diagrama de Pareto ao planejamento fatorial é possível verificar quais variáveis tiveram maiores influências sob a resposta, no caso, no RCC. Aqueles fatores ou combinações de fatores cujos efeitos são significantes, de acordo com o teste T, apresentam barras que ultrapassam a linha marcada no diagrama, possuem valor  $p < 0,05$  com um nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Como pode ser visto pelo diagrama de Pareto na Figura 6, a variável temperatura foi o fator mais importante que afeta a eficiência da digestão, seguida pela interação dos fatores temperatura e concentração de ácido nítrico.

As amostras dos constituintes e da pomada aciclovir foram tratadas segundo a otimização apresentada anteriormente e os valores dos teores de carbono residual que foram quantificados por ICP OES estão apresentados na Tabela 9.



**Figura 6** - Diagrama de Pareto obtido do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) de tratamento de amostra de aciclovir pomada por MW-AD.



**Tabela 9**- Teores de carbono residual de amostras tratadas de aciclovir pomada e constituintes após tratamento otimizado de MW-AD

Amostra	Teor de carbono residual (RCC)
<i>Aciclovir pomada</i>	8,0 ± 0,6
<i>Aciclovir – API</i>	6,0 ± 0,6
<i>Metilparabeno</i>	4,4 ± 0,3
<i>Edetato dissódico</i>	3,9 ± 0,3
<i>Cera</i>	3,3 ± 0,5

Como visto, o valor RCC reflete a eficiência da digestão por micro-ondas e essa eficácia pode estar relacionada com as estruturas químicas dos compostos orgânicos (Figura 5). Conforme relatado por Würfels et al. (1989) alguns grupos de substâncias, tais como álcoois de cadeia longa, carboidratos e ácidos graxos de cadeia longa, são quase completamente decompostos por ácido nítrico sob pressão. Embora não especificado pelo fabricante, é provável que a composição básica da cera seja um álcool de cadeia longa como, por exemplo, álcool cetosteárilico um álcool graxo primário, linear, saturado

utilizado como emulsionante (VIAFARMA, 2014). O alto teor de carbono total encontrado na cera, cerca de 72% (Tabela 9), indica a presença de altas quantidades de carbono, no entanto, esta amostra obteve o menor valor de RCC (3,3%) mostrando que o meio reacional empregado no tratamento das amostras promoveu a decomposição adequada para este excipiente.

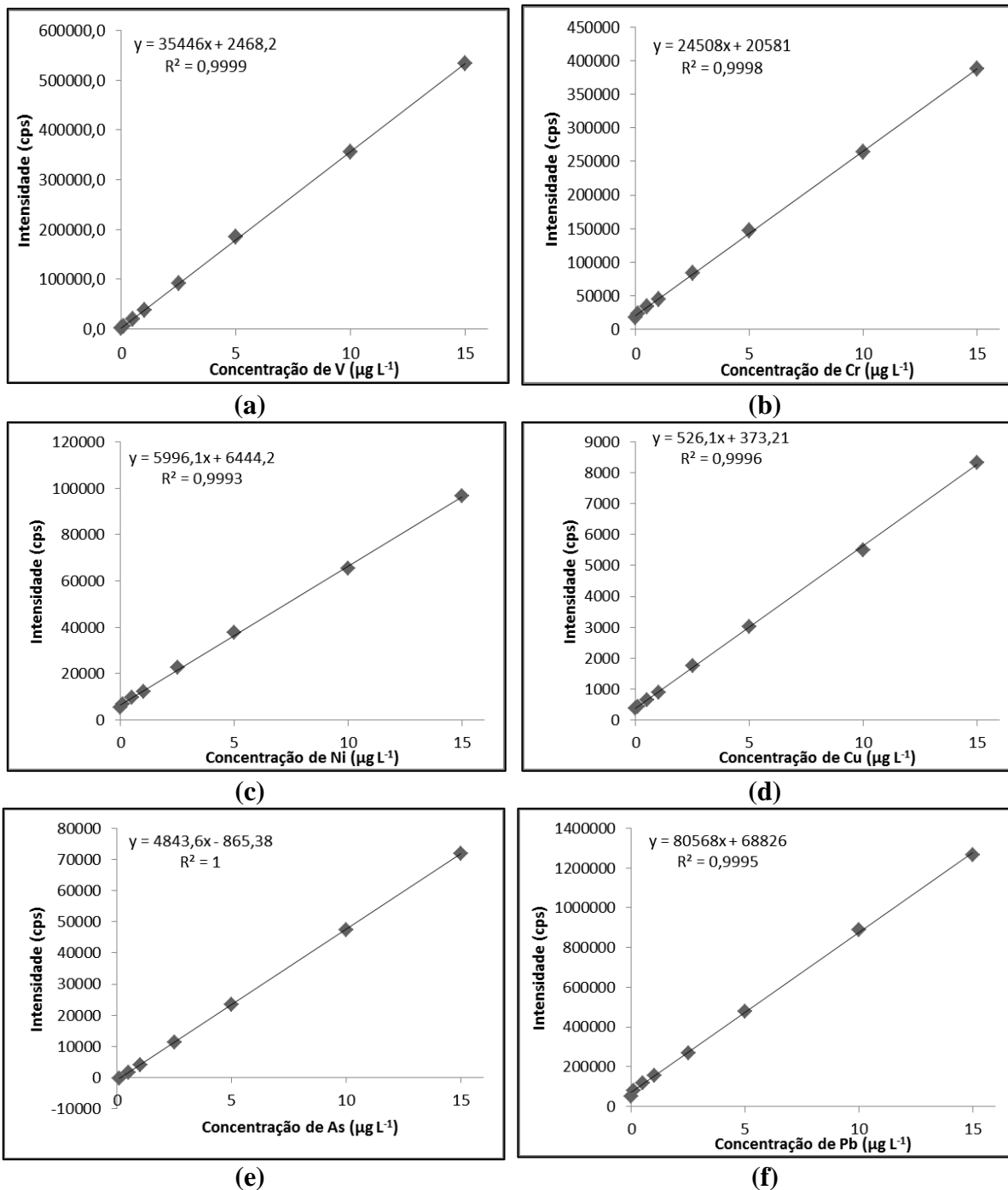
Embora o mecanismo de degradação do EDTA em ácido nítrico com a assistência de radiação micro-ondas não seja claro, sabe-se que a molécula de EDTA torna-se instável na presença de agentes oxidantes fortes como  $\text{HNO}_3$  (SELIVERSTOV et al., 2008). E por isso, o valor de RCC do EDTA obtido é o segundo mais baixo (3,9 %), porém bem próximo do RCC da cera apesar de obter uma estrutura mais complexa (Figura 5).

Compostos orgânicos que contêm anéis aromáticos em suas estruturas podem apresentar maiores resistências à oxidação promovida por  $\text{HNO}_3$ , porém o grupo substituinte do anel pode facilitar a reação (FLORENCE e ATTWOOD, 2006; MULLER et al., 2015). Das amostras estudadas tanto aciclovir-API quanto o metilparabeno possuem anéis aromáticos em suas estruturas químicas (Figura 5), porém os valores de RCC entre esses excipientes são diferentes, sendo de 6,0 e 4,4% respectivamente. É interessante mencionar que os fortes substituintes de ativação, como o grupo  $-\text{OH}$  presente no metilparabeno, facilitam a oxidação de anéis aromáticos, o que esclarece o porquê do valor de RCC observado para este composto é inferior ao valor de RCC obtido para a amostra de aciclovir-API. O produto final (Aciclovir pomada) apresentou o maior valor de RCC (8%), pois é constituído de outros excipientes além dos que foram estudados nesta etapa.

#### **4.2.2. Validação do Método de Determinação de V, Cr, Ni, Cu, As e Pb por ICP-MS**

A linearidade expressa pelo coeficiente de correlação das curvas de calibração (R) são para V, Cr, Ni, Cu, As e Pb, respectivamente iguais a 0,9999, 0,9999, 0,9996, 0,9998, 1 e 0,9997. Os gráficos das curvas de calibração estão apresentados na Figura 7.

**Figura 7** - Gráficos das curvas de calibração de faixa linear de 0,1 a 15  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos elementos (a) V, (b) Cr, (c) Ni, (d) Cu, (e) As e (f) Pb.



Os limites de detecção (LD) obtidos estão de acordo com os exigidos pela Convenção da USP, mostrando que a técnica de ICP-MS é bastante adequada para a

quantificação destes elementos. Os LD's em  $\text{ng L}^{-1}$  em meio 1%  $\text{HNO}_3$  v v<sup>-1</sup> estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Limites de detecção em  $\text{ng. L}^{-1}$  dos elementos V, Cr, Ni, Cu, As e Pb para as amostras de aciclovir.

Elemento	<sup>51</sup> V <sup>+</sup>	<sup>52</sup> Cr <sup>+</sup>	<sup>58</sup> Ni <sup>+</sup>	<sup>65</sup> Cu <sup>+</sup>	<sup>75</sup> As <sup>+</sup>	<sup>208</sup> Pb <sup>+</sup>
<i>Limite de Detecção (ng L<sup>-1</sup>)</i>	2,2	81,3	91,9	6,9	0,2	3,1

A exatidão foi determinada por teste de adição e recuperação, em que as amostras de aciclovir pomada foram fortificadas pelos analitos de interesse com concentração conhecida em dois níveis 2,5 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , antes e depois da MW-AD. As determinações das recuperações dos elementos no teste realizado antes da MW-AD, garante a verificação das perdas dos analitos por esse método de preparo de amostra, e para o teste realizado depois de MW-AD pode-se garantir a exatidão da técnica de ICP-MS. As determinações dos elementos foram realizadas por ICP-MS em modo padrão e modo KED. As concentrações obtidas nas amostras de aciclovir fortificadas e as porcentagens de recuperação estão apresentadas na Tabela 11.

Com exceção do Cr, as recuperações dos analitos estiveram dentro da faixa de recuperação aceitável de 70-150% estabelecida pela USP – 233 para testes de exatidão. Podendo assim, inferir que tanto no método de MW-AD quanto na técnica de ICP-MS não houve perdas de analitos, e são exatos.

Em geral, as recuperações não foram melhoradas quando o modo KED foi empregado. Na verdade, em alguns casos os valores de recuperação diminuiu, como no caso de <sup>52</sup>Cr<sup>+</sup> ou <sup>75</sup>As<sup>+</sup>, o que pode ser explicado pelo fato de que o gás hélio desfoca os feixes de íons, devido as muitas colisões, comprometendo a sensibilidade, e por sua vez, pode comprometer a precisão de o método (COTTA e ENZWEILER, 2009; PEREIRA et al, 2010). De acordo com Cotta e Enzweiler (2009), a introdução de uma mistura contendo

gases H<sub>2</sub> e He minimiza algumas interferências encontradas na quantificação dos oligoelementos em água, no entanto, as intensidades dos sinais dos analitos foram severamente afetadas.

A grave interferência poliatômica <sup>35</sup>Cl<sup>16</sup>O<sup>+</sup> de 51 m/z, provavelmente reduz a precisão das medições por ICP-MS para <sup>51</sup>V<sup>+</sup> no modo padrão. Portanto, apenas para vanádio foi possível verificar a correção das interferências espectrais usando KED e gás He, levando a resultados precisos. Estas observações podem ser explicadas pela sobreposição de sinais de espécies poliatômicas formadas no plasma. Na verdade, cromo e vanádio isótopos, <sup>52</sup>Cr<sup>+</sup> e <sup>51</sup>V<sup>+</sup>, sofrem interferências graves causadas por espécies como <sup>40</sup>Ar<sup>12</sup>C<sup>+</sup>, <sup>36</sup>Ar<sup>15</sup>N<sup>1</sup>H<sup>+</sup>, <sup>36</sup>Ar<sup>16</sup>O<sup>+</sup> e <sup>36</sup>Ar<sup>15</sup>N<sup>+</sup>, <sup>38</sup>Ar<sup>13</sup>C<sup>+</sup>, <sup>36</sup>Ar<sup>14</sup>N<sup>1</sup>H<sup>+</sup>, respectivamente.

**Tabela 11** - Valores de concentração e recuperação para amostras aciclovir fortificadas quantificados por ICP-MS (média ± desvio padrão, n = 3).

Amostra	Modo de operação	Isótopo	Antes de MW-AD		Depois de MW-AD	
			Concentração (µg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Concentração (µg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
<i>Aciclovir Fortificado</i> (2.5 µg L <sup>-1</sup> )	KED	<sup>51</sup> V <sup>+</sup>	2,50 ± 0,06	100	2,7 ± 0,2	110
	Padrão	<sup>52</sup> Cr <sup>+</sup>	1,5 ± 0,4	59,6	2,1 ± 0,4	85,6
	Padrão	<sup>58</sup> Ni <sup>+</sup>	2,4 ± 0,6	95,1	2,20 ± 0,04	87,3
	Padrão	<sup>65</sup> Cu <sup>+</sup>	2,6 ± 0,1	105	3,0 ± 0,3	121
	Padrão	<sup>75</sup> As <sup>+</sup>	2,6 ± 0,1	104	2,80 ± 0,03	112
	Padrão	<sup>208</sup> Pb <sup>+</sup>	3,1 ± 0,5	126	2,80 ± 0,08	112
<i>Aciclovir Fortificado</i> (10 µg L <sup>-1</sup> )	KED	<sup>51</sup> V <sup>+</sup>	12,4 ± 0,1	125	13,2 ± 0,3	132
	Padrão	<sup>52</sup> Cr <sup>+</sup>	10,8 ± 0,6	108	9,5 ± 0,6	95,1
	Padrão	<sup>58</sup> Ni <sup>+</sup>	10,1 ± 0,07	101	10,2 ± 0,3	102
	Padrão	<sup>65</sup> Cu <sup>+</sup>	10,7 ± 0,2	108	9,2 ± 0,4	92,6
	Padrão	<sup>75</sup> As <sup>+</sup>	10,5 ± 0,1	106	11,2 ± 0,3	112
	Padrão	<sup>208</sup> Pb <sup>+</sup>	9,8 ± 0,1	98,7	10,5 ± 0,1	105

### 4.2.3. Determinação de V, Cr, Ni, Cu, As e Pb por ICP-MS

As determinações de Cr, Ni, Cu, As e Pb nas amostras de aciclovir pomada e seus constituintes foram realizadas por ICP-MS operando em modo padrão e de V em modo KED; foi empregada para estes analitos uma curva de calibração analítica externa com faixa de 0,1 a 15  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Na Tabela 12 estão dispostas as concentrações determinadas nas amostras de aciclovir e seus constituintes.

**Tabela 12** – Determinação de V, Cr, Ni, Cu, As e Pb ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão, n=3) em pomada aciclovir e seus constituintes por ICP-MS operando em modo padrão.

Amostras	Modo KED <sup>a</sup>	Modo padrão ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )				
	( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) $^{51}\text{V}^+$	$^{52}\text{Cr}^+$	$^{58}\text{Ni}^+$	$^{65}\text{Cu}^+$	$^{75}\text{As}^+$	$^{208}\text{Pb}^+$
<i>Edetato dissódico</i>	102,6 $\pm$ 3,5	1535 $\pm$ 25	155 $\pm$ 3,6	181 $\pm$ 40	2,3 $\pm$ 0,8	8,6 $\pm$ 2,3
<i>Aciclovir - API</i>	61,0 $\pm$ 2,4	3446 $\pm$ 47	442 $\pm$ 42	185 $\pm$ 17,1	285 $\pm$ 51	81,9 $\pm$ 14
<i>Aciclovir pomada</i>	57,0 $\pm$ 3,0	1554 $\pm$ 98	413 $\pm$ 39	166 $\pm$ 4,4	15,7 $\pm$ 6,9	25,4 $\pm$ 2,6
<i>Cera</i>	63,3 $\pm$ 1,82	1362 $\pm$ 175	382 $\pm$ 11,1	133 $\pm$ 0,5	11,9 $\pm$ 1,8	20,1 $\pm$ 5,1
<i>Metilparabeno</i>	56,2 $\pm$ 3,0	1062 $\pm$ 183	220 $\pm$ 69	74,4 $\pm$ 8,0	8,4 $\pm$ 0,9	10,9 $\pm$ 5,9
<i>USP- 232<sup>b</sup></i>	1000	110000	2000	30000	1500	500

<sup>a</sup> KED: Discriminação Energia Cinética;

<sup>b</sup> Capítulo 232 - Impurezas Elementares: limites de impurezas inorgânica ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nos componentes dos fármacos e excipientes usados em medicamentos parentais com dose diária máxima  $\leq 10$  g/dia de medicamento, com base numa pessoa de 50 kg. USP 39 –NF 34, 2016

As concentrações de V, Cr, Ni, Cu, As e Pb determinadas em alguns constituintes são maiores em comparação com as concentrações obtidas no produto final (pomada aciclovir); essas variações podem acontecer durante o processo de fabricação e também devidos aos diferentes fornecedores e lotes das matérias-primas.

Além disso, como visto na Tabela 10 as concentrações de V, Cr, Ni, Cu, As e Pb determinadas nas amostras de aciclovir pomada e seus constituintes estão em conformidade com os limites estabelecido pela USP capítulo 232 (USP 39 –NF 34, 2016).

#### 4.3. CONCLUSÃO

O método de preparo de amostra por MW-AD proposto neste trabalho foi adequado e eficiente frente à destruição da matéria orgânica presente no produto final e nos excipientes do medicamento aciclovir, apresentando valores de RCC menores que 8%, que são baixos considerando complexidade da matriz.

O método desenvolvido para a determinação de impurezas elementares nestas amostras usando ICP-UCT-MS mostrou-se adequado, exato e com baixos limites de detecção. A exatidão do método avaliada por experimento de adição e recuperação, com exceção do Cr, apresentou recuperações de 95,1 a 126% para os elementos adicionados às amostras antes da etapa de MW-AD, e após a MW-AD de 85,6 a 132%. Os LD's ( $\text{ng L}^{-1}$ ) para  $^{51}\text{V}^+$ ,  $^{52}\text{Cr}^+$ ,  $^{58}\text{Ni}^+$ ,  $^{65}\text{Cu}^+$ ,  $^{75}\text{As}^+$  e  $^{208}\text{Pb}^+$  em meio  $\text{HNO}_3$  a 1% v/v foram: 2,2, 81,3, 91,9, 6,9, 0,2 e 3,1, respectivamente mostrando que o método proposto está de acordo com os requisitos da USP, e que a técnica ICP-MS é bem adequada para quantificação desses elementos. Além disso, a fim de superar as interferências espectrais o modo KED mostrou-se adequado somente para a determinação de  $^{51}\text{V}^+$ , enquanto que e para os demais isótopos o uso do modo padrão foi suficiente.

## 5 - OMEPRAZOL

---



## 5. OMEPRAZOL

### 5.1. AMOSTRAS

Nesta etapa foi analisado um medicamento em comprimido para tratamento de úlceras (Omeprazol). A fim de avaliar diferentes produtos, foram estudadas amostras de duas marcas do medicamento genérico e duas marcas de similar. As amostras foram adquiridas em farmácia comercial na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Os comprimidos de omeprazol são vendidos em cápsulas gelatinosas com microgrânulos e os excipientes mais comuns estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Relação dos excipientes mais comuns do medicamento omeprazol.

Amostra	Excipientes
<i>Omeprazol</i>	Manitol, sacarose, álcool cetílico, hipromelose; laurilsulfato de sódio e metilparabeno, fosfato de sódio dibásico, carbonato de cálcio e omeprazol-API.

### 5.2. INSTRUMENTAÇÃO, REAGENTES E SOLUÇÕES.

Todas as vidrarias, frascos e tubos utilizados nos procedimentos foram lavados com detergente livre de metais (Extran), descontaminados e desmineralizados em banho de HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) durante 24 horas. Todas as soluções e diluições foram preparadas com água deionizada purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (18.2 Ω cm, Millipore, EUA). Os padrões de As, Cd, Pb e Hg utilizados foram de 1000 mg L<sup>-1</sup> (Fluka<sup>®</sup> Analytical TraceCERT<sup>®</sup> CRMs for ICP – Sigma Aldrich). O ácido nítrico utilizado nas soluções e preparo de amostra foi subdestilado a 130° C em sistema de destilação de sub-ebulição de PTFE, SubClean, Milestone, Itália.

As amostras de omeprazol também foram tratadas em sistema de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas com tubos fechados de perfluoroalcoxi (PFA), Multiwave 3000, Anton-Paar na Embrapa Pecuária Sudeste na cidade de São Carlos-SP. Os métodos de extração ácida assistida por ultrassom foram realizados em banho ultrassom, Q3.0/40A, Unique.

As determinações de As, Cd, Pb e Hg foram executadas empregando um espectrômetro de massa acoplado ao plasma induzido (ICP-MS) modelo NexION 300 ICP-MS, Perkin Elmer, EUA. As determinações foram feitas com o equipamento em modo padrão. As condições instrumentais e os parâmetros de aquisição de dados estão apresentados na Tabela 14.

Gás Argônio (99,999%) foi fornecido pela White Martins (Sertãozinho, SP, Brasil), usado para a geração de plasma, nebulização e também como gás auxiliar no ICP-MS.

**Tabela 14** - Configurações instrumentais e parâmetros de aquisição de dados do ICP-MS para o modo padrão.

Configurações instrumentais		Parâmetros de aquisição de dados	
Potencia RF (W)	1600	Modo de varredura	Peak Jump
Vazão de gás no Plasma (L/min)	18,00	Dwell time (ms)	25
Vazão de gás Auxiliar (L/min)	1,20	Número de varreduras	50
Vazão de gás no Nebulizador (L/min)	1,05	Número de leituras	1
Voltagem modo padrão (V)	-3	Número de replicatas	3
		RPq <sup>a</sup> (V)	0,25

<sup>a</sup> RPQ: Parâmetros de Ajuste Banda Dinâmica de Quadrupolo.

### 5.3. PREPARO DE AMOSTRA

#### **5.3.1. Digestão Ácida Assistida por Radiação Micro-ondas (MW-AD)**

As amostras foram maceradas em almofariz com o auxílio de pistilo. Foram pesados aproximadamente 200 mg de amostra e colocadas em tubos digestores de PFA, em seguida foram adicionados 6,0 mL de HNO<sub>3</sub> 50% (7,0 mol L<sup>-1</sup>) e 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), os tubos foram levados ao forno micro-ondas e iniciou-se o programa de aquecimento. Nessa etapa do estudo foram executados dois programas de aquecimento diferentes para avaliar a melhor condição e eficiência de decomposição; variou-se a potência radiação (W) e a temperatura (°C) em um programa foram aplicados 160° C e 900 W, e no outro 190° C e 1100 W. Os programas de aquecimento seguiram por 20 minutos para atingir a temperatura e 20 minutos para mantê-la, e depois 20 minutos de resfriamento. Após a digestão as amostras foram quantitativamente diluídas para 30 mL com água deionizada.

Todo o procedimento foi executado em triplicata, incluindo os brancos para cada programa e a temperatura durante o processo foi controlada por um sensor de temperatura interno. Entre cada um dos métodos e no final da execução dos experimentos foi realizada uma etapa de limpeza dos tubos digestores adicionando 8,0 mL de HNO<sub>3</sub> 50 % (v/v) em cada tubo e levado ao forno micro-ondas e iniciada a programação de limpeza.

#### **5.3.2. Extração Ácida Assistida por Ultrassom (UAE)**

A fim de obter as condições que proporcionem a otimização do método e a melhor eficiência foi realizado um planejamento fatorial para três variáveis independentes: a concentração de ácido nítrico, a utilização de peróxido de hidrogênio (30% v/v) e o tempo de sonificação. Na literatura é encontrada uma faixa de variação muito ampla destes parâmetros (FILGUEIRA, 2000; KRUG, 2008; SANTOS, 2014; TRINDADE, 2015). Na Tabela 15 estão apresentadas as condições aplicadas para cada experimento do planejamento fatorial.

**Tabela 15** - Planejamento fatorial completo  $2^3$  em dois níveis avaliados para cada variável estudada na etapa de tratamento de amostra de omeprazol por extração ácida assistida por ultrassom ( $n = 2$  para cada condição experimental avaliada)

<b>Experimento</b>	<b>Replicata</b>	<b>Tempo de sonificação (minutos)</b>	<b>Ácido Nítrico (<math>\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Peróxido de hidrogênio (mL)</b>
1	1	10	2,0	0,0
2	2	10	2,0	0,0
3	1	10	7,0	0,0
4	2	10	7,0	0,0
5	1	10	2,0	1,0
6	2	10	2,0	1,0
7	1	10	7,0	1,0
8	2	10	7,0	1,0
9	1	60	2,0	0,0
10	2	60	2,0	0,0
11	1	60	7,0	0,0
12	2	60	7,0	0,0
13	1	60	2,0	1,0
14	2	60	2,0	1,0
15	1	60	7,0	1,0
16	2	60	7,0	1,0

A eficiência do método foi calculada por meio de ensaio recuperação de analito, que consistiu em adicionar uma concentração conhecida de cada analito ( $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) nas amostras antes do tratamento e calcular a porcentagem de sua recuperação, um procedimento semelhante ao cálculo de exatidão. O planejamento foi aplicado nas amostras de Similar 2 e para todos os experimentos do planejamento foi realizada a pesagem de 100mg de amostra e colocados em tubos de PP de 50 mL e em seguida foram adicionados em cada tubo as soluções extratoras de acordo com o planejamento fatorial. Os tubos foram ao banho ultrassom e programado o tempo de sonificação, posteriormente as soluções obtidas foram diluídas quantitativamente para 30 mL e por fim filtradas em membranas de nitrocelulose de  $0,45 \mu\text{m}$ .

#### 5.4. DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Pb E Hg POR ICP-MS

As determinações de As, Cd, Hg e Pb foram realizadas em amostras de omeprazol foram determinadas por ICP-MS operando em modo padrão. Foram analisados os isótopos mais abundantes de  $^{75}\text{As}^+$ ,  $^{202}\text{Hg}^+$  e  $^{208}\text{Pb}^+$ , e o isótopo  $^{111}\text{Cd}^+$  foi analisado pois apesar de  $^{112}\text{Cd}^+$  e  $^{114}\text{Cd}^+$  serem mais abundantes são interferidos por  $^{112}\text{Sn}^+$  e  $^{114}\text{Sn}^+$ , respectivamente.

Visando a remoção do principal interferente poliatômico do  $^{75}\text{As}^+$ , o  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ , foi usada a seguinte equação matemática –  $3,1273 * \text{Se77} + 0,8738 * \text{Se82}$ , recomendada pelo próprio fabricante do equipamento.

A curva multielementar de calibração analítica externa foi preparada na faixa de 0,1 a  $15,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito.

#### 5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 5.5.1. Digestão Ácida Assistida por Radiação Micro-ondas (MW-AD)

###### 5.5.1.1. Otimização do Método de MW-AD

Para a definição do método mais adequado de preparo de amostra de omeprazol foram realizadas as avaliações das eficiências de digestão dos dois métodos de MW-AD estudados. Primeiramente, foram determinados os teores de carbono total (TCC) das amostras por analisador elementar. Os teores de carbono total, de nitrogênio e hidrogênio das amostras de omeprazol estudadas estão apresentados na Tabela 16. Os TCC variaram de 40,8% a 43,8%, e mesmo considerando as diferenciações de excipientes entre as marcas do medicamento, esses valores são próximos.

**Tabela 16** – Teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio totais das amostras de omeprazol determinados por analisador elementar antes de MW-AD (n= 3, média  $\pm$  desvio padrão).

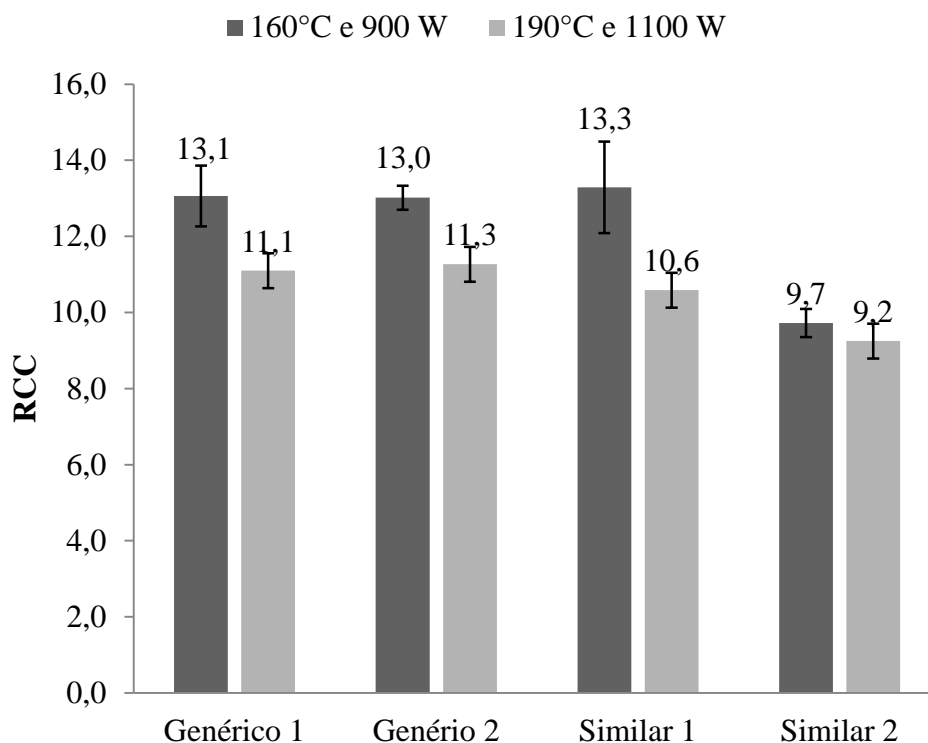
<b>Amostras</b>	<b>C (%)</b>	<b>H (%)</b>	<b>N (%)</b>
<i>Genérico 1</i>	42,3 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,1
<i>Genérico 2</i>	43,8 $\pm$ 0,0	5,7 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1
<i>Similar 1</i>	43,5 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,1
<i>Similar 2</i>	40,8 $\pm$ 1,4	5,3 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,1

Com isso, seguiu-se com a determinação dos teores de carbono residual (RCC) por ICP OES de acordo com Gouveia et. al. (2001), a fim verificar se a decomposição foi ou não efetiva frente à destruição da matéria orgânica.

Os dois métodos de MW-AD promoveram a destruição da matéria orgânica das amostras de omeprazol, pois os valores de RCC foram reduzidos variando de 9,2 a 13,3%. Além disso, como pode ser visto na Figura 8 o método de maior temperatura e potência, 190°C e 1100 W, apresentou valores menores de RCC em relação ao método de menor temperatura e potência, 160°C e 900 W, como já esperado.

Dessa forma, poderia ser concluído que o método de maior temperatura e potência (190°C e 1100 W) possui a melhor eficiência de digestão. Porém é necessário que um tratamento estatístico confirme se a diferença entre os RCC dos métodos é significativa ou não. Logo, foi aplicado um Teste t de Student por meio do programa Excel<sup>®</sup> e o resultado está apresentado na Tabela 17; como pode ser observado o valor p é menor que 0,05, portanto, a hipótese de que a diferença entre dos valores de RCC de cada método é significativa é aceita. Portanto, conclui-se que o método 190°C e 1100 W é o mais eficiente na digestão de amostras de omeprazol.

**Figura 8** - Gráfico dos teores de carbono residual (RCC) das amostras de omeprazol tratadas por dois métodos de MW-AD.



**Tabela 17** - Tratamento estatístico aplicado aos valores de RCC dos métodos de MW-AD. Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes.

	Variável 1 160°C e 900W	Variável 2 190°C e 1100W
<i>Média</i>	12,27189514	10,5514684
<i>Variância</i>	2,638837229	1,850038876
<i>Observações</i>	36	36
<i>Hipótese da diferença de média</i>	0	
<i>gl</i>	68	
<i>Stat t</i>	4,872127265	
<i>P(T&lt;=t) uni-caudal</i>	3,45956E-06	
<i>t crítico uni-caudal</i>	1,667572281	
<i>P(T&lt;=t) bi-caudal</i>	6,91913E-06	
<i>t crítico bi-caudal</i>	1,995468931	

Por fim, a diferença dos valores de RCC entre as marcas seguiu praticamente a mesma ordem apresentada na análise de TCC, ou seja, as amostras de Genérico 1 e 2 e Similar 1 apresentaram porcentagens bem próximas e a menor porcentagem foi obtida no Similar 2. Considerando que segundo a ANVISA (2010) os genéricos são iguais aos de referência, os valores de TCC e RCC para as amostras de Genérico 1 e 2 são relativamente iguais. A diferença dos RCC entre os medicamentos similares pode ser explicada pelo fato de ser permitido aos fabricantes o uso de outros excipientes, não necessariamente iguais ao de referência, gerando uma grande variação nas composições destes medicamentos. As exatas composições dos medicamentos não são citadas neste documento para que não seja possível constatar as marcas estudadas. Porém, pela observação dos valores de TCC destas amostras (Tabela 16) o medicamento Similar 2 pode possuir uma composição mais simples que o Similar 1.

#### 5.5.1.2. Validação do Método de Determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de cada elemento, nos dois métodos de MW-AD, estão apresentados na Tabela 18. Os limites de detecção para todos os elementos são menores que  $0,07 \text{ ng L}^{-1}$ , indicando que o ICP-MS é adequado para as determinações de As, Cd, Hg e Pb em medicamentos sólidos decompostos por MW-AD.

Realizando um teste estatístico para os dois métodos foi possível inferir que a variação dos valores de LD e LQ entre os métodos não é significativa, pois o valor p para ambos os teste foi maior que 0,05, como podem ser visto na Tabela 19.



**Tabela 18** - Limites de detecção e quantificação ( $\text{ng L}^{-1}$ ) dos elementos As, Cd, Hg e Pb para os amostras de omeprazol tratadas por MW-AD em dois métodos diferentes.

Elemento	MW-AD (160°C e 900 W)		MW-AD (190°C e 1100 W)	
	Limite de Detecção (LD) ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Limites de Quantificação (LQ) ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Limite de Detecção (LD) ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Limites de Quantificação (LQ) ( $\text{ng L}^{-1}$ )
As	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-2}$
Cd	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$7,2 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$
Hg	$8,2 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$7,0 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^{-2}$
Pb	$3,9 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$3,9 \cdot 10^{-4}$

**Tabela 19** - Tratamento estatístico aplicado aos valores de LD e LQ dos métodos de MW-AD. Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes.

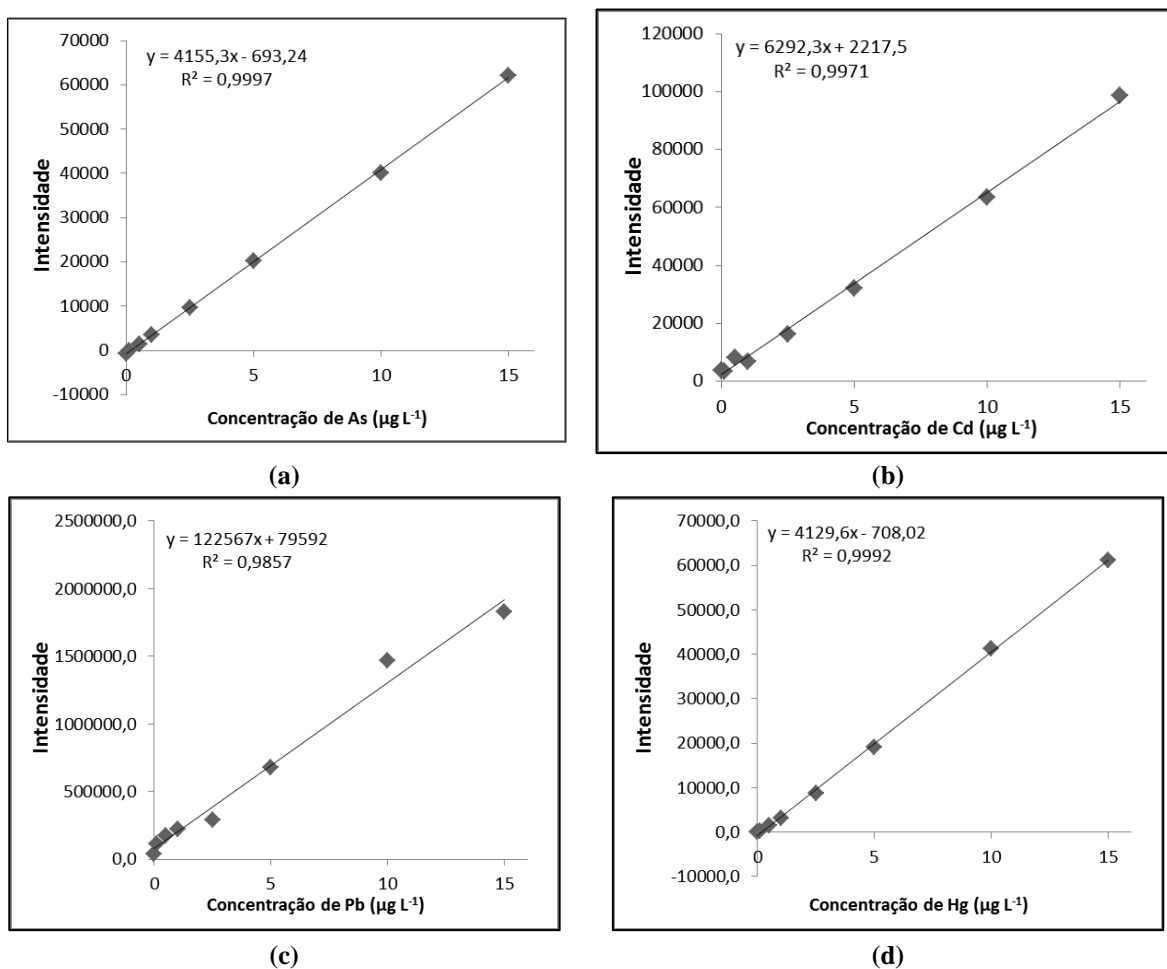
	Limite de Detecção (LD) ( $\text{ng L}^{-1}$ )		Limites de Quantificação (LQ) ( $\text{ng L}^{-1}$ )	
	Variável 1 MW-AD 160°C/900 W	Variável 2 MW-AD 190°C/1100 W	Variável 1 MW-AD 160°C/900 W	Variável 2 MW-AD 190°C/1100 W
Média	0,00711	0,021505	0,0235825	0,019098
Variância	6,46E-05	0,00107	0,000718773	0,00028
Observações	4	4	4	4
Hipótese da diferença de média	0		0	
gl	3		5	
Stat t	-0,8548		0,283863898	
P(T<=t) uni-caudal	0,227748		0,393946992	
t crítico uni-caudal	2,353363		2,015048373	
P(T<=t) bi-caudal	0,455495		0,787893985	
t crítico bi-caudal	3,182446		2,570581836	

A linearidade do método, dada pelo coeficiente de correlação (R) das curvas de calibração analítica de As, Cd, Hg e Pb, são respectivamente estão 0,999, 0,998, 0,993 e 0,999. Os gráficos com as curvas de calibração são apresentados na Figura 9.

Nesta etapa do estudo houve um problema de detecção de chumbo, cujo branco da curva analítica ( $\text{HNO}_3$  1%) apresentava altas concentrações prejudicando a linearidade da curva. Para sanar este problema foi estudada uma curva mais diluída de 0,01 a  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,

porém o resultado não foi satisfatório. A solução encontrada foi usar ácido nítrico mais puro e subdestilado nas curvas, realizar as análises logo após uma limpeza do equipamento e além de realizar uma limpeza com HCl 5% entre as leituras das amostras para evitar efeitos de memória.

**Figura 9** – Gráficos das curvas de calibração de faixa linear de 0,1 a 15  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos elementos (a) As, (b) Cd, (c) Pb e (d) Hg



A exatidão do método foi determinada por teste de adição e recuperação de analito. As amostras de omeprazol foram enriquecidas com uma concentração conhecida de As, Cd, Hg e Pb igual a 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e determinadas por ICP-MS operando em modo padrão. Os valores das concentrações determinadas nas amostras fortificadas e as porcentagens de

recuperações obtidas para todos os medicamentos em ambos os métodos de MW-AD estão apresentados na Tabela 20.

**Tabela 20** - Valores de concentração e recuperação para amostras omeprazol enriquecidas, quantificados por ICP-MS (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3).

Amostra	Isótopo	MW-AD		MW-AD	
		160°C e 900 W		190°C e 1100 W	
		Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
<i>Genérico 1</i>	$^{75}\text{As}^+$	2,51 $\pm$ 0,07	100,2	3,02 $\pm$ 0,04	121,0
	$^{111}\text{Cd}^+$	2,07 $\pm$ 0,16	82,8	2,82 $\pm$ 0,35	107,4
	$^{202}\text{Hg}^+$	1,89 $\pm$ 0,08	75,6	1,99 $\pm$ 0,05	79,6
	$^{208}\text{Pb}^+$	3,23 $\pm$ 0,63	129,0	3,25 $\pm$ 0,15	130,0
<i>Genérico 2</i>	$^{75}\text{As}^+$	2,55 $\pm$ 0,03	102,0	2,94 $\pm$ 0,09	115,1
	$^{111}\text{Cd}^+$	2,41 $\pm$ 0,41	96,5	2,22 $\pm$ 0,15	88,9
	$^{202}\text{Hg}^+$	2,02 $\pm$ 0,04	80,7	2,06 $\pm$ 0,001	82,2
	$^{208}\text{Pb}^+$	2,35 $\pm$ 0,70	94,0	2,97 $\pm$ 0,09	118,8
<i>Similar 1</i>	$^{75}\text{As}^+$	2,54 $\pm$ 0,04	101,8	2,85 $\pm$ 0,03	114,0
	$^{111}\text{Cd}^+$	2,13 $\pm$ 0,08	85,2	2,69 $\pm$ 0,16	107,5
	$^{202}\text{Hg}^+$	2,04 $\pm$ 0,04	81,5	2,00 $\pm$ 0,05	79,9
	$^{208}\text{Pb}^+$	2,87 $\pm$ 0,10	114,7	2,73 $\pm$ 0,37	109,3
<i>Similar 2</i>	$^{75}\text{As}^+$	2,79 $\pm$ 0,38	111,6	2,90 $\pm$ 0,04	116,2
	$^{111}\text{Cd}^+$	2,84 $\pm$ 0,45	113,5	2,36 $\pm$ 0,27	94,5
	$^{202}\text{Hg}^+$	2,06 $\pm$ 0,07	82,4	2,23 $\pm$ 0,16	89,3
	$^{208}\text{Pb}^+$	2,87 $\pm$ 0,1	114,9	2,66 $\pm$ 0,06	106,3

Visto que o capítulo 233 da USP (2013) estabelece como aceitável as recuperações que estejam entre 70% e 150%, todos os ensaios estão em conformidade com o padrão exigido. Portanto, os métodos de determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS operando em modo padrão é exato e está conforme as exigências USP.

Além disso, com bons valores de recuperação pode-se concluir que as estratégias adotadas para correção das interferências de As e Cd foram satisfatórias, a aplicação da equação matemática para remoção do interferente poliatômico  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  em  $^{75}\text{As}^+$  e também escolha do isótopo  $^{111}\text{Cd}^+$  por não ser interferido por  $^{114}\text{Sn}^+$  e  $^{112}\text{Sn}^+$ .

Os valores de recuperações de analitos entre os métodos de MW-AD são próximos e para confirmar se há variação entre estes dados foi realizado um tratamento estatístico, cujos valores estão apresentados na Tabela 21. Como pode ser observado o valor p é maior que 0,05, logo conclui-se que não há significância na diferença desses valores.

**Tabela 21** - Tratamento estatístico aplicado aos valores de recuperação dos analitos (%) dos métodos de MW-AD. Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes.

	<b>Variável 1 MW-AD 160°C e 900 W</b>	<b>Variável 2 MW-AD 190°C e 1100 W</b>
<i>Média</i>	97,9	103,75
<i>Variância</i>	247,708	253,2027
<i>Observações</i>	16	16
<i>Hipótese da diferença de média</i>	0	
<i>gl</i>	30	
<i>Stat t</i>	-1,04553	
<i>P(T&lt;=t) uni-caudal</i>	0,152065	
<i>t crítico uni-caudal</i>	1,697261	
<i>P(T&lt;=t) bi-caudal</i>	0,304131	
<i>t crítico bi-caudal</i>	2,042272	

Analisando os estudos estatísticos realizados para LD e exatidão (% recuperação dos analitos), a insignificância das variações dos valores entre os métodos de MW-AD mostra que é possível adotar um método de preparo de amostra mais brando, como o método 160° C e 900 W e todavia os parâmetros analíticos serem satisfatórios.

#### 5.5.1.3. Determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS

As determinações obtidas para as amostras de omeprazol das duas marcas de medicamento similar e as duas de medicamento genérico decompostas pelos métodos 160° C e 900 W e 190° C e 1100 W estão apresentados na Tabela 22.

As concentrações de  $^{75}\text{As}^+$  variaram de 0,013 a 0,171  $\mu\text{g g}^{-1}$ , os valores mais altos foram obtidos para as amostras Similar 2 em ambos os métodos, e nas amostras Similar 1 as determinações ficaram abaixo do limite de detecção LD (sendo de  $9,0 \cdot 10^{-5}$  para o método 160° C e 900 W e de  $6,0 \cdot 10^{-5}$  para o método 190° C e 1100 W). Para  $^{111}\text{Cd}^+$ , nenhuma amostra apresentou concentração maior que o limite de detecção, que são de  $1,1 \cdot 10^{-5}$  e de  $2,0 \cdot 10^{-5}$  para o método 160° C e 900 W e 190° C e 1100 W, respectivamente. É interessante observar que assim como o  $^{75}\text{As}^+$ , o  $^{208}\text{Pb}^+$  teve suas maiores concentrações determinadas nas amostras de Similar 2, iguais a 0,134 e 0,154  $\mu\text{g g}^{-1}$ , e as menores para as amostras de Similar 1, 0,013  $\mu\text{g g}^{-1}$ . As concentrações de Hg, assim como de Cd, estão abaixo do limite de detecção, que são de  $4,1 \cdot 10^{-5}$  para o método 160° C e 900 W e de  $35 \cdot 10^{-5}$  para o método 190° C e 1100 W.

No capítulo 232 da USP (USP 39 – NF 34, 2016), estabelece o limite de concentração de As, Cd, Hg e Pb para medicamentos orais com uma dose diária máxima de  $\leq 10 \text{ g / dia}$  respectivamente de 1,5, 0,5, 3,0 e 0,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Portanto, todas as amostras estão em conformidade com essa legislação.

**Tabela 22** - Determinação de As, Cd, Hg e Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão, n=3) em amostras de omeprazol tratadas MW-AD em dois métodos diferentes por ICP-MS operando em modo padrão.

Amostra	Isótopo	MW-AD 160°C e 900 w ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	MW-AD 190°C e 1100 w ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<i>Genérico 1</i>	$^{75}\text{As}^+$	0,013 $\pm$ 0,001	0,041 $\pm$ 0,006
	$^{111}\text{Cd}^+$	< $1,1.10^{-5}$	< $2,0.10^{-5}$
	$^{202}\text{Hg}^+$	< $4,1.10^{-5}$	< $35.10^{-5}$
	$^{208}\text{Pb}^+$	0,038 $\pm$ 0,004	0,030 $\pm$ 0,005
<i>Genérico 2</i>	$^{75}\text{As}^+$	0,093 $\pm$ 0,003	0,115 $\pm$ 0,005
	$^{111}\text{Cd}^+$	< $1,1.10^{-5}$	< $2,0.10^{-5}$
	$^{202}\text{Hg}^+$	< $4,1.10^{-5}$	< $35.10^{-5}$
	$^{208}\text{Pb}^+$	0,075 $\pm$ 0,012	0,063 $\pm$ 0,006
<i>Similar 1</i>	$^{75}\text{As}^+$	< $9,0.10^{-5}$	< $6,0.10^{-5}$
	$^{111}\text{Cd}^+$	< $1,1.10^{-5}$	< $2,0.10^{-5}$
	$^{202}\text{Hg}^+$	< $4,1.10^{-5}$	< $35.10^{-5}$
	$^{208}\text{Pb}^+$	0,013 $\pm$ 0,008	< $0,06.10^{-5}$
<i>Similar 2</i>	$^{75}\text{As}^+$	0,154 $\pm$ 0,003	0,171 $\pm$ 0,008
	$^{111}\text{Cd}^+$	< $1,1.10^{-5}$	< $2,0.10^{-5}$
	$^{202}\text{Hg}^+$	< $4,1.10^{-5}$	< $35.10^{-5}$
	$^{208}\text{Pb}^+$	0,154 $\pm$ 0,018	0,134 $\pm$ 0,010

### 5.5.2. Extração Ácida Assistida por Ultrassom (UAE)

#### 5.5.2.1. Otimização do Método de UAE

O planejamento fatorial completo  $2^3$  foi aplicado em amostras de omeprazol para determinar as melhores condições do método de tratamento por extração ácida assistida por ultrassom (UAE). As condições estudadas e aplicadas em cada experimento e as recuperações dos analitos (%) estão detalhadas na Tabela 23.

**Tabela 23** - Planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> em dois níveis avaliados para cada variável estudada na etapa de tratamento de amostra de omeprazol por extração ácida assistida por ultrassom (n = 2 para cada condição experimental avaliada).

Experimento	Replicata	Tempo de sonificação (minutos)	Ácido Nítrico (mol L <sup>-1</sup> )	Peróxido de hidrogênio (mL)	Recuperação do analito (%)			
					As	Cd	Hg	Pb
1	1	10	2,0	0,0	84,5	90,8	89,8	99,0
2	2	10	2,0	0,0	48,6	86,1	100,4	73,6
3	1	10	7,0	0,0	17,8*	87,5	79,2	85,0
4	2	10	7,0	0,0	12,6*	100,3	80,6	104,1
5	1	10	2,0	1,0	97,9	84,8	20,5*	161,2*
6	2	10	2,0	1,0	97,7	87,5	42,8	80,6
7	1	10	7,0	1,0	142,7	89,2	80,8	98,6
8	2	10	7,0	1,0	16,5*	92,4	80,4	145,7
9	1	60	2,0	0,0	128,4	94,9	85,9	41,6
10	2	60	2,0	0,0	91,9	85,0	95,8	49,2
11	1	60	7,0	0,0	67,1	81,9	79,3	71,7
12	2	60	7,0	0,0	102,4	81,8	72,9	61,1
13	1	60	2,0	1,0	162,1*	94,8	35,2*	65,6
14	2	60	2,0	1,0	138,4	99,8	47,2	67,4
15	1	60	7,0	1,0	475,8*	94,2	80,4	93,6
16	2	60	7,0	1,0	142,1	97,2	78,4	117,6

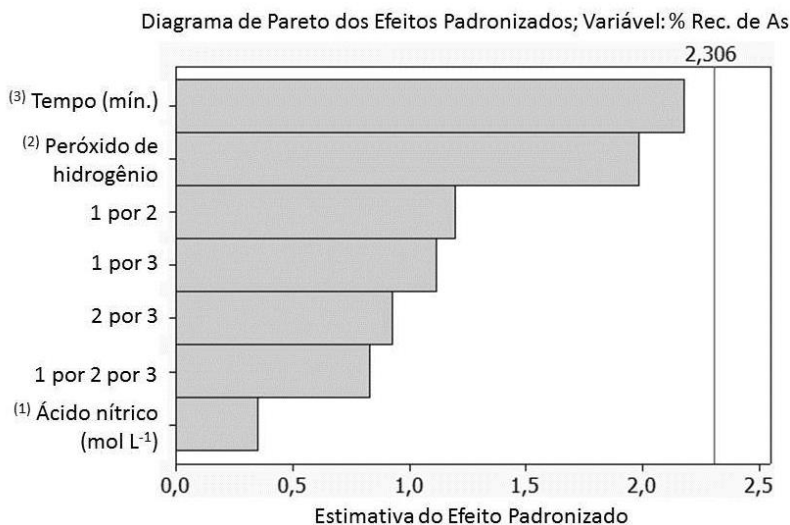
\* Não atendem as recuperações estabelecidas como aceitáveis de 40-120% (GONZALEZ E HERRADOR, 2007) e de 70-150% (USP- 233. 39 – NF 34, 2016).

Segundo Gonzalez e Herrador (2007), para concentrações na ordem de 1 ppb as recuperações aceitáveis são de 40% a 120%; no capítulo 233 da USP são estabelecidas recuperações aceitáveis de 70% a 150%. Logo, a maioria das recuperações do planejamento fatorial para o método de UAE ficou dentro das faixas estipuladas pelas duas referências citadas acima. As recuperações para As variaram de 12,6 a 475%, para Cd de 81,8 a 100,3%, para Hg de 20,5 a 100,4, e para Pb de 41,6 a 145,7%.

Portanto, como a maioria das recuperações obtidas estão dentro da faixa esperada, o experimento 1 e sua replicata 2 podem ser definidas como as condições mais adequadas para o método de UAE, pois dentre as demais que também possuem ótimas porcentagens de recuperação, esta é a mais branda utilizando reagentes menos concentrados ( $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), um menor tempo de execução (10 min.) e não usa o agente oxidante  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

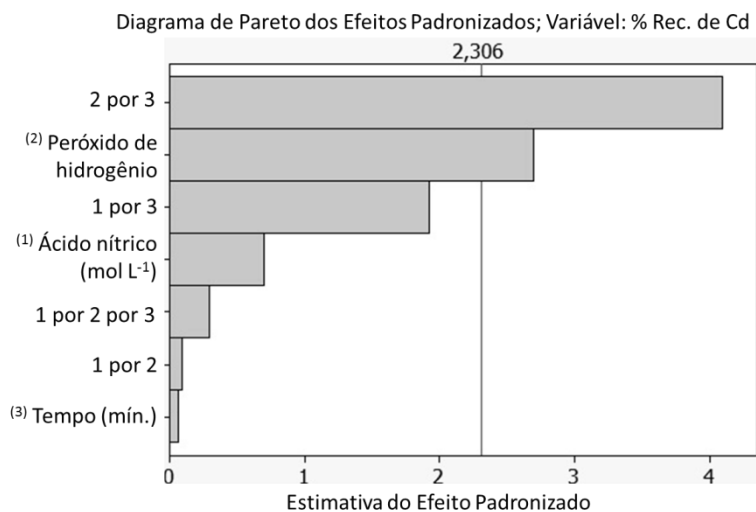
Com a execução dos diagramas de Pareto é possível observar quais parâmetros analisados no planejamento fatorial foram mais influentes na recuperação de cada elemento. No caso do As (Figura 10), nenhum dos parâmetros tiveram influências significativas sob sua recuperação. Para Cd (Figura 11) os fatores peróxido de hidrogênio e tempo tiveram mais influência nos resultados de recuperação de Cd, seguido da utilização ou não de peróxido de hidrogênio no ensaio. A combinação do peróxido de hidrogênio com o ácido nítrico, seguida dos fatores individuais peróxido de hidrogênio e ácido nítrico foram os que apresentaram influência significativa na recuperação do Hg (Figura 12). Já pra o Pb (Figura 13), somente os fatores tempo e peróxido de hidrogênio, individualmente mostraram influência significativa.

**Figura 10** - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial ( $2^3$ ) do tratamento da amostra de omeprazol por UAE (% As)

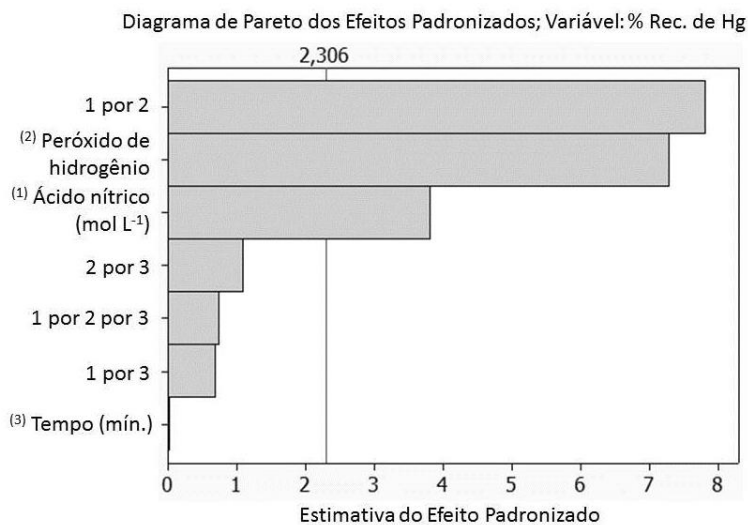




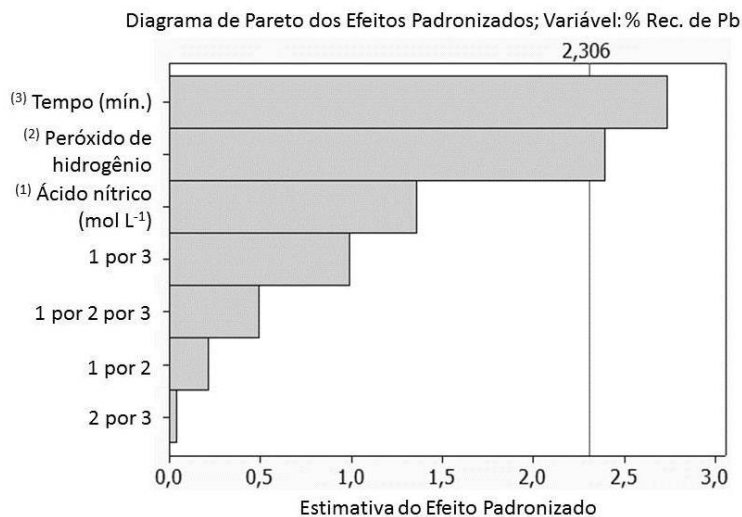
**Figura 11** - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) de tratamento de amostra de omeprazol por UAE (% Cd)



**Figura 12** - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) de tratamento de amostra de omeprazol por UAE (% Hg)



**Figura 13** - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) de tratamento de amostra de omeprazol por UAE (% Pb)



Por fim, considerando que as recuperações para as diferentes condições estudadas estão em sua maioria dentro da faixa estabelecida como aceitável pela USP e levando em consideração os fatores que podem influenciar as recuperações destes analitos seria realizado um novo planejamento fatorial com valores dos fatores mais ajustados para que se pudesse chegar às condições ótimas de extração. Porém, um incidente ocorreu com o ICP-MS e este está em manutenção, contudo pretende-se que mesmo após a defesa desta dissertação este segundo planejamento fatorial seja executado para concluir a otimização deste método, e assim será possível comparar as concentrações obtidas nas amostras de omeprazol tratadas por MW-AD e UAE, e então, verificar se UAE é uma boa alternativa para o preparo de amostra de medicamentos sólidos para a determinação de metais tóxicos por ICP-MS, já sabendo que esta já é menos onerosa.

## 5.6. CONCLUSÃO

O método 190° C e 1100 W de MW-AD mostrou-se eficiente para o tratamento de amostras de omeprazol, apresentando valores de RCC menores que 11,3%. Porém, as avaliações das figuras de mérito das determinações de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS, comprovaram que ambos os métodos estudados de MW-AD obtiveram valores significativamente iguais, não sendo descartado o método 160° C e 900 W, cujas condições são mais brandas.

Além disso, a avaliação dos parâmetros analíticos expressa que a técnica de ICP-MS é adequada para a quantificação de metais tóxicos em medicamentos sólidos, sendo sensível, pois os LD's são menores que 0,07 ng L<sup>-1</sup>; estando em conformidade com as exigências da USP. Ademais, o uso do ICP-MS em modo padrão mostrou-se satisfatório, pois as ótimas recuperações dos analitos comprovam que somente o uso de equação matemática foi capaz de remover interferentes poliatômicos graves, como o <sup>40</sup>Ar<sup>35</sup>Cl.

Os resultados preliminares obtidos para o método de UAE indicou que essa alternativa de preparo de amostra é promissora, e que condições mais amenas como o uso de ácido nítrico diluído (2,0 mol L<sup>-1</sup>), baixo tempo de extração (10 min), sem o auxílio de agentes oxidantes pode apresentar boa eficiência.

## 9 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

A análise inorgânica de amostras de medicamentos é fundamental para elucidar as composições reais dessas matrizes. O conhecimento das composições inorgânicas destas amostras é necessário, a fim de detectar e monitorizar os contaminantes inorgânicos que podem estar presentes no produto final e nas matérias-primas. O presente trabalho relata cuidadosamente a composição inorgânica da pomada de aciclovir, permitindo o conhecimento do perfil inorgânica destas amostras. Além disso, o estudo de diferentes marcas do medicamento omeprazol mostrou a diferença entre os processos de fabricação das indústrias farmacêuticas.

Como visto, a etapa de preparo de amostra é de suma importância para a sequência analítica, os métodos de preparo de amostra por MW-AD estudados neste trabalho mostraram-se eficiente mesmo para as diferentes matrizes estudadas (pomada, matérias-primas e comprimidos) apresentando RCC baixos.

Neste trabalho também foram descritos métodos de determinação de impurezas inorgânicas em medicamento por ICP-MS, que se mostraram exatos e com baixos limites de detecção indicando que, além dessa técnica ser adequada para tal uso, as estratégias utilizadas para superar as interferências foram eficazes.

## 10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS S.A. **Bula para Profissional de Saúde – Gastrium (omeprazol).** Disponível em : <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=8734342013&pIdAnexo=1828164](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=8734342013&pIdAnexo=1828164)> Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução – RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003.** Guia de validação de métodos analíticos e bionalíticos. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA).. **O que de vemos saber sobre medicamentos.** 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA).. **Medicamentos de Referências.** Disponível em : <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+de+referencia>> Acesso em: 21 de fevereiro de 2016

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA).. **Medicamentos Similares.** Disponível em : <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+similares> > Acesso em: 21 de fevereiro de 2016

ARRUDA, M. A. Z. e SANTELLI, R. E., Mecanização no Preparo de Amostras por Microondas: O Estado Da Arte. **Química Nova**, v. 20, p. 638-643, 1997.

ASSOCIAÇÃO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DE PESQUISA. **Guia 2015 INTERFARMA.** Disponível em: <<http://www.interfarma.org.br/guia2015/site/guia/index.php?val=1&titulo=Apresenta%C3%A7%C3%A3o>> Acesso em: 03 de dezembro de 2015

ATKINS,P. W. et. al. **Química Inorgânica.** Roberto de Barros Faria (trad.). 4 ed. Porto Alegre: Brookman, 2008.

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

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

BATSALA, M., CHANDU, B., SAKALA, B., NAMA, S. E DOMATOTI, S. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). **International Journal of Research In Pharmacy And Chemistry**. n. 2, 2012.

BENDICHO, C.; LAVILLA, I.; PENA, F.; COSTAS, M. Green Sample Preparation Methods. In: GUARDIA, M. de la. e GARRIGUES, S. (Ed.). **RSC Green Chemistry: Challenges in Green Analytical Chemistry**. n. 13. 2011. cap. 4, p. 63-99.

BRAZILIAN PHARMA SOLUTIONS. **Mercado farmacêutico cresce, mas ainda não é competitivo no exterior.** Disponível em: <[http://brazilianpharmasolutions.com.br/?post\\_type=noticias&p=2229](http://brazilianpharmasolutions.com.br/?post_type=noticias&p=2229)> Acesso em: 18 de abril de 2015.

BRYRNS, M.C. e PENNING, T.M. Toxicologia Ambiental: carcinógenos e metais tóxicos. In: BRUNTON, L.L. (Ed.) **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. p. 1853-1877.

CAPOTE, F. P. e CASTRO, M. D. L. de. Ultrasound in analytical chemistry. **Anal. Bional. Chem.** Department of Analytical Chemistry, University of Córdoba v. 387, p. 249-257, 2007

CASSAP, M. Using ICP-MS and ICP OES to Mensure Trace Elemental Impurities in Pharmaceuticals in Compliance with proposed Pharmacopeia Chapters. **Spectroscopy**, Santa Monica, v. 26, issue 3, março 2011.

CLAYTON, B. D.; STOCK, Y. N.; COOPER, S. E. **Farmacologia na Prática de Enfermagem**. 15 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

CORREA, J.C.V. **Qualidade dos medicamentos comercializados no Brasil segundo dados do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde do Instituto Adolfo Lutz**. 2003. 152 f. Dissertação – mestrado. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo- Brasil, 2003.

COTTA, A. J. B. e ENZWEILER, J. Quantification of major and trace elements in water samples by ICP-MS and collision cell to attenuate Ar and Cl-based polyatomic ions. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**. 2009

DAVIDOWSKI, L., PRUSZKOWSKI, E. Benefits of the NexION 300X/350X ICP-MS Coupled with the prepFAST In-line Auto-dilution/calibrationSystem for the Implementation of the New USP Chapters on Elemental Impurities, **Perkinelmer, Inc. Shelton, Ct Usa**, Nota de aplicação ICP-Mass Spectrometry, 2012.

ELDER, D. P., MARTIN, K. e HOLM, R. Pharmaceutical excipients- quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. **European Journal of pharmaceutical Sciences**, n. 87, p. 88-99, 2016.

ELLINGSEN, D. G., HORN, N. e AASETH, J. Copper. In: GUNNAR, F. et. al. (Ed.) **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3. Ed.: Academic Press, 2007. Cap. 26, p. 529-546.

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



FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5ª ed. Brasília, 2010.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D.; **Physicochemical Principles of Pharmacy**, 4ª ed.; Pharmaceutical Press: Cornwall, 2006.

GONZALEZ, G. A. e HERRADOR, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**. Elsevier. v. 26, n. 3, 2007

GONZALEZ, M. H.; MENEZES, E. A.; MATOS, W. O.; BIANCHI, S. R.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. In: **Microwaves: Theoretical Aspects and Practical Applications in Chemistry**; Marchetti, A., ed.; Transworld Research Network: Kerala, 2011, p. 249.

GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G.B.; OLIVEIRA, R.V.; FORATO, L.A.; NÓBREGA, J.A.; NOGUEIRA, A.R.A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, p. 396-401, 2009.

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**, DOQ-CGCRE-008, Revisão 4, Jul. 2011.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER (IARC). **Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–117**. Disponível em: <[http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php/](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php/)> Acesso em: 24 de outubro de 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH)/ FOOD AND DRUG ADMINISTRATION'S (FDA'S). **Guideline For Elemental Impurities Q3D**. Versão atualizada etapa 2b, 26 de julho de 2013.

KLEIN, C. e COSTA, M. Nickel. In: GUNNAR, F. et. al. (Ed.) **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3. Ed.: Academic Press, 2007. Cap. 35, p. 743-758.

KRUG, F. J. et al. **Métodos de preparo de amostras. Fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª edição. Piracicaba, SP: CENA/USP, 2008. 340 p.

LAGERKVIST, B. J. e OSKARSSON, A. Vanadium. In: GUNNAR, F. et. al. (Ed.) **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3. Ed.: Academic Press, 2007. Cap. 46, p. 905-923.

LEWEN, N. Preparation of Pharmaceutical Samples for Elemental Impurities Analysis: Some Potential Approaches. **Spectroscopy**, v. 31, ed.4, p. 36–43, 2016. Disponível em: <<http://www.spectroscopyonline.com/preparation-pharmaceutical-samples-elemental-impurities-analysis-some-potential-approaches> > Acesso em: 08 de setembro de 2016.

MERCK S.A. **Bula para Profissionais – Aciclovir Creme**. Disponível em: <[http://www.merck.com.br/country.br/pt/images/Aciclovir-creme\\_Bula\\_Profissional\\_19.08.2014\\_tcm512\\_134942.pdf?Version=>](http://www.merck.com.br/country.br/pt/images/Aciclovir-creme_Bula_Profissional_19.08.2014_tcm512_134942.pdf?Version=>) Acesso em: 07 de agosto de 2016.

MULLER, A.L.H.; OLIVEIRA, J. S.S.; MELLO, P. A.; MULLER, E. I.; FLORES, E.M.M. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. **Talanta**, Santa Maria-RS, Brasil. v. 136, p. 161–169, 2015.

MURAKAMI, F. S. **Omeprazol Sódico: Caracterização das Propriedades Físico-Químicas e Desenvolvimento de Comprimidos Gastro-Resistentes**. 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PEREIRA, C. D.; et. al. Behaviour of arsenic and selenium in an ICP-QMS with collision and reaction interface. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v.10,2010

PFARMA. **Perfil de consumo de medicamentos genéricos muda no Brasil**. Disponível em: < <http://pfarma.com.br/noticia-setor-farmaceutico/mercado/876-10-medicamentos-genericos-mais-consumidos-2011.html>> Acesso em: 21 de fevereiro de 2016

PINTO, A. C. e BARREIRO, E. J. Desafios da indústria farmacêutica brasileira. **Quím. Nova**. v. 36, n.10, p. 1557-1560, 2013.

PORTAL BRASIL. **Portal Brasil**. Governo Federal, 3 de Dezembro de 2010. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2010/12/industria-farmaceutica>>. Acesso em em: 3 de Dezembro de 2014.

PRICEWATERHOUSECOOPERS. **PricewaterhouseCoopers**, 2013. O setor farmacêutico no Brasil. Disponível em <<http://www.pwc.com.br/pt/publicacoes/setores-atividade/saude/setor-farmaceutico.jhtml>> Acesso em: 21 de Dezembro de 2014.

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

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. Trad. 5ª edição. Elsevier. 2004.

RHEIN, B. T. R. **Desenvolvimento e Validação de um Método Indicativo de Estabilidade para o Antiviral Aciclovir**. 2013. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RÜBENSAM, G. Revisão em geoquímica e ecotoxicologia dos metais chumbo, cobre, cromo e zinco. **Periódico Tchê Química** (Impresso) , v. 01, p. 36-51, 2004.

SELIVERSTOVA, A. F.; ERSHOVA, B. G.; LAGUNOVAA, YU. O.; MOROZOVA, P. A.; KAMRUKOV, A. S. e SHASHKOVSKIIB, S. G. Oxidative Degradation of EDTA in Aqueous Solutions under UV Irradiation. **Radiochemistry**. v. 50, n. 1, 2008.

SHIBAMOTO, T. e BJELDANES, L. F. **Introdução à Toxicologia dos Alimentos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J; WEST, D. M. **Espectroscopia Atômica**. In:\_\_\_\_\_. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo-SP: Editora Thomson, 2006. cap. 28, p. 796- 829.

SINDICATO DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO (SINDUSFARMA). Mercado Farmacêutico - Brasil (Canal Farmácia): Vendas do Mercado Total em Dólares (US\$). Disponível em: <[http://sindusfarma.org.br/cadastro/index.php/site/ap\\_indicadores](http://sindusfarma.org.br/cadastro/index.php/site/ap_indicadores)> Acesso em: 31 de dezembro de 2016.

SOUZA, G. B., MENEZES, E. A., GONZALEZ, M. H., CARAPELLI, R., CHAVES, F. S., MATOS, W. O., NOGUEIRA, A. R. A. Pressurized System and Microwave-Assisted Extraction for Rapid Analysis of Fiber in Animal Feedstuffs. **Analytical Letters**, v. 41, p. 1633-1639, 2008.

SPIRO, T. G. e STIGLIANI, W. M. *Química Ambiental*. 2 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2009

TAVARES, A.T. **Determinação Multielementar de Elementos Traços em Radiofármacos Produzidos pela Diretoria de Radiofarmácia por Espectrometria de Emissão por Plasma**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2013.

THAYER, A. M., Trace Metals Debate. **Chemical & Engineering News, American Chemical Society** n. 33, v. 91, Washington :, 2013,. ISSN 0009-2347. Disponível em <<http://cen.acs.org/articles/91/i33/Trace-Metals-Debate.html>>. Acesso em: 15 de março de 2015.

THOMAS, R. **Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners**. 3ª ed. CRC Press, 2013. xxvii, 418 p.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Chapter 231 - Heavy Metals Limit. Test. 1905.** Elemental Impurities - Limits. United States : Revision Bulletin, 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Chapter 232 — Elemental Impurities.** Revision Bulletin Official February 1, 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Chapter 232 — Elemental Impurities.** USP 39 – NF 34, 2016.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Chapter 233 — Elemental Impurities – Procedures.** Revision Bulletin Official February 1, 2013

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Notice of Intent to Revise January 14, 2015** [Online] General Chapter <231> Heavy Metals and Affected Monographs and General Chapters Disponível em <<http://www.usp.org/usp-nf/notices/general-chapter-heavy-metals-and-affected-monographs-and-general-chapters>> Acesso em: 24 de fevereiro de 2015.

VALLS, M. e LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for remediation of heavy metal pollution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 327-338, 2002.

VIAFARMA. **Informações Técnicas: Álcool Cetoestearílico 30/70.** 2014. Disponível em: <<http://viafarmanet.com.br/wp-content/uploads/2015/07/--LCOOL-CETOESTEAR--LICO-30-70.pdf>>. Acesso em: 07 de novembro de 2016.

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

WÜRFELS, M. e JACKWERTH, E. Residues From Biological Materials After Pressure Decomposition With Nitric Acid. Part 1. Carbon Conversion During Sample Decomposition. **Analytica Chimica Acta**, n. 226, p. 1-16, 1989.

YAMADA, N. 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.

ZIMMERMANN, A. E., WALTERS, J. K., KATONA, B. G., SOUNEY, P. F. E  
LEVINE, D. A Review of Omeprazole Use in the Treatment of Acid-Related Disorders in Children. **Clinical Therapeutics**. v. 23, n. 5, 2001.