



UFSM

Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM FÁRMACOS E
ESTUDO DE INTERFERÊNCIAS EM ICP-MS APÓS DECOMPOSIÇÃO EM
SISTEMA DE ALTA PRESSÃO E POR COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-
ONDAS**

Aline Lima Hermes Müller

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM FÁRMACOS E
ESTUDO DE INTERFERÊNCIAS EM ICP-MS APÓS DECOMPOSIÇÃO EM
SISTEMA DE ALTA PRESSÃO E POR COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-
ONDAS**

por

Aline Lima Hermes Müller

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, **Área de
Química Analítica**, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito
parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM FÁRMACOS E
ESTUDO DE INTERFERÊNCIAS EM ICP-MS APÓS DECOMPOSIÇÃO EM
SISTEMA DE ALTA PRESSÃO E POR COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-
ONDAS**

Elaborada por

Aline Lima Hermes Müller

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores – Orientador - (UFSM-RS)

Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges – (UFSC-SC)

Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin – (UFSM-RS)

Prof. Dr. Rodrigo Cordeiro Bolzan – (CAFW-RS)

Prof. Dr. Valderi Luiz Dressler – (UFSM-RS)

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria**, pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de doutorado.

Ao Professor Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pelo exemplo de profissionalismo, pela orientação durante todos estes anos, pelo apoio constante e oportunidades que permitiram o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos Professores Drs. **Daniel L. Gallindo Borges, Juliano S. Barin, Rodrigo C. Bolzan e Valderi L. Dressler** pela participação na banca examinadora desta tese e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos Professores Drs. **José N. G. Paniz, Juliano S. Barin e Valderi L. Dressler** pela amizade construída durante estes anos, apoio e colaborações durante a execução deste trabalho.

Aos Professores Drs. **Cézar A. Bizzi, Fábio A. Duarte e Paola A. Mello** pela contribuição durante atividades do doutorado.

Ao **Ademir e a Valéria** da secretaria do PPGQ, pela atenção disponibilizada durante todos estes anos de doutorado.

A todos os colegas do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) em especial, a **Gabrielle D. Iop, a Juliana P. Souza** e ao **Cristiano C. Müller** pela disposição e colaboração durante toda a execução deste trabalho.

Ao **Edson** pela paciência, pelo companheirismo, pelas palavras de incentivo, carinho e contribuição para a concretização deste trabalho.

Aos meus pais **Osmar e Lisane** e minha irmã **Carine** pelo amor incondicional, apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Dedico este trabalho aos meus pais Osmar e Lisane e à minha irmã Carine por todo amor, incentivo e dedicação, e ao Edson, pelo companheirismo, carinho e compreensão.

LISTA E FIGURAS	<i>ix</i>
LISTA E TABELAS	<i>xii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	<i>xiv</i>
RESUMO	<i>xvi</i>
ABSTRACT	<i>xvii</i>
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Controle de qualidade de impurezas em produtos farmacêuticos.....	6
2.2 Métodos analíticos para o preparo de amostras farmacêuticas	9
2.2.1 Decomposição de amostras farmacêuticas por via úmida	10
2.2.2 Decomposição de amostras farmacêuticas por combustão	16
2.3 Interferências nas determinações de impurezas elementares por ICP-MS	21
2.4 Validação de métodos analíticos.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Instrumentação	29
3.2 Reagentes.....	32
3.3 Amostras	34
3.4 Avaliação de interferências na determinação de impurezas elementares por ICP-MS	35
3.4.1 Avaliação das interferências na determinação de impurezas elementares por ICP-MS utilizando soluções sintéticas.....	36
3.4.2 Avaliação de interferências na determinação de impurezas elementares por ICP-MS utilizando digeridos	36
3.5 Decomposição assistida por micro-ondas em sistema MultiWave®	36
3.6 Decomposição assistida por micro-ondas em sistema UltraWave®	37
3.7 Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas.....	39
3.8 Decomposição em sistema aberto em forno tipo mufla	43

3.9	Determinação do teor de carbono residual	43
3.10	Determinação de acidez residual	44
3.11	Validação dos métodos de decomposição e determinação de impurezas elementares por ICP-MS	44
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	47
4.1	Avaliação de possíveis interferências na determinação de impurezas elementares por ICP-MS.....	48
4.1.1	Efeito da acidez residual na determinação de impurezas elementares por ICP-MS.....	49
4.1.2	Efeito da concentração de carbono na determinação de impurezas elementares por ICP-MS	55
4.1.3	Efeito da concentração de cloro na determinação de impurezas elementares por ICP-MS.....	58
4.1.4	Efeito da concentração de enxofre na determinação de impurezas elementares por ICP-MS	61
4.1.5	Efeito da concentração de fósforo na determinação de impurezas elementares por ICP-MS	63
4.1.6	Efeito da concentração de sódio na determinação de impurezas elementares por ICP-MS.....	64
4.2	Métodos de preparo de amostras de fármacos.....	70
4.2.1	Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema MultiWave®	71
4.2.2	Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave®.....	78
4.2.3	Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas em sistema fechado	85
4.2.4	Decomposição em sistema aberto por forno tipo mufla	95
4.2.5	Validação dos métodos de decomposição e determinação de impurezas elementares por ICP-MS	99

4.2.5.1 Validação do método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave [®] e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS.....	99
4.2.5.2 Validação do método de decomposição por combustão iniciada por micro-ondas e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS	104
4.2.6 Determinação das impurezas elementares em fármacos	109
4.3 Comparação dos métodos de decomposição	115
5 CONCLUSÕES.....	118
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Preparo do sistema UltraWave[®] para decomposição de fármacos:
 (A) Introdução da solução contendo 120 mL de água, 5 mL H₂O₂ e 2 mL de H₂SO₄ no copo reacional de PTFE, (B) inserção do copo reacional de PTFE na cavidade do forno, (C) rotor com 15 frascos de quartzo, (D) inserção do rotor automaticamente no interior da cavidade, (E) e (F) fechamento manual do grampo metálico e (H) pressurização com Ar_(g) até 40 bar..... 38
- Figura 2. Etapas do preparo das amostras para decomposição por combustão iniciada por micro-ondas: (A) fármaco, (B) NH₄Cl, (C) homogeneização da mistura do fármaco mais NH₄Cl em gral (D) e (E) comprimidos, (F) suporte de quartzo com comprimido alocado sobre o papel filtro umedecido com NH₄NO₃ e (G) suporte de quartzo inserido no frasco de decomposição contendo solução absorvedora. 42
- Figura 3. Esquema simplificado dos parâmetros avaliados para os métodos de decomposição no presente estudo..... 46
- Figura 4. Efeito da concentração do ácido nítrico na determinação de ⁵¹V, ⁵³Cr, ⁵⁵Mn e ⁶⁰Ni utilizando soluções de referência (n = 3)..... 53
- Figura 5. Efeito da concentração do ácido nítrico na determinação de ⁶³Cu, ⁷⁵As, ⁹⁵Mo e ¹⁰¹Ru utilizando soluções de referência (n = 3).....53
- Figura 6. Efeito da concentração do ácido nítrico na determinação de ¹⁰³Rh, ¹⁰⁵Pd, ¹¹¹Cd e ¹⁸⁹Os utilizando soluções de referência (n = 3). 54
- Figura 7. Efeito da concentração do ácido nítrico na determinação de ¹⁹³Ir, ¹⁹⁵Pt, ²⁰²Hg e ²⁰⁷Pb utilizando soluções de referência (n = 3)..... 54
- Figura 8. Efeito da concentração de C na recuperação de As utilizando soluções de referência. 57
- Figura 9. Efeito da concentração de Cl presente em diferentes massas de PROP (cloridrato de propranolol) após decomposição no sistema UltraWave[®], na determinação de ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵³Cr e ⁷⁵As (n=3).60
- Figura 10. Efeito da concentração de Na na determinação de ⁵¹V, ⁵³Cr, ⁵⁵Mn e ⁶⁰Ni utilizando soluções de referência (n=3)..... 66
- Figura 11. Efeito da concentração de Na na determinação de ⁶³Cu, ⁷⁵As,

^{95}Mo e ^{101}Ru utilizando soluções de referência (n=3).....	67
Figura 12. Efeito da concentração de Na na determinação de ^{103}Rh , ^{105}Pd , ^{111}Cd e ^{189}Os utilizando soluções de referência (n=3).....	67
Figura 13. Efeito da concentração de Na na determinação de ^{193}Ir , ^{195}Pt , ^{202}Hg e ^{207}Pb utilizando soluções de referência (n=3).....	68
Figura 14. Efeito da concentração de Na presente em diferentes massas de DICL (diclofenaco de sódio), após decomposição no sistema UltraWave [®] , na determinação de ^{62}Ni e ^{63}Cu (n=3).....	70
Figura 15. Resultados de RCC após decomposição de 100, 250 e 500 mg de PROP (cloridrato de propranolol), PRIM (difosfato de primaquina) DICL (diclofenaco de sódio) e SULF (sulfametoxazol) por método de decomposição por via úmida em sistema MultiWave [®] com 6 mL de HNO ₃	73
Figura 16. Estruturas químicas dos fármacos: a) DICL (diclofenaco de sódio), b) LEVO (levodopa), c) PRIM (difosfato de primaquina), d) PROP (cloridrato de propranolol) e, e) SULF (sulfametoxazol).....	74
Figura 17. Digeridos de SULF (sulfametoxazol) obtidos com sistema MultiWave [®] , empregando 100 mg de amostra e 6 mL de água régia invertida.....	76
Figura 18. Digeridos de DICL (diclofenaco de sódio) obtidos com sistema MultiWave [®] , empregando 100 mg de amostra e 6 mL de água régia invertida.....	77
Figura 19. Digeridos de PROP (cloridrato de propranolol) obtidos com sistema MultiWave [®] , empregando 100 mg de amostra e 6 mL de água régia invertida.....	77
Figura 20. Decomposição de diferentes amostras de fármacos por sistema UltraWave [®] utilizando rotor de 15 posições e frascos de 15 mL cada.	79
Figura 21. Perfil do programa de decomposição em sistema UltraWave [®] para temperatura de 270 °C, 500 mg de amostra e 6 mL de HNO ₃	80
Figura 22. Resultados de RCC obtidos após decomposição, por sistema UltraWave [®] , de 100 mg de SULF (sulfametoxazol) com 3 e 6 mL de HNO ₃ nas temperaturas de 170, 220 e 270 °C.....	81
Figura 23. Resultados de RCC obtidos após decomposição, por sistema	

UltraWave [®] , de 250 mg de SULF (sulfametoxazol) com 3 e 6 mL de HNO ₃ a nas temperaturas de 170, 220 e 270 °C.....	82
Figura 24. Resultados de RCC obtidos após decomposição, por sistema UltraWave [®] , de 500 mg de SULF (sulfametoxazol) com 3 e 6 mL de HNO ₃ a nas temperaturas de 170, 220 e 270 °C.....	82
Figura 25. Recuperação para ⁵¹ V, ⁵³ Cr, ⁵⁵ Mn e ⁶⁰ Ni em diferentes concentrações de HNO ₃ após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).	88
Figura 26. Recuperação para ⁶³ Cu, ⁷⁵ As, ⁹⁵ Mo e ¹⁰¹ Ru em diferentes concentrações de HNO ₃ após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).	88
Figura 27. Recuperação para ¹⁰³ Rh, ¹⁰⁵ Pd, ¹¹¹ Cd e ¹⁸⁹ Os em diferentes concentrações de HNO ₃ após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).	89
Figura 28. Recuperação para ¹⁹⁵ Ir, ¹⁹⁵ Pt, ²⁰² Hg e ²⁰⁷ Pb em diferentes concentrações de HNO ₃ após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).	89
Figura 29. Recuperação para ¹⁰¹ Ru, ¹⁰³ Rh, ¹⁰⁵ Pd, ¹⁸⁹ Os, ¹⁹³ Ir e ¹⁹⁵ Pt para diferentes tempos de refluxo após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).....	91
Figura 30. Recuperação para ¹⁰¹ Ru, ¹⁰³ Rh, ¹⁰⁵ Pd, ¹⁸⁹ Os, ¹⁹³ Ir e ¹⁹⁵ Pt após decomposição de 300 mg de LEVO (levodopa) + 200 mg de NH ₄ Cl por MIC com diferentes misturas de água régia como solução absorvedora (n = 3).....	93
Figura 31. Aspecto do resíduo obtido após incineração da amostra de LEVO (levodopa) na chama do bico de Bunsen.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros operacionais para a determinação das impurezas elementares por ICP-MS e FI-CVG-ICP-MS, e de carbono por ICP OES.....	31
Tabela 2. Fármacos e suas respectivas classes farmacológicas.....	35
Tabela 3. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{60}Ni para soluções contendo diferentes concentrações de C (média e desvio padrão para n=3).	56
Tabela 4. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{75}As para soluções contendo diferentes concentrações de Cl (média e desvio padrão, n=3).....	59
Tabela 5. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ^{52}Cu e ^{65}Cr para soluções contendo diferentes concentrações de S (média e desvio padrão, n=3).....	62
Tabela 6. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ^{63}Cu e ^{65}Cr para soluções contendo diferentes concentrações de P (média e desvio padrão, n=3).....	64
Tabela 7. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ^{62}Ni e ^{63}Cu para soluções contendo diferentes concentrações de Na (média e desvio padrão, n=3).....	68
Tabela 8. Recuperação das impurezas elementares após decomposição por via seca (média e desvio padrão, n=5).	98
Tabela 9. Valores de recuperação para os três diferentes níveis de concentração estudados para sistema UltraWave [®] (média e desvio padrão, n=3).	101
Tabela 10. Concentração de elementos em CRMs de tecido de ostra e músculo de peixe. As determinações foram feitas por ICP-MS após decomposição no sistema UltraWave [®] utilizando 6 mL de HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹ (média e desvio padrão, n=3).....	102
Tabela 11. Limites de quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$), obtidos por ICP-MS após decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave [®]	104
Tabela 12. Valores de recuperação para os três diferentes níveis de concentração estudados para decomposição por MIC (média e desvio	

padrão, n=3).....	106
Tabela 13. Concentração de elementos em CRMs de tecido de ostra e músculo de peixe determinados por ICP-MS após decomposição por MIC utilizando 6 mL de HNO ₃ 7 mol L ⁻¹ como solução absorvedora (média e desvio padrão, n=3).....	107
Tabela 14. Limites de quantificação, expresso em massas de amostras (µg g ⁻¹), obtidos por ICP-MS após decomposição por MIC.....	109
Tabela 15. Resultados, em µg g ⁻¹ , obtidos após decomposição de AZAT, ATEN, AMIT, CAPT, ENAL e DICL por sistema UltraWave [®] e determinação de impurezas elementares por ICP-MS (média e desvio padrão, n=3).....	112
Tabela 16. Resultados, em µg g ⁻¹ , obtidos após decomposição de HALO, IMIP, LEVO, NIFE e NIME por sistema UltraWave [®] e determinação de impurezas elementares por ICP-MS (média e desvio padrão, n=3).....	113
Tabela 17. Resultados, em µg g ⁻¹ , obtidos após decomposição de PRIM, PROP, SALB, SULF e ZIDO por sistema UltraWave [®] e determinação de impurezas elementares por ICP-MS (média e desvio padrão, n=3).....	114
Tabela 18. Comparação dos métodos de preparo de amostras investigados para decomposição de fármacos e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- 1 AMIT, cloridrato de amitriptilina
- 2 ANVISA, Agências Nacional de Vigilância Sanitária
- 3 ATEN, atenolol
- 4 AZAT, azatioprina
- 5 CAPT, captopril
- 6 CRM, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*
- 7 DICL, diclofenaco de sódio
- 8 DRC, cela dinâmica de reação, do inglês *dynamic reaction cell*
- 9 ETAAS, do inglês *electrothermal atomic absorption spectrometry*
- 10 ENAL, maleato de enalapril
- 11 FI-CVG-ICP-MS, do inglês *flow injection chemical vapour generation inductively coupled plasma mass spectrometry*
- 12 GFAAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*
- 13 HALO, haloperidol
- 14 HPA, sistema de decomposição em alta temperatura e pressão, do inglês *high pressure asher*
- 15 ICP OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
- 16 ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*
- 17 ICP-SFMS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com setor eletromagnético, do inglês *sector field inductively coupled plasma mass spectrometry*
- 18 IMIP, cloridrato de imipramina
- 19 LD, limite de detecção
- 20 LEVO, levodopa
- 21 LQ, limite de quantificação

- 22 MIC, combustão iniciada por radiação micro-ondas, do inglês *microwave-induced combustion*
- 23 NIFE, nifedipina
- 24 NIME, nimesulida
- 25 NIST, do inglês *National Institute of Standards and Technology*
- 26 PRIM, difosfato de primaquina
- 27 PROP, cloridrato de propranolol
- 28 PTFE, politetrafluoretileno
- 29 RCC, conteúdo de carbono residual, do inglês *residual carbon content*
- 30 RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*
- 31 SALB, salbutamol
- 32 SULF, sulfametoxazol
- 33 USP, do inglês *United States Pharmacopeia*
- 34 ZIDO, zidovudina

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados os seguintes métodos: *i*) via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistemas MultiWave[®] e UltraWave[®], *ii*) combustão iniciada por micro-ondas (MIC) e *iii*) decomposição por via seca, para a decomposição dos fármacos levodopa (LEVO), cloridrato de propranolol (PROP), diclofenaco de sódio (DACL), difosfato de primaquina (PRIM) e sulfametoxazol (SULF). Estes métodos foram avaliados em função da massa de amostra, mistura de reagentes, temperatura, tempo de decomposição, acidez residual, conteúdo de carbono residual (RCC) e recuperação das impurezas elementares. Somente os métodos de decomposição com sistema UltraWave[®] e MIC forneceram digeridos adequados para todos os fármacos e valores de recuperação entre 91 e 109% para todas as impurezas elementares (As, Cd, Cr, Cu, Ir, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V) determinadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), com exceção do Os. Nas decomposições utilizando o sistema UltraWave[®], massas de até 500 mg dos fármacos foram decompostas com 6 mL de HNO₃ e temperatura e pressões máximas de 270°C e 199 bar, respectivamente, para posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V. Para a determinação das demais impurezas elementares (Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru) massas de 250 mg dos fármacos foram decompostas com 4,5 mL HNO₃ e 1,5 mL HCl. Os digeridos obtidos pelo sistema UltraWave[®] apresentaram valores de RCC inferiores a 250 mg L⁻¹ e acidez residual de até 25% permitindo a minimização de interferências espectrais e não espectrais nas determinações por ICP-MS. A decomposição utilizando MIC permitiu a decomposição de comprimidos de 500 mg, utilizando como solução absorvedora HNO₃ 7 mol L⁻¹ para posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Ir, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V. Para a determinação de Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru por MIC foram confeccionados comprimidos a partir de uma mistura de 300 mg dos fármacos e 200 mg NH₄Cl e 6 mL de água régia foi utilizada como solução absorvedora. Valores de RCC inferiores a 60 mg L⁻¹ foram obtidos para os digeridos de MIC. Interferências poliatômicas causadas por S, P e Cl (presentes nas matrizes dos fármacos) na determinação de ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵³Cr, ⁶³Cu e ⁶⁵Cu foram resolvidas utilizando cela dinâmica de reação (DRC) e amônia como gás de reação. As determinações de As foram feitas utilizando análise por injeção em fluxo com geração química de vapor (FI-CVG) combinada a ICP-MS para resolver os problemas de interferências poliatômicas causadas por matrizes contendo Cl. Os métodos de decomposição em sistema UltraWave[®] e MIC foram validados conforme recomendações dos compêndios farmacopeicos. Os limites de detecção e quantificação obtidos pelos métodos propostos atendem às exigências preconizadas pelas Farmacopéias.

ABSTRACT

In this work a wet microwave assisted digestion procedure using Multiwave™ and UltraWave™ systems, microwave induced combustion (MIC) and dry ashing decomposition method were evaluated for the digestion of levodopa (LEVO), propranolol hydrochloride (PROP), sodium diclofenac (DICL), primaquine diphosphate (PRIM) and sulfamethoxazole (SULF). The proposed decomposition methods were evaluated based on the sample mass, oxidant mixtures, temperature, time of decomposition, residual acidity, residual carbon content (RCC) and recovery of elemental impurities. Only wet decomposition methods with UltraWave™ system and MIC provided suitable digests for all active pharmaceutical ingredients (APIs) and recovery values between 91 and 109% were obtained for all elemental impurities (As, Cd, Cr, Cu, Ir, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru and V) determined by inductively coupled plasma with mass spectrometry (ICP-MS), with the exception of Os. Decomposition with UltraWave™ system was carried out using masses up to 500 mg of APIs, 6 mL of HNO₃ and maximum temperature and pressure of 270 ° C and 199 bar, respectively, for further determination of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V. For the determination of other elemental impurities (Ir, Os, Pd, Pt, Rh and Ru) masses of 250 mg of the APIs were digested with 4.5 mL HNO₃ and 1.5 mL HCl. Digests obtained using UltraWave™ system have shown RCC values lower than 250 mg L⁻¹ and residual acidity equivalent to 25% of the initial amount of HNO₃ which allowed solving the spectral interferences on ICP-MS determination. MIC digests were performed using pellets of APIs with 500 mg and 7 mol L⁻¹ HNO₃ as absorbing solution for subsequent determination of all elemental impurities, with the exception of Ir, Os, Pd, Pt, Rh and Ru. On the other hand, for the determination of Ir, Os, Pd, Pt, Rh and Ru a mixture of 300 mg of APIs and 200 mg NH₄Cl and 6 mL of aqua regia as absorbing solution and were used for MIC digestion. RCC values provided by MIC were lower than 60 mg L⁻¹ for all APIs. Polyatomic interferences caused by S, P and Cl (present in APIs chemical structure) in the determination of ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵³Cr, ⁶³Cu and ⁶⁵Cu were solved using dynamic reaction cell (DRC) with ammonia as reaction gas. Determination of As was carried out using flow injection analysis with chemical vapor generation (FI-VG) combined with ICP-MS to solve the polyatomic interference caused by APIs matrices containing Cl. The decomposition methods using Ultrawave™ and MIC were validated according to the recommendations of pharmacopoeial compendia. The limits of detection and quantification obtained by the proposed methods meet the requirements outlined in the USP Pharmaceutical Forum.

O controle de qualidade de produtos farmacêuticos é uma etapa fundamental durante as etapas de produção de medicamentos e tem como objetivo assegurar a qualidade dos produtos que serão liberados para o consumo humano.¹ Os parâmetros utilizados para atestar a qualidade de produtos farmacêuticos são estabelecidos pelas Farmacopeias e, dentre eles, pode-se citar o doseamento, a identificação e os ensaios de pureza que identificam e quantificam a presença ou não de impurezas elementares nos fármacos e nos produtos acabados.

Impurezas elementares em produtos farmacêuticos são, muitas vezes, indesejáveis e podem estar presentes em pequenas quantidades nos fármacos devido aos reagentes utilizados durante a síntese, equipamentos e recipientes utilizados na preparação e no armazenamento, respectivamente. Estas impurezas podem influenciar na qualidade, na segurança e na eficácia dos produtos, assim causando danos a saúde humana.² Deste modo é de suma importância que estes produtos sejam caracterizados e avaliados o mais cuidadosamente possível.

A determinação de impurezas elementares em fármacos pode ser considerada um desafio, uma vez que na maioria das vezes, estas impurezas encontram-se em baixas concentrações. Para tanto, é necessária a utilização de técnicas de determinação capazes de atender aos limites preconizados pelas farmacopeias.^{3,4} Além do mais, técnicas multielementares são as preferidas devido à possibilidade de determinação de diversos elementos em fármacos de forma simultânea.^{2,5,6} A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) são técnicas que apresentam estas vantagens, possibilitando atender aos requisitos exigidos pelos compêndios oficiais. Porém, a ICP-MS é preferida já que permite melhores limites de detecção quando comparados com ICP OES. A técnica de ICP-MS pode apresentar algumas interferências espectrais devido à

¹ Hardman, J. G., Limbird, L. E., Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica, 2012.

² Rao, R. N., Talluri, M., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 1-13.

³ The United States Pharmacopeia, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopeia Brasileira*, 5ª Ed., Brasil, 2010

⁵ Silveira, J. N. *et al. Atomic Spectroscopy* 28 (2007) 1-7.

⁶ Van Hoecke, K., Catry, C., Vanhaecke, F., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1909-1919.

formação de íons poliatômicos e interferências não espectrais devido ao efeito de matriz.^{7,8} Estas interferências podem ser minimizadas utilizando métodos adequados de preparo de amostras, tendo em vista que as amostras devem passar por uma etapa prévia de decomposição para então serem analisadas por ICP-MS. Além disso, há a possibilidade da utilização de celas de colisão e reação presentes nos espectrômetros de massa com plasma indutivamente acoplado que permite resolver os problemas de interferências espectrais.⁹

Neste contexto os métodos de determinação de impurezas elementares têm sido discutidos em diversos fóruns promovidos pela *United States Pharmacopeia* (USP), nos quais as recomendações iniciais sugerem a decomposição prévia de amostras de fármacos utilizando misturas ácidas em sistemas fechados aquecidos com micro-ondas e posterior determinação das impurezas elementares por técnicas com plasma. Além disso, as farmacopeias têm inserido em suas monografias relacionadas à determinação de impurezas elementares, analitos que geralmente são utilizados como catalisadores, tais como Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru.^{3,4}

Dentre os métodos normalmente utilizados para a decomposição de fármacos pode-se citar a decomposição por via seca em forno tipo mufla,^{10,11} a decomposição por via úmida em sistema aberto^{12,13} e a decomposição por via úmida em sistema fechado com aquecimento por micro-ondas.¹⁴⁻¹⁶

No que se refere aos métodos de decomposição, os que utilizam sistema fechado apresentam vantagens frente aos demais, devido à possibilidade de evitar perdas de elementos voláteis durante a decomposição, minimização da

³ The United States Pharmacopeia, 232, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopeia Brasileira*, 5ª Ed., Brasil, 2010

⁷ Grindlay, G. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

⁸ Vanhoe, H. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.

⁹ O'Connor, G., Evans, E. H., in: S. J. Hill, *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*, Australia, 2007, 134-159.

¹⁰ Lewen, N. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 739-752.

¹¹ Lira S. *et al. Pharmacopeial Forum* 34 (2008) 1613-1618

¹² Ang, H. H. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 1969-1975.

¹³ Caldas, E. D., Machado, L. L., *Food and Chemical Toxicology* 42 (2004) 599-603.

¹⁴ Bubnic, Z. *et al. Acta Chimica Slovenica* 57 (2010) 37-44.

¹⁵ Niemela, M. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 433-439.

¹⁶ Stoica, A. I. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004) 653-656.

contaminação da amostra e digeridos com menor conteúdo de carbono residual (RCC).¹⁷

A maioria dos métodos de preparo de amostras utiliza ácidos concentrados ou mistura deles para a decomposição de amostras farmacêuticas já que a utilização de condições drásticas é requerida para a completa digestão de alguns tipos de fármacos, especialmente aqueles que apresentam estrutura aromática refratária ao ataque ácido.¹⁸ Assim, reações desenvolvidas em alta pressão e temperatura permitem a obtenção de digeridos com baixo conteúdo de RCC para os diferentes tipos de fármacos, reduzindo assim interferências durante as determinações por ICP-MS.¹⁸

Deve-se destacar, também, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) que tem sido considerada como um dos métodos mais eficientes para a decomposição de amostras farmacêuticas já que permite a obtenção de digeridos com valores de RCC inferiores a 1% com baixo valor de acidez residual.¹⁸⁻²⁰

Com base nas considerações acima, o presente trabalho tem por objetivo avaliar métodos de preparo de amostras por via úmida em sistema fechado com aquecimento por micro-ondas utilizando os sistemas MultiWave[®] e UltraWave[®] para decomposição de fármacos com estruturas moleculares diversas e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS. Adicionalmente, também foram estudados os métodos de decomposição por via seca e MIC. Além disso, foram avaliadas algumas interferências espectrais e não espectrais causadas pela matriz dos digeridos dos fármacos. Para tanto, quando necessário, utilizou-se a cela dinâmica de reação (DRC) para a minimização das interferências. Com base nas otimizações dos métodos de preparo de amostras pretendeu-se obter a melhor condição de decomposição considerando uma adequada frequência de análise, a decomposição de massas relativamente elevadas de amostra, a utilização de misturas de ácidos adequadas para a solubilização de todos os analitos de interesse e digeridos com baixos valores de RCC. Os métodos foram validados utilizando parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, faixa de trabalho, especificidade,

¹⁷ Flores, E. M. M. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1051-1064.

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

¹⁹ Muller, A. L. H., *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

²⁰ Nam, K. H. *et al. Spectroscopy* 26 (2011) 36-41.

robustez, limites de detecção e quantificação, conforme recomendações dos compêndios farmacopeicos.²¹⁻²³

²¹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, 2003.

²² International Conference on Harmonisation, 2005, Acessado em: 25/04/2014
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2013) 3.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão da literatura, onde serão abordados alguns aspectos gerais sobre a determinação de impurezas elementares em fármacos e os principais métodos de preparo de amostra empregados para a decomposição de fármacos. Além disso, serão discutidas as principais interferências observadas nas análises por ICP-MS dos digeridos obtidos para os diferentes fármacos. Cabe destacar que, apesar da determinação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos ser de grande importância, poucos trabalhos são, ainda, encontrados na literatura utilizando métodos de decomposição com radiação micro-ondas e subsequente determinação de impurezas elementares por ICP-MS.

2.1 Controle de qualidade de impurezas em produtos farmacêuticos

O controle de qualidade caracteriza-se por um conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e demais produtos para que satisfaçam às normas de pureza, eficácia e inocuidade.²⁴ Tendo em vista que o tipo de impurezas presentes nos produtos farmacêuticos depende da rota sintética e das matérias primas utilizadas, é de suma importância que os produtos destinados ao consumo humano sejam caracterizados e controlados com muito rigor, a fim de evitar os efeitos adversos provocados por estas impurezas.

As impurezas presentes em produtos farmacêuticos podem apresentar diferentes origens. Dentre elas destacam-se os resíduos oriundos de compostos utilizados durante o processo de síntese ou a contaminação pelo maquinário utilizado no processamento dos fármacos. Assim, as impurezas podem ser classificadas em orgânicas, inorgânicas e solventes residuais. As impurezas orgânicas podem ser produzidas durante o processo de manufatura ou estocagem dos compostos farmacêuticos. Podem se originar de materiais de partida, subprodutos, produtos intermediários, produtos de degradação, reagentes, ligantes e catalisadores. Já os solventes residuais são líquidos orgânicos ou inorgânicos utilizados na síntese de fármacos.²⁵ As impurezas elementares, por sua vez, podem ser introduzidas durante o processo de manufatura e incluem reagentes, ligantes, catalisadores, resíduos de metais, sais inorgânicos e outros materiais. Em especial, destacam-se as impurezas elementares, já que alguns elementos são potencialmente tóxicos mesmo em baixas doses. Neste sentido, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação dos contaminantes inorgânicos, muitas vezes presentes em nível de traços nos fármacos.

De acordo com o *Guideline for Elemental Impurities*,²⁵ as impurezas inorgânicas podem ser divididas em quatro classes. A classe 1 inclui As, Cd, Hg e Pb, que são significativamente tóxicos para todas as vias de administração. Estes elementos são considerados genotóxicos, mas não mutagênicos, e são conhecidos

²⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Acessado em: 25/04/2014
<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#3.25>, 2014.

²⁵ International Conference on Harmonisation, Acessado em: 25/04/2014
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

como carcinogênicos para os humanos. Além do mais a exposição ao Pb pode provocar problemas neurológicos, cardiovasculares, renais, entre outros.²⁵

A classe 2 compreende os elementos que são tóxicos em maior ou menor extensão de acordo com a forma de administração. Alguns dos elementos presentes nesta categoria são utilizados como catalisadores e que não são eficientemente eliminados durante a síntese. Dentre os estudados no presente trabalho, encontram-se nesta categoria Ir, Mo, Os, Pd, Pt, Rh, Ru e V. Dentre estes elementos somente o V representa riscos de genotoxicidade, porém não é mutagênico. O Mo, se ingerido excessivamente, pode ocasionar infertilidade, anorexia, atraso no crescimento e anemia. Com relação aos elementos Ir, Os, Pd, Rh e Ru não há dados suficientes para definir quais são os riscos inerentes à sua toxicidade, contudo, os estudos baseiam-se nas suas semelhanças com a Pt, que quando administrada em excesso pode resultar em complicações hematológicas e toxicidade renal.²⁵

Já na classe 3, estão incluídos os elementos que apresentam baixa toxicidade quando administrados via oral, mas que exigem cuidados quando administrados por outras vias como, por exemplo, por inalação ou parenteral. Dentre os elementos determinados no presente trabalho estão Cr, Cu e Ni. Cabe destacar que o Cu quando administrado em doses elevadas ou contínuas, pode resultar em problemas no trato gastrointestinal, rins e fígado. Além do mais, o Ni é considerado genotóxico, mas não mutagênico. O consumo de doses elevadas de Ni pode levar a dores de estômago, diminuição do peso corporal e problemas no sangue e rins.²⁵

Por fim, a classe 4 representa os elementos que não apresentam limites de exposição diária permitida pois representam baixa toxicidade, como por exemplo o Mn. Apesar disso, no presente trabalho o elemento Mn foi determinado, tendo em vista que a Farmacopeia Brasileira exige sua determinação.²⁵

Dentre os métodos utilizados para a determinação de metais, encontra-se o método de precipitação de sulfetos em meio ácido^{4,26} que apresenta muitas limitações, dentre elas a falta de seletividade e a incapacidade de detecção de

⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopeia Brasileira*, 5 Ed., Brasil, 2010

²⁵ International Conference on Harmonisation, Acessado em: 25/04/2014

<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

²⁶ The United States Pharmacopoeial Convention, USP, 35 th Rockville, 2012.

vários elementos. Apesar disso, as farmacopéias ainda mantêm este método em suas monografias que propõem a determinação de metais pesados.

Nos últimos anos, as farmacopéias em especial, a Farmacopéia Brasileira e a USP, têm proposto modificações para os métodos utilizados na determinação de impurezas elementares em fármacos com a introdução de técnicas instrumentais de alta capacidade de detecção e seletividade. Sob este aspecto, a Farmacopeia Brasileira foi a pioneira na utilização de micro-ondas como método de preparo de amostra e ICP-MS como técnica de determinação de impurezas elementares em fármacos.

A USP disponibiliza um fórum *online*, o *Pharmacopeial Forum* para debates e sugestões sobre novos métodos que são incorporados na USP anualmente. Dentre estes métodos encontram-se os capítulos *Elemental Impurities – Limits 232* e *Elemental Impurities – Procedures 233* que abordam novos limites para contaminantes inorgânicos e procedimentos para o preparo de amostra e a determinação de impurezas elementares.^{3,23} Além disso, elementos utilizados como catalisadores (Ir, Pd, Pt, Os, Rh and Ru), pela indústria farmacêutica, foram incorporados nestes capítulos.

De acordo com o capítulo *Elemental Impurities – Procedures 233*, para a determinação de impurezas elementares faz-se necessário a prévia decomposição das amostras com ácidos concentrados e aquecimento com micro-ondas para a decomposição da matéria orgânica e a solubilização das impurezas elementares. Sendo assim, os digeridos podem, posteriormente ser analisados por ICP OES e ICP-MS.²³ Contudo, alguns cuidados durante a decomposição das amostras devem ser tomados, a fim de garantir uma determinação exata e precisa dos elementos de interesse, tais como: massa de amostra, programa de aquecimento do micro-ondas a escolha adequada dos reagentes para a decomposição, além da avaliação dos digeridos finais com respeito a acidez e o RCC.

³ The United States Pharmacopeia, 232, *Pharmacopeial Forum* 37 (2013) 3.

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2013) 3.

O HNO₃ concentrado é o reagente mais utilizado para decomposição de matrizes orgânicas devido ao seu elevado potencial de oxidação e a sua disponibilidade em alta pureza. Contudo, para assegurar a solubilização de elementos como Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru, há a necessidade de utilização de uma mistura de HNO₃ e HCl (ou solução de água régia) para possibilitar sua solubilização.²⁷ Adicionalmente, a mistura oxidante escolhida deve produzir digeridos com o menor RCC e acidez residual possível a fim de minimizar interferências durante as determinações por ICP-MS.²⁸

Muitos trabalhos são apresentados na literatura utilizando métodos de preparo de amostras com aquecimento por radiação micro-ondas objetivando a posterior determinação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos.^{6,11,15,18,20,28,29} Na próxima seção serão discutidos os principais métodos de preparo de amostras para determinação de impurezas elementares em fármacos.

2.2 Métodos analíticos para o preparo de amostras farmacêuticas

A maioria das técnicas analíticas, com exceção daquelas que permitem a análise direta de sólidos, necessita, normalmente, que a amostra esteja na forma de solução.²⁹ Assim, uma etapa prévia de decomposição é requerida para posterior determinação, principalmente, para amostras orgânicas tais como os fármacos. A decomposição de produtos farmacêuticos permite a destruição da matéria orgânica minimizando, assim, os riscos de interferências causadas pelo C na etapa de determinação. Diversos métodos têm sido utilizados na preparação de amostras farmacêuticas para posterior determinação de impurezas inorgânicas, tais como decomposição por via seca, decomposição por via úmida com aquecimento por

⁶ Van Hoecke, K., Catry, C., Vanhaecke, F., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1909-1919.

¹¹ Lira S. *et al. Pharmacopeial Forum* 34 (2008) 1613-1618

¹⁵ Niemela, M. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 433-439.

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

²⁰ Nam, K. H. *et al. Spectroscopy* 26 (2011) 36-41.

²⁷ Walter, P. J., Chalk, S., Kingston, H. M. S., *Microwave-enhanced chemistry. Fundamentals, sample preparation and applications*, Washington, 1997.

²⁸ Nobrega, J. A. *et al. Talanta* 98 (2012) 272-276.

²⁹ Pavlović, D. M. *et al. TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 1062-1075.

micro-ondas e métodos de combustão. Para todos estes métodos a pureza dos reagentes é um aspecto crítico que deve ser observado devido à possibilidade de contaminação. Deste modo, faz-se necessária uma etapa de purificação prévia dos reagentes antes de sua utilização.¹⁷ Em seguida, serão abordados com maiores detalhes os métodos de decomposição de amostras farmacêuticas utilizando decomposição por via úmida e combustão.

2.2.1 Decomposição de amostras farmacêuticas por via úmida

A decomposição por via úmida de amostras farmacêuticas pode ser feita utilizando sistemas abertos ou sistemas fechados com aquecimento convencional ou por micro-ondas.³⁰ Os sistemas fechados são preferidos, pois minimizam as perdas dos elementos voláteis e a contaminação do ambiente, aumentam a eficiência na decomposição devido ao aumento da pressão e conseqüente aumento da temperatura e do poder de oxidação do ácido nítrico.

Além disso, para a decomposição de amostras por via úmida, ácidos concentrados são utilizados como oxidantes da matéria orgânica, permitindo a eliminação da matriz orgânica e a solubilização das impurezas elementares. O ácido mais comumente utilizado é o HNO₃ que apresenta algumas vantagens, tais como, a obtenção em um alto grau de pureza e possibilidade de formação de nitratos solúveis em água de boa parte dos metais durante a mineralização.³⁰ Contudo, a fim de assegurar a completa decomposição de amostras farmacêuticas uma

¹⁷ Flores, E. M. M. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1051-1064.

³⁰ Matusiewicz, H., in: Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.) *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Amsterdam, 2003, pp. 193-233.

combinação com diferentes ácidos (H_2SO_4 , HClO_4 , HCl e HF)^{12,15,31-38} e peróxido de hidrogênio pode ser necessária.^{14,15,39-44} A seleção satisfatória da combinação de reagentes para a decomposição dependerá da matriz, bem como dos elementos a serem determinados.

Com relação à transferência de calor, esta pode ser feita utilizando aquecimento resistivo ou irradiação com micro-ondas. De um modo geral, o aquecimento por micro-ondas permite uma decomposição em menor período de tempo, pois a energia das micro-ondas é diretamente transferida para a solução contendo a amostra.³⁰

Os métodos de decomposição por via úmida em sistema fechado têm sido atualmente utilizados com o objetivo de melhorar a eficiência de oxidação. Utilizando sistema fechado a dissolução da amostra é assegurada devido a maior temperatura, sendo que este método é, geralmente, mais eficiente que a decomposição por via úmida em sistema aberto, o que permite, inclusive, a decomposição de amostras refratárias ao ataque ácido.³⁰

Neste sentido, é importante apontar que o desenvolvimento de métodos de decomposição efetivos para produtos farmacêuticos pode ser considerado um desafio atual, devido não só aos aspectos acima mencionados, mas também às

¹² Ang, H. H. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 1969-1975.

¹⁴ Bubnic, Z. *et al. Acta Chimica Slovenica* 57 (2010) 37-44.

¹⁵ Niemela, M. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 433-439.

³⁰ Matusiewicz, H., in: Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.) *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Amsterdam, 2003, pp. 193-233.

³¹ Ajasa, A. *et al. Food Chemistry* 85 (2004) 67-71.

³² Barthwal, J., Nair, S., Kakkar, P., *Biomedical and Environmental Sciences* 21 (2008) 319-324.

³³ Baye, H., Hymete, A. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84 (2010) 197-201.

³⁴ Campos, M. M. A. *et al. Phytochemical Analysis* 20 (2009) 445-449.

³⁵ Chuang, I. C. *et al. Biological Trace Element Research* 76 (2000) 235-244.

³⁶ Orisakwe, O. E., Nduka, J. K. *Science of the Total Environment* 407 (2009) 5993-5996.

³⁷ Razic, S. *et al. Talanta* 67 (2005) 233-239.

³⁸ Wu, X. H., *et al. Analytica Chimica Acta* 453 (2002) 311-323.

³⁹ Chizzola, R., Michitsch, H., Franz, C. *European Food Research and Technology* 216 (2003) 407-411.

⁴⁰ Lasztity, A. *et al. Talanta* 59 (2003) 393-398.

⁴¹ Lesniewicz, A., Jaworska, K., Zyrnicki, W. *Food Chemistry* 99 (2006) 670-679.

⁴² Murty, A. *et al. Indian Journal of Chemical Technology* 12 (2005) 229-231.

⁴³ Nookabkaew, S., Rangkadilok, N., Satayavivad, J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 6939-6944.

⁴⁴ Razic, S. *et al. Journal of the Serbian Chemical Society* 71 (2006) 1095-1105.

dificuldades envolvidas na decomposição de algumas moléculas orgânicas estáveis. Os anéis aromáticos (isolados ou condensados) estão, geralmente, presentes em estruturas de produtos farmacêuticos e podem ser refratários ao ataque pelo HNO₃, mesmo utilizando altas temperaturas e pressões.^{18,45} Os anéis aromáticos sem substituintes ativantes (como por exemplo -OH) podem não ser completamente digeridos mesmo utilizando HNO₃ concentrado e temperaturas de até 180 °C.⁴⁵ Já estruturas aromáticas condensadas são mais refratárias à oxidação e à utilização de HNO₃ concentrado, sendo que temperaturas acima de 260 °C são necessárias para promover a completa decomposição de fármacos que apresentam estes anéis em sua estrutura.¹⁸

Sistemas de micro-ondas, normalmente, permitem a decomposição com temperaturas e pressões de, aproximadamente, 240 °C e 55 bar, respectivamente.⁴⁶ Contudo, mesmo sob estas condições alguns fármacos não podem ser completamente decompostos e interferências relacionadas ao alto teor de carbono residual nos digeridos podem ser observadas.¹⁸ Alguns autores observaram que concentrações de carbono residual mais altas que 750 mg L⁻¹ aumentam o sinal analítico para As.⁴⁷ Neste sentido, novos métodos tem sido reportados na literatura a fim de assegurar a completa decomposição de compostos orgânicos refratários.^{8,48-50} Um exemplo é a MIC que tem sido satisfatoriamente aplicada para a decomposição de muitas matrizes orgânicas resultando em teores de carbono residuais menores que 1%.^{49,51-58} Este método já foi aplicado para a decomposição de amostras de

⁸ Vanhoe, H. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

⁴⁵ Würfels, M., Jackwerth, E., Stoepler, M. *Analytica Chimica Acta* 226 (1989) 1-16.

⁴⁶ Barclay, D., Microwave Digestion. Moves to 21st century, *Today's Chemist at work*, (2004) 28-32.

⁴⁷ Antes, F. G. *et al. Microchemical Journal* 98 (2011) 144-149.

⁴⁸ Larsen, E. H., Sturup, S. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 1099-1105.

⁴⁹ Muller, A. L. H. *et al. Journal Brazilian Chemical Society* 22 (2011) 1649-1655.

⁵⁰ Stewart, I. I., Olesik, J. W. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1249-1256.

⁵¹ Antes, F. G. *et al. Talanta* 83 (2010) 364-369.

⁵² Flores, E. M. M. *et al. Analytical Chemistry* 85 (2013) 374-380.

⁵³ Mello, P. D. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 911-916.

⁵⁴ Moraes, D. P. *et al. Analytical Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 563-570.

⁵⁵ Mortari, S. R. *et al. Analytical Chemistry* 82 (2010) 4298-4303.

⁵⁶ Muller, A. L. H. *et al. Analytical Letters* 45 (2012) 1004-1015.

⁵⁷ Pereira, J. S. F. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (2010) 1268-1274.

⁵⁸ Pereira, J. S. F. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (2011) 1849-1857.

fármacos utilizando massas de amostras relativamente elevadas (até 500 mg) e soluções diluídas para absorção dos analitos.^{18,19}

Por outro lado, para superar os inconvenientes relacionados com a decomposição incompleta dos digeridos, algumas melhorias nos sistemas de micro-ondas têm sido propostas pelos fabricantes a fim de permitir temperaturas e pressões mais altas durante a decomposição. Um desses novos sistemas, chamado de câmara de reação simples (*single reaction chamber* – SRC, UltraWave[®], Milestone Srl) permite temperaturas e pressões de até 300 °C e 199 bar, respectivamente. Este sistema já foi aplicado para a decomposição de matrizes orgânicas (leite em pó, fígado e rim bovino) permitindo a obtenção de digeridos com teores de carbono e acidez residuais menores que 1,5% e 1,04 mol L⁻¹, respectivamente.²⁸

Em seguida, serão enumeradas as principais aplicações para determinação de impurezas elementares em compostos farmacêuticos utilizando sistemas fechados e posterior determinação utilizando técnicas espectrométricas.

Em trabalho recente, Van Hoecke e colaboradores⁶ propuseram a utilização da dissolução direta (massa de 250 mg de amostra) e decomposição por via úmida em sistema fechado assistido por radiação micro-ondas (massa de 250 mg de amostra) para o preparo de excipientes farmacêuticos orgânicos. A concentração dos analitos e ensaios de recuperação para os isótopos ⁶⁰Ni, ⁶²Ni, ⁶³Cu, ⁶⁴Zn, ⁶⁵Cu, ⁶⁶Zn, ⁶⁸Zn, ⁹⁵Mo, ⁹⁸Mo, ⁹⁹Ru, ¹⁰¹Ru, ¹⁰³Rh, ¹⁰⁵Pd, ¹⁰⁸Pd, ¹¹¹Cd, ¹⁸⁹Os, ¹⁹¹Ir, ¹⁹²Os, ¹⁹³Ir, ¹⁹⁴Pt, ¹⁹⁵Pt, ²⁰⁰Hg, ²⁰¹Hg, ²⁰²Hg, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb e ²⁰⁸Pb foram feitos utilizando ICP-MS com sistema equipado com cela de reação e colisão. A dissolução aquosa foi feita com uma mistura contendo 0,009 mmol L⁻¹ de KBrO₃ em 1% (v/v) de HNO₃ e 1% (v/v) HCl. Para a determinação das impurezas metálicas foram utilizadas calibrações externas e com adição de analito. As interferências poliatômicas sobre os isótopos ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵³Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe e ⁷⁵As foram eliminadas com a cela de reação e colisão utilizando He/H₂ como gás de reação e colisão e aplicando uma barreira de energia cinética de 3 V entre o hexapolo (cela de reação e colisão) e o quadrupolo. Os valores para os ensaios de recuperação variaram de 93,8 a 109,9% quando a

⁶ Van Hoecke, K., Catry, C., Vanhaecke, F., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1909-1919.

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

¹⁹ Muller, A. L. H., *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

²⁸ Nobrega, J. A. *et al. Talanta* 98 (2012) 272-276.

calibração com adição de analito foi utilizada. Os autores também observaram valores superestimados para Os quando as amostras foram submetidas a decomposição por via úmida em sistema fechado assistido por radiação micro-ondas com misturas de água régia invertida. Segundo os autores, a presença de HNO_3 promove a formação de OsO_4 durante a decomposição. O OsO_4 apresenta elevada volatilidade e causa efeito de memória na etapa de determinação por ICP-MS. Efeitos de memória para Os não foram observados para análise de amostras dissolvidas na mistura contendo $0,009 \text{ mmol L}^{-1}$ de KBrO_3 em 1% (v/v) de HNO_3 e 1% (v/v) HCl . Os limites de detecção foram dez vezes menores que os limites máximos permitidos para produtos de administração parenteral estabelecidos pela *Pharmacopeial Forum* da USP.

Stoving e colaboradores⁵⁹ propuseram um método para determinação de As, Cd, Cu, Cr, Fe, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, V e Zn por ICP OES em comprimidos de um fármaco seguindo os novos capítulos (232 e 233) do *Pharmacopeial Forum* da USP. Para tanto, comprimidos de aproximadamente 450 mg de amostras farmacêuticas foram decompostos utilizando 12 mL de água régia invertida sob aquecimento em micro-ondas sob temperatura máxima de 220 °C. Valores de recuperação entre 85,3 e 103,8% foram obtidos para todos os elementos, com exceção para Os (161,5%). Os limites de detecção obtidos foram dez vezes menores do que os limites máximos estabelecidos para produtos de administração oral.

Venzago e colaboradores⁶⁰ propuseram a estabilização do Os nos digeridos obtidos após decomposição de excipiente farmacêutico no sistema HPA com HNO_3 concentrado. Após a decomposição, adicionaram-se quantidades milimolares de tiouréia em combinação com ácido ascórbico dissolvido em ácido acético para evitar as perdas das espécies voláteis de Os e prevenir as recuperações superestimadas devido ao enriquecimento em fase vapor destas espécies no sistema de nebulização do espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado. Os autores realizaram ensaios de recuperação utilizando soluções padrão de Os de diferentes fabricantes e observaram diferenças significativas nos valores de recuperação ao serem utilizadas estas soluções. A utilização solução de ácido acético (0,5% v/v)

⁵⁹ Stoving, C. et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 84 (2013) 209-214.

⁶⁰ Venzago, C. et al. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28 (2013) 1125-1129.

contendo tiouréia ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido ascórbico ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) foi capaz de minimizar as diferenças dos valores de recuperação das soluções de Os dos diferentes fabricantes. Foram obtidas recuperações de 81% para a amostra as quais foram adicionadas concentração equivalente de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de Os. Para a decomposição de preparações farmacêuticas de compostos multivitamínicos, Solytik e colaboradores⁶¹ utilizaram um método de decomposição por via úmida em sistema fechado com aquecimento por micro-ondas. Massas de amostras de aproximadamente 0,2 a 0,6 g de comprimidos e 0,16 g do conteúdo de cápsulas foram pesadas e colocadas em um frasco de politetrafluoretileno com 3 mL de HNO_3 . Posteriormente, Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, P, Se e Zn foram determinados por ICP-MS e por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). A exatidão foi avaliada pela decomposição de material de referencia certificado (CRM) de algas verdes (P-ACHK Number 12-2-02) e folhas de tabaco oriental (CTA-OTL-1) e determinação por ICP-MS e ETAAS. O efeito do carbono residual na determinação de Cr por ICP-MS foi minimizado pela diluição das soluções decompostas, ou pela aplicação de equação de correção disponíveis no equipamento para interferências poliatômicas causadas por Cr.

Niemela e colaboradores¹⁵ propuseram um método de decomposição assistida por micro-ondas com digestão em fase de vapor para amostras de metrotrexato (pó) para a determinação de Fe e Pd. Massas de aproximadamente 0,2 g do fármaco foram pesadas, transferidas para frascos de quartzo, adicionado 1 mL de H_2SO_4 e 0,5 mL de HNO_3 (ambos concentrados). Três mililitros de HNO_3 concentrado foram adicionados ao interior do frasco de micro-ondas contendo os frascos de quartzo com a amostra para que fosse realizada a decomposição em fase de vapor. A exatidão para Pd foi avaliada através de ensaio de recuperação utilizando um padrão organometálico $[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_2\text{PdCl}_2$ e valores de recuperação superiores a 91% foram obtidos. Para a determinação de Fe foi necessário a utilização de cela de reação e colisão para eliminar as interferências causadas pela espécie poliatômica $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$. A exatidão foi avaliada também mediante análise do CRM NIST (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*) SRM 8433 (corn bran) e não foram observadas diferenças significativas entre valores obtidos pelo método proposto e os valores certificados para Fe e Pd.

¹⁵ Niemela, M. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 433-439.

⁶¹ Solytik, K. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32 (2003) 425-432.

Leon e colaboradores⁶² desenvolveram um método para determinação de Cr, Ni, Pb e Sn por ICP-MS em digeridos de suplementos de vitamina E obtidos por decomposição por via úmida em sistema fechado. Massas de aproximadamente 0,1 g de amostra foram pesadas e transferidas, juntamente com 5 mL de HNO₃ e 500 µL de H₂O₂, para frascos de micro-ondas. As amostras foram aquecidas a temperatura máxima de 165 °C. Ítrio, In e Tl foram utilizados como padrões internos para calibração e o efeito de matriz foi avaliado pela comparação das inclinações das curvas obtidas utilizando adição de analito e calibração externa. Não foi observada diferença significativa entre os valores das inclinações das duas curvas de calibração e, portanto, não foi observado efeito significativo de matriz. A exatidão foi avaliada pela utilização do CRM 1085a (*wear metals in oil*) e concordâncias melhores que 90% foram obtidas para Cu, Fe, Mo, Ni, Pb, Sn e Ti

2.2.2 Decomposição de amostras farmacêuticas por combustão

Os métodos de combustão envolvem a decomposição de amostras na presença de uma atmosfera de natureza oxidativa (geralmente oxigênio) que promove a conversão da matriz orgânica, normalmente, em CO₂ e H₂O. Além disso, a combustão pode ser feita em sistemas abertos ou fechados e empregando diferentes temperaturas e formas de aquecimento. Desta forma, os principais métodos de combustão são divididos em via seca, frasco de combustão do tipo Schöniger, bomba de combustão, decomposição em sistema dinâmico, sistema tipo Wickbold e combustão iniciada por micro-ondas. Nesta seção será dada ênfase, principalmente, aos métodos de combustão por via seca e combustão iniciada por micro-ondas.³⁰

O método de decomposição por via seca utiliza frascos abertos aquecidos em forno do tipo mufla a temperaturas em torno de 500 °C. Este método é, frequentemente, recomendado em compêndios oficiais devido a sua alta eficiência

³⁰ Matusiewicz, H., in: Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.) *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Amsterdam, 2003, pp. 193-233.

⁶² de Leon, C. A. P., Bayon, M. M., Caruso, J. A. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 374 (2002) 230-234.

de decomposição e por utilizar instrumentação simples.²⁶ Uma das vantagens do procedimento por via seca é a possibilidade de decomposição de grandes quantidades de amostras (superiores a 1 g) e a subsequente solubilização das cinzas resultantes em um pequeno volume de ácido.⁶⁸ Durante o procedimento, o oxigênio é continuamente fornecido à reação, permitindo a completa oxidação da amostra.^{30,63} Em alguns casos, antes da amostra ser inserida no forno, um tratamento prévio da matéria orgânica pode ser feita pela utilização de ácidos concentrados como H₂SO₄ ou HNO₃.^{17,30} Contudo, alguns estudos têm demonstrado que perdas significativas de elementos-traços e contaminação podem ser observadas quando utilizada a combustão por via seca.^{11,64,65} Assim, a decomposição de amostras farmacêuticas por via seca não é recomendada, pois relatos na literatura demonstram perdas significativas de elementos tais como As, Cd, Hg e Pb.⁶³ Além do mais, o método de decomposição por via seca está propenso à contaminação devido aos auxiliares de muitas vezes utilizados e, também, a atmosfera do interior da mufla. Na literatura, muitos trabalhos utilizam decomposição por via seca para amostras farmacêuticas e alguns destes serão descritos a seguir.

Lewen e colaboradores¹⁰ decompueram produtos farmacêuticos utilizando o sistema por via seca em forno tipo mufla para a determinação de As, Se, Sn, Sb, Pd, Cd, In, Pt, Pb, Bi, Hg, Ru e Mo por ICP-MS. De acordo com o método II da USP, a amostra é previamente misturada com ácido sulfúrico concentrado no interior do cadinho de Pt e aquecimento em bico de Bunsen. Em seguida, o resíduo é misturado com HNO₃ concentrado e novamente aquecido em bico de Bunsen. Por fim, os resíduos são calcinados a 600 °C em mufla. A partir de ensaios de

¹⁰ Lewen, N. *et al.* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 739-752.

¹¹ Lira S. *et al.* *Pharmacoepial Forum* 34 (2008) 1613-1618

¹⁷ Flores, E. M. M. *et al.* *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1051-1064.

²⁶ The United States Pharmacopeial Convention, USP, 35 th Rockville, 2012.

³⁰ Matusiewicz, H., in: Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.) *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Amsterdam, 2003, pp. 193-233.

⁶³ Hoenig, M., Kersabiec, A. M. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 51 (1996) 1297-1307.

⁶⁴ Fecher, P., Ruhnke, G. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 373 (2002) 787-791.

⁶⁵ Koh, S. *et al.* *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 239 (1999) 591-594.

⁶⁸ Flores, E. M. D. *et al.* *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.

recuperação os autores observaram recuperações inferiores a 10% para Ru e Hg, enquanto que para Pb, As, Cd, Mo, Pd, Pt as recuperações foram inferiores a 50%.

Resultados similares foram, também, observados por Lira e colaboradores¹¹ na decomposição de croovidona e povidona por combustão via seca a temperatura de 600 °C de acordo com o método II da USP descrito anteriormente. Ensaios de recuperação foram feitos para As, Ag, Sn, Sb, Cu, Cd, Pb, Bi, Hg e Mo, utilizando ICP-OES para as determinações. Os autores observaram recuperações inferiores a 78% para As, Ag, Bi, Sb e Sn e Hg nos digeridos obtidos por decomposição por via seca utilizando forno tipo mufla.

A fim de superar os problemas relatados de perdas de elementos-traços, a combustão pode ser feita utilizando frascos fechados. Os métodos clássicos de combustão em sistema fechados são a bomba de combustão e o frasco de Schöninger.⁶⁶ Nestes métodos, a amostra é queimada em um recipiente fechado, preenchido com o oxigênio e absorção subsequente dos produtos gasosos ocorre em uma solução adequada. Além disso, a decomposição da matéria orgânica é eficaz e pode ser realizado em poucos minutos. Contudo, apenas uma amostra pode ser digerida por vez, caracterizando-se como um método moroso.⁶⁶ Com relação à bomba de combustão, a determinação de impurezas metálicas é inviável devido ao grande risco de contaminação causado pelas partes em aço que compõe o sistema de combustão.

Há poucos anos, o desenvolvimento da MIC permitiu a combinação de algumas das vantagens da decomposição assistida por micro-ondas convencional e técnicas de combustão clássicas, dentre as quais se destacam a rapidez promovida pelo aquecimento das micro-ondas, baixo teor de carbono residual dos digeridos e a possibilidade de uma etapa de refluxo após a combustão.⁶⁸

A amostra, na forma de comprimido (com massas de até 500 mg), e um pequeno disco de papel de filtro são colocados no suporte de quartzo e transferidos para um frasco de quartzo contendo uma solução absorvedora adequada. No caso da determinação de metais são preferidas soluções diluídas de ácidos. Alguns

¹¹ Lira S. *et al. Pharmacopeial Forum* 34 (2008) 1613-1618

⁶⁶ Moraes, D. P. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1065-1071.

⁶⁸ Flores, E. M. D. *et al. Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.

microlitros de solução de nitrato de amônio são adicionados ao papel filtro permitindo a ignição da amostra quando irradiadas com micro-ondas. O frasco de quartzo contendo a amostra é pressurizado com oxigênio (normalmente 20 bar) e submetido a radiação micro-ondas. Após alguns segundos a amostra é queimada e os produtos da combustão são absorvidos pela solução. Este método permite a decomposição de massas de até 500 mg de amostra, apresenta elevada frequência analítica (até 8 amostras podem ser processadas simultaneamente), utiliza sistema fechado de decomposição e é aplicável para diferentes amostras.^{18,19,67,68} Além do mais, o risco de contaminação e perda das espécies voláteis são reduzidos.⁶⁶ Finalmente, a MIC permite a aplicação de uma etapa de refluxo após a combustão por, aproximadamente, 5 minutos. Este aspecto é importante para permitir uma lavagem mais eficiente do suporte e das paredes do frasco de quartzo.

Atualmente, a combinação de MIC e de ICP-MS é proposta como um dos métodos mais adequados para a decomposição e posterior determinação de elementos-traços em amostras farmacêuticas.¹⁸⁻²⁰ Contudo, as aplicações de MIC para amostras farmacêuticas são recentes e escassas na literatura.

Nam e colaboradores²⁰ propuseram a decomposição de fármacos e excipientes usando MIC para posterior determinação de elementos-traços (As, Cd, Hg, Pb, V, Cr, Mn, Ni, Cu, Mo, Ru, Rh, Pd, Os, Ir e Pt) por ICP-MS. Comprimidos de aspirina foram moídos e embrulhados com papel de filtro que foi colocado sobre um suporte de quartzo e umedecido com alguns microlitros de nitrato de amônio. Os frascos de quartzo foram pressurizados com 20 bar de oxigênio de alta pureza e 5 mL de HNO₃ 20% (v/v) foram utilizados como solução absorvedora. A solução resultante apresentou RCC inferior a 1% e os LDs na faixa de 0,002 a 0,006 µg g⁻¹ para todos os analitos.

A eficiência de decomposição para fármacos tricíclicos (carbamazepina, cloridrato de amitriptilina e cloridrato de imipramina) foi comparada por quatro métodos de decomposição: *i*) MIC; *ii*) sistema de alta pressão e temperatura (*High*

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

¹⁹ Muller, A. L. H., *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

²⁰ Nam, K. H. *et al. Spectroscopy* 26 (2011) 36-41.

⁶⁶ Moraes, D. P. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1065-1071.

⁶⁷ Barin, J. S. *et al. in: M. A. Z. Arruda, Trends in Sample Preparation, New York, 2006, 53-82.*

⁶⁸ Flores, E. M. D. *et al. Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.

Pressure Asher, HPA); *iii*) decomposição por via úmida assistida por micro-ondas em sistema fechado com sistema MultiWave[®] e *iv*) via seca em forno tipo mufla. A carbamazepina apresenta a estrutura tricíclica mais refratária à decomposição com HNO₃ necessitando de alta pressão e temperatura para produzir digeridos com baixo teor de RCC. A decomposição por via úmida foi feita nos diversos sistemas utilizando massas de até 200 mg de carbamazepina, e temperaturas e tempos máximos de 280 °C (0,5 h), 320 °C (2 h) MultiWave[®] 3000 e para os sistemas HPA, respectivamente. Contudo, nessas condições as decomposições não foram satisfatórias e resíduos sólidos foram observados nos digeridos finais. De acordo com os autores, a decomposição completa somente foi observada utilizando o sistema de HPA, com 80 mg de amostra e 320 °C durante 3 h, resultando em digeridos com RCC de 0,6%. Por outro lado, a decomposição de 500 mg de amostra foi possível utilizando o método de MIC com etapa de refluxo de 5 minutos e HNO₃ 7 mol L⁻¹, o que resultou em RCC inferiores a 0,3%. Arsênio, Cd, Hg e Pb foram determinados por ICP-MS. Ensaios de recuperação foram conduzidos para estes elementos e recuperações entre 94 e 103% foram obtidas.¹⁸

O método de MIC foi, também, proposto por Muller e colaboradores¹⁹ para a decomposição de diversos fármacos e posterior determinação de Br e I por ICP-MS. Comprimidos de 500 mg das amostras foram confeccionados e alocados sobre o papel filtro contendo 50 µL de solução de nitrato de amônio. Os frascos de quartzo foram preenchidos com 6 mL de solução absorvedora de (NH₄)₂CO₃ 5 mmol L⁻¹ e pressurizados com 20 bar de oxigênio. O programa utilizado foi 5 min (etapa de refluxo opcional) a 1400 W de potência, com temperaturas e pressões máximas de 280 °C e 80 bar, respectivamente, e 20 min a 0 W (etapa de resfriamento). O método de decomposição por MIC apresentou teores de carbono residual nos digeridos menores que 500 mg L⁻¹ e limites de detecção para Br e I por ICP-MS de 20 e 1 µg kg⁻¹, respectivamente.

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

¹⁹ Muller, A. L. H., *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

2.3 Interferências nas determinações de impurezas elementares por ICP-MS

É bem documentado que a exatidão dos resultados analíticos obtidos empregando ICP-MS é frequentemente limitada por interferências que o analito pode sofrer durante a introdução e o transporte de amostra, bem como durante a geração dos íons e o transporte destes até o detector, resultando em interferências conhecidas como espectrais e não espectrais.^{69,70}

Elementos facilmente ionizáveis, como Na e K, podem causar interferências não espectrais, suprimindo o sinal dos analitos na determinação por ICP-MS. Uma amostra que apresenta matriz com elevada concentração de Na, por exemplo, pode promover um aumento da densidade eletrônica no plasma promovendo o decréscimo do grau de ionização dos elementos de interesse no plasma devido à recombinação do tipo íon-elétron.^{69,70} Além do mais, analitos que apresentam elevados potenciais de ionização são mais suscetíveis à presença de elevada concentração de Na e apresentam recuperações não quantitativas devido à supressão da ionização quando da presença de matrizes com elevada concentração de sais.^{70,71} Para avaliar esta interferência, Rodushkin e colaboradores⁷⁰ determinaram elementos com diferentes m/z e potenciais de ionização na presença de matriz salina (água do mar diluída 5 vezes). De um modo geral, os autores observaram que menores recuperações foram obtidas para os elementos com maiores potenciais de ionização. Além disso, os autores constataram que a exatidão dos resultados pode ser melhorada mediante a utilização de padrão interno apropriado. No trabalho proposto pelos autores foram utilizados nove padrões internos (Y, Sc, Cs, Rh, In, Be, Bi, Tl, Lu) de forma a contemplar as diferenças de potencial de ionização e m/z dos elementos determinados por ICP-MS.

Fraser e colaboradores⁷² avaliaram o efeito de elementos concomitantes presentes na matriz (Na, K, Cs, Cl, etc) na resposta analítica para diferentes analitos determinados por ICP-MS. De uma forma geral, os autores atribuem a supressão do sinal para os analitos devido a um deslocamento no equilíbrio de ionização e ao

⁶⁹ Agatemor, C., Beauchemin, D. *Analytical Chimica Acta* 706 (2011) 66-83.

⁷⁰ Rodushkin, I., Ruth, T., Klockare, D. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 159-166.

⁷¹ Olivares, J. A., Houk, R. S. *Analytical Chemistry* 58 (1986) 20-25.

⁷² Fraser, M. M., Beauchemin, D. *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 1705-1731.

efeito espaço-carga. Além disso, observaram que a supressão do sinal para os analitos aumenta com o aumento da massa do elemento presente na matriz. Adicionalmente, a supressão do sinal analítico é menos acentuada para os analitos de maior m/z. Os autores ainda sugerem que a presença de um grande número de átomos facilmente ionizáveis é capaz de consumir uma grande parte da população de íons Ar^+ necessários para a ocorrência das reações de transferência de carga envolvendo os analitos de interesse.⁷²

Interferências não espectrais são, também, causadas por digeridos com elevado RCC que promovem o aumento ou supressão do sinal analítico para alguns elementos durante as determinações por ICP-MS.^{7,73} Neste caso, o carbono presente nos digeridos interfere no mecanismo de ionização baseado na transferência de carga. De acordo com trabalhos relatados na literatura, o aumento de sinal tem sido observado para ^{75}As e ^{202}Hg em soluções contendo concentrações de carbono na faixa de 5 a 30 g L⁻¹. Já a supressão do sinal pode ser observada para ^{114}Cd , ^{59}Co , ^{191}Ir , ^{55}Mn , ^{98}Mo , ^{189}Os , ^{208}Pb , ^{105}Pd e ^{195}Pt quando soluções contendo 30 g L⁻¹ de carbono foram analisadas.⁶⁷

Já está bem estabelecido na literatura que soluções com elevada acidez podem ocasionar supressão de sinal do analito em determinações por ICP-MS.^{50,74-76} Guo e colaboradores,⁷⁴ demonstraram que a intensidade do sinal para elementos com o primeiro potencial de ionização maior que 9 eV (exemplo para ^{75}As e ^{202}Hg) são aproximadamente de 30 a 40% suprimidos com soluções de HNO_3 a 10%. Por outro lado, para ^{52}Cr , ^{114}Cd e ^{208}Pb (elementos com potencial de ionização menores que 9 eV) a supressão do sinal é menor que 10% para soluções de HNO_3 a 10%.⁷⁴

As interferências espectrais, por sua vez, são causadas por isótopos de elementos ou espécies poliatômicas que apresentam a mesma razão massa carga (m/z) do analito. Isso ocorre devido à baixa resolução do separador de massa do

⁷ Grindlay, G. *et al.* *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

⁵⁰ Stewart, I. I., Olesik, J. W. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1249-1256.

⁶⁷ Barin, J. S. *et al.* in: M. A. Z. Arruda, Trends in Sample Preparation, New York, 2006, 53-82.

⁷² Fraser, M. M., Beauchemin, D. *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 1705-1731.

⁷³ Reed, N. M., Cairns, R. O., Hutton, R. C., Takaku, Y. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 881-896.

⁷⁴ Guo, W. *et al.* *Talanta* 91 (2012) 60-64.

⁷⁵ Hu, Z. C. *et al.* *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20 (2005) 1263-1269.

⁷⁶ Stewart, I. I., W. Olesik, J. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1313-1320.

tipo quadrupolo, presentes em muitos dos instrumentos de ICP-MS disponíveis comercialmente.^{7,8,48}

Digeridos de amostras com matriz orgânica podem conter elevado conteúdo de carbono residual produzindo importantes interferências espectrais devido à formação de íons poliatômicos formados por Ar e C ($^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$) que afetam a determinação de ^{52}Cr e ^{53}Cr .⁸ Desta forma, sistemas de decomposição eficientes devem ser utilizados de forma a produzir digeridos com o menor conteúdo de carbono residual.

Adicionalmente as dificuldades relatadas à decomposição devido à presença de C, as estruturas químicas dos fármacos podem apresentar outros elementos em sua estrutura molecular como, por exemplo, N, Na, O, Cl, P e S. A presença destes elementos nos digeridos pode resultar em interferências durante as determinações por ICP-MS devido à formação de íons poliatômicos.^{8,47,77} A concentração em que as interferências poliatômicas, causadas pela matriz do fármaco, tornam-se significativas, depende do tipo do espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado utilizado e dos parâmetros operacionais empregados.

Soluções com elevadas concentrações de Cl, podem resultar em íons poliatômicos como de ClO^+ e ClOH^+ que interferem na determinação de elementos com m/z na faixa de 51 a 54, especialmente, ^{53}Cr e ^{51}V . Além do mais, interferências devido a formação do íon poliatômico ArCl^+ afetam a determinação de ^{75}As por ICP-MS.⁸ Por outro lado, a combinação de S e O presente na matriz de fármacos produz interferências nas determinações de ^{52}Cr e ^{65}Cu . Para ^{52}Cr uma interferência significativa é observada, causada pelo íon poliatômico $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$, enquanto possíveis interferências produzidas por espécies contendo S, O e H são observadas durante a determinação de ^{65}Cu .⁸ Adicionalmente, a formação de íons poliatômicos contendo

⁷ Grindlay, G. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

⁸ Vanhoe, H. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.

⁴⁷ Antes, F. G. *et al. Microchemical Journal* 98 (2011) 144-149.

⁴⁸ Larsen, E. H., Sturup, S. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 1099-1105.

⁷⁷ Evans, E. H., Giglio, J. J. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 8 (1993) 1-18.

P (PO_2^+) interferem na determinação de ^{63}Cu .⁸ Por fim, a presença de elevadas concentrações de Na, além de causar interferências não espectrais, podem resultar em interferências durante a determinação de ^{62}Ni e ^{63}Cu devido à possível formação de íons poliatômicos entre Na e O, e $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, respectivamente.

Dessa forma, a determinação de impurezas elementares em fármacos, que contém C, Cl, P e S em sua estrutura, está propensa a interferências e um método de decomposição satisfatório, bem como, otimizações das condições operacionais do ICP-MS, devem ser cuidadosamente avaliadas.

Para a resolução de possíveis interferências causadas por elementos presentes na matriz, algumas alternativas podem ser utilizadas para a determinação do elemento de interesse. A geração de vapor químico é uma delas, uma vez que, possibilita a separação do analito de interesse da matriz da amostra pela geração de espécies gasosas, como resultado de uma reação química. Este método tem sido amplamente aplicado na forma de vapor frio para a determinação de Hg^{18,78,79} e pela geração de hidretos com ICP-MS, para elementos formadores de hidretos covalentes gasosos como, por exemplo, As.^{80,81}

Adicionalmente, a utilização de cela de reação e colisão tem possibilitado a resolução de muitas interferências poliatômicas. A cela de reação e colisão, normalmente um quadrupolo, hexapolo ou octapolo, permite a dissociação de íons poliatômicos antes dos mesmos entrarem para o analisador de massas. Um gás, como o hidrogênio, hélio, amônia ou metano, é introduzido dentro da cela onde ocorrem as reações e as colisões causando a neutralização ou a dissociação das espécies poliatômicas.⁹ Trabalhos na literatura tem demonstrado bons resultados quando a cela de reação e colisão são utilizadas para resolver interferências relacionadas à presença de Cl ou C na matriz da amostra.^{6,47}

⁶ Van Hoecke, K., Catry, C., Vanhaecke, F., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1909-1919.

⁸ Vanhoe, H. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.

⁹ O'Connor, G., Evans, E. H., in: S. J. Hill, *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*, Australia, 2007, 134-159.

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

⁴⁷ Antes, F. G. *et al. Microchemical Journal* 98 (2011) 144-149.

⁷⁸ Dittert, I. M. *et al. Talanta* 72 (2007) 1786-1790.

⁷⁹ Dressler, V. L. *et al. Food Analytical Methods* 5 (2012) 505-511.

⁸⁰ Duarte, F. A. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 224-227.

⁸¹ Flores, E. M. D. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56 (2001) 1883-1891.

2.4 Validação de métodos analíticos

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, no presente trabalho, a determinação de impurezas em fármacos.²¹ Os parâmetros exigidos para validação são comuns à maioria das normas e são, normalmente, a especificidade, exatidão, limites de detecção e quantificação, linearidade, faixa ou intervalo de trabalho, precisão e robustez.^{22,23}

A especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.^{22,23} A exatidão, por sua vez, expressa a concordância entre os resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor aceito como verdadeiro.²² De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a exatidão deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando, três níveis de concentrações (em triplicata) dentro da faixa de trabalho. A exatidão para as situações em que materiais de referência certificados não estão disponíveis é avaliada a partir de ensaios de recuperação. O capítulo da USP 233 (*Elemental Impurities – Procedures*) prevê valores aceitáveis de recuperações entre 70 a 150% para impurezas elementares,²³ enquanto que a maioria das normas não dispõe de critérios de aceitabilidade.

A linearidade de um método analítico é a habilidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos da amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, soluções de referência com 5 níveis de concentração.²²

Faixa de trabalho é o intervalo entre a maior e a menor concentração do analito na amostra para o qual tenha sido demonstrado que o método analítico tem níveis satisfatórios de precisão, exatidão e linearidade.²²

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.^{21,22} Para métodos instrumentais

²¹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, 2003.

²² International Conference on Harmonisation, 2005, Acessado em: 25/04/2014
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

(cromatografia, espectrometria de absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base somado ao valor do branco.

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra.^{21,22} Pode ser determinado como sendo 10 vezes o ruído da linha de base somado ao valor do branco.

A precisão expressa a proximidade de concordância entre uma série de medidas obtidas por amostragem múltiplas de uma mesma amostra. A precisão pode ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade expressa a precisão sobre a mesma condição operacional em um curto intervalo de tempo e é verificada por, no mínimo, nove determinações, em 3 concentrações distintas.^{21,22} Já a precisão intermediária expressa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias com analistas diferentes.²¹ Finalmente a reprodutibilidade é 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 farmacopéias.²¹

Os resultados obtidos podem ser expressos como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (RSD) de uma série de medidas e são aceitos valores máximos de 20 e 25% para repetitividade e precisão intermediária, respectivamente.²³

Por fim, a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser

²¹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, 2003.

²² International Conference on Harmonisation, 2005, Acessado em: 25/04/2014
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

controladas e incluídas no procedimento.^{21,22} Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse método em relação a sua precisão.⁸²

Os métodos desenvolvidos, no presente trabalho, foram validados de acordo com os parâmetros descritos anteriormente.

²¹ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, 2003.

²² International Conference on Harmonisation, 2005, Acessado em: 25/04/2014
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

⁸² Instituto Nacional Metrologia, Qualidade e Tecnologia, *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos*, 2011. Acessado em: 30/03/2014 <https://www.inmetro.gov.br/>

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os equipamentos, reagentes e amostras utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Serão apresentadas as etapas de otimizações detalhadas de todos os métodos de preparo de amostras empregados para a decomposição de fármacos com diferentes estruturas moleculares e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS. Além disso, serão apresentados os estudos de interferências que foram realizados durante as etapas de determinações por ICP-MS.

3.1 Instrumentação

Neste trabalho foram avaliados quatro métodos de preparo de amostras de fármacos para posterior determinação de impurezas elementares. Foram utilizados os métodos de: *i*) decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema MultiWave[®], *ii*) MIC, *iii*) decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®] e *iv*) decomposição por via seca em forno tipo mufla.

Para a decomposição dos fármacos pelos métodos por via úmida assistida por radiação micro-ondas e MIC, foi utilizado um forno de micro-ondas (modelo MultiWave[®] 3000, Anton Paar, Graz, Áustria) equipado com um rotor para até oito frascos de quartzo com capacidade individual de 80 mL cada. A pressão, temperatura e potência máximas recomendadas pelo fabricante são de 80 bar, 280 °C e 1400 W, respectivamente. Em cada ciclo de decomposição foi feito o monitoramento com sensores de pressão e temperatura, permitindo o controle da potência irradiada. Para o resfriamento dos frascos durante o programa de aquecimento, foi utilizado o sistema de passagem forçada de ar no “nível 1” que equivale a 63 m³ h⁻¹. Ao final do programa de aquecimento, os frascos foram resfriados utilizando passagem de ar forçada no “nível 2” (126 m³ h⁻¹). Este mesmo modo de resfriamento também foi utilizado para a decomposição utilizando MIC.

A decomposição das amostras de fármacos pelo método por via úmida foi feita, também, em forno de micro-ondas (modelo UltraWave[®] com câmara única de reação, Milestone, Sorisole, Itália) equipado com um rotor com capacidade para 15 frascos de quartzo, com capacidade individual de 15 mL cada. O forno de micro-ondas é equipado com sensores de pressão e temperatura que permitem acompanhar a potência irradiada no decorrer de cada decomposição. A pressão, temperatura e potência máximas recomendadas pelo fabricante são de 199 bar, 300 °C e 1500 W, respectivamente. Para o resfriamento dos frascos, após o término do programa de decomposição, o forno de micro-ondas UltraWave[®] utiliza um sistema de passagem forçada de ar.

A eficiência de decomposição foi avaliada através da determinação do RCC nos digeridos resultantes dos diferentes métodos de decomposição. A determinação foi feita utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Optima 4300 DV Perkin Elmer, Shelton, EUA), equipado com

câmara de nebulização ciclônica de vidro (Glass Expansion, Austrália) e nebulizador concêntrico de quartzo (Meinhard[®] Nebulizer, tipo, modelo TQ-50-C1, Golden, EUA). Para a determinação de RCC foi monitorada a linha de emissão de 193,091 nm do C, com vista axial de observação do plasma, além de adição de ítrio como padrão interno (Tabela 1).

A determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V foi feita empregando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan[®] DRC II, Perkin Elmer-SCIEX, Waltham, EUA), equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard tipo A, Golden, EUA), com câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc. West Melbourne, Austrália, <http://www.geicp.com>) e tocha com tubo injetor de quartzo com 2 mm de diâmetro interno. Na Tabela 1 estão mostradas as condições operacionais utilizadas para a determinação de RCC e das impurezas elementares por ICP OES e ICP-MS, respectivamente.

Para minimizar as interferências poliatômicas na determinação de Cr, Cu e V, foi empregada a DRC com amônia como gás de reação. Foram avaliadas vazões de amônia entre 0,1 e 1,2 mL min⁻¹ e valores do parâmetro de rejeição q (RPq) entre 0,10 e 0,75.

A determinação de As e Hg foi feita, também, empregando um sistema com injeção em fluxo para geração química de vapor acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (FI-CVG-ICP-MS). O sistema FI-CVG foi desenvolvido no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) da UFSM. Soluções de HCl 1,0 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,1 mol L⁻¹ foram utilizadas para a produção e transporte das espécies voláteis de As e Hg.⁸⁰

⁸⁰ Duarte, F. A. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 224-227.

Tabela 1. Parâmetros operacionais para a determinação das impurezas elementares por ICP-MS e FI-CVG-ICP-MS, e de carbono por ICP OES.

Parâmetros	ICP-MS	FI-CVG-ICP-MS	ICP OES
Potência do gerador de RF (W)	1300	1300	1400
Vazão de argônio (L min ⁻¹)			
Principal	15	15	14
Auxiliar	1,20	1,20	1,00
Nebulização	1,15	1,15	1,00
Câmara de nebulização	ciclônica	ciclônica	ciclônica
Nebulizador	concêntrico	concêntrico	concêntrico
Cones (amostragem e <i>skimmer</i>)	Pt	Pt	--
Vista	--	--	Axial
Lente iônica	<i>Auto lens "on"</i>	<i>Auto lens "on"</i>	--
Leitura/Replicatas	3	500	3
Replicatas	3	1	3
<i>Dwell time</i> (ms)	50	50	--
Isótopos monitorados (m/z)*	⁵¹ V, ⁵² Cr, ⁵³ Cr, ⁵⁵ Mn, ⁶⁰ Ni, ⁶² Ni, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁹⁵ Mo, ⁹⁸ Mo, ⁹⁹ Ru, ¹⁰¹ Ru, ¹⁰³ Rh, ¹⁰⁵ Pd, ¹⁰⁸ Pd, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd, ¹⁸⁹ Os, ¹⁹¹ Ir, ¹⁹² Os, ¹⁹³ Ir, ¹⁹⁴ Pt, ¹⁹⁵ Pt, ²⁰⁶ Pb, ²⁰⁷ Pb e ²⁰⁸ Pb	⁷⁵ As, ²⁰⁰ Hg, ²⁰² Hg,	--
Linha de emissão (nm)	--	--	C (193,091)

* Neste trabalho todos os isótopos, apresentados acima, foram monitorados durante as etapas de otimizações dos métodos.

A determinação de cloreto nas soluções resultantes dos diferentes métodos de decomposição foi feita empregando um cromatógrafo de íons equipado com detector de condutividade (modelo 850 Professional IC, Metrohm, Suíça) e sistema de supressão química. A separação cromatográfica foi feita utilizando uma coluna de troca iônica (Metrosep A Supp5, Metrohm, 150 x 4 mm d.i., 5 µm de diâmetro de partícula) que possui grupos amônio quaternário suportados sobre poli(álcool vinílico). O sistema cromatográfico conta com uma coluna de guarda preenchida com

o mesmo material da coluna de troca iônica (Metrosep A Supp 4/5 Guard, 5 x 4 mm d.i., 5 μm de diâmetro de partícula). Todas as determinações foram feitas utilizando uma alça de amostragem de 200 μL e um amostrador automático (modelo 858 Professional IC, Metrohm), com capacidade para 112 amostras.

Todas as pesagens foram feitas em uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Filipinas) com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g.

Para a confecção de comprimidos dos fármacos utilizados para o método MIC, foi utilizada uma prensa de aço Specac (modelo Hydraulic Press 15 ton, Inglaterra).

A acidez nos digeridos foi determinada por titulação em meio aquoso utilizando um titulador automático (modelo 836 Titrand, Metrohm) equipado com módulo de agitação magnética (modelo 803 Ti Stand, Metrohm) e eletrodo de pH combinado (modelo 6.0262.100, Metrohm).

3.2 Reagentes

A água utilizada foi destilada, deionizada em uma coluna de troca iônica (condutividade máxima de 0,6 $\mu\text{S cm}^{-1}$) e, posteriormente, purificada em um sistema Milli-Q[®] (modelo Milli-Q[®], Millipore, Billerica, EUA), apresentando resistividade final de 18,2 M Ω cm. Os ácidos concentrados HNO₃ 65% (Merck) e HCl 37% (Merck) utilizados nos métodos de preparo de amostra foram bidestilados em um sistema de sub-ebulição (modelo duoPUR[®] 2.01E, Milestone, Bergamo, Itália). Peróxido de hidrogênio 30% (m/m) (Merck) também foi utilizado nos métodos de decomposição. A solução de nitrato de amônio 6 mol L⁻¹ (Merck), utilizada com iniciador de combustão, foi preparada a partir de seu respectivo sal dissolvido em água purificada. Cloreto de amônio (Merck) foi utilizado juntamente nos comprimidos de fármacos decompostos por MIC para posterior determinação de Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru.

Para a determinação do RCC por ICP OES foi feita a calibração com soluções padrões (10 a 500 mg L⁻¹) preparados a partir de uma solução de ácido cítrico (Vetec). A exatidão da curva de calibração para carbono foi avaliada utilizando uma solução de referência de carbono (CGC1-5Y, Inorganic Ventures, 1001 \pm 12 mg L⁻¹), a partir do ácido tartárico dissolvido em HNO₃ 0,2% (v/v). Como padrão interno foi utilizada uma solução de referência de ítrio (Fluka, em HNO₃ 2%) na concentração final de 1 mg L⁻¹. Esta solução foi utilizada na determinação do RCC tanto nas soluções de referência quanto nas amostras.

Para a determinação das impurezas elementares por ICP-MS foi preparada uma curva de calibração (0,025 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) a partir de uma solução multielementar de 10 mg L^{-1} de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb e V em HNO_3 5% (v/v) (SCP33MS, PlasmaCAL, Canadá). Uma solução de referência de Hg, com concentração de 10 mg L^{-1} em HNO_3 5% (v/v), foi utilizada para o preparo da curva de calibração (0,025 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) para a determinação por ICP-MS e FI-CVG-ICP-MS. Soluções de referência monoelementares de Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru (1000 mg L^{-1}) em HCl 5% (v/v), foram utilizadas para o preparo das curvas de calibração (0,025 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) para a determinação por ICP-MS. A solução estoque de Os (1000 mg L^{-1}) foi preparada a partir da dissolução de OsO_4 (99,8%, Sigma-Aldrich) em HCl 5% (v/v). Estas soluções estoque também foram utilizadas para a confecção das soluções de referências de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizados nos ensaios de recuperação durante a etapa de estudos das interferências, bem como para avaliação da exatidão dos métodos de decomposição de amostras avaliados.

Acetato de paládio (II) (pureza de 99,9%), acetilacetato de platina (II) (pureza de 97%) e trifluoroacetato de ródio (II) (pureza de 90%), todos adquiridos da Sigma-Aldrich, foram utilizados para ensaios de recuperação dos métodos de decomposição avaliados neste trabalho.

Para avaliação das possíveis interferências na determinação dos elementos por ICP-MS, foram utilizadas soluções com concentrações crescentes de C, Cl, P, S e Na, preparadas pela dissolução de ácido cítrico (Vetec), ácido clorídrico (Merck), ácido fosfórico (Merck), ácido sulfúrico (97% Sigma-Aldrich) e nitrato de sódio (Vetec), respectivamente, a partir da diluição de soluções estoque de 10 g L^{-1} , preparadas em HNO_3 5%.

A avaliação do efeito da concentração de HNO_3 na resposta analítica na determinação dos analitos por ICP-MS foi feita utilizando soluções contendo concentrações de HNO_3 de 1,4; 2,8; 4,3; 5,6 e 7 mol L^{-1} .

Para a geração e transporte das espécies voláteis de As e Hg, foram utilizadas soluções de 1,0 mol L^{-1} de HCl e 0,1 mol L^{-1} de NaBH_4 (Vetec). A solução de NaBH_4 foi preparada diariamente pela dissolução do reagente sólido em solução de NaOH 0,1% (m/v) (Merck).

Argônio com pureza de 99,998% (White Martins, Duque de Caxias, Brasil, <http://www.whitemartins.com.br>) foi utilizado para geração do plasma dos

equipamentos de ICP-MS e ICP OES, bem como na pressurização da câmara de reação única do forno de micro-ondas (modelo UltraWave®). Oxigênio com pureza de 99,6% (White Martins) foi utilizado como auxiliar no processo de combustão na decomposição por MIC.

A determinação de acidez por titulação em meio aquoso foi feita utilizando uma solução de KOH 0,1 mol L⁻¹ (Merck). Esta solução foi preparada através da dissolução do reagente em água purificada e a mesma foi padronizada com biftalato de potássio (Merck).

Todos os materiais (vidrarias e materiais comuns de laboratório) foram descontaminados pela imersão, por pelo menos 24 horas, em uma solução HNO₃ 10% (v/v) e, posteriormente, lavados com água purificada.

3.3 Amostras

Neste trabalho, foram utilizados dezesseis fármacos de diferentes classes farmacológicas (conforme Tabela 2), os quais foram doados pela Farmacopeia Brasileira.

Amostras dos fármacos cloridrato de propranolol, diclofenaco de sódio, difosfato de primaquina, levodopa e sulfametoxazol foram utilizadas para as otimizações dos métodos de decomposição avaliados e para a execução dos ensaios de recuperação.

Os CRMs de tecido de ostra (NIST 1566a, *Oyster tissue*) e músculo de peixe (DORM-2, *Dogfish muscle*) foram utilizados para avaliar a exatidão dos métodos de decomposição previamente otimizados neste trabalho.

Tabela 2. Fármacos e suas respectivas classes farmacológicas.

Nome do fármaco	Abreviação*	Classe farmacológica
Atenolol	ATEN	Anti-hipertensivo
Azatioprina	AZAT	Imunossupressor
Captopril	CAPT	Anti-hipertensivo
Cloridrato de amitriptilina	AMIT	Antidepressivo
Cloridrato de imipramina	IMIP	Antidepressivo
Cloridrato de propranolol	PROP	Anti-hipertensivo
Diclofenaco de sódio	DICL	Anti-inflamatório
Difosfato de primaquina	PRIM	Antimalárico
Haloperidol	HALO	Antipsicótico
Levodopa	LEVO	Antiparkinsoniano
Maleato de enalapril	ENAL	Anti-hipertensivo
Nifedipina	NIFE	Anti-hipertensivo
Nimesulida	NIME	Anti-inflamatório
Salbutamol	SALB	Broncodilatador
Sulfametoxazol	SULF	Antimicrobiano
Zidovudina	ZIDO	Antiviral

* As abreviaturas não são usuais e foram definidas somente para este trabalho.

3.4 Avaliação de interferências na determinação de impurezas elementares por ICP-MS

As interferências causadas por íons poliatômicos foram avaliadas mediante a utilização de soluções sintéticas e de digeridos obtidos através dos diferentes métodos de decomposição, ambos contendo C, Cl, S, P e Na. Em ambas as situações as soluções (sintéticas e digeridos) continham $5 \mu\text{g L}^{-1}$ das impurezas elementares de interesse.

3.4.1 Avaliação das interferências na determinação de impurezas elementares por ICP-MS utilizando soluções sintéticas

O efeito da presença de C, Cl, S, P e Na sobre a resposta analítica no instrumento de ICP-MS para as impurezas elementares foi avaliado, tendo em vista a diversidade de estruturas moleculares que compõem os fármacos. Para isso, foram preparadas (em HNO₃ 5%, v/v) soluções com concentração de 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 mg L⁻¹ de cada elemento interferente. Finalmente, foram adicionados a estas soluções todos os elementos de interesse, para apresentar concentração final de 5 µg L⁻¹.

3.4.2 Avaliação de interferências na determinação de impurezas elementares por ICP-MS utilizando digeridos

Com o objetivo de avaliar a interferência ocasionada por C, Cl, S, P e Na, os seguintes fármacos foram decompostos: DICL, LEVO, PRIM, PROP e SULF. Foram utilizados massas de 100, 250 e 500 mg e 6 mL de HNO₃ concentrado. Para o fármaco diclofenaco de sódio, também foram utilizadas massas de 25 e 50 mg. O sistema utilizado para a decomposição destes fármacos foi o UltraWave[®], conforme descrito no item 3.6. Previamente à decomposição, foi feita a adição de todos analitos, para apresentarem concentração final de 5 µg L⁻¹.

Além disso, foi avaliado o efeito da concentração de HNO₃ na resposta analítica dos analitos, utilizando concentrações crescentes de HNO₃ (10, 20, 30, 40 e 50%) e adição prévia de todos os analitos, para apresentar concentração final de 5 µg L⁻¹.

3.5 Decomposição assistida por micro-ondas em sistema MultiWave[®]

Inicialmente, o método de decomposição por via úmida em sistema MultiWave[®] foi feito utilizando rotor com capacidade para 8 frascos de quartzo, 6 mL de HNO₃ e massas de amostra de 100, 250 e 500 mg de PROP, DICL, PRIM e SULF (Figura 1). Os frascos foram posicionados no rotor e submetidos ao programa de aquecimento. O programa de aquecimento utilizado para o sistema MultiWave[®] foi: i)

rampa de aquecimento de 10 min até potência máxima de 1400 W, *ii*) permanência de 20 min na potência de 1400 W e *iii*) resfriamento até atingir a temperatura de 50 °C.

Após o término do programa de aquecimento, os digeridos foram avolumados a 25 mL com água purificada. Após cada etapa de decomposição, os frascos de quartzo foram descontaminados com 6 mL de HNO₃ concentrado e feito o aquecimento em forno de micro-ondas por 10 min a 1400 W e 20 min a 0 W (etapa de resfriamento).

Para os fármacos AMIT e IMIP foram utilizadas massas de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 e 400 mg, devido às dificuldades da decomposição destes fármacos tricíclicos. Foram utilizados 6 mL de HNO₃ e o mesmo programa de aquecimento utilizado para os outros fármacos.

As amostras também foram decompostas utilizando misturas de HNO₃ e HCl, tendo em vista que a utilização de HCl é requerida para a solubilização e posterior determinação de Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru. Assim, massas de amostra de 100, 250 e 500 mg de DICL, PRIM, PROP e SULF foram digeridas em frasco de quartzo utilizando duas misturas ácidas: *i*) 1,5 mL de HNO₃ concentrado e 4,5 mL de HCl concentrado (água régia) e *ii*) 4,5 mL de HNO₃ concentrado e 1,5 mL de HCl concentrado (água régia invertida). Foi utilizado o mesmo programa de aquecimento empregado nas decomposições com HNO₃.

3.6 Decomposição assistida por micro-ondas em sistema UltraWave®

O método de decomposição por via úmida em sistema UltraWave® foi feito utilizando um rotor com capacidade para 15 frascos de quartzo, com volume máximo de cada frasco de 15 mL. Por se tratar de um sistema de decomposição novo e pouco relatado na literatura^{28,83} foi necessário avaliar a massa de amostra, o volume de ácido e a temperatura de decomposição.

Para tanto, massas do fármaco SULF (fármaco disponível em maior quantidade para a realização deste trabalho) de 100, 250 e 500 mg foram pesadas e transferidas diretamente para o interior dos frascos de quartzo. Foram avaliados volumes de 3 ou

²⁸ Nobrega, J. A. *et al.* *Talanta* 98 (2012) 272-276.

⁸³ Muller, C. C. *et al.* *Microchemical Journal* 116 (2014) 255-260.

6 mL HNO₃ concentrado e temperaturas de 170, 220 e 270 °C. Os frascos foram fechados, alocados no rotor e este foi fixado em um compartimento apropriado para ser inserido na cavidade do forno de micro-ondas, conforme mostrado na Figura 1. O copo reacional de PTFE foi previamente preenchido com uma solução de 120 mL de água, 5 mL H₂O₂ e 2 mL de H₂SO₄ (Figura 1-A). Posteriormente, o copo foi alocado na cavidade do equipamento (Figura 1-B) e o rotor foi inserido na cavidade do forno (Figuras 1-C e 1-D). Em seguida, fechou-se o grampo (Figuras 1-E e 1-F), manualmente, e o sistema foi pressurizado com 40 bar de argônio (Figura 1-G). O programa de aquecimento utilizado para o sistema UltraWave[®] foi: *i*) potência de 1500 W com rampa de aquecimento de 10 min até 170, 220 ou 270 °C, *ii*) permanência de 20 min na temperatura de 170, 220 ou 270 °C e *iii*) resfriamento até a temperatura atingir 50 °C. Após o término do programa de aquecimento, o resfriamento foi feito pela circulação de água no sistema. A temperatura mínima para início da despressurização, bem como a taxa de despressurização foram de 50 °C e 1 bar min⁻¹, respectivamente. Posteriormente, o grampo metálico foi aberto e o rotor retirado da cavidade do forno.

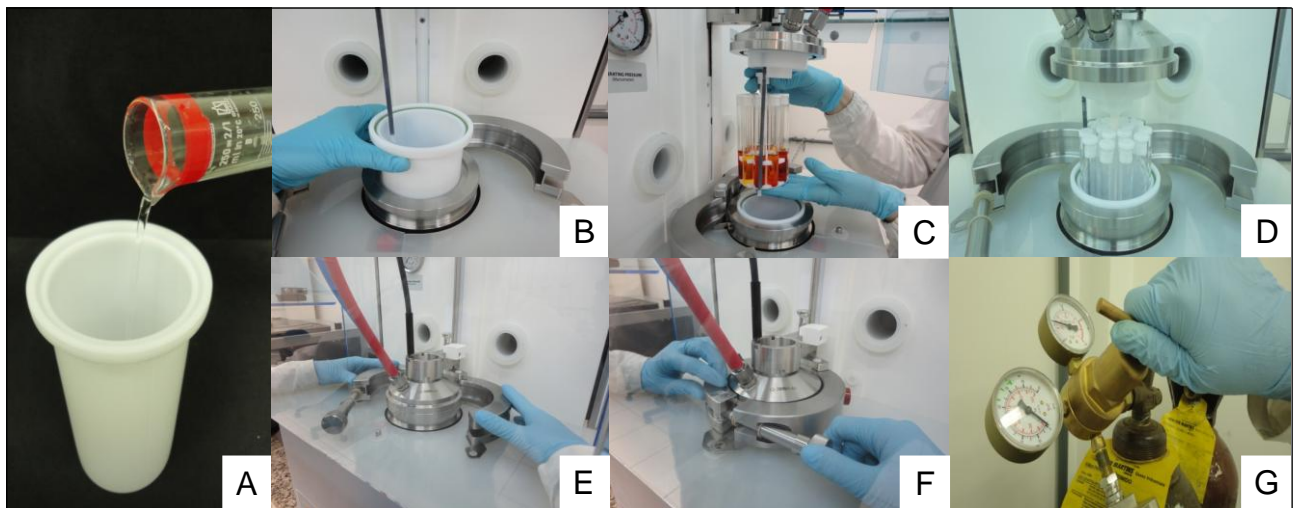


Figura 1. Preparo do sistema UltraWave[®] para decomposição de fármacos: (A) Introdução da solução contendo 120 mL de água, 5 mL H₂O₂ e 2 mL de H₂SO₄ no copo reacional de PTFE, (B) inserção do copo reacional de PTFE na cavidade do forno, (C) rotor com 15 frascos de quartzo, (D) inserção do rotor automaticamente no interior da cavidade, (E) e (F) fechamento manual do grampo metálico e (H) pressurização com Ar_(g) até 40 bar.

Os fármacos DICL, PRIM, PROP e LEVO foram, também, decompostos empregando sistema UltraWave[®] na melhor temperatura de decomposição obtida. Posteriormente todos os digeridos foram submetidos à determinação do RCC por ICP OES.

Para os fármacos AMIT e IMIP, massas de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 300 e 400 mg foram decompostas com 6 mL de HNO₃ concentrado na temperatura de 270 °C. Estas massas foram utilizadas devido à característica refratária que estes fármacos apresentam.

Para a verificação da exatidão do método de decomposição proposto, em todas as amostras de fármacos foram adicionadas as impurezas elementares na concentração de 5 µg L⁻¹. É importante destacar que a adição das impurezas elementares foi feita previamente à decomposição.

De forma análoga ao procedimento feito no sistema MultiWave[®] (volume de ácido e tempo total de programa), os fármacos foram digeridos com mistura de HNO₃ e HCl (água régia e água régia invertida), para solubilização e posterior determinação de Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru.

As soluções resultantes foram coletadas em frascos de polipropileno e avolumadas com água purificada a 25 mL. Os frascos de quartzo utilizados para a decomposição por sistema UltraWave[®], foram descontaminados pela adição de 6 mL de HNO₃ concentrado e aquecimento por 10 min a 170 °C e com pressurização a 30 bar.

Após a avaliação das melhores condições de decomposição utilizando sistema UltraWave[®], os fármacos LEVO e PROP foram utilizados para a realização de ensaios de recuperações a fim de avaliar o método de decomposição proposto. Nestes ensaios, foram utilizados soluções com concentração final de 5 µg L⁻¹ de todos os analitos. Além disso, ensaios de recuperação também foram feitos utilizando padrões orgânicos de Pd, Pt e Rh.

3.7 Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas

A decomposição por MIC foi feita com base em trabalhos descritos na literatura para decomposição de fármacos.^{18,19} Inicialmente, foram avaliadas massas

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

¹⁹ Muller, A. L. H., *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

de 100, 250 e 500 mg para LEVO utilizando como solução absorvedora água e refluxo de 5 min. Para este método de decomposição as amostras foram prensadas na forma de comprimido, com diâmetro de 13 mm.

Após seleção da massa apropriada para decomposição por MIC, foi investigada a solução ideal para a absorção das impurezas elementares, utilizando 6 mL de HNO₃ nas concentrações de 4, 7, 10 e 14,4 mol L⁻¹. Uma etapa de refluxo (tempo de aquecimento) de 5 min foi utilizada em todos os ciclos de decomposição, tendo em vista que o uso desta etapa aumenta a eficiência de absorção dos analitos.^{53,66,84}

Para o procedimento de decomposição por MIC, 6 mL de solução absorvedora foram transferidos para os frascos de quartzo. As amostras comprimidas dos fármacos foram posicionadas na base do suporte de quartzo contendo um disco de papel filtro (1,5 cm de diâmetro com, aproximadamente, 20 mg) umedecido com 50 µL de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹. Em seguida, o suporte de quartzo com a amostra foi inserido no interior do frasco de quartzo, com auxílio de uma haste de vidro. Logo, os frascos foram fechados, fixados no rotor e pressurizados com 20 bar de oxigênio por 1 min. Para a pressurização dos frascos contendo as amostras, uma ponteira de PTFE foi posicionada no orifício utilizado para o alívio de pressão dos frascos e, simultaneamente, a válvula de escape dos gases foi mantida parcialmente aberta para permitir que o frasco fosse preenchido com oxigênio. Após a pressurização, a capa de proteção do rotor foi colocada e o conjunto foi posicionado no interior da cavidade do forno de micro-ondas. O programa de aquecimento utilizado para o método MIC foi potência de 1400 W com etapa de refluxo de 5 min e etapa de resfriamento de 20 min.

Durante o programa de aquecimento, a taxa máxima permitida de aumento de pressão foi modificada de 0,8 para 3 bar s⁻¹ pois, deste modo, o sistema possibilita que a pressão aumente em função do tempo (durante a combustão da amostra) sem interromper a radiação micro-ondas. Isso ocorreu para evitar que a irradiação das

⁵³ Mello, P. D. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 911-916.

⁶⁶ Moraes, D. P. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1065-1071.

⁸⁴ Pereira, J. S. F., *et al. Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.

micro-ondas seja interrompida, pois quando a taxa de pressão selecionada é excedida, o sistema de exaustão do forno é acionado como forma de segurança.

Após o término do programa (aquecimento e resfriamento), o rotor foi retirado da cavidade do forno de micro-ondas e a pressão interna dos frascos foi aliviada. A solução resultante foi coletada em frascos de polipropileno, os quais foram aferidos com água até 25 mL. Em seguida, os frascos de quartzo e os suportes utilizados para a decomposição por MIC foram descontaminados com 6 mL de HNO₃ concentrado e aquecimento em forno de micro-ondas por 10 min a 1000 W. Por fim, os frascos e os suportes de quartzo foram lavados com água e secos com ar comprimido.

Adicionalmente, comprimidos obtidos através de uma mistura contendo 200 ou 300 mg do fármaco e 100, 200 ou 300 mg de NH₄Cl foram confeccionados com objetivo de minimizar a formação de espécies refratárias de Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru no momento da combustão garantindo, assim, a recuperação quantitativa destes elementos. Um procedimento semelhante foi feito por White e colaboradores⁸⁵ em que utilizaram clorato de potássio (KClO₃) na forma sólida em suporte de quartzo para promover a produção de HClO₃ e garantir a recuperação quantitativa de Ir, Rh e Ru. Cabe destacar que o fármaco e o NH₄Cl foram previamente homogeneizados em um gral e, posteriormente, prensados conforme mostrado na Figura 2.

⁸⁵ White, R. T., Kettisch, P., Kainrath, P. *Atomic Spectroscopy* 19 (1998) 187-192.



Figura 2. Etapas do preparo das amostras para decomposição por combustão iniciada por micro-ondas: (A) fármaco, (B) NH_4Cl , (C) homogeneização da mistura do fármaco mais NH_4Cl em gral (D) e (E) comprimidos, (F) suporte de quartzo com comprimido alocado sobre o papel filtro umedecido com NH_4NO_3 e (G) suporte de quartzo inserido no frasco de decomposição contendo solução absorvedora.

Durante estes experimentos, foram utilizadas como soluções absorvedoras 1,5 mL de HNO_3 concentrado + 4,5 mL de HCl concentrado (água régia) e 4,5 mL de HNO_3 concentrado + 1,5 mL de HCl concentrado (água régia invertida). Além disso, foi avaliada a etapa de refluxo (5, 10, 20 e 30 minutos), tendo em vista que este método de decomposição está sendo empregado, pela primeira vez, para decomposição de fármacos e posterior determinação de Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru por ICP-MS.

Após estabelecer a melhor condição para decomposição por MIC dos fármacos em estudo, ensaios de recuperações foram realizados utilizando PROP e SULF. Assim, para avaliar o método proposto, a adição de todos os elementos foi

feita previamente à decomposição. Além disso, ensaios de recuperações também foram feitos para os padrões orgânicos de Pd, Pt e Rh.

3.8 Decomposição em sistema aberto em forno tipo mufla

A decomposição em sistema aberto em forno tipo mufla foi baseada no Método III do Ensaio Limite para Metais Pesados da Farmacopéia Brasileira 5ª Edição.⁴ Cerca de 2 g de amostra de LEVO foram pesados e transferidos para um cadinho de platina. Previamente ao início da decomposição, alíquotas de uma solução de referência foram adicionados nas amostras de forma a produzir digeridos contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de todos os analitos. Também foram feitos ensaios de recuperação utilizando os padrões de sais orgânicos de Pd, Pt e Rh. Para os ensaios de recuperação para Pt foram utilizados cadinhos de porcelana. Assim, foi adicionado H_2SO_4 concentrado o suficiente para umedecer a amostra, seguido da incineração em bico de Bunsen. Foram adicionados 2 mL de HNO_3 e 5 gotas de H_2SO_4 à amostra carbonizada, seguido de aquecimento até o desaparecimento total de fumos brancos. Posteriormente, a mistura foi aquecida em forno tipo mufla com temperatura entre 500 e 600 °C, até completa combustão da amostra. Após resfriamento, foram adicionados 4 mL de HCl 6 mol L^{-1} em cada uma das replicatas. Após, os cadinhos foram cobertos e levados para decomposição em banho-maria por 15 minutos. Em seguida, descobriram-se os cadinhos e evaporaram-se os reagentes, também em banho-maria, até secura. Logo, foi adicionada 1 gota de HCl concentrado, 10 mL de água quente e aplicado novamente aquecimento em banho-maria por 2 minutos. Por fim, as soluções foram transferidas para um frasco de polipropileno e avolumadas a 25 mL. Por fim, os digeridos foram analisados por ICP-MS.

O fluxograma da Figura 3 mostra, de forma resumida, as avaliações feitas no presente trabalho referentes aos métodos de decomposição.

3.9 Determinação do teor de carbono residual

A eficiência dos métodos de decomposição foi avaliada através da determinação do C por ICP OES e posterior cálculo dos valores de RCC baseado no

⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopeia Brasileira*, 5ª Ed., Brasil, 2010

teor de carbono original da amostra. Em todas as soluções (digeridos e padrões) foi adicionada uma solução de ítrio como padrão interno, na concentração de 1 mg L⁻¹. Posteriormente, estas soluções foram submetidas ao borbulhamento com Ar para eliminação dos gases dissolvidos. Este procedimento foi efetuado por, no mínimo 2 min ou até que a intensidade do sinal do analito (carbono) fosse constante.

3.10 Determinação de acidez residual

A determinação de acidez residual nos digeridos também foi utilizada como método de avaliação da eficiência de decomposição. Este procedimento foi feito por titulação em meio aquoso com solução padrão de KOH. A titulação foi feita com volumes de amostra entre 100 e 200 µL em um frasco de vidro contendo 20 mL de água. Após a homogeneização das amostras, por agitação magnética, a titulação foi iniciada e o ponto de equivalência foi determinado potenciométricamente.

3.11 Validação dos métodos de decomposição e determinação de impurezas elementares por ICP-MS

Os métodos de decomposição e determinação de impurezas elementares por ICP-MS foram validados utilizando os parâmetros de exatidão, precisão (intermediária e repetitividade), linearidade, faixa de trabalho, robustez, especificidade, LD e LQ, conforme apresentados pelo capítulo 233 - “*Elemental Impurities-Procedures*”, publicado pelo *Pharmacopeial Forum* da USP e *International Conference on Harmonisation (ICH)*.^{22,23}

Neste trabalho, os fármacos LEVO, PROP, PRIM, SULF e DICL foram utilizados para a validação dos métodos de decomposição e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS.

Para avaliar a exatidão, ensaios de recuperação para todos os analitos foram feitos em três níveis de concentrações equivalentes a 50, 100 e 150% do valor

²² International Conference on Harmonisation, 2005, Acessado em: 25/04/2014
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

máximo permitido para produtos farmacêuticos de uso parenteral.³ Além do mais, os CRMs de leite em pó, músculo de peixe e tecido de ostra foram decompostos e analisados por ICP-MS. Estes padrões foram utilizados, tendo em vista a indisponibilidade de CRMs de fármacos.

Para a avaliação da repetitividade, seis replicatas do fármaco LEVO foram decompostos e previamente à decomposição foram adicionadas soluções de referência contendo todas impurezas elementares no nível de concentração de 100% do valor máximo permitido pela USP para os produtos de uso parenterais.

A precisão intermediária e a robustez, por sua vez, foram avaliadas através da decomposição e determinação de impurezas elementares de seis replicatas do fármaco LEVO, por 02 laboratoristas em três diferentes dias, totalizando 36 replicatas.

A linearidade e faixa de trabalho foram avaliadas através da construção das curvas de calibração com pelo menos 5 concentrações diferentes e observação das mesmas para os diferentes analitos estudados.

A especificidade foi determinada através da análise de soluções padrões contendo todos os analitos em estudo e os possíveis interferentes (C, Cl, S, P e Na) por ICP-MS. Além do mais, foram decompostas amostras contendo estes mesmos interferentes e previamente à decomposição os analitos foram adicionados para posterior determinação por ICP-MS.

Os LDs e LQs foram obtidos através do cálculo de 3 e 10 vezes o desvio padrão das medidas de 10 replicatas do branco, somado ao valor médio do branco referente à cada método de decomposição.

³ The United States Pharmacopeia, 232, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

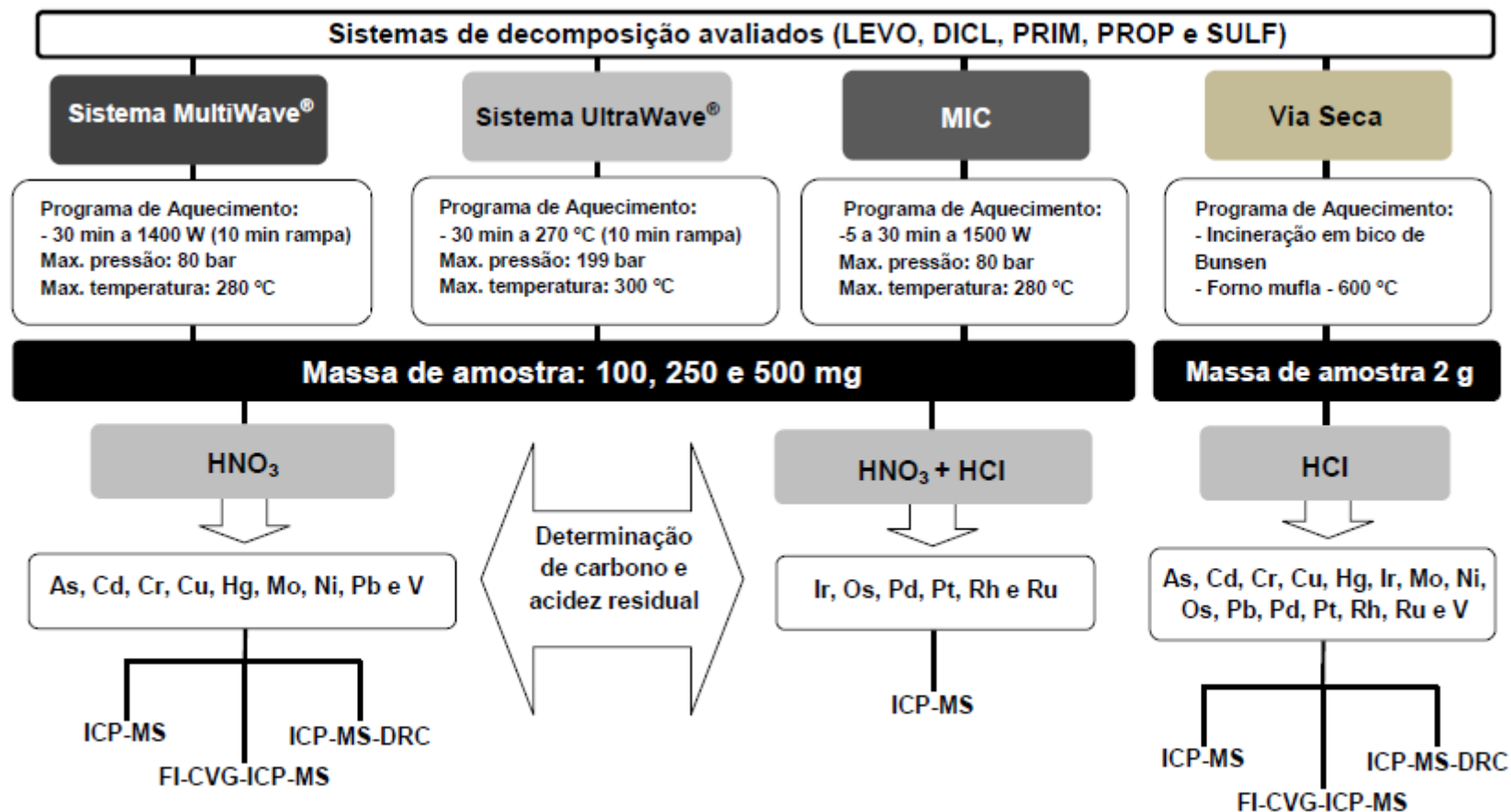


Figura 3. Esquema simplificado dos parâmetros avaliados para os métodos de decomposição no presente estudo.

4 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo, primeiramente serão mostrados os resultados obtidos para o estudo de interferências durante as determinações de impurezas elementares por ICP-MS. Após, serão apresentados a aplicabilidade dos métodos de preparo de amostra para diferentes fármacos. Ainda serão mostrados os resultados obtidos na determinação de impurezas elementares por ICP-MS após a decomposição de fármacos. E por fim, serão mostrados os resultados obtidos na validação dos métodos propostos.

4.1 Avaliação de possíveis interferências na determinação de impurezas elementares por ICP-MS

Diversas interferências espectrais podem ocorrer durante a determinação de impurezas elementares por ICP-MS, dentre elas destacam-se as interferências causadas sobre o As, Cr, Cu, Ni e V, devido à presença de elementos na matriz (ex. C, Cl, Na, P, S) que podem promover a formação de interferências poliatômicas.⁸ Com o objetivo de avaliar essas interferências durante a determinação das impurezas elementares por ICP-MS, foram preparadas soluções de referência com concentrações crescentes de C, Cl, Na, P e S, e os elementos de interesse. Também foram avaliados os digeridos de fármacos preparados pelo método de decomposição assistida por micro-ondas em sistema UltraWave[®] contendo todas as impurezas elementares. É importante destacar que os fármacos empregados no presente trabalho apresentam em sua estrutura molecular elementos capazes de produzir íons poliatômicos interferentes como, por exemplo, Cl, Na, P e S. Além disso, avaliou-se o efeito da concentração de ácido nítrico residual nos digeridos, na determinação dos analitos por ICP-MS.

Levando-se em consideração que os interferentes podem suprimir ou superestimar a intensidade dos sinais de alguns elementos e resultar em valores errôneos, devem-se estabelecer critérios de aceitação dos resultados obtidos durante desenvolvimento de métodos analíticos. Segundo o *Pharmacopeial Forum* da USP, durante a avaliação da exatidão de um método analítico para decomposição de fármacos e posterior determinação de impurezas elementares podem ser aceitos valores de recuperações entre 70 e 150%.²³ Contudo, neste trabalho foi utilizado um critério analítico mais rigoroso para a avaliação da exatidão dos métodos propostos baseado na incerteza obtida durante testes de repetitividade. Grindlay e colaboradores⁷ também estabeleceram o critério de avaliação da exatidão a partir da incerteza da repetitividade nas medidas por ICP-MS. Assim, procedeu-se a análise de uma solução de referência contendo 5 µg L⁻¹ de todos os analitos através de 10 determinações dessa solução por ICP-MS. Obteve-se a média dos RSDs de 4,1%

⁷ Grindlay, G. et al. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

⁸ Vanhoe, H. et al. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

para a resposta analítica de todos os isótopos. Em seguida, estimou-se a incerteza expandida multiplicando-se o RSD de 4,1% pelo fator de abrangência $k=2,2$. Desta forma, obteve-se uma incerteza expandida de 9,0% e uma faixa de aceitação de 91 a 109% para os ensaios de recuperação utilizados para a verificação da exatidão.⁸⁶

Cabe destacar que os isótopos ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{60}Ni , ^{62}Ni , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{75}As , ^{95}Mo , ^{98}Mo , ^{99}Ru , ^{101}Ru , ^{103}Rh , ^{105}Pd , ^{108}Pd , ^{111}Cd , ^{114}Cd , ^{198}Os , ^{191}Ir , ^{192}Os , ^{193}Ir , ^{194}Pt , ^{195}Pt , ^{200}Hg , ^{202}Hg , ^{206}Pb , ^{207}Pb e ^{208}Pb foram monitorados por ICP-MS utilizando sistema de nebulização convencional. Além disso, foram investigados os sistemas de FI-CVG-ICP-MS e ICP-MS no modo DRC para aqueles elementos que apresentaram valores de recuperações insatisfatórios. Para Hg, foi utilizado um sistema por FI-CVG-ICP-MS a fim de verificar possível efeito de memória decorrente do sistema de nebulização convencional. Assim, foram consideradas apropriadas as recuperações dos elementos com valores compreendidos entre 91 a 109%. Nas próximas seções serão somente apresentados os isótopos que sofreram interferências e apresentaram resposta analítica fora da faixa de aceitação acima descrita.

4.1.1 Efeito da acidez residual na determinação de impurezas elementares por ICP-MS

Nas análises por ICP-MS os efeitos provocados por elevadas concentrações de ácidos nos digeridos são conhecidos por causar supressão da intensidade de sinal à medida que a concentração do ácido aumenta.^{87,88} Diversos trabalhos reportam que a presença da concentração elevada de ácidos pode provocar interferências durante as determinações utilizando ICP OES e ICP-MS.^{89,90} A supressão da intensidade do sinal está relacionada ao efeito do ácido na formação

⁸⁶ Joint Committee for Guides in Metrology, *Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement*, Bureau International des Poids et Mesures 2008, pp. 120.

⁸⁷ Brenner, I. B., et al. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 50 (1995) 333-340.

⁸⁸ Greenfield, S., Mcgeachin, H. M., Smith, P. B. *Analytica Chimica Acta* 84 (1976) 67-78.

⁸⁹ Stewart, I. I., Olesik, J. W. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 843-854.

⁹⁰ Todolí, J. L., Mermet, J. M. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 54 (1999) 895-929.

do aerossol,⁵⁰ no processo de transporte⁹¹ e modificações na estabilidade do plasma.⁹² Além disso, o efeito de supressão do ácido nítrico depende do valor de m/z e do potencial de ionização do elemento.^{76,93} Deste modo, o efeito da concentração de HNO₃ foi avaliado a fim de se estimar a concentração máxima de ácido em solução, de forma a não produzir supressão da intensidade do sinal. A determinação dos elementos foi feita a partir da medição de soluções de referência contendo diferentes concentrações de HNO₃ (1,4; 2,8; 4,2; 5,6 e 7 mol L⁻¹). A concentração de HNO₃ 0,7 mol L⁻¹ (que corresponde a HNO₃ a cerca de 5%, v/v, volume final de 25 mL) foi utilizada como solução de referência (100%), ou seja, todas as demais soluções contendo diferentes concentrações de HNO₃ foram comparadas aos resultados obtidos para esta solução. Os resultados obtidos para os ensaios de recuperação das impurezas elementares estão mostrados nas Figuras 4, 5, 6 e 7. É importante destacar que foram apresentados os resultados da interferência da concentração de HNO₃ somente na resposta analítica dos isótopos mais abundantes e livres de interferências isobáricas, com exceção dos isótopos de ⁵³Cr, ⁹⁵Mo, ¹⁰¹Ru ¹¹¹Cd, ¹⁸⁹Os e ²⁰⁷Pb que foram monitorados devido às interferências observadas nos isótopos mais abundantes.

De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que a utilização de concentrações com até 2,8 mol L⁻¹ (a cerca de 20%, v/v) de HNO₃ não provocaram supressão da intensidade do sinal para nenhum dos elementos estudados. Para Os observa-se um aumento do sinal analítico à medida que a concentração de HNO₃ aumenta. Esta constatação foi importante, principalmente quando se trata do desenvolvimento de métodos utilizando decomposição por via úmida com ácidos concentrados. Para minimizar os efeitos decorrentes de elevada acidez, podem ser feitas diluições dos digeridos, porém com prejuízos nos LDs. Felizmente, a acidez residual dos digeridos obtidos utilizando o sistema UltraWave[®] foi inferior a 2,8 mol L⁻¹ (20%, v/v). Desta forma, a diluição prévia das soluções não foi necessária para as determinações por ICP-MS utilizando nebulizador concêntrico, câmara de

50 Stewart, I. I., Olesik, J. W. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1249-1256.

76 Stewart, I. I., W. Olesik, J. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1313-1320.

91 Farino, J. *et al. Analytical Chemistry* 59 (1987) 2303-2309.

92 Chudinov, E. G., Ostroukhova, I. I., Varvanina, G. V. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 335 (1989) 25-33.

93 Cai, Y., Georgiadis, M., Fourquarean, J. W. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 1411-1422.

nebulização ciclônica, vazão do gás de nebulização de $1,05 \text{ L min}^{-1}$ e 1300 W de potência no plasma.

Desta forma, conforme mostrado nas Figuras 4, 5, 6 e 7 fica evidente a supressão da intensidade do sinal para soluções com concentração de HNO_3 superior a $2,8 \text{ mol L}^{-1}$ (20%, v/v). Por exemplo, foi possível observar valores de recuperação inferiores a 91% para ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{75}As , ^{105}Pd , ^{111}Cd , ^{195}Pt e ^{202}Hg para soluções contendo $4,2 \text{ mol L}^{-1}$ (a cerca de 30%, v/v) de HNO_3 . Por outro lado, elementos como ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{95}Mo , ^{101}Ru , ^{103}Rh e ^{105}Pd apresentaram supressão significativa de sinal somente para concentrações de HNO_3 superiores a $5,6 \text{ mol L}^{-1}$. No caso do ^{189}Os não foram obtidas recuperações satisfatórias para nenhuma das concentrações de HNO_3 avaliadas.

De acordo com Stewart e Olesik⁷⁶ o efeito da concentração de ácido nas determinações por ICP-MS depende do tipo de nebulizador e da câmara de nebulização, da vazão do gás de nebulização e da potência do plasma utilizados. Os autores não observaram supressão do sinal para As e outros elementos quando soluções de HNO_3 com concentrações de até $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ (25%, v/v) foram analisadas utilizando nebulizador do tipo *cross-flow*, câmara de nebulização de duplo passo (Scott), vazão do gás de nebulização de $0,70 \text{ L min}^{-1}$ e 800 W de potência do plasma. Contudo, o aumento da vazão do gás de nebulização ($0,90 \text{ min L}^{-1}$) promoveu significativa supressão do sinal para As, mesmo com o aumento da potência do plasma para 1350 W.

Também foi observada por Guo e colaboradores⁷⁴ a supressão do sinal para ^{75}As , ^{82}Se e ^{202}Hg em determinações por ICP-MS. Os autores observaram supressões de até 40% para soluções com concentração de HNO_3 10% utilizando micronebulizador PFA 400[®], câmara de nebulização ciclônica, vazão do gás de nebulização de $0,76 \text{ L min}^{-1}$ e potência do plasma de 1300 W. De acordo com os autores há uma dependência entre o primeiro potencial de ionização (IP) e a supressão do sinal analítico para estes elementos. Os elementos mais afetados (^{75}As , ^{82}Se e ^{202}Hg) possuem IP superior a 9 eV. Além disso, os autores sugerem que há significativo resfriamento do plasma quando são utilizadas soluções com elevada

⁷⁴ Guo, W. *et al. Talanta* 91 (2012) 60-64.

⁷⁶ Stewart, I. I., W. Olesik, J. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1313-1320.

concentração de HNO₃. Para resolver esta interferência, foi adicionado metano no plasma para determinação de elementos traços em amostras de alimentos.

Hu e colaboradores⁷⁵ relatam significativa supressão do sinal do As, Se e Te (maior do que 20%) empregando micro nebulizador de vidro, câmara de nebulização ciclônica, vazão do gás de nebulização de 0,94 L min⁻¹ e 1350 W de potência no plasma. De acordo com os autores, a interferência causada pela concentração de HNO₃ não pode ser corrigida mediante utilização de padrões internos (Rh e In), já que a supressão do sinal é aparentemente dependente do primeiro potencial de ionização dos elementos. Como solução, Guo e colaboradores⁷⁴ propuseram a utilização de pequenas quantidades de etanol (4%, v/v) para a redução dos efeitos do HNO₃ na análise de amostras geológicas.

Entretanto, no presente trabalho não foi necessário o desenvolvimento de estratégias para a minimização do efeito da concentração de HNO₃ na resposta analítica para os elementos determinados, uma vez que, a concentração final dos digeridos foi inferior a 2,8 mol L⁻¹ (20%, v/v) para os métodos de decomposição utilizando sistema Ultrawave[®] e MIC.

⁷⁴ Guo, W. *et al.* *Talanta* 91 (2012) 60-64.

⁷⁵ Hu, Z. C. *et al.* *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20 (2005) 1263-1269.

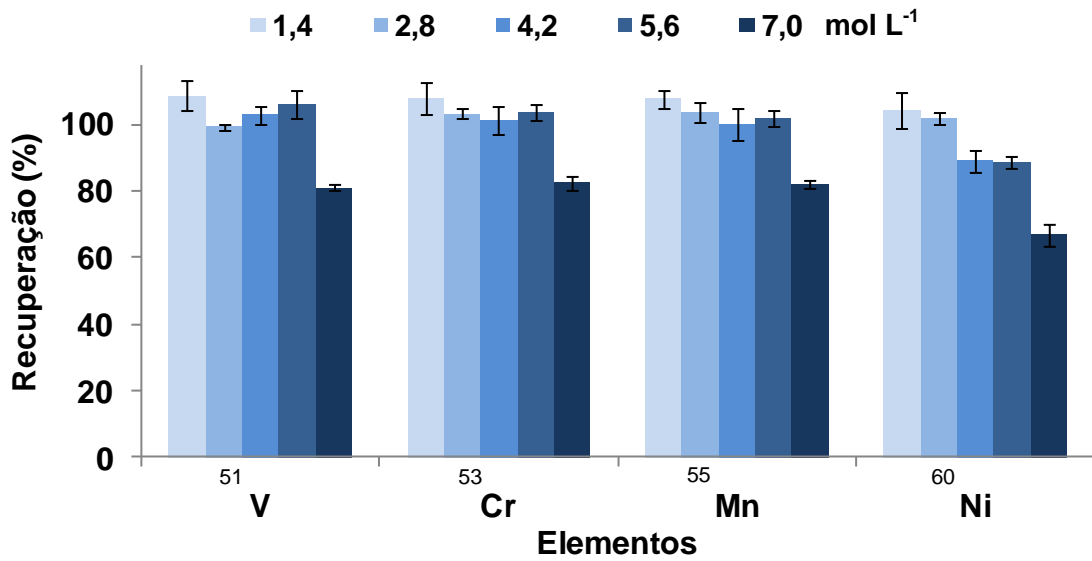


Figura 4. Efeito da concentração do ácido nítrico na determinação de ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn e ^{60}Ni utilizando soluções de referência (n = 3).

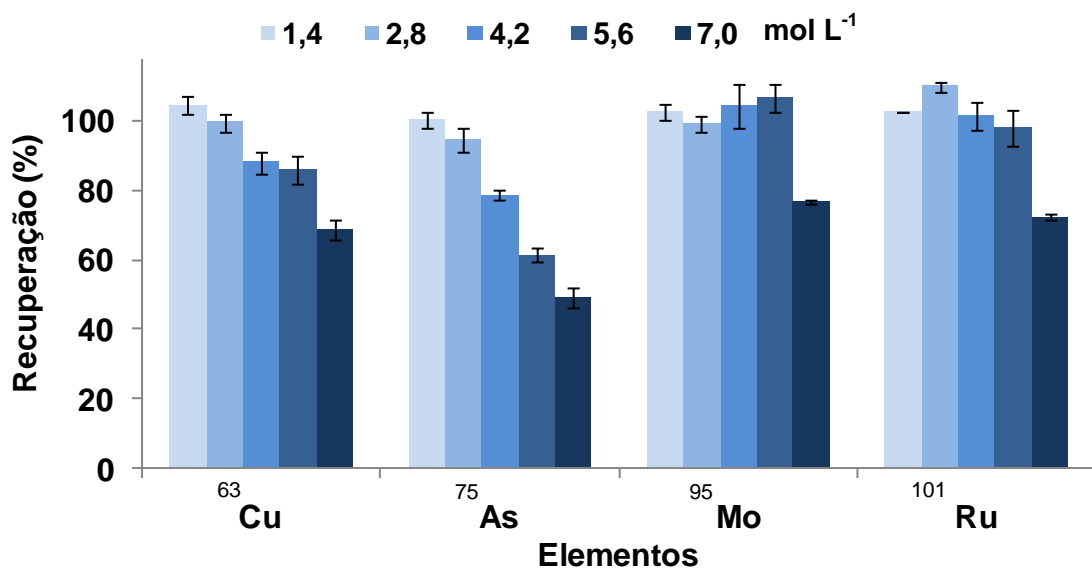


Figura 5. Efeito da concentração do ácido nítrico na determinação de ^{63}Cu , ^{75}As , ^{95}Mo e ^{101}Ru utilizando soluções de referência (n = 3).

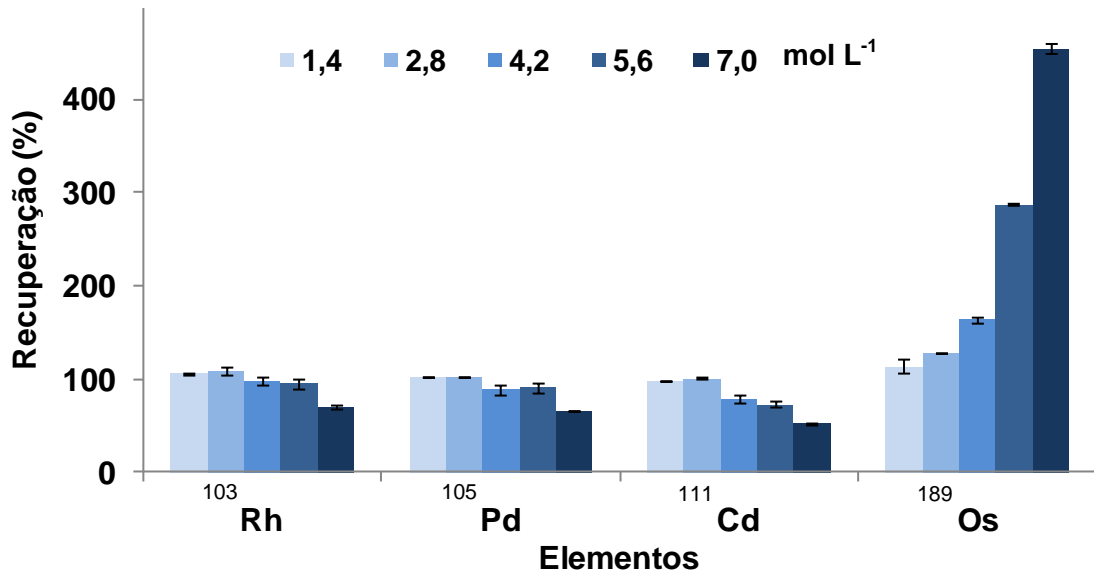


Figura 6. Efeito da concentração do ácido nítrico na determinação de ¹⁰³Rh, ¹⁰⁵Pd, ¹¹¹Cd e ¹⁸⁹Os utilizando soluções de referência (n = 3).

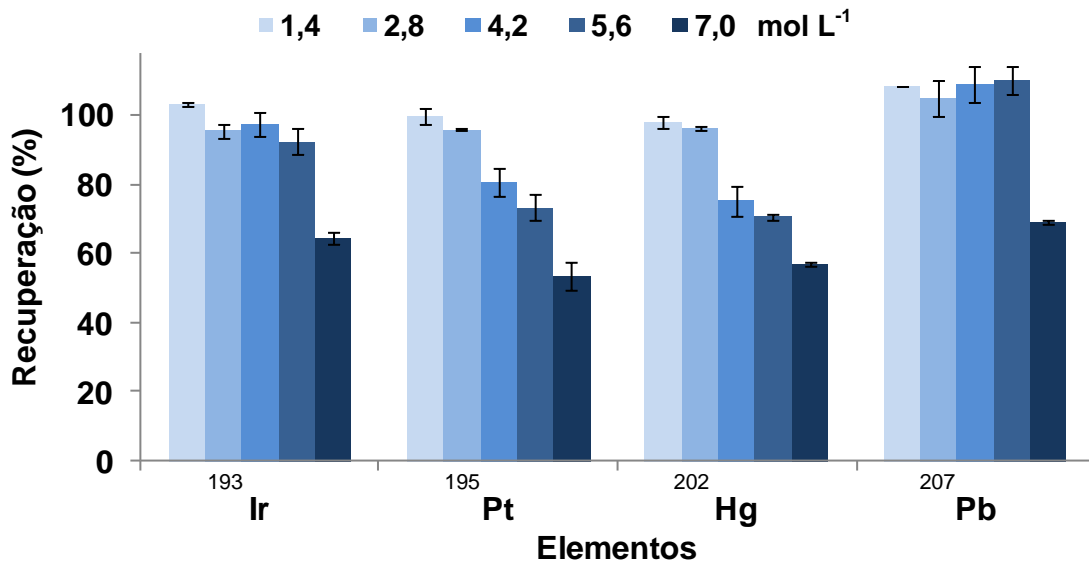


Figura 7. Efeito da concentração do ácido nítrico na determinação de ¹⁹³Ir, ¹⁹⁵Pt, ²⁰²Hg e ²⁰⁷Pb utilizando soluções de referência (n = 3).

4.1.2 Efeito da concentração de carbono na determinação de impurezas elementares por ICP-MS

As principais interferências causadas pelo C nas determinações por ICP-MS devem-se à formação de íons poliatômicos e o aumento da intensidade do sinal analítico para alguns isótopos devido à mudança dos fenômenos de ionização em soluções contendo elevada concentração de C.

Com o objetivo de simular possíveis interferências, causadas pela presença de carbono nas determinações de impurezas elementares por ICP-MS, foram feitas soluções de referência com $5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos estudados contendo concentrações crescentes de C (125, 250, 500, 1000 e 2000 mg L^{-1} de C) em ácido nítrico 5% (v/v). Os resultados foram comparados frente a uma solução contendo somente $5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos elementos estudados em ácido nítrico 5% (v/v). As soluções de referência foram preparadas em triplicata e entre cada solução, o sistema foi lavado com água purificada.

As principais interferências espectrais foram observadas para ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{60}Ni , conforme os resultados na Tabela 3. Além disso, foram obtidos valores de recuperação apropriados (entre 91 a 109%) para os demais elementos, exceto para Os (141%).

De acordo com a Tabela 3 foi possível observar que para concentrações inferiores a 250mg L^{-1} de C, recuperações próximas a 100% foram observadas para ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{60}Ni , evidenciando que não ocorrem interferências espectrais causadas pelo C. Por outro lado, recuperação de 131% foi obtida nos ensaios de recuperação para ^{52}Cr em soluções contendo 500mg L^{-1} de C possivelmente, devido à formação do íon poliatômico $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ que resulta em resposta superestimada para este isótopo.

Tabela 3. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{60}Ni para soluções contendo diferentes concentrações de C (média e desvio padrão para n=3).

Isótopos	Interferências	Concentração de C (mg L ⁻¹)				
		100	250	500	1000	2000
^{52}Cr	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$	97 ± 6	106 ± 8	131 ± 4	171 ± 3	239 ± 1
^{53}Cr	$^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$	101 ± 9	93 ± 3	100 ± 2	106 ± 2	116 ± 4
^{60}Ni	Espécies contendo C e O	98 ± 2	95 ± 2	102 ± 4	105 ± 6	117 ± 8

Por sua vez, para a determinação de ^{53}Cr e ^{60}Ni foram observados valores superestimados para soluções contendo, pelo menos, 2000 mg L⁻¹ de C. Neste caso, as recuperações insatisfatórias para ^{53}Cr e ^{60}Ni devem-se, possivelmente, à formação de íons poliatômicos interferentes, $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ e espécies contendo C e O, respectivamente. Vanhoe e colaboradores⁸ também obtiveram valores superestimados para ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{60}Ni quando soluções contendo diferentes concentrações de carbono foram analisadas por ICP-MS.

Trabalhos reportados na literatura têm mostrado que a presença de C nos digeridos pode promover o aumento do sinal para alguns elementos como, por exemplo, As, Hg, I, Sb, Se, entre outros, devido aos mecanismos de transferência de carga do C durante o processo de ionização destes elementos.^{7,48,94} Desta forma, foi avaliada a influência da concentração de C na determinação de As e Hg em soluções contendo 125, 250, 500, 1000 a 2000 mg L⁻¹ de C. Primeiramente, não foi observado aumento significativo na resposta para Hg para as soluções contendo diferentes concentrações de C. Por outro lado, para As foi observado aumento significativo (recuperação superior a 109%) da intensidade do sinal para soluções contendo concentração superior a 250 mg L⁻¹ de C (Figura 8).

⁷ Grindlay, G. *et al.* *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.

⁸ Vanhoe, H. *et al.* *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.

⁴⁸ Larsen, E. H., Sturup, S. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 1099-1105.

⁹⁴ Hu, B. *et al.* *Analytica Chimica Acta* 650 (2009) 23-32.

Deste modo, para obtenção de melhores resultados nas determinações de As em amostras de fármacos, é importante que a concentração de C nos digeridos sejam inferiores a 250 mg L^{-1} . Felizmente, a concentração de C nos digeridos dos fármacos avaliados, utilizando o sistema UltraWave[®] foram inferiores a 250 mg L^{-1} de C.

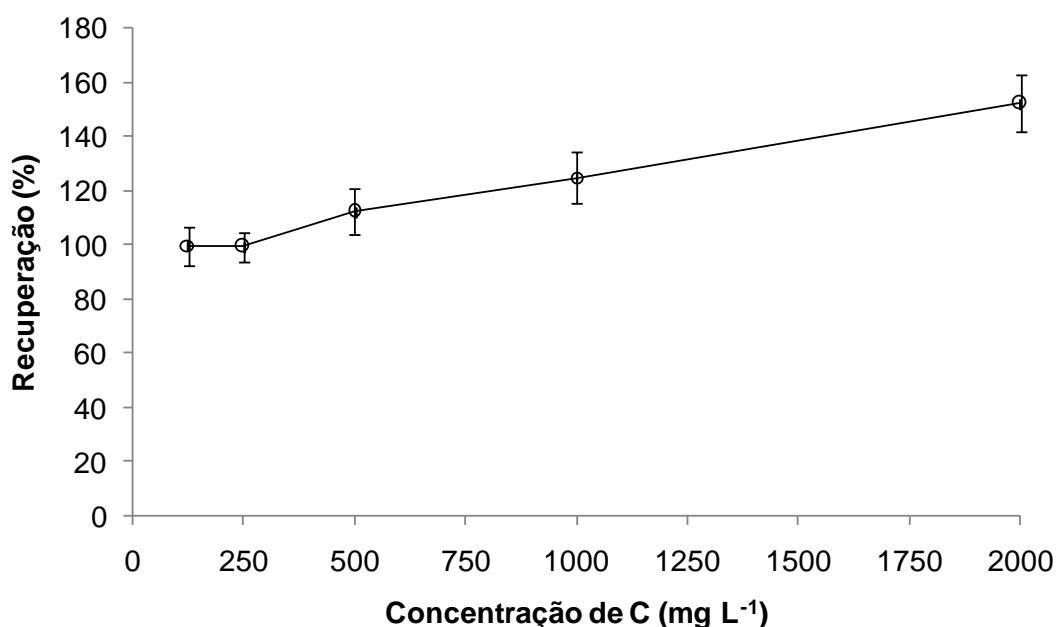


Figura 8. Efeito da concentração de C na recuperação de As utilizando soluções de referência.

Em um segundo momento, foi avaliada a influência da concentração de carbono residual dos digeridos de LEVO na determinação das impurezas elementares por ICP-MS. O LEVO é um fármaco que apresenta em sua estrutura molecular somente átomos de C, H, O e N, minimizando assim a possibilidade da ocorrência de interferências poliatômicas durante a determinação por ICP-MS. Assim, foram decompostas massas de 100, 250 e 500 mg de LEVO em 6 mL de HNO_3 concentrado em sistema UltraWave[®] e procedeu-se a adição prévia de alíquota de uma solução de referência de forma a produzir digeridos contendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de todos os elementos de interesse. Inicialmente, foi determinada a concentração de carbono residual dos digeridos por ICP OES e, posteriormente, foram realizadas as

determinações dos elementos de interesse por ICP-MS. O teor de carbono residual para as amostras de 100, 250 e 500 mg foi inferior a 250 mg L⁻¹ de C. De acordo com os resultados obtidos não foi observada interferência na determinação de ⁵²Cr, ⁵³Cr, ⁶⁰Ni e ⁷⁵As por ICP-MS devido aos baixos teores de carbono residual.

4.1.3 Efeito da concentração de cloro na determinação de impurezas elementares por ICP-MS

Devido à existência de muitos fármacos na forma de cloridrato, realizaram-se alguns estudos com o objetivo de verificar a influência da concentração de cloro nas amostras durante as determinações dos analitos por ICP-MS. Primeiramente, foram feitos testes com soluções de referência contendo 5 µg L⁻¹ de todos os elementos em soluções com diferentes concentrações de cloro: 50, 100, 250, 500, 1000 e 2000 mg L⁻¹. Todos os padrões foram preparados em HNO₃ 5% (v/v) partindo-se de uma solução estoque de Cl de 10 g L⁻¹ preparada a partir de HCl em água purificada. As concentrações de Cl foram selecionadas a partir da quantidade de Cl presente em 500 mg de PROP.

Interferências espectrais foram observadas para ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵³Cr e ⁷⁵As, conforme os resultados na Tabela 4. Para os demais elementos recuperação apropriados (entre 91 a 109%) foram obtidas, exceto para Os (141%).

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 4) foi possível observar que as recuperações foram apropriadas (de 91 a 109%) para ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵³Cr e ⁷⁵As quando solução de 50 mg L⁻¹ de Cl foram analisadas. Contudo, durante a análise de soluções com concentrações Cl iguais ou maiores a 100 mg L⁻¹ de Cl, recuperações superiores a 109% foram obtidas para ⁵¹V, ⁵²Cr e ⁷⁵As, devido as interferências causadas pelos íons poliatômicos ³⁵Cl¹⁶O⁺ e ³⁷Cl¹⁴N⁺; ³⁵Cl¹⁶OH⁺ e ³⁵Cl¹⁷O⁺; e ⁴⁰Ar³⁵Cl⁺, respectivamente. Além disso, observaram-se, recuperações superiores a 109% para ⁵³Cr em soluções com concentrações de Cl superiores a 500 mg L⁻¹ devido às interferências causadas pelos íons poliatômicos ³⁵Cl¹⁸O⁺ ou ³⁷Cl¹⁶O⁺ e ³⁵Cl¹⁶OH⁺, conforme pode ser observado na Tabela 4. Estas interferências também foram observadas por Vanhoe e colaboradores,⁸ os quais relatam interferências significativas para ⁵¹V, ⁵³Cr e ⁷⁵As em soluções contendo 5 mg L⁻¹ de Cl.

⁸ Vanhoe, H. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.

Tabela 4. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{75}As para soluções contendo diferentes concentrações de Cl (média e desvio padrão, n=3).

Isótopos	Interferências	Concentração de Cl (mg L^{-1})					
		50	100	250	500	1000	2000
^{51}V	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}^+$	108 ± 7	121 ± 2	132 ± 5	172 ± 6	223 ± 3	325 ± 4
^{52}Cr	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$	96 ± 8	98 ± 2	108 ± 4	115 ± 2	122 ± 6	123 ± 2
^{53}Cr	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$	109 ± 9	138 ± 5	170 ± 3	258 ± 5	388 ± 4	648 ± 6
^{75}As	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$	106 ± 6	115 ± 1	121 ± 4	140 ± 1	172 ± 2	223 ± 1

Neste trabalho, foram feitos ensaios de recuperação dos analitos nos digeridos de PROP obtidos pelo sistema UltraWave[®]. Deste modo, 100, 250 e 500 mg (contendo 400, 1000 e 2000 mg L^{-1} de Cl) do fármaco PROP foram decompostas utilizando 6 mL de HNO_3 concentrado.

Neste sentido, recuperações apropriadas (entre 91 e 109%) foram obtidas para todos os analitos, nas diferentes massas digeridas, com exceção de ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{75}As (Figura 9), além de Os em que valores de recuperações superiores a 179% foram obtidos para todos os isótopos. Quando massas de 100 mg de PROP foram decompostas, foram obtidas recuperações superiores a 130% para ^{53}Cr devido à formação de íons poliatômicos $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$. Nestes digeridos, a concentração esperada seria de, aproximadamente, 400 mg L^{-1} de Cl. Além disso, de acordo com os resultados obtidos para soluções de referência, também deveriam ter sido observadas, recuperações superiores a 109% para ^{51}V , ^{52}Cr e ^{75}As em digeridos de 100 mg de PROP. No entanto, foram obtidas recuperações apropriadas para estes elementos e para tentar elucidar este fato, foi determinada a concentração de Cl nos digeridos de PROP utilizando cromatografia de íons. A partir dos resultados obtidos foram observadas perdas de 70% da concentração teórica de Cl presente no fármaco. Os resultados obtidos foram de aproximadamente 120, 300 e 600 mg L^{-1} de Cl em solução para massas de 100, 250 e 500 mg, respectivamente. Assim, justifica-

se o fato de não terem sido observadas interferências muito acentuadas na determinação de ^{51}V , ^{52}Cr e ^{75}As nos digeridos de 100 mg de PROP em comparação com as interferências observadas para as soluções de referência. Para os digeridos contendo massas de amostra de PROP iguais ou superiores a 250 mg foram observadas recuperações superiores a 109% para ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{75}As (Figura 9).

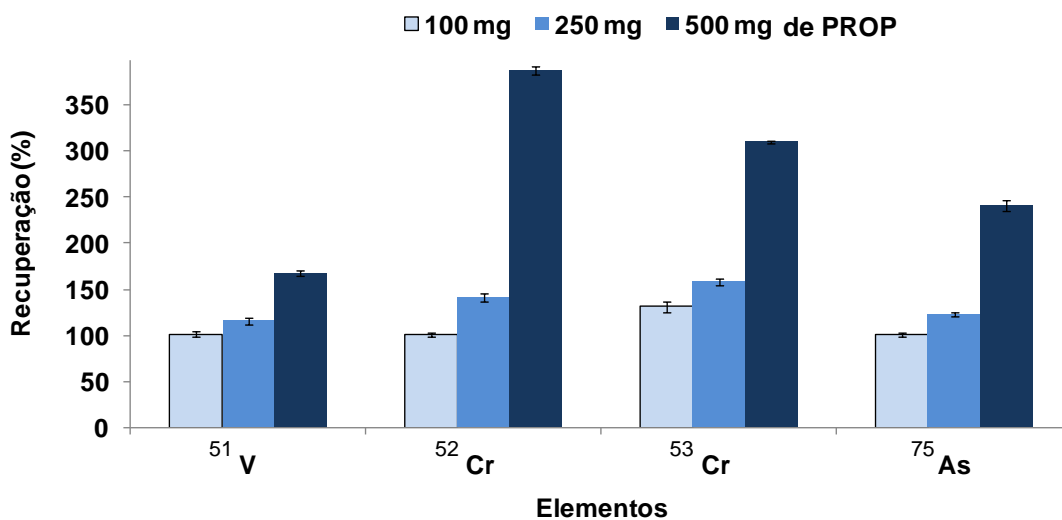


Figura 9. Efeito da concentração de Cl presente em diferentes massas de PROP (cloridrato de propranolol) após decomposição no sistema UltraWave[®], na determinação de ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{75}As (n=3).

Desta forma, neste trabalho optou-se por minimizar as interferências sobre os isótopos ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{75}As , permitindo a utilização de massas de até 500 mg do fármaco PROP. Para tanto, as determinações foram feitas utilizando ICP-MS e DRC, com o objetivo de eliminar as interferências de ^{51}V , ^{52}Cr e ^{53}Cr . A escolha da melhor vazão do gás amônia e a otimização do parâmetro de rejeição (RPq) foram feitos utilizando uma solução padrão de 5000 mg L⁻¹ de Cl (branco/interferente) e uma solução padrão de 5000 mg L⁻¹ de Cl contendo 5 µg L⁻¹ de V e Cr (analito + interferente). Cabe destacar que solução de referência de 5000 mg L⁻¹ apresenta concentração de Cl superior àquela presente em 500 mg do fármaco PROP. A vazão de amônia (gás de reação) foi avaliada de 0,1 a 1,2 mL min⁻¹ e a condição de compromisso foi ajustada em 0,4 mL min⁻¹ a partir dos valores de LD fornecidos pelo software do equipamento. Em seguida, o RPq foi ajustado em 0,65; 0,40 e 0,40 para

^{51}V , ^{52}Cr e ^{53}Cr , respectivamente, a fim de obter os melhores LDs. Após otimização dos parâmetros da DRC foram obtidas recuperações entre 91 e 109% para ^{51}V , ^{52}Cr e ^{53}Cr nos digeridos com massas de até 500 mg de PROP.

Para a determinação de ^{75}As sem interferências, foi utilizada FI-CVG-ICP-MS. Dessa forma, foi utilizada solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ e NaBH₄ 0,1 mol L⁻¹ conforme descrito por Duarte e colaboradores.⁸⁰ Assim, foram obtidas recuperações apropriadas para As mesmo utilizando massas de amostras de 500 mg de PROP.

Por fim, a utilização de DRC e FI-CVG-ICP-MS permitiu a determinação de ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{75}As livre de interferências poliatômicas em digeridos contendo Cl.

4.1.4 Efeito da concentração de enxofre na determinação de impurezas elementares por ICP-MS

Nas farmacopéias são encontrados diversos fármacos que apresentam enxofre em sua estrutura química. Dessa forma, foram investigadas as interferências causadas pelo S presente na matriz do fármaco na determinação dos analitos por ICP-MS. Inicialmente, foram avaliadas soluções de referência contendo 5 µg L⁻¹ dos analitos e concentrações crescentes de S. Posteriormente, diferentes massas SULF (apresenta S em sua estrutura química) foram decompostas no sistema UltraWave[®], e os digeridos contendo 5 µg L⁻¹ dos analitos foram analisados por ICP-MS.

As soluções de S foram preparadas a partir da diluição de H₂SO₄ concentrado de forma a produzir soluções contendo 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 mg L⁻¹ de S em HNO₃ 5%. Em seguida, foram feitas determinações de V, Cr, Mn, Ni, Cu, As, Mo, Ru, Rh, Pd, Cd, Os, Ir, Pt, Hg e Pb por ICP-MS. As principais interferências espectrais causadas por espécies contendo S podem ser observadas para isótopos ^{52}Cr e ^{65}Cu . Para o isótopo ^{52}Cr é observada a interferência causada pela formação da espécie poliatômica $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$, enquanto que para ^{65}Cu as interferências são causadas pela formação de espécies contendo S, O e H.⁸

A partir da análise dos resultados da Tabela 5, foram observadas recuperações superiores a 117% para ^{65}Cu para soluções de referência com concentrações igual ou superiores a 100 mg L⁻¹ de S. Por outro lado, não foram

⁸ Vanhoe, H. *et al.* *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.

observadas interferências na determinação de ^{52}Cr para concentração de até 4000 mg L⁻¹ de S. Neste caso, a interferência é causada pelo íon poliatômico que contém o isótopo ^{36}S de pequena abundância natural (0,02%).

É importante destacar que as recuperações superiores a 109% para ^{65}Cu devem-se, provavelmente, a formação de íons poliatômicos e não devido a interferências físicas (devido à viscosidade, por exemplo) durante o processo de nebulização. Isso pode ser comprovado, já que não foram observadas recuperações fora da faixa de aceitação (91 a 109%) para os demais analitos.

Tabela 5. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ^{52}Cu e ^{65}Cr para soluções contendo diferentes concentrações de S (média e desvio padrão, n=3).

Isótopos	Interferências	Concentração de S (mg L ⁻¹)						
		50	100	250	500	1000	2000	4000
^{52}Cr	$^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$	99 ± 5	106 ± 2	96 ± 4	105 ± 7	107 ± 6	101 ± 3	99 ± 2
^{65}Cu	Espécies contendo S, O e H	106 ± 5	118 ± 3	136 ± 5	150 ± 3	182 ± 3	232 ± 4	388 ± 8

Posteriormente, foi feita a decomposição do fármaco SULF com o objetivo de avaliar a influência da matriz contendo S na determinação dos analitos. Deste modo, foram decompostos 100, 250 e 500 mg do fármaco em sistema UltraWave[®] com 6 mL de HNO₃ concentrado. Previamente à decomposição, foi adicionada uma alíquota de uma solução de referência de forma que o digerido final contivesse 5 µg L⁻¹ de todos os analitos. Foi possível observar que ao decompor massas iguais ou superiores a 100 mg do fármaco foram obtidas recuperações superiores a 133% na determinação de ^{65}Cu .

Com o objetivo de resolver a interferência sobre o isótopo ^{65}Cu para os digeridos contendo 500 mg do fármaco SULF, foi utilizada a DRC-ICP-MS. A escolha da melhor vazão de amônia e a otimização do parâmetro de rejeição (RPq) foram feitos utilizando uma solução de referência de 5000 mg L⁻¹ de S (branco/interferente) e uma solução de referência de 5000 mg L⁻¹ de S contendo 5 µg L⁻¹ de Cu (analito + interferente). Cabe destacar que a solução de referência de 5000 mg L⁻¹ de S contém

concentração de S superior aquela presente em 500 mg do fármaco SULF. Após a realização dos testes de otimização da DRC, foram selecionadas a vazão de amônia de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e RPq de 0,4, uma vez que, apresentaram os melhores valores de LD.

Assim, foi possível a determinação de impurezas elementares nos digeridos utilizando até 500 mg de SULF. Além disso, foram observadas interferências somente na determinação de ^{65}Cu as quais foram solucionadas com a utilização de DRC-ICP-MS.

4.1.5 Efeito da concentração de fósforo na determinação de impurezas elementares por ICP-MS

Alguns fármacos podem apresentar em sua estrutura química o elemento P o qual é responsável pela formação de interferências poliatômicas na determinação de algumas impurezas elementares. Desta forma, foram estudadas as possíveis interferências causadas por soluções de referência contendo P e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos. Adicionalmente, massas de PRIM foram decompostas com 6 mL de HNO_3 concentrado em sistema UltraWave[®] e os digeridos foram analisados por ICP-MS. É importante salientar que somente serão apresentados os isótopos que sofreram interferências e apresentaram resposta analítica fora da faixa de aceitação (91 a 109%).

Soluções com concentrações crescentes de P (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 mg L^{-1}) foram preparadas a partir da diluição de ácido fosfórico (10 g L^{-1}), em HNO_3 5%. De acordo com a Tabela 6, foram observadas interferências na determinação de ^{63}Cu e ^{65}Cu . Neste sentido, recuperações superiores a 155% foram observadas para ^{63}Cu quando soluções de referência de 500 mg L^{-1} de P foram analisadas. Esta interferência ocorre devido à formação de provável íon poliatômico formado por P e O. Por outro lado, para ^{65}Cu foram observadas recuperações superiores a 170% para soluções contendo concentração superior a 1000 mg L^{-1} de P.

No que diz respeito aos ensaios de recuperação nos digeridos de PRIM, foram decompostas massas de 100, 250 e 500 mg do fármaco, com o objetivo de verificar a influência da concentração de P na determinação de ^{63}Cu e ^{65}Cu . Para massas de

100 mg de PRIM, foram observadas recuperações de 220% para ^{63}Cu . Para ^{65}Cu , foram obtidas recuperações de 156% para digeridos contendo massas de 250 mg de PRIM.

Tabela 6. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ^{63}Cu e ^{65}Cu para soluções contendo diferentes concentrações de P (média e desvio padrão, n=3).

Isótopos	Interferências	Concentração P (mg L ⁻¹)						
		50	100	250	500	1000	2000	4000
^{63}Cu	Espécies contendo P e O	99 ± 3	97 ± 4	104 ± 5	156 ± 7	257 ± 4	456 ± 6	943 ± 8
^{65}Cu	Espécies contendo P e O	101 ± 4	96 ± 4	97 ± 4	98 ± 5	171 ± 8	222 ± 15	487 ± 13

Com o objetivo de resolver as interferências sobre os isótopos ^{63}Cu e ^{65}Cu e, assim possibilitando o uso de massas de até 500 mg de PRIM, foi otimizado o método utilizando DRC-ICP-MS. As otimizações foram feitas utilizando solução de referência de 5000 mg L⁻¹ de P (branco/interferente) e uma solução de referência de 5000 mg L⁻¹ de P contendo 5 µg L⁻¹ de Cu (analito + interferente). É importante salientar que solução de referência de 5000 mg L⁻¹ de P apresenta concentração de P superior àquela presente em 500 mg de PRIM. A vazão de amônia selecionada foi de 0,4 mL min⁻¹ e os valores de RPq foram ajustados em 0,50 e 0,40 para ^{63}Cu e ^{65}Cu , respectivamente.

Desta forma, foi possível a determinação de impurezas elementares em PRIM utilizando até 500 mg deste fármaco e as interferências observadas foram minimizadas com a utilização de DRC.

4.1.6 Efeito da concentração de sódio na determinação de impurezas elementares por ICP-MS

Alguns elementos (por exemplo, o Na) podem alterar as características do plasma, causando supressão do sinal durante a determinação de diversos

elementos.⁷² Sob este aspecto, a presença de Na pode causar alterações nas condições de ionização do plasma e na transmissão dos analitos.⁹⁵ Como muitos fármacos estão disponíveis na forma de sais de sódio, houve a necessidade de avaliar a influência da concentração de Na no sinal analítico. Deste modo, foram feitos testes com solução de referência de concentrações crescentes de Na (50 a 2000 mg L⁻¹) preparadas a partir de diluições da solução de nitrato de sódio 10 g L⁻¹. Em todas as soluções sintéticas foram adicionadas alíquotas de uma solução de referência de forma a produzir soluções finais contendo o equivalente a 5 µg L⁻¹ de todos os analitos. Nas Figuras 10, 11, 12 e 13 estão mostrados os resultados da influência da concentração de Na nos valores de recuperação para os analitos. É importante destacar que foram mostrados somente os isótopos mais abundantes e livres de interferências, com exceção dos isótopos de ⁵³Cr, ⁹⁵Mo, ¹⁰¹Ru, ¹¹¹Cd, ¹⁸⁹Os e ²⁰⁷Pb que foram monitorados devido às interferências observadas nos isótopos mais abundantes. De acordo com as Figuras 10, 11, 12 e 13, é possível observar valores de recuperações apropriados para solução de referência contendo até 100 mg L⁻¹ de Na para todos os analitos, com exceção dos isótopos ¹⁸⁹Os, ¹⁹⁰Os e ⁶²Ni. Estes resultados mostram que não ocorre supressão do sinal analítico para soluções de referência contendo até 100 mg L⁻¹ de Na. Por outro lado, para soluções contendo concentrações igual ou superiores a 250 mg L⁻¹ foi observada supressão significativa do sinal analítico, já que recuperações inferiores a 91% foram obtidas. É importante destacar que a supressão do sinal analítico parece ser mais intensa para os isótopos de menor m/z, principalmente para soluções contendo concentrações de Na igual ou superiores a 500 mg L⁻¹. Por exemplo, para elementos como ⁵¹V e ⁵³Cr foram observadas recuperações de 66 e 69% (supressão de 34 e 31%) para soluções contendo 500 mg L⁻¹ de Na. Por outro lado nesta mesma solução de 500 mg L⁻¹ de Na foram obtidas recuperações de 83 e 85% para ¹⁹³Ir e ¹⁹⁵Pt, respectivamente. Efeito semelhante foi observado por Fraser e colaboradores⁷² durante avaliação do efeito de Na na supressão do sinal analítico para diferentes elementos.

Além disso, o íon Na pode ocasionar também interferências devido à formação de espécies poliatômicas contendo Na e O, e ⁴⁰Ar ²³Na⁺ sobre os isótopos ⁶²Ni e

⁷² Fraser, M. M., Beauchemin, D. *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 1705-1731.

⁹⁵ Dubuisson, C. et al. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 53 (1998) 593-600.

^{63}Cu , respectivamente. Na Tabela 7 são mostrados os valores de recuperação para ^{62}Ni e ^{63}Cu na presença de Na em diferentes concentrações. Somente para soluções contendo no máximo 50 e 100 mg L⁻¹ de Na foram obtidas recuperações apropriadas para ^{62}Ni e ^{63}Cu , respectivamente. Para ^{62}Ni foram obtidas recuperações entre 135 e 4458% quando foram analisadas solução de referência contendo de 100 a 2000 mg L⁻¹ de Na. A interferência sobre este isótopo de Ni é devido a formação da espécie poliatômica $^{23}\text{Na}^{23}\text{Na}^{16}\text{O}^+$. Já para ^{63}Cu , foram observadas recuperações entre 164 e 908% na presença de 250 a 2000 mg L⁻¹ de Na. Esta interferência poliatômica é causada pela formação da espécie poliatômica $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$.

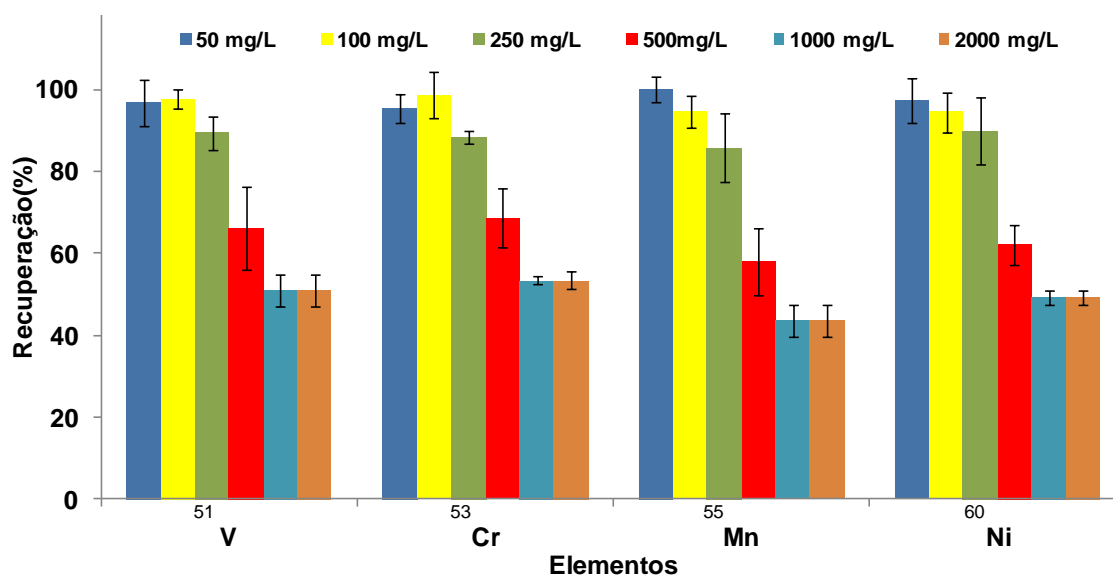


Figura 10. Efeito da concentração de Na na determinação de ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn e ^{60}Ni utilizando soluções de referência (n=3).

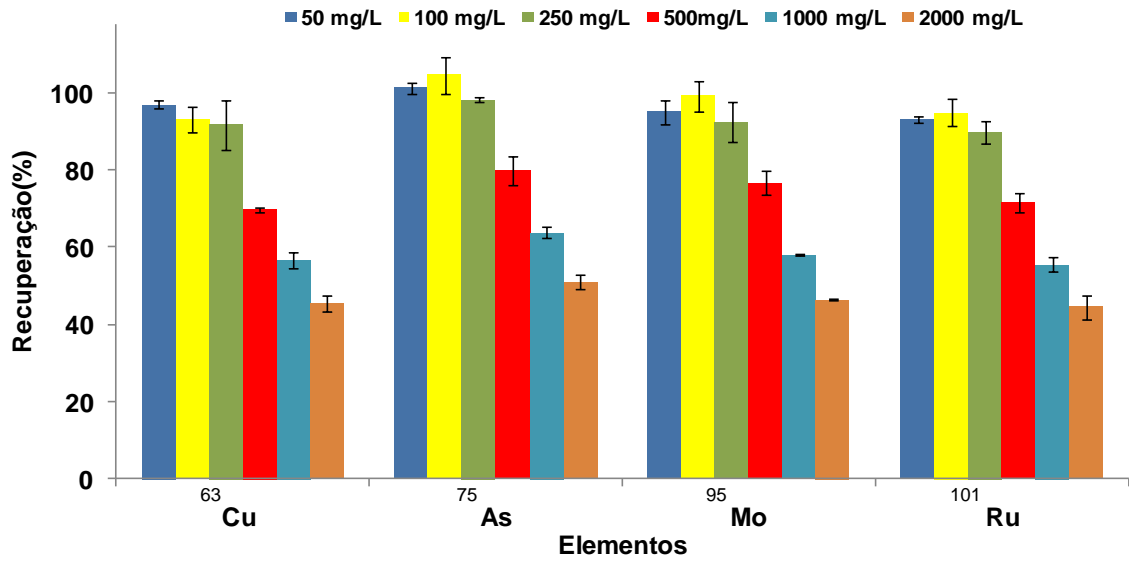


Figura 11. Efeito da concentração de Na na determinação de ^{63}Cu , ^{75}As , ^{95}Mo e ^{101}Ru utilizando soluções de referência (n=3).

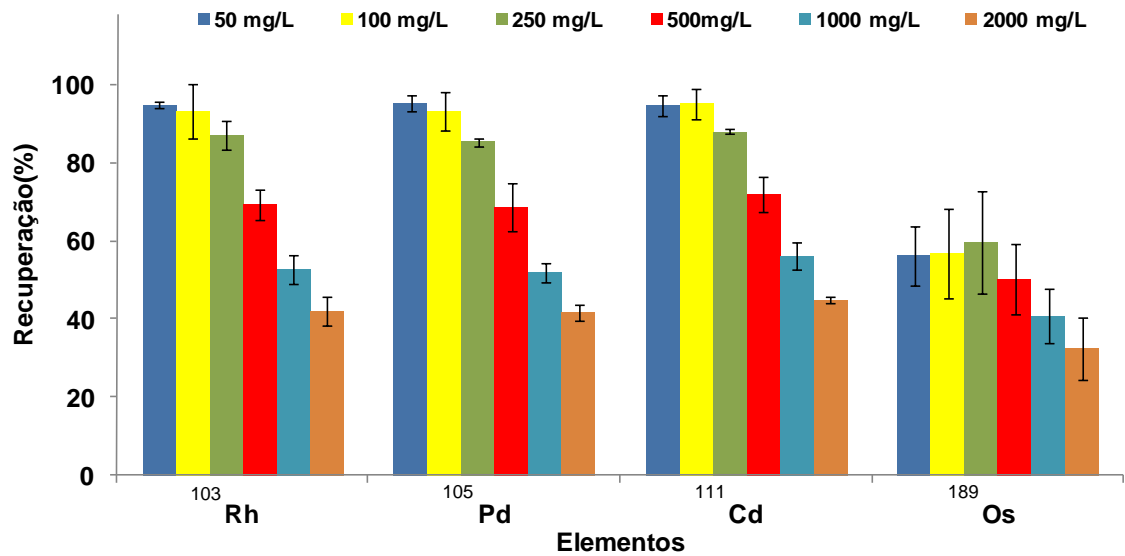


Figura 12. Efeito da concentração de Na na determinação de ^{103}Rh , ^{105}Pd , ^{111}Cd e ^{189}Os utilizando soluções de referência (n=3).

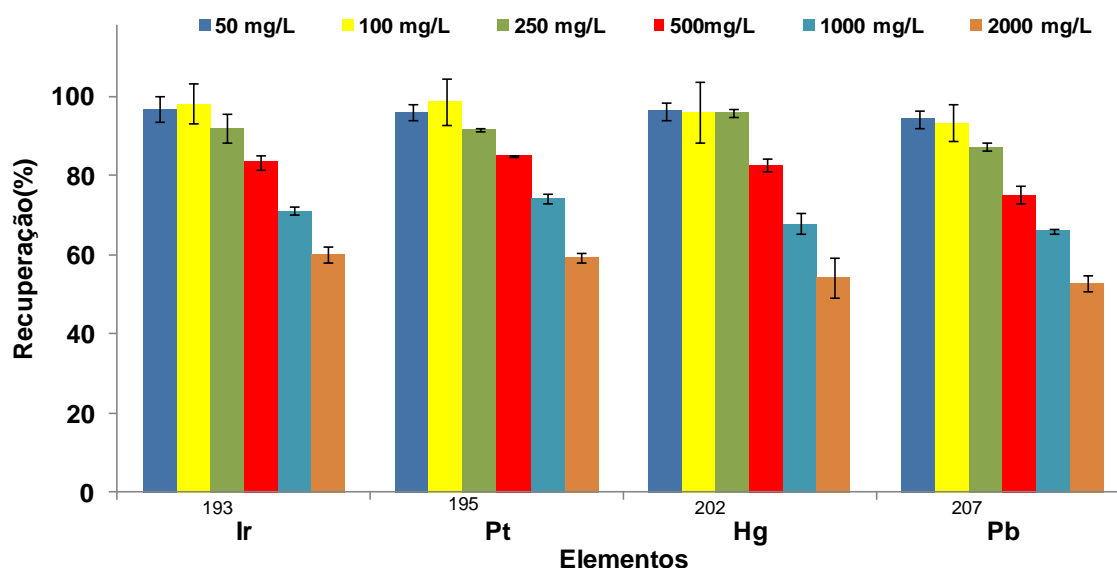


Figura 13. Efeito da concentração de Na na determinação de ¹⁹³Ir, ¹⁹⁵Pt, ²⁰²Hg e ²⁰⁷Pb utilizando soluções de referência (n=3).

Tabela 7. Interferências poliatômicas e resultados de recuperação (%) de ⁶²Ni e ⁶³Cu para soluções contendo diferentes concentrações de Na (média e desvio padrão, n=3).

Isótopos	Interferências	Concentração de Na (mg L ⁻¹)					
		50	100	250	500	1000	2000
⁶² Ni	Espécies contendo N e O	94 ± 2	135 ± 7	447 ± 1	1189 ± 12	2398 ± 31	4458 ± 23
⁶³ Cu	⁴⁰ Ar ²³ Na	98 ± 5	108 ± 1	164 ± 6	252 ± 6	485 ± 27	908 ± 24

Em um segundo momento, foram feitos experimentos utilizando o fármaco DICL que contém além do Na o elemento Cl na estrutura molecular. Neste sentido, deve-se tomar cuidado na avaliação da supressão do sinal para ⁷⁵As, ⁵³Cr e ⁵¹V, já que o Cl promove o aumento do sinal para os mesmos devido à formação de interferências poliatômicas. Massas de 25, 50, 100, 250 e 500 mg de amostra foram decompostas no sistema UltraWave[®] com 6 mL de HNO₃ concentrado e com prévia adição de alíquota de uma solução de referência perfazendo 5 µg L⁻¹ de todos os analitos. Os digeridos resultantes continham 60, 120, 240 e 600 mg L⁻¹ de Na

(valores teóricos) para massas de 25, 50, 100 e 250 mg, respectivamente. Para os digeridos contendo 25 mg de DICL, foram obtidas recuperações de 95 a 108% para a maioria dos analitos, exceto para Os. Para digeridos contendo massas iguais ou superiores a 50 mg de DICL (concentração superior a 120 mg L⁻¹ de Na), foram observadas recuperações inferiores a 91% para a maioria dos analitos, atestando a supressão do sinal analítico promovido pelo Na. Desta forma, para evitar a supressão do sinal analítico das impurezas elementares devem ser analisados os digeridos contendo no máximo 60 mg L⁻¹ de Na.

Para ⁵¹V, ⁵³Cr e ⁷⁵As não foi observada supressão significativa do sinal para estes isótopos, mesmo para os digeridos contendo 100 mg de DICL. Este comportamento diferenciado é justificado pela presença de Cl na estrutura do DICL que promove o aumento do sinal para estes isótopos, concorrendo com o efeito de supressão de sinal promovido por Na.

Para os isótopos ⁶²Ni e ⁶³Cu, foram observadas recuperações superiores a 148 e 124%, respectivamente, para os digeridos contendo 50 mg de DICL (Figura 14). Estes valores superestimados são produzidos pela presença de íons poliatômicos formados por Na e O, e ⁴⁰Ar²³Na⁺, respectivamente, que resultam em aumento do sinal e concorrem com a supressão causada pelo Na. Por fim, foi observado um aumento expressivo na recuperação de Os, provavelmente, devido à formação de espécies voláteis (OsO₄) e aos problemas de efeito de memória gerados já reportados na literatura.⁶

⁶ Van Hoecke, K., Catry, C., Vanhaecke, F., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1909-1919.

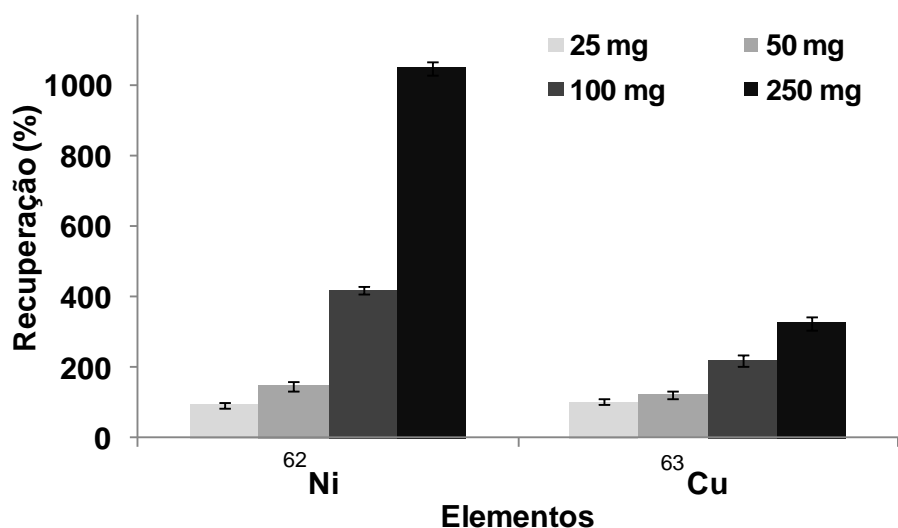


Figura 14. Efeito da concentração de Na presente em diferentes massas de DICL (diclofenaco de sódio), após decomposição no sistema UltraWave[®], na determinação de ^{62}Ni e ^{63}Cu (n=3).

Por fim, optou-se em não otimizar condições para o uso de DRC para solucionar as interferências poliatômicas nos isótopos ^{62}Ni e ^{63}Cu , já que a supressão do sinal analítico das demais impurezas elementares, promovido pelo sódio, não é passível de correção usando a DRC. Desta forma, é recomendado que os digeridos contêm concentração de Na inferior a 60 mg L^{-1} .

4.2 Métodos de preparo de amostras de fármacos

Inicialmente, foram feitos experimentos com o objetivo de otimizar as condições experimentais dos métodos de decomposição utilizando aquecimento com radiação micro-ondas. O objetivo destas otimizações foi avaliar a eficiência de decomposição e desenvolver métodos de decomposição que forneçam digeridos com baixo RCC e acidez residual reduzida para minimizar as interferências nas determinações das impurezas elementares por ICP-MS.

A eficiência de decomposição é dependente da temperatura e pressão, do tipo de reagentes utilizados, da concentração e do volume dos reagentes, do tempo de aquecimento e da quantidade e do tipo de carbono presente originalmente na

amostra.⁹⁶ Dessa forma, o RCC foi determinado nos digeridos por ICP OES a fim de avaliar a eficiência dos métodos de decomposição propostos, evitando possíveis interferências na determinação de alguns elementos por ICP-MS.

Como mencionado anteriormente, foram utilizados métodos de decomposição por via úmida em sistema MultiWave[®], decomposição por via úmida em sistema UltraWave[®], decomposição por MIC e decomposição por via seca. A eficiência destes métodos de decomposição foi comparada a partir dos valores de RCC. Os valores RCC foram calculados utilizando a massa de carbono originalmente presente na estrutura química dos fármacos.

Na comparação dos métodos de decomposição foram utilizados 7 fármacos com estruturas químicas diferentes: AMIT, IMIP, PROP, DICL, PRIM, LEVO e SULF.

Os fármacos foram decompostos utilizando inicialmente soluções de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ e recuperações satisfatórias foram obtidas para todos os analitos, com exceção de Os. Para tentar melhores recuperações de Os e considerando que Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru são solúveis em misturas de HNO₃ e HCl, água-régia normal e água régia invertida, estas soluções também foram utilizadas para a decomposição dos fármacos.

4.2.1 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema MultiWave[®]

O primeiro método de decomposição avaliado neste trabalho foi o que utiliza o sistema MultiWave[®] com massas de amostra de 100, 250 e 500 mg dos fármacos DICL, LEVO, PRIM, PROP e SULF, juntamente com 6 mL de HNO₃ concentrado (volume mínimo sugerido pelo fabricante). Por recomendação do fabricante, não foram utilizadas massas superiores a 500 mg de forma a evitar um aumento excessivo da pressão no interior dos frasco de quartzo.

O programa de aquecimento do forno de micro-ondas foi feito em duas etapas: a primeira com uma rampa de 10 minutos até potência de 1400 W e a segunda com permanência do aquecimento por 20 min nesta potência. O programa de aquecimento escolhido apresentou uma rampa de aquecimento, uma vez que, sem a mesma o programa de aquecimento excedia a taxa de 0,8 bar s⁻¹ e o equipamento

⁹⁶ Florian, D., Knapp, G. *Analytical Chemistry* 73 (2001) 1515-1520.

cessava a irradiação das micro-ondas. A temperatura máxima atingida durante a decomposição variou de 195 a 220 °C para todas as massas avaliadas e para os diferentes fármacos decompostos.

Todos os digeridos de DICL, LEVO, PRIM, PROP e SULF utilizando 500 mg de amostra e 6 mL de HNO₃ concentrado não apresentaram resíduos insolúveis. Desta forma, a eficiência de decomposição foi avaliada utilizando os valores de RCC. Neste sentido, na Figura 15 estão mostrados os valores de RCC obtidos para DICL, PRIM, PROP e SULF para diferentes massas dos fármacos. Como esperado, os valores de RCC aumentaram com o incremento de massa de amostra. Para 500 mg os valores de RCC foram de 32,1% (3470 mg L⁻¹ de C nos digeridos), 14,1% (933 mg L⁻¹ de C nos digeridos), 5,1% (405 mg L⁻¹ de C nos digeridos), 3,6% (330 mg L⁻¹ de C nos digeridos) para PROP, PRIM, SULF e DICL, respectivamente. Os menores valores de RCC foram obtidos para os digeridos de LEVO, cujos valores de RCC foram inferiores a 1% (68 mg L⁻¹ de C nos digeridos).

A partir dos dados de RCC para os diferentes fármacos, percebe-se que a eficiência de decomposição está relacionada com a estrutura química destas substâncias. De uma forma geral, os fármacos apresentam em suas estruturas químicas anéis aromáticos, cuja reatividade é dependente dos substituintes ligados a esta estrutura. Neste contexto, os menores valores de RCC foram observados para LEVO que apresenta um anel aromático com dois grupamentos –OH (Figura 16 b) em sua estrutura química, que comportam-se como substituintes com característica de ativante forte.

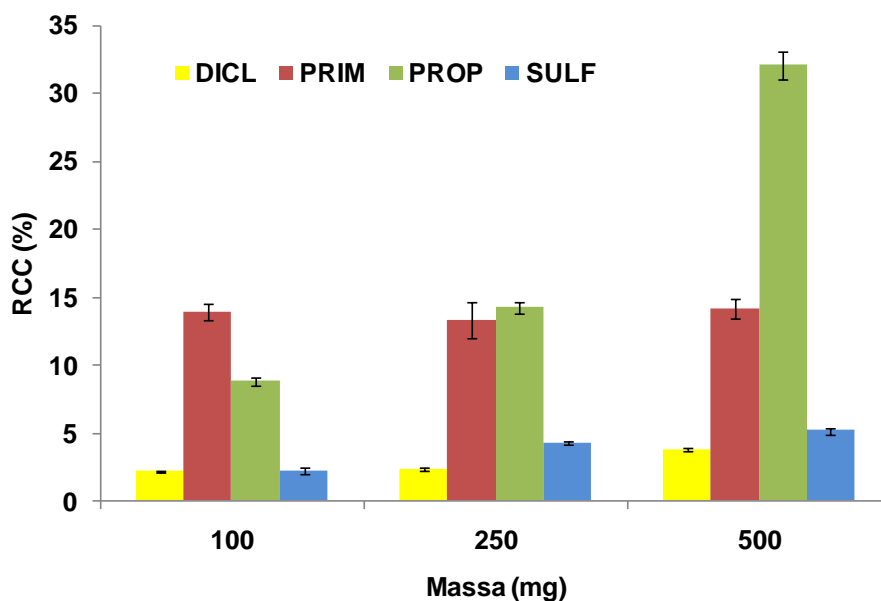


Figura 15. Resultados de RCC após decomposição de 100, 250 e 500 mg de PROP (cloridrato de propranolol), PRIM (difosfato de primaquina) DICL (diclofenaco de sódio) e SULF (sulfametoxazol) por método de decomposição por via úmida em sistema MultiWave[®] com 6 mL de HNO₃.

De acordo com Würfels e colaboradores,⁴⁵ substituintes com características ativantes fortes, como –OH, facilitam a oxidação do anel aromático com HNO₃. O fármaco SULF (Figura 16 e), por sua vez, apresenta em sua estrutura química um substituinte –NH₂ que também facilita a oxidação com ácido nítrico e, conseqüentemente, a obtenção de baixos valores de RCC. O DICL (Figura 16 a) é constituído por dois anéis aromáticos isolados que produzem digeridos com baixo valor de RCC, já que há presença de um substituinte ativante (–NHR) em sua estrutura química.

Por outro lado, a presença de anéis aromáticos condensados diminui a reatividade química dos fármacos frente ao HNO₃ quando comparada à reatividade das estruturas contendo anéis aromáticos isolados. Neste sentido, os fármacos PRIM e PROP apresentam os maiores valores de RCC já que apresentam anéis aromáticos condensados em sua estrutura (Figura 16 c e d). Comparativamente, o PROP é a estrutura mais refratária à oxidação com HNO₃ do que o PRIM, já que o

⁴⁵ Würfels, M., Jackwerth, E., Stoepler, M. *Analytica Chimica Acta* 226 (1989) 1-16.

PROP apresenta apenas um substituinte –OR que é grupamento com características ativantes moderadas. O PRIM tem sua oxidação facilitada pela presença de um substituinte –NH considerado com característica ativante.

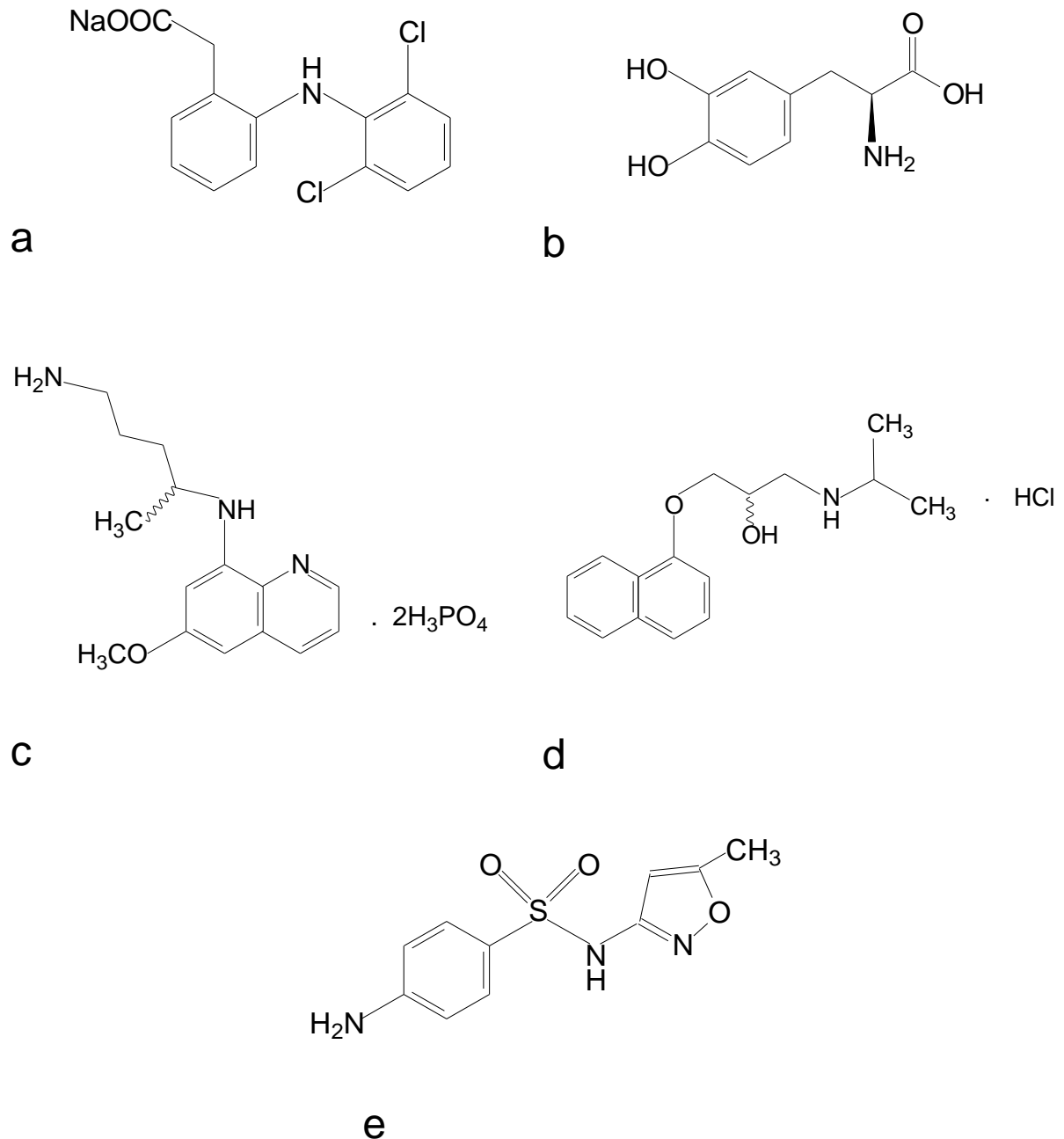


Figura 16. Estruturas químicas dos fármacos: a) DICL (diclofenaco de sódio), b) LEVO (levodopa), c) PRIM (difosfato de primaquina), d) PROP (cloridrato de propranolol) e, e) SULF (sulfametoxazol).

Também foi avaliada a decomposição dos fármacos AMIT e IMIP, que apresentam em sua estrutura três anéis aromáticos condensados (tricíclicos). Para estes fármacos, massas de 25, 50, 75 e 100 mg e 6 mL de HNO₃ foram avaliados com o sistema MultiWave[®]. Contudo, para ambos os fármacos (AMIT e IMIP), somente digeridos obtidos com 50 mg de amostra não apresentaram resíduo insolúvel. Os digeridos obtidos para 50 mg de AMIT e IMIP apresentaram valores de RCC de 19% (304 mg L⁻¹ de C no digerido) e 7% (89 mg L⁻¹ de C no digerido), respectivamente. Digeridos obtidos com massas superiores a 50 mg dos fármacos tricíclicos apresentaram material insolúvel ao final do programa de aquecimento, o que inviabiliza a etapa de determinação. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Barin e colaboradores¹⁸ que demonstraram o caráter extremamente refratário dos fármacos tricíclicos frente ao ataque com HNO₃. Além disso, ainda segundo os autores, temperaturas da ordem de 320 °C são necessárias para promover a eficiente oxidação dos fármacos tricíclicos.

Desta forma, todos os fármacos avaliados apresentaram concentração de C residual superior a 250 mg L⁻¹ para digeridos contendo massas de 500 mg quando foi utilizado o sistema MultiWave[®], exceto para a decomposição de LEVO. De acordo com os resultados obtidos para os testes de interferências com C em ICP-MS, observou-se aumento do sinal analítico para As em digeridos com concentração superior a 250 mg L⁻¹. Há a possibilidade de utilização de massas menores dos fármacos, contudo para fármacos como PROP somente massas da ordem de 100 mg puderam ser utilizadas, com prejuízo significativo dos LDs. Assim, para garantir a eficiente decomposição de massas de até 500 mg foram avaliados, também, os métodos de decomposição em sistema UltraWave[®] e MIC apresentados nas seções 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente.

Geralmente, água régia ou misturas de diferentes ácidos são utilizados como reagentes de decomposição quando se deseja determinar elementos do grupo da platina (Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru).⁹⁷ Entretanto, alguns autores já relataram na literatura dificuldades de decomposição de fármacos devido ao baixo poder oxidante da água régia e optaram pela decomposição destas amostras utilizando água régia invertida.⁶

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

⁹⁷ Balcerzak, M., *Analytical Sciences* 18 (2002) 737-750.

Deste modo, as amostras de fármacos foram também decompostas com água régia invertida com o objetivo de permitir a posterior determinação de Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru. Neste sentido, massas de amostras de 500 mg de DICL, LEVO, PROP e SULF foram decompostas com 4,5 mL de HNO₃ e 1,5 mL de HCl (água régia invertida) em sistema MultiWave[®]. Dos fármacos avaliados, somente a LEVO produziu digeridos sem a presença de material insolúvel e com valores de RCC inferiores a 1%. Os demais fármacos resultaram em digeridos com a presença de resíduos sólidos (SULF) e resíduos com características oleosas (PROP e DICL).

Neste contexto, foram avaliadas massas de 50, 100 e 250 mg dos fármacos SULF, PROP e DICL utilizando água régia invertida em sistema MultiWave[®]. No entanto, mesmo com a utilização de massas menores de amostras foram obtidos digeridos com material insolúvel. As Figuras 17, 18 e 19 apresentam o aspecto das soluções de PROP, DICL e SULF de 100 mg em 4,5 mL de HNO₃ e 1,5 mL de HCl.

Assim, o sistema MultiWave[®] não foi apropriado para a decomposição dos fármacos utilizando água régia invertida e foram avaliados os métodos de decomposição com sistema UltraWave[®] e MIC.

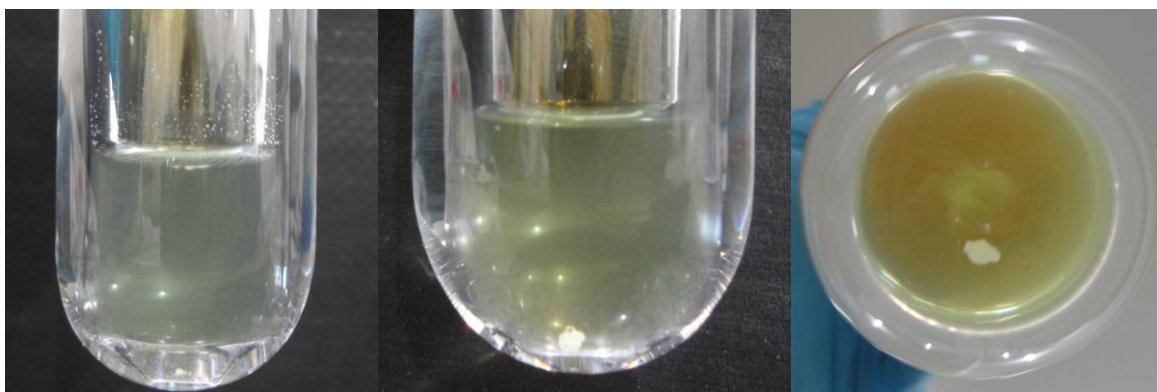


Figura 17. Digeridos de SULF (sulfametoxazol) obtidos com sistema MultiWave[®], empregando 100 mg de amostra e 6 mL de água régia invertida.

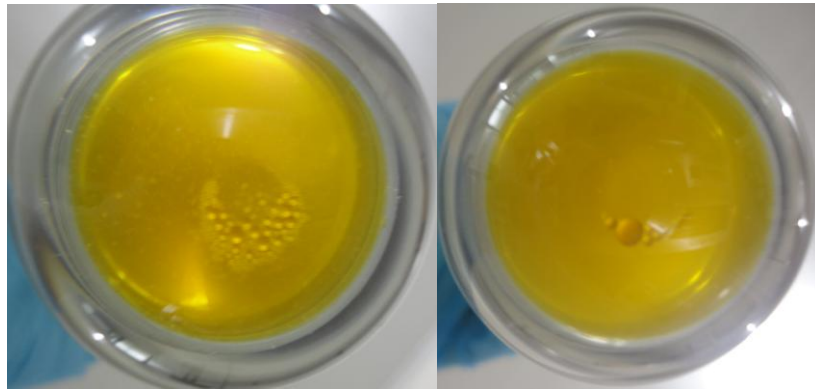


Figura 18. Digeridos de DICL (diclofenaco de sódio) obtidos com sistema MultiWave®, empregando 100 mg de amostra e 6 mL de água régia invertida.

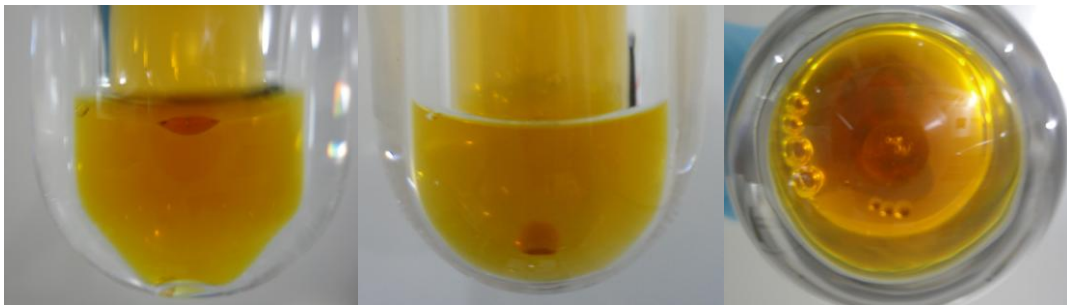


Figura 19. Digeridos de PROP (cloridrato de propranolol) obtidos com sistema MultiWave®, empregando 100 mg de amostra e 6 mL de água régia invertida.

Apesar dos valores de RCC superiores a 250 mg L^{-1} obtidos para os digeridos com HNO_3 e da presença de material insolúvel nos digeridos produzidos com água régia invertida com sistema MultiWave®, foram feitos ensaios de recuperação com todos os elementos estudados utilizando a LEVO. Os ensaios de recuperação foram feitos decompondo-se massas de 500 mg de LEVO com adição prévia dos elementos V, Cr, Mn, Ni, Cu, As, Mo, Cd, Hg e Pb (solução final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$), seguido da adição de 6 mL de HNO_3 concentrado. Da mesma forma, foram conduzidos os ensaios de recuperação para Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru em que 500 mg de LEVO foram decompostos com 6 mL de água régia invertida em sistema MultiWave® (solução final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$).

Após a análise dos digeridos, empregando somente com HNO₃, por ICP-MS foram obtidas recuperações compreendidas entre 93,6 a 105% para todos os analitos determinados. Também foram obtidos valores de recuperação apropriados (entre 91 a 109%) para os digeridos com água régia invertida, com exceção do Os.

4.2.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®]

O método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado UltraWave[®] utiliza uma câmara de reação, onde o rotor com os frascos de decomposição são alocados. Esta câmara é pressurizada com um gás inerte (neste trabalho foi utilizado argônio) e aquecida pela energia das micro-ondas. Este sistema apresenta algumas vantagens, tais como, controle de pressão e temperatura em todos os frascos, permitindo que elevadas massas de amostras sejam decompostas sem o risco de explosões. Além disso, pequenos volumes de ácidos podem ser utilizados (não havendo um mínimo recomendado), conseqüentemente menores valores de brancos podem ser obtidos. Além disso, em uma mesma rodada é possível decompor diferentes massas de amostra, bem como amostras com características de matrizes totalmente diferentes.⁹⁸

Neste trabalho, foi utilizado o sistema UltraWave[®] com o objetivo de avaliar a eficiência de decomposição de fármacos através da variação de algumas condições tais como massa de amostra (25 a 500 mg), volume de ácidos (3 e 6 mL), misturas de ácido (HNO₃ e HCl) e temperatura de aquecimento (170, 220 e 270 °C).

O programa de aquecimento utilizado foi baseado no tempo total do programa utilizado no método MultiWave[®] (total de 30 min) com temperaturas e pressões máximas de 280 °C e 199 bar. Quando se compara os sistemas MultiWave[®] e UltraWave[®], percebe-se que o último permite temperaturas e pressões maiores e, conseqüentemente, permite decomposições mais eficientes com digeridos apresentando menores valores de RCC.

Inicialmente, foi avaliado o desempenho do sistema UltraWave[®] utilizando um programa de aquecimento com uma rampa de 10 min com temperaturas finais de

⁹⁸ Milestone Srl, UltraWAVE, Operator Manual, 2013.

170, 220 e 270 °C e tempo de permanência de 20 min nestas temperaturas.⁹⁸ Nestes testes de avaliação da temperatura, foram utilizadas massas de 100, 250 e 500 mg de SULF com 3 ou 6 mL de HNO₃ concentrado e frascos de decomposição de quartzo de 15 mL. O rotor no qual são acondicionados esses frascos permite decomposição de até 15 amostras simultaneamente (Figura 20). Na Figura 21 está demonstrado o perfil típico do gráfico de aquecimento para temperatura e pressão durante a decomposição das amostras de fármaco.

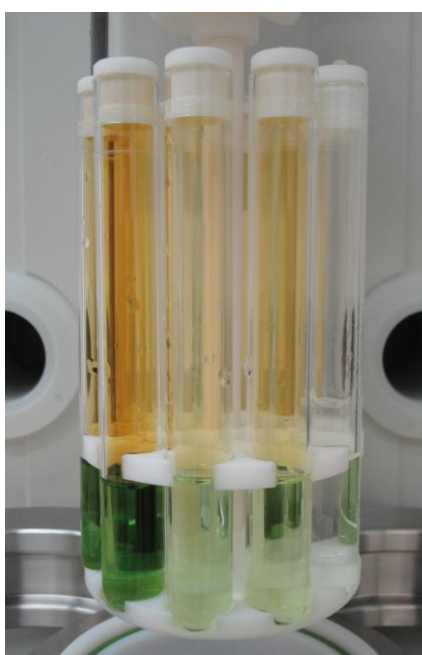


Figura 20. Decomposição de diferentes amostras de fármacos por sistema UltraWave® utilizando rotor de 15 posições e frascos de 15 mL cada.

⁹⁸ Milestone Srl, UltraWAVE, Operator Manual, 2013.

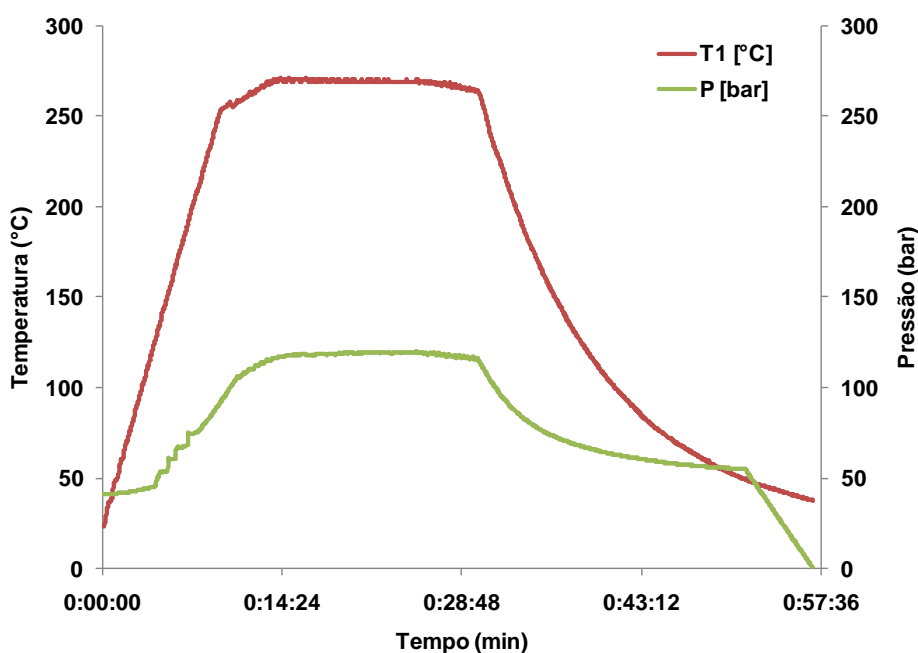


Figura 21. Perfil do programa de decomposição em sistema UltraWave[®] para temperatura de 270 °C, 500 mg de amostra e 6 mL de HNO₃.

Os digeridos obtidos no sistema UltraWave[®] para as diferentes massas de SULF, temperaturas e volume de HNO₃ foram analisados por ICP OES para determinar RCC e estão mostrados nas Figuras 22, 23 e 24. Inicialmente, é importante destacar que todos os digeridos obtidos nas diferentes condições não apresentaram material insolúvel, com exceção do digerido obtidos com 500 mg de SULF, 3 mL HNO₃ e temperatura de 170 °C. De um modo geral, como esperado, percebe-se que os menores valores de RCC foram obtidos para a temperatura de 270 °C, já que há um aumento do potencial de oxidação do HNO₃ com o aumento da temperatura. Além disso, é possível observar que os valores de RCC são menores para os digeridos obtidos com 6 mL de HNO₃. Adicionalmente, os valores de RCC independem da massa de amostra utilizada, já que não há diferença significativa para os valores de RCC obtidos para as massas de 100, 250 e 500 mg de SULF em uma mesma temperatura. Foram obtidos valores de RCC de 3,1% (49 mg L⁻¹ de C); 3,2% (127 mg L⁻¹ de C) e 2,9% (230 mg L⁻¹ de C) quando 100, 250 e 500 mg de SULF foram decompostos em temperatura de 270 °C, respectivamente. Isto se deve à característica do sistema UltraWave[®], em que não há limitação da pressão do

sistema permitindo que maiores temperaturas sejam atingidas garantindo a eficiente decomposição das amostras.

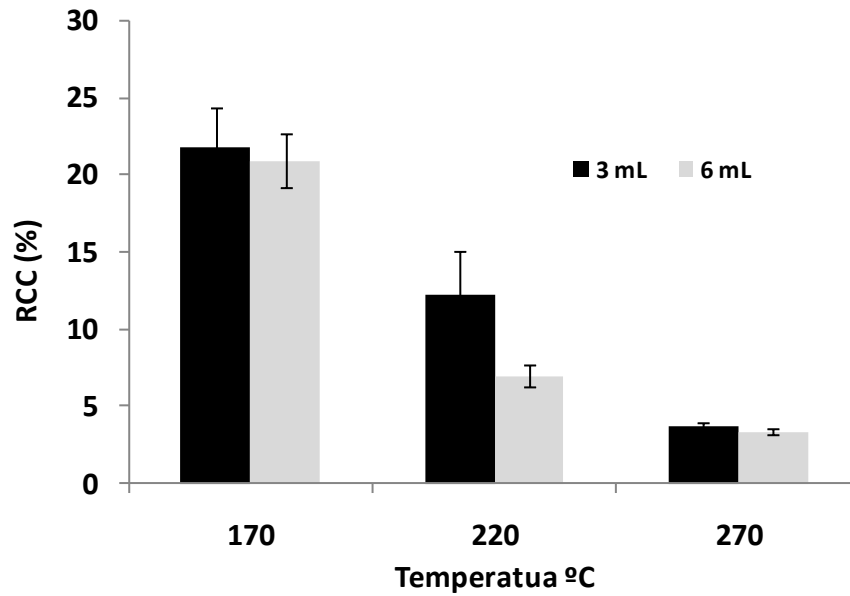


Figura 22. Resultados de RCC obtidos após decomposição, por sistema UltraWave[®], de 100 mg de SULF (sulfametoxazol) com 3 e 6 mL de HNO₃ nas temperaturas de 170, 220 e 270 °C.

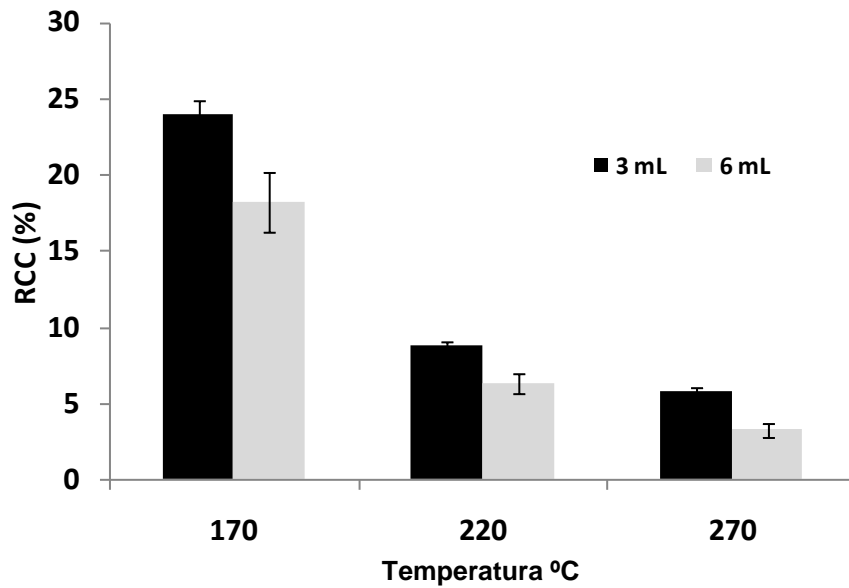


Figura 23. Resultados de RCC obtidos após decomposição, por sistema UltraWave[®], de 250 mg de SULF (sulfametoxazol) com 3 e 6 mL de HNO₃ a nas temperaturas de 170, 220 e 270 °C.

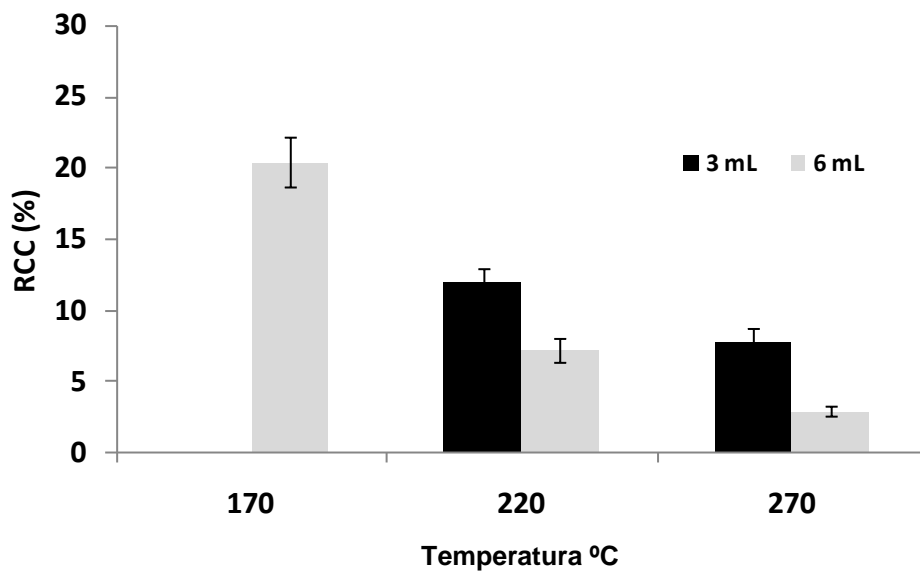


Figura 24. Resultados de RCC obtidos após decomposição, por sistema UltraWave[®], de 500 mg de SULF (sulfametoxazol) com 3 e 6 mL de HNO₃ a nas temperaturas de 170, 220 e 270 °C.

Massas de 500 mg de LEVO, DICL, PRIM e PROP também foram decompostas com 6 mL de HNO₃ e 270 °C a fim de avaliar a eficiência de decomposição do sistema UltraWave®. Todas as amostras com massas de 500 mg produziram digeridos sem a presença de material insolúvel. Os valores RCC para PROP, DICL, PRIM, LEVO foram de 1,8% (193 mg L⁻¹ de C), 1,9% (167 mg L⁻¹ de C), 0,9% (59 mg L⁻¹ de C) e 0,5% (45 mg L⁻¹ de C), respectivamente.

Assim, os digeridos de todos os fármacos apresentaram RCC inferior a 250 mg L⁻¹ quando 500 mg foram digeridos no sistema UltraWave®. Com esta concentração de C, foi possível minimizar a ocorrência de interferências poliatômicas produzidas por este elemento, especialmente para a subsequente determinação de As. Além disso, é importante destacar que a acidez residual dos digeridos, com 500 mg dos diferentes fármacos e 6 mL de HNO₃, foi de somente 25% do HNO₃ original, ou seja, em torno de 6% de HNO₃.

O método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave® foi, também, avaliado com água régia invertida para decomposição de todos os fármacos e posterior determinação de Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru. Desta forma, massas de 100, 250 e 500 mg de PROP, DICL, PRIM, LEVO e SULF foram decompostas com 4,5 mL de HNO₃ e 1,5 mL de HCl. Massas de 100 e 250 mg de todos os fármacos foram eficientemente decompostas e os digeridos não apresentaram material insolúvel. Os digeridos, obtidos com massas menores que 250 mg para todos os fármacos com água régia invertida, apresentaram valores de RCC inferiores a 250 mg L⁻¹.

Por fim foram feitos os ensaios de recuperação para V, Cr, Mn, Ni, Cu, As, Mo, Cd, Hg e Pb, nos digeridos obtidos com 500 mg de LEVO e 6 mL de HNO₃, bem como para Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru nos digeridos produzidos com 250 mg de LEVO e 6 mL de água régia invertida. Todos os elementos foram adicionados a fim de perfazer uma solução com concentração final de 5 µg L⁻¹.

Para os ensaios de recuperação dos digeridos empregando HNO₃ foram obtidos valores de recuperação compreendidos entre de 97 a 105% para todos os analitos. Já para os digeridos com água régia invertida, recuperações entre 96 a 101% foram obtidas para todos os analitos, com exceção do Os, cujos valores de recuperação foram superiores a 209%.

Ensaio de recuperação foram, também, feitos com PROP que apresenta estrutura química mais refratária à oxidação com HNO₃ dentre os fármacos avaliados.

Neste caso, recuperações apropriadas (entre 91 a 109%) foram obtidas para todos os analitos, com exceção de ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr e ^{75}As que resultaram em recuperações superiores a 109%. Isto se deve a presença de Cl na estrutura química que produz interferência poliatômica na determinação ^{51}V , ^{52}Cr e ^{53}Cr . Para contornar estas interferências, a determinação destes elementos foi feita por ICP-MS no modo DRC, obtendo-se valores de recuperação entre 94 e 105%. Para a determinação de ^{75}As , ^{200}Hg e ^{202}Hg , foi utilizado FI-CVG-ICP-MS com recuperações entre 96 e 101%.

Adicionalmente, foram feitos ensaios de recuperação nos digeridos obtidos com 250 mg de PROP e água régia invertida para os elementos com maior solubilidade em meio clorídrico. Recuperações entre 94 a 100% foram obtidos para todos os isótopos, exceto para Os cujas recuperações foram superiores a 190%.

Com o objetivo de avaliar a exatidão deste método de decomposição, ensaios de recuperação com padrões de sais orgânicos (utilizados frequentemente como catalisadores) foram, também, avaliados. Para tanto foram adicionados alíquotas de uma solução padrão, previamente à decomposição de 500 mg de LEVO, perfazendo soluções com concentração final de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pd, Pt e Rh (padrões de acetato de paládio (II), acetilacetato de platina (II) e trifluoracetato de ródio (II)). Recuperações de 95, 95 e 101% foram obtidas para as soluções de Pd, Pt e Rh, respectivamente. Neste sentido, foi verificado que o método de decomposição utilizando o sistema UltraWave[®] permite recuperações quantitativas para espécies orgânicas de Pd, Pt e Rh.

Também foi investigada a decomposição de fármacos que apresentam estruturas moleculares mais complexas, como os fármacos tricíclicos. Dentre eles destacam-se o AMIT e IMIP. Para isso, massas compreendidas entre 25 e 500 mg foram decompostas com 6 mL de HNO_3 e temperatura de 270 °C em sistema UltraWave[®]. Somente digeridos obtidos com massas inferiores ou iguais a 200 mg de AMIT não apresentaram materiais insolúveis, enquanto que para IMIP massas de até 350 mg foram eficientemente decompostas. Os digeridos obtidos com 200 mg de AMIT apresentaram valores de carbono residual de 240 mg L^{-1} , ao passo que os digeridos de IMIP forneceram valores de carbono residual de 125 mg L^{-1} .

Assim, é possível concluir que o sistema UltraWave[®] permitiu a decomposição eficiente de todos os fármacos avaliados utilizando somente o HNO_3 ou água régia invertida com valores de carbono residual nos digeridos inferiores a 250 mg L^{-1} . Além disso, este sistema também foi mais eficiente na decomposição dos diferentes

fármacos quando comparado com o sistema MultiWave[®]. Os ensaios de recuperação apresentaram valores apropriados para todos os elementos, com exceção do Os.

Baseado no trabalho de Venzago e colaboradores⁶⁰ foram feitos testes preliminares utilizando uma solução de ácido acético (0,5% v/v) contendo tiouréia (0,01 mol L⁻¹) e ácido ascórbico (0,1 g L⁻¹) para promover a estabilização das espécies de Os presentes nos digeridos e obter recuperações quantitativas deste elemento. Contudo, não foram obtidas recuperações quantitativas ao reproduzir as condições sugeridas pelos autores.

4.2.3 Decomposição por combustão iniciada por micro-ondas em sistema fechado

A decomposição por MIC em sistema fechado é um método que, nos últimos anos, tem sido muito aplicado para a decomposição de diversas amostras e posterior determinação de elementos em baixas concentrações. Isto se deve ao fato deste método reunir algumas vantagens como a possibilidade de utilização de massas de amostras em torno de 500 mg e ácidos diluídos como solução absorvedora, minimizando os valores de brancos e a geração de resíduos. Diversas matrizes já foram decompostas por este método, como amostras biológicas^{68,80,99,100} ambientais,^{51,55,57,101,102} materiais de alta pureza,^{55,57} materiais poliméricos^{54,58,66} e

⁵¹ Antes, F. G. *et al.* *Talanta* 83 (2010) 364-369.

⁵⁴ Moraes, D. P. *et al.* *Analytical Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 563-570.

⁵⁵ Mortari, S. R. *et al.* *Analytical Chemistry* 82 (2010) 4298-4303.

⁵⁷ Pereira, J. S. F. *et al.* *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (2010) 1268-1274.

⁵⁸ Pereira, J. S. F. *et al.* *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (2011) 1849-1857.

⁶⁰ Venzago, C. *et al.* *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28 (2013) 1125-1129.

⁶⁶ Moraes, D. P. *et al.* *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1065-1071.

⁶⁸ Flores, E. M. D. *et al.* *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.

⁸⁰ Duarte, F. A. *et al.* *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 224-227.

⁹⁹ Mesko, M. F. *et al.* *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.

¹⁰⁰ Mesko, M. F. *et al.* *Analytical Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.

¹⁰¹ Flores, E. M. M. *et al.* *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.

¹⁰² Pereira, J. S. F. *et al.* *Chemosphere* 83 (2011) 281-286.

¹⁰³ Mello, P. A. *et al.* *Analytical Letters* 41 (2008) 1623-1632.

¹⁰⁴ Pereira, J. S. F. *et al.* *Journal of Chromatography A* 1213 (2008) 249-252.

¹⁰⁵ Pereira, J. S. F. *et al.* *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 554-558.

amostras petroquímicas.^{53,84,103-105} Contudo, poucos trabalhos têm utilizado MIC para a decomposição de amostras de produtos farmacêuticos.¹⁸⁻²⁰ Além disso, nenhum trabalho utilizando MIC avaliou a viabilidade da utilização deste método de decomposição para posterior determinação de elementos como Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru por ICP-MS. Deste modo, o método de decomposição por MIC foi investigado para a decomposição de amostras de fármacos e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS. Para isso, alguns parâmetros foram avaliados como massa de amostra (100, 250 e 500 mg), solução absorvedora (4; 7 e 14,4 mol L⁻¹), misturas de ácidos (água régia e água régia invertida) e tempo para etapa de refluxo (5 a 30 min).

Inicialmente, foram avaliados comprimidos de LEVO, com massas de 100, 250 e 500 mg, confeccionados utilizando uma prensa hidráulica. Os comprimidos foram posicionados sobre o papel filtro, previamente umedecido com nitrato de amônio, disposto sobre o suporte de quartzo. Para estes testes os frascos foram pressurizados com 20 bar de oxigênio e H₂O foi utilizada como solução absorvedora, uma vez que se desejava apenas monitorar a pressão durante a combustão. Quando 500 mg de LEVO foram utilizados a pressão máxima foi de 40 bar, sendo este valor considerado seguro, tendo em vista que o mesmo representa 50% do valor máximo recomendado pelo fabricante. Para os experimentos posteriores massas de 500 mg foram utilizadas.

Foram feitos testes a fim de obter a solução absorvedora adequada para a retenção dos analitos. De acordo com dados da literatura, recuperações quantitativas são influenciadas pela escolha adequada da solução absorvedora e a escolha desta é dependente do elemento a ser determinado.⁶⁶ De uma forma geral, recuperações quantitativas de metais podem ser obtidas utilizando HNO₃ diluído.^{53,66,84,99} Entretanto, dependendo do elemento, pode haver a necessidade de uso de misturas

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

¹⁹ Muller, A. L. H., *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

²⁰ Nam, K. H. *et al. Spectroscopy* 26 (2011) 36-41.

⁵³ Mello, P. D. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 911-916.

⁶⁶ Moraes, D. P. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1065-1071.

⁸⁴ Pereira, J. S. F., *et al. Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.

⁹⁹ Mesko, M. F. *et al. Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.

¹⁰³ Mello, P. A. *et al. Analytical Letters* 41 (2008) 1623-1632.

¹⁰⁴ Pereira, J. S. F. *et al. Journal of Chromatography A* 1213 (2008) 249-252.

¹⁰⁵ Pereira, J. S. F. *et al. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 554-558.

com HCl.⁵⁸ Em um primeiro momento, foram feitos ensaios de recuperação com todos as impurezas elementares estudadas em comprimidos de LEVO com massas de 500 mg. Soluções com concentrações de 4, 7 e 14,4 mol L⁻¹ de HNO₃ foram avaliadas como solução absorvedora e os valores de recuperação para cada uma das concentrações são mostrados nas Figuras 25, 26, 27 e 28. As soluções de 7 e 14,4 mol L⁻¹ de HNO₃ levaram a recuperações entre 93 e 105%, respectivamente, para todos os elementos, com exceção de Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru, cujas as recuperações foram inferiores a 65%. Para a solução absorvedora de 4 mol L⁻¹ de HNO₃ não foram observadas recuperações apropriadas para Mn, Hg, Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru. Para Os, devido aos problemas com efeito de memória, recuperações próximas a 300% foram obtidas.

⁵⁸ Pereira, J. S. F. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (2011) 1849-1857.

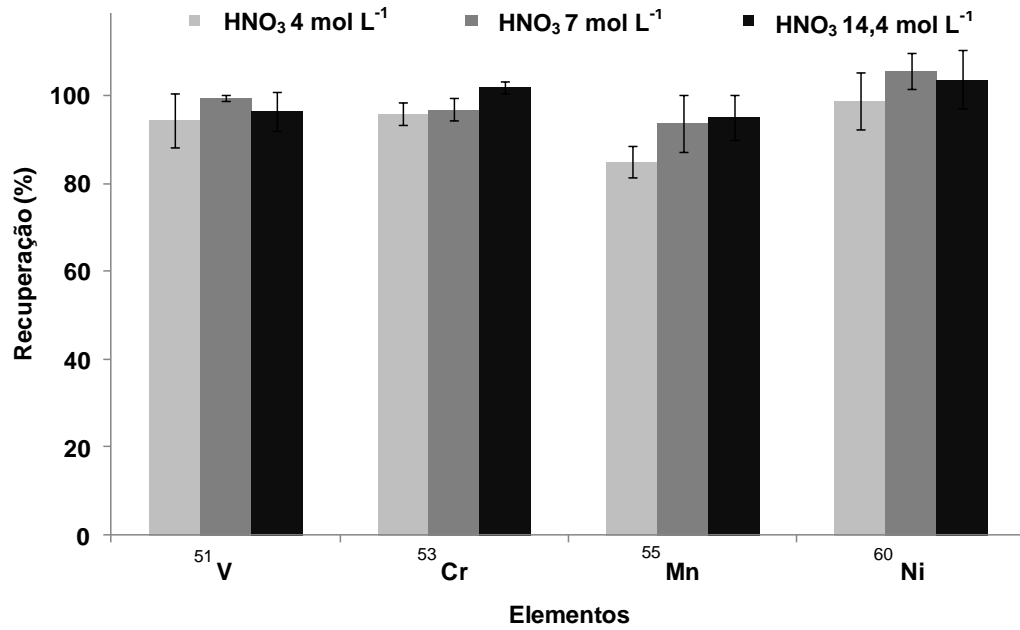


Figura 25. Recuperação para ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn e ^{60}Ni em diferentes concentrações de HNO_3 após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).

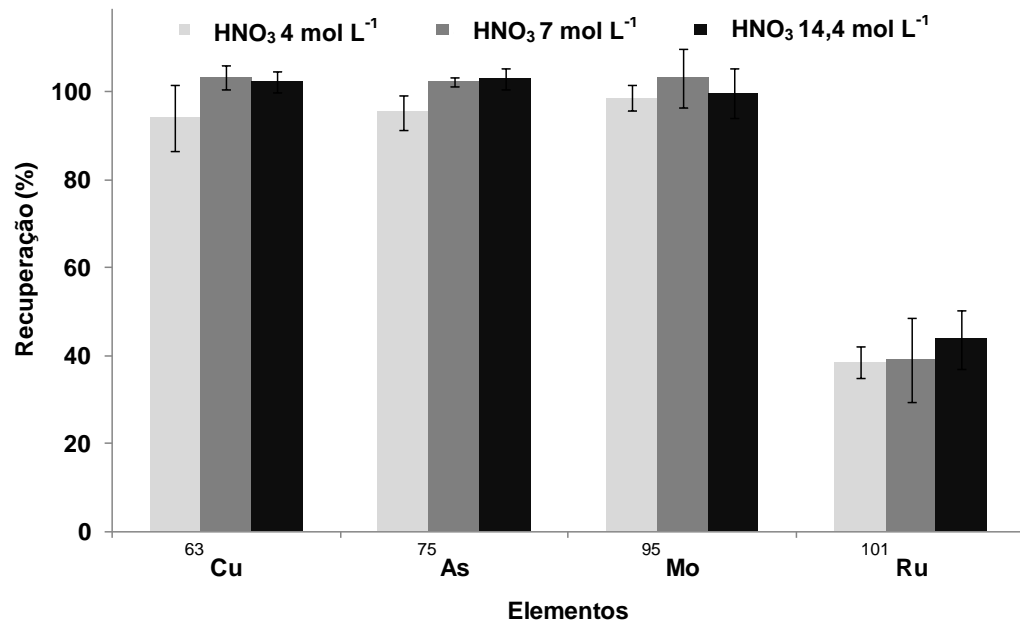


Figura 26. Recuperação para ^{63}Cu , ^{75}As , ^{95}Mo e ^{101}Ru em diferentes concentrações de HNO_3 após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).

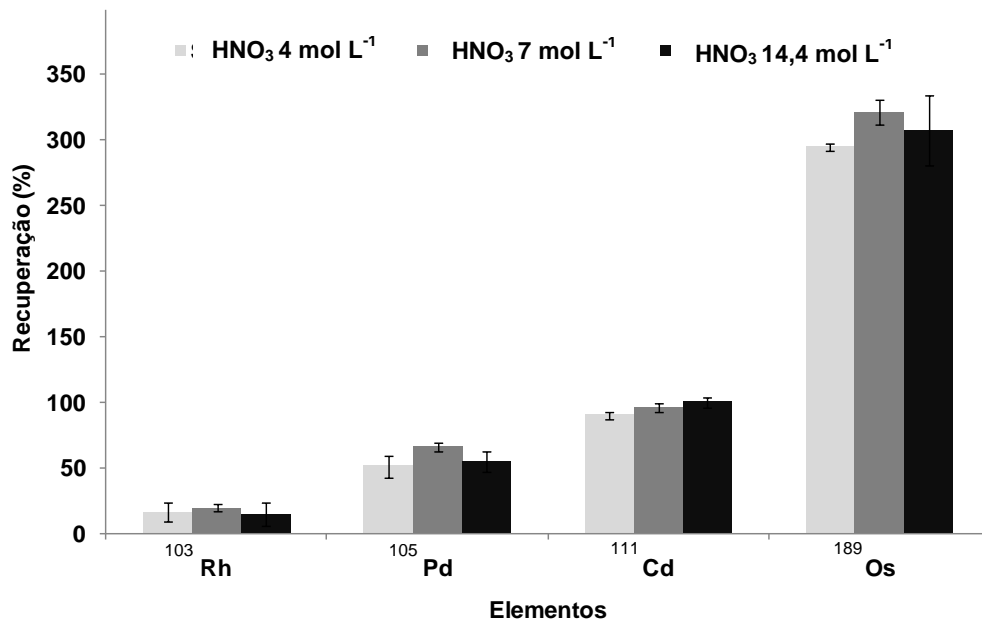


Figura 27. Recuperação para ^{103}Rh , ^{105}Pd , ^{111}Cd e ^{189}Os em diferentes concentrações de HNO_3 após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).

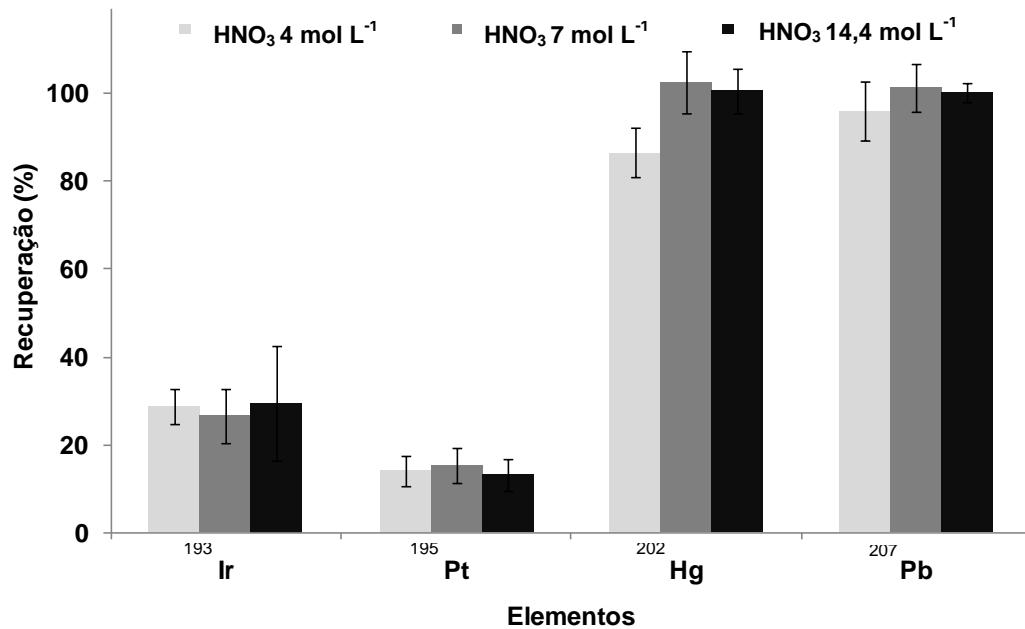


Figura 28. Recuperação para ^{193}Ir , ^{195}Pt , ^{202}Hg e ^{207}Pb em diferentes concentrações de HNO_3 após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).

Com o objetivo de melhorar as recuperações para Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru foram avaliadas misturas de HCl e HNO₃ como solução absorvedora. Assim, foi feita a decomposição por MIC utilizando 500 mg de LEVO e mistura contendo 4,5 mL de HCl e 1,5 mL de HNO₃ (água régia). Cabe salientar que se preferiu trabalhar com água régia, tendo em vista que em testes iniciais não se observaram melhoras significativas nas recuperações quando se utilizou água régia invertida como solução absorvedora quando comparadas com recuperações obtidas para HNO₃ como solução absorvedora.

Além disso, também foi avaliado o tempo de refluxo após a combustão em 5, 10, 20 e 30 min. Na Figura 29 são mostrados os valores de recuperação para Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru utilizando HNO₃, água régia e diferentes tempos de refluxo.

De acordo com a Figura 29, a utilização de água régia como solução absorvedora aumentou os valores de recuperação para Ru, Rh, Pd, Os, Ir e Pt quando comparados com as recuperações obtidas para HNO₃ como solução absorvedora. Contudo, os valores de recuperação ainda foram insatisfatórios (menores que 91%).

A partir da avaliação dos resultados obtidos com os diferentes tempos de refluxo, observa-se que o aumento do tempo de refluxo promove incrementos significativos dos valores de recuperação para Pd. Recuperações de 90% e 96% foram obtidas para tempos de refluxo de 20 e 30 min, respectivamente. Assim, para os testes posteriores uma etapa de refluxo de 30 min foi utilizada. Para Ir, Pt, Rh e Ru as recuperações foram inferiores, mesmo com a utilização de 30 min de refluxo. Apesar de garantir recuperações quantitativas somente para Pd, o tempo de 30 min de refluxo foi adotado para os demais experimentos que utilizaram MIC. Para Os, novamente, recuperações próximas a 300% foram obtidas.

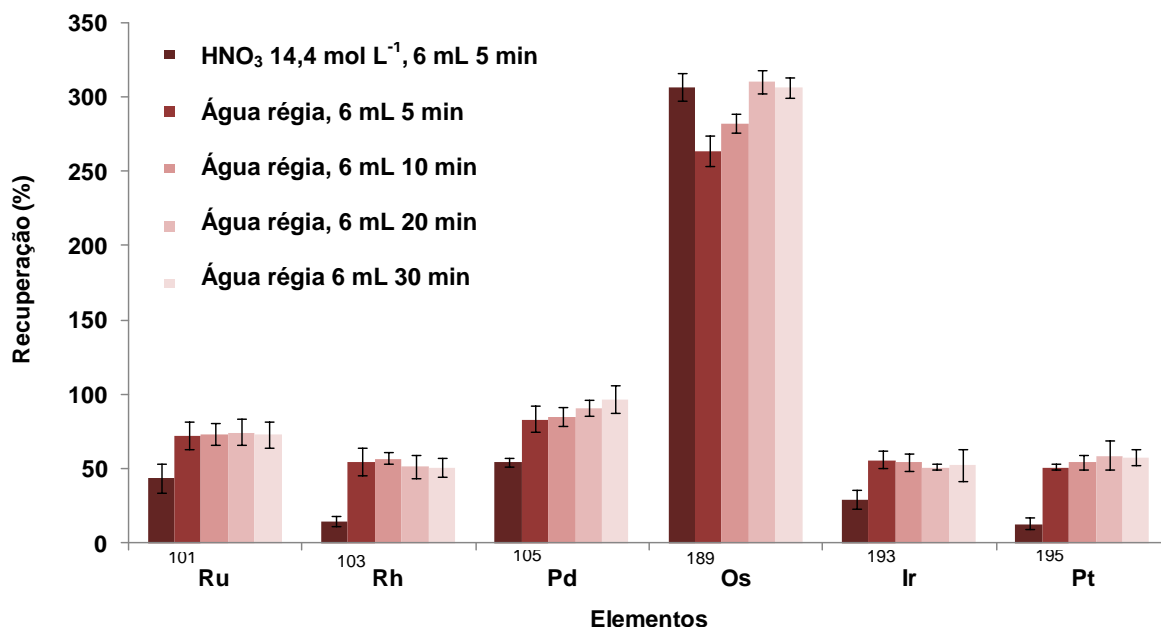


Figura 29. Recuperação para ¹⁰¹Ru, ¹⁰³Rh, ¹⁰⁵Pd, ¹⁸⁹Os, ¹⁹³Ir e ¹⁹⁵Pt para diferentes tempos de refluxo após decomposição de 500 mg de LEVO (levodopa) por MIC (n = 3).

Assim, cloreto de amônio sólido, misturado ao fármaco, foi utilizado com o objetivo de aumentar a recuperação de Ir, Pt, Rh e Ru nos digeridos obtidos por MIC. Estratégia semelhante foi proposta por White e colaboradores⁸⁵ que utilizaram KClO₃, na forma sólida em suporte de quartzo para promover a produção de HClO₃ e garantir a recuperação quantitativa de Ir, Rh e Ru. Segundo os autores, o ácido clórico formado favorece a formação de cloretos solúveis de Ir, Rh e Ru.

Desta forma, misturas utilizando diferentes massas de NH₄Cl foram avaliadas com o objetivo de aumentar as recuperações para Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru. Massas de 300 mg de LEVO e 100, 200 ou 300 mg de NH₄Cl foram homogeneizadas em um gral de ágata e prensados na prensa hidráulica para confecção de comprimidos. Em seguida, estes comprimidos foram submetidos à combustão na presença de 6 mL de água régia utilizada como solução absorvedora. Previamente à decomposição das amostras, foi feita a adição de uma alíquota de uma solução padrão contendo Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru de forma a produzir uma solução final com concentração de 5 µg L⁻¹ destes elementos. Neste caso, para a avaliação dos ensaios de recuperação, os sinais analíticos dos digeridos do MIC foram comparados frente a uma solução

⁸⁵ White, R. T., Kettisch, P., Kainrath, P. *Atomic Spectroscopy* 19 (1998) 187-192.

padrão obtida por um digerido contendo 300 mg de LEVO, 200 mg de NH_4Cl , solução absorvedora de água régia e $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru. Isto ocorreu devido à observação de interferências ocasionadas pela presença de altas concentrações de NH_4Cl .

Os primeiros testes foram feitos com o objetivo de verificar a massa de NH_4Cl necessária para garantir a recuperação quantitativa de Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru. Quando misturas de 300 mg de LEVO e 100 mg de NH_4Cl foram utilizadas, recuperações próximas a 100% foram obtidas para Ru, Pd, Ir e Pt, exceto para Rh (inferior a 90%) e Os (superior a 200%). A utilização de misturas de 300 mg de LEVO e 200 mg de NH_4Cl , por sua vez, possibilitou recuperação quantitativa de todos os analitos avaliados, exceto para Os, cujas recuperações superiores a 300% foram obtidas. Por fim, quando misturas de 300 mg de LEVO e 300 mg de NH_4Cl foram utilizadas, a decomposição de LEVO não foi completa e resíduos de amostra restaram no suportes de quartzo ao final das etapas de combustão e refluxo. Provavelmente, isso ocorreu devido à presença de uma maior quantidade de matéria inorgânica e, conseqüentemente, uma menor quantidade de calor foi liberada durante a combustão, o que impossibilitou a completa decomposição da amostra. Assim, misturas de 300 mg de LEVO e 200 mg de NH_4Cl foram utilizadas para os posteriores experimentos com MIC para determinação de Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru.

Com o objetivo de verificar a possibilidade de utilização de soluções diluídas de água régia como solução absorvedora para MIC, foram feitos testes utilizando 6 mL de soluções contendo concentração de 25, 50 e 100% (v/v) de água régia.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 30, foi possível observar que a maioria dos elementos estudados apresentou decréscimo nas recuperações quando foram utilizadas soluções diluídas de água régia como solução absorvedora.

Paládio foi o único elemento que resultou em recuperação superior a 90% quando foi utilizada a água régia 50% (v/v). Dessa forma, houve a necessidade da utilização de água régia 100% para se obter recuperações quantitativas para Ir, Pd, Pt, Rh e Ru.

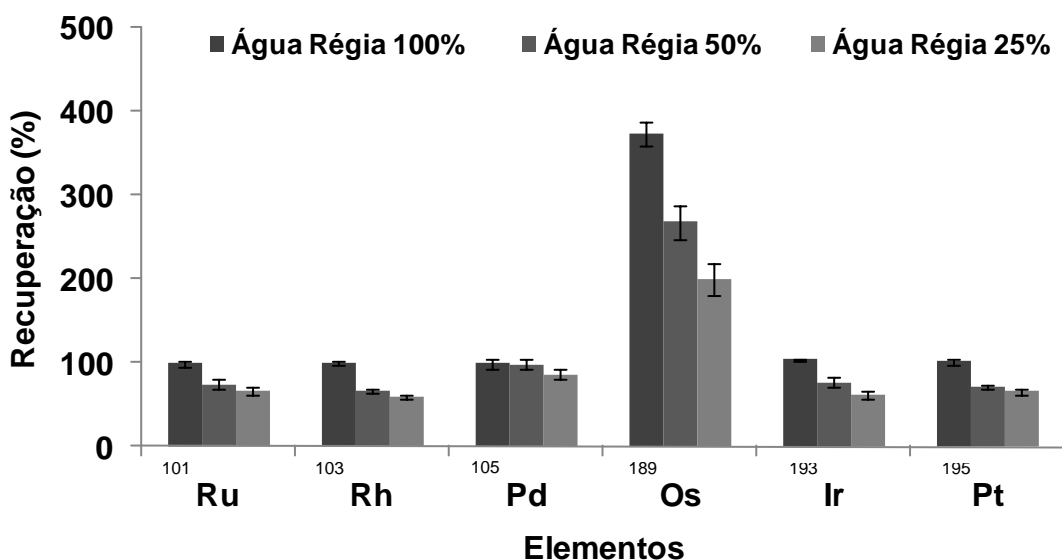


Figura 30. Recuperação para ^{101}Ru , ^{103}Rh , ^{105}Pd , ^{189}Os , ^{193}Ir e ^{195}Pt após decomposição de 300 mg de LEVO (levodopa) + 200 mg de NH_4Cl por MIC com diferentes misturas de água régia como solução absorvedora (n = 3).

Estabelecida a condição adequada de decomposição que utiliza 300 mg de amostra do fármaco, 200 mg de NH_4Cl e 6 mL de água régia 100%, a MIC foi avaliada, também, com a adição de alíquotas de solução padrão contendo Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru a fim de perfazer uma solução final de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ destes elementos. Após a decomposição por MIC, foram obtidas recuperações entre 93 e 102% para todos os elementos estudados, exceto para Os, cujas recuperações foram da ordem de 350%.

Por fim, novamente, foi avaliado o tempo de refluxo durante a MIC, uma vez que, o mesmo não havia sido avaliado com a utilização de misturas de LEVO e NH_4Cl . Desta forma, foram avaliados tempos de refluxo de 10 e 20 min, porém, não foram observadas recuperações quantitativas para Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru. Assim, a etapa de refluxo de 30 min foi estabelecida como ideal após a combustão das amostras.

Dessa forma, foram propostos dois métodos utilizando MIC para posterior determinação de impurezas elementares nos diferentes fármacos: *i)* 500 mg dos fármacos e solução de HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora para determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb e V e, *ii)* mistura de 300 mg dos fármacos, 200 mg de NH_4Cl e solução de água régia como solução absorvedora para determinação de Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru.

Todos os fármacos foram decompostos por MIC utilizando os dois métodos propostos e os valores de carbono residual foram inferiores a 60 mg L^{-1} de C. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura utilizando o método de MIC para decomposição de fármacos.¹⁸⁻²⁰ Além disso, não foram feitos estudos para a decomposição dos fármacos AMIT e IMIP por MIC, já que as melhores condições já foram estudadas por Barin e colaboradores.¹⁸

Cabe destacar que as determinações de Ir, Pd, Pt, Os, Rh e Ru foram feitas por calibração de adição de analito, devido às interferências ocasionadas pela presença de altas concentrações de NH_4Cl .

Finalmente, ensaios de recuperação foram realizados com todos os analitos para os fármacos PROP e SULF utilizando os dois métodos de MIC propostos.

Para PROP foram obtidas recuperações de 93 a 105% todos os analitos, exceto para Os (recuperações superiores a 353%). Os isótopos de ^{55}Mn , ^{60}Ni , ^{62}Ni , ^{95}Mo , ^{98}Mo , ^{99}Ru , ^{101}Ru , ^{103}Rh , ^{105}Pd , ^{108}Pd , ^{111}Cd , ^{114}Cd , ^{191}Ir , ^{192}Os , ^{193}Ir , ^{194}Pt , ^{195}Pt , ^{206}Pb , ^{207}Pb e ^{208}Pb foram determinados por ICP-MS no modo normal, os isótopos ^{51}V , ^{52}Cr , ^{53}Cr , ^{63}Cu e ^{65}Cu , foram determinados por ICP-MS no modo DRC e, os isótopos ^{75}As , ^{200}Hg e ^{202}Hg , foram determinados por FI-CVG-ICP-MS. Também foi investigada a concentração de cloreto, por cromatografia de íons, nos digeridos obtidos a partir da decomposição do fármaco PROP por MIC quando HNO_3 7 mol L^{-1} foi utilizado como solução absorvedora. Diferentemente dos resultados obtidos nos digeridos por via úmida, foi observado que as perdas de cloreto por MIC são inferiores as observadas por via úmida. Assim, as interferências poliatômicas causadas pelo Cl da matriz de PROP são mais intensas para os digeridos obtidos por MIC.

Após decomposição da SULF por MIC, foram obtidas recuperações entre 96 a 103% para todos os elementos, exceto para Os (recuperações superiores a 285%).

Por fim, foram feitos ensaios recuperação com solução de referência de sais orgânicos de Pd, Pt e Rh. Para tanto, alíquotas de soluções padrões contendo Pd, Pt e Rh foram adicionadas, previamente à decomposição, aos comprimidos de 300 mg de LEVO e 200 mg de NH_4Cl perfazendo soluções finais com concentrações de $5 \mu\text{g}$

¹⁸ Barin, J. S. *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 352-358.

¹⁹ Muller, A. L. H., *et al. Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.

²⁰ Nam, K. H. *et al. Spectroscopy* 26 (2011) 36-41.

L⁻¹ destes elementos. As recuperações foram da ordem de 96, 94 e 98% para Pd, Pt e Rh, respectivamente. Assim, foi observado que a MIC possibilita a obtenção de recuperações quantitativas de Pd, Pt e Rh na forma orgânica.

4.2.4 Decomposição em sistema aberto por forno tipo mufla

A decomposição em sistema aberto com forno tipo mufla foi feita seguindo as recomendações do Método III de Ensaio Limites para Metais Pesados, de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Ed,⁴ conforme descritos no capítulo de *Materiais e Métodos* do presente trabalho. Massas de aproximadamente 2 g de LEVO foram pesadas e transferidas para cadinhos de platina. Foram feitos ensaios de recuperação através da adição de uma solução contendo todos os elementos de interesse perfazendo uma solução final com concentração de 20 µg L⁻¹. Adicionalmente, ensaios de recuperação com os padrões orgânicos de Pd e Rh também foram efetuados. Para os ensaios de recuperação para Pt, foram utilizados cadinhos de porcelana. Inicialmente, as amostras foram incineradas com a chama de um bico de Bunsen. Em seguida, após o arrefecimento dos cadinhos (aproximadamente 45 min), foram adicionados 2 mL de HNO₃ concentrado. Neste momento foi observada uma reação exotérmica. Na Figura 31 está mostrado o aspecto da amostra de LEVO após a incineração e adição de 2 mL de HNO₃.

⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopeia Brasileira*, 5ª Ed., Brasil, 2010



Figura 31. Aspecto do resíduo obtido após incineração da amostra de LEVO (levodopa) na chama do bico de Bunsen.

Posteriormente, após a nova incineração com bico de Bunsen e verificada a ausência de fumos brancos, os cadinhos contendo as amostras de LEVO foram aquecidas em mufla a uma temperatura de 600 °C por, aproximadamente, 2 h. Após o arrefecimento dos cadinhos, as cinzas restantes foram solubilizadas com 4 mL de HCl 6 mol L⁻¹ em banho maria, sendo aquecidos até *secura*. O resíduo foi novamente umedecido com HCl 6 mol L⁻¹, transferido para frasco volumétrico e avolumado a 25 mL com água purificada. As soluções resultantes foram diluídas 4 vezes e os analitos determinados por ICP-MS.

Conforme mostrado na Tabela 8 é possível observar perdas significativas de para Hg, Ir, Os e Ru, em que recuperações inferiores a 10% foram obtidas. Além disso, recuperações entre 30 e 60% foram observadas para os isótopos de Cd, Mo, Pd e Rh. Resultados similares foram observados por Lewen¹⁰ e colaboradores para Cd, Hg, Mo, Pd e Ru, quando os autores decomuseram fármacos utilizando decomposição por via seca. Adicionalmente, Cr, Cu, Mn e Ni não foram determinados devido à contaminação das amostras durante a etapa de decomposição na mufla.

Quando se analisaram os digeridos, que foram decompostos com adição prévia dos padrões de sais orgânicos, foram observadas perdas significativas de Pd,

¹⁰ Lewen, N. *et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 739-752.

Pt e Rh (recuperações menores que 10%). Possivelmente, estas perdas ocorreram devido aos baixos pontos de ebulição dessas espécies orgânicas. De acordo com a literatura, os pontos de ebulição de acetato de paládio (II), acetylacetonato de platina (II) e trifluoroacetato de ródio (II) são 117,1; 187,6 e 72,2 °C, respectivamente.

Tabela 8. Recuperação das impurezas elementares após decomposição por via seca (média e desvio padrão, n=5).

Analitos	Recuperação (%)	
	Soluções de referência	Soluções de sais orgânicos
⁵¹ V	59 ± 6	-
⁵² Cr	ND*	-
⁵³ Cr	ND	-
⁵⁵ Mn	ND	-
⁶⁰ Ni	ND	-
⁶² Ni	ND	-
⁶³ Cu	ND	-
⁶⁵ Cu	ND	-
⁷⁵ As	62 ± 10	-
⁹⁵ Mo	45 ± 8	-
⁹⁸ Mo	54 ± 7	-
⁹⁹ Ru	8 ± 3	-
¹⁰¹ Ru	8 ± 2	-
¹⁰³ Rh	36 ± 6	8 ± 3
¹⁰⁵ Pd	41 ± 5	9 ± 3
¹⁰⁸ Pd	38 ± 5	9 ± 2
¹¹¹ Cd	41 ± 4	-
¹¹⁴ Cd	46 ± 5	-
¹⁸⁹ Os	9 ± 2	-
¹⁹¹ Ir	9 ± 2	-
¹⁹² Os	9 ± 4	-
¹⁹³ Ir	8 ± 3	-
¹⁹⁴ Pt	56 ± 6	9 ± 2
¹⁹⁵ Pt	55 ± 5	8 ± 4
²⁰⁰ Hg	6 ± 2	-
²⁰² Hg	5 ± 2	-
²⁰⁶ Pb	91 ± 11	-
²⁰⁷ Pb	89 ± 12	-
²⁰⁸ Pb	87 ± 10	-

*ND - não determinado

4.2.5 Validação dos métodos de decomposição e determinação de impurezas elementares por ICP-MS

Após o desenvolvimento dos métodos de decomposição para os fármacos e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS, fez-se necessária a validação dos mesmos de acordo com alguns parâmetros recomendados pelo capítulo 233 - “*Elemental Impurities-Procedures*”, publicado pelo *Pharmacopeial Forum* da USP, pela ANVISA e pelo ICH tais como: especificidade, exatidão, linearidade, faixa de trabalho, LDs, LQs e precisão na forma de repetitividade e precisão intermediária.^{22,23} Neste sentido, foram validados os métodos de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®] e decomposição por MIC, já que somente estes dois métodos possibilitaram a decomposição eficiente de todos os fármacos. Nesta seção, serão mostrados apenas os isótopos mais abundantes e livres de interferência para cada um dos analitos.

4.2.5.1 Validação do método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®] e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS

A especificidade do método proposto utilizando decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®] foi avaliada através da utilização de soluções de referência contendo todos os elementos estudados e interferentes como C, Cl, Na, P ou S. Adicionalmente, os fármacos LEVO, PROP, DICL, PRIMA e SULF foram decompostos, com prévia adição dos analitos, para posterior determinação por ICP-MS. Cabe lembrar que estes fármacos foram selecionados pois possuem em suas estruturas químicas os interferentes acima citados. Assim, foi possível a determinação de Cd, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh e Ru por ICP-MS. Para As, as determinações foram feitas por FI-CVG-ICP-MS. Como foram observadas interferências para Cr, Cu e V, as determinações foram feitas por

²² International Conference on Harmonisation, 2005, Acessado em: 25/04/2014
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

ICP-MS utilizando DRC. Assim, foi possível obter um método específico para a determinação de impurezas elementares em fármacos após decomposição por sistema UltraWave[®], independente da presença de interferentes na matriz.

A avaliação da exatidão do método proposto utilizando sistema UltraWave[®] foi realizada através de ensaios de recuperação com uma solução de referência contendo todos os analitos e pela utilização de CRMs. Os ensaios de recuperação foram feitos em três níveis de concentração equivalentes a 50, 100 e 150% do valor máximo permitido para produtos de uso parenteral. Este parâmetro (produtos parenterais) foi escolhido pelo fato de muitos fármacos utilizados neste trabalho serem empregados para a fabricação de medicamentos administrados por via parenteral. Além disso, os valores limites para produtos de uso parenteral são mais exigentes com respeito aos limites máximos permitidos de cada analito, quando comparados aqueles estabelecidos para formas de administração oral.

Deste modo, massas de 500 mg de LEVO foram digeridas com 6 mL de HNO₃ utilizando o método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®]. Previamente à decomposição, foi adicionada uma solução de referência multielementar contendo As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V (concentração final de 50, 100 e 150% do valor para uso parenteral). Por outro lado, massas de 250 mg foram, também, digeridas utilizando 6 mL de água régia invertida e solução de referência contendo Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru (concentração final de 50, 100 e 150% do valor para uso parenteral).

De acordo com o *Pharmacopeial Forum* da USP os critérios aceitáveis para ensaios de recuperação devem estar entre 70 a 150%.²³ Contudo, neste trabalho os critérios de aceitação foram arbitrariamente fixados entre 91 a 109% conforme mencionado anteriormente. Para todos os níveis de concentração estudados, foram obtidas recuperações próximas a 100%, exceto para Os para o qual recuperações superiores a 199% foram observadas.

Para o primeiro nível de concentração, equivalente a 50% (faixa entre 0,075 e 12,5 µg g⁻¹), foram obtidas recuperações entre 95,6 e 105,1% para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V (Tabela 9). Adicionalmente, para o segundo nível de concentração (equivalente a 100% entre 0,15 e 25 µg g⁻¹), foram obtidas recuperações entre 94 e 106% para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt,

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

Rh, Ru e V. Finalmente, para o terceiro nível de concentração (equivalente a 150% entre 0,23 e 37,5 $\mu\text{g g}^{-1}$), foram obtidas recuperações entre 94 e 106% (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de recuperação para os três diferentes níveis de concentração estudados para sistema UltraWave[®] (média e desvio padrão, n=3).

	Valores de recuperação		
	Concentração de 50%	Concentração de 100%	Concentração de 150%
⁷⁵ As	104 ± 3	102 ± 4	105 ± 5
¹¹¹ Cd	98 ± 4	103 ± 6	96 ± 3
⁵³ Cr	97 ± 5	102 ± 3	104 ± 3
⁶³ Cu	98 ± 2	102 ± 3	99 ± 2
²⁰² Hg	96 ± 6	104 ± 2	97 ± 5
¹⁹³ Ir	95 ± 4	95 ± 2	97 ± 2
⁵⁵ Mn	96 ± 4	96 ± 2	99 ± 3
⁹⁵ Mo	98 ± 3	98 ± 2	95 ± 4
⁶⁰ Ni	105 ± 2	106 ± 4	99 ± 3
¹⁸⁹ Os	212 ± 12	213 ± 10	199 ± 3
²⁰⁷ Pb	104 ± 3	96 ± 4	94 ± 3
¹⁰⁵ Pd	98 ± 5	94 ± 4	97 ± 4
¹⁹⁵ Pt	100 ± 4	101 ± 8	105 ± 1
¹⁰³ Rh	103 ± 4	97 ± 5	102 ± 6
¹⁰¹ Ru	99 ± 2	97 ± 2	98 ± 4
⁵¹ V	98 ± 3	99 ± 3	95 ± 3

A exatidão do método proposto empregando o sistema UltraWave[®] também foi avaliada pela decomposição de CRMs de tecido de ostra e músculo de peixe para posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS (Tabela 10). Não se

observaram diferenças significativas entre os valores certificados e os valores obtidos experimentalmente (teste *t-student*, nível de confiança de 95%).

Tabela 10. Concentração de elementos em CRMs de tecido de ostra e músculo de peixe. As determinações foram feitas por ICP-MS após decomposição no sistema UltraWave® utilizando 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ (média e desvio padrão, n=3).

Analitos	NIST 1566a		DORM-2	
	Valor certificado	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado
⁷⁵ As	14 ± 1,2	13,5 ± 1,1	18 ± 1,1	19 ± 0,9
¹¹¹ Cd	4,15 ± 0,38	4,27 ± 0,29	0,043 ± 0,008	0,041 ± 0,003
⁵³ Cr	1,43 ± 0,46	1,39 ± 0,12	34,7 ± 5,5	33,5 ± 2,2
⁶³ Cu	66,3 ± 4,3	63,1 ± 3,5	2,34 ± 0,16	2,48 ± 0,13
²⁰² Hg	0,0642 ± 0,0067	0,063 ± 0,005	4,64 ± 0,26	4,55 ± 0,20
¹⁹³ Ir	-	-	-	-
⁵⁵ Mn	12,3 ± 1,5	12,7 ± 0,9	3,66 ± 0,34	3,72 ± 0,28
⁹⁵ Mo	-	-	-	-
⁶⁰ Ni	2,25 ± 0,44	2,30 ± 0,19	19,4 ± 3,1	19,5 ± 1,2
¹⁸⁹ Os	-	-	-	-
²⁰⁷ Pb	0,371 ± 0,014	0,357 ± 0,021	0,065 ± 0,007	0,062 ± 0,005
¹⁰⁵ Pd	-	-	-	-
¹⁹⁵ Pt	-	-	-	-
¹⁰³ Rh	-	-	-	-
¹⁰¹ Ru	-	-	-	-
⁵¹ V	4,68 ± 0,15	4,81 ± 0,26	-	-

As faixas de trabalho utilizadas para a determinação das impurezas elementares de interesse foram: 0,025 a 10 µg L⁻¹ para Cd, Ir, Mo e Rh; 0,050 a 10 µg L⁻¹ para As, Pd, Ru e V; 0,100 a 10 µg L⁻¹ para Mn, Ni, Pb e Pt; 0,250 a 10 µg L⁻¹ para Cu e Hg; 0,500 a 10 µg L⁻¹ para Cr. Estas faixas de trabalho foram considerada

linear para a determinação de todos os analitos de interesse por ICP-MS. As curvas de calibração foram consideradas lineares com coeficientes de correlação superiores a 0,999, variância equivalente dos padrões utilizados na calibração (dados homocedásticos) e resíduos distribuídos aleatoriamente.

A repetitividade foi avaliada através da decomposição de seis replicatas do fármaco LEVO contendo solução de referência com todos os analitos no nível de concentração de 100% do valor máximo permitido para produtos de uso parenterais. De acordo com *Pharmacopeial Forum* da USP,²³ a repetitividade é considerada aceitável quando valores de RSDs são inferiores a 20%. O método de decomposição de fármacos por via úmida assistida em sistema UltraWave[®] resultou em valores de RSDs entre 2,2 e 6,5% para todos os analitos, exceto para Os (RSD superior a 15%).

A precisão intermediária e a robustez foram avaliadas através da decomposição de seis replicatas do fármaco LEVO, por 02 laboratoristas em três dias totalizando 36 replicatas. Foram utilizadas amostras contendo concentração de 100% do valor máximo permitido para produtos de uso parenterais. Os RSDs obtidos, após a determinação dos analitos por ICP-MS, foram inferiores a 15% e estão de acordo com os valores recomendados pelo *Pharmacopeial Forum* da USP.²³

Os LDs obtidos, para método de decomposição de fármacos por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®] e posterior determinação por ICP-MS, foram na faixa de 0,0001 a 0,0044 $\mu\text{g g}^{-1}$ para todas as impurezas elementares estudadas (com exceção para Os que não foi calculado). Os LQs obtidos estão mostrados na Tabela 11. Os LDs e LQs para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V foram calculados levando-se em consideração 500 mg de amostra e volume final de solução de 25 mL para todos os fármacos com exceção de AMIT, DICL e IMIP em que massas de 200, 25 e 350 mg foram levadas em consideração para um volume final de solução de 25 mL.

Para Ir, Pd, Pt, Rh e Ru os LDs e LQs foram calculados levando-se em consideração 250 mg de amostra para todos os fármacos e volume final de solução de 25 mL (exceção, também, para AMI, DICL e IMIP). Cabe salientar que os resultados de V, Cr e Cu foram obtidos usando ICP-MS no modo DRC e os resultados de As e Hg foram obtidos usando FI-CVG-ICP-MS. De acordo com a

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

Tabela 11, é possível observar que os resultados obtidos são satisfatórios e atendem os valores exigidos pelo *Pharmacopeial Forum* da USP.³

Tabela 11. Limites de quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$), obtidos por ICP-MS após decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®].

Analitos	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Limite máximo para produtos parenterais ($\mu\text{g g}^{-1}$)
⁷⁵ As	0,002	0,15
¹¹¹ Cd	0,001	0,25
⁵³ Cr	0,015	-
⁶³ Cu	0,009	10
²⁰² Hg	0,014	0,15
¹⁹³ Ir	0,003	1,0
⁵⁵ Mn	0,005	25*
⁹⁵ Mo	0,001	1,0
⁶⁰ Ni	0,005	5,0
²⁰⁷ Pb	0,004	0,5
¹⁰⁵ Pd	0,005	1,0
¹⁹⁵ Pt	0,009	1,0
¹⁰³ Rh	0,003	1,0
¹⁰¹ Ru	0,004	1,0
⁵¹ V	0,002	1,0

* Limite máximo permitido de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª Ed, 2010.

4.2.5.2 Validação do método de decomposição por combustão iniciada por micro-ondas e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS

A especificidade do método proposto utilizando MIC foi avaliada da mesma forma que no item 4.2.5.1. As determinações de Cd, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh e Ru foram feitas por ICP-MS, enquanto que a determinação de As foi feita por FI-CVG-ICP-MS e as de Cr, Cu e V por ICP-MS utilizando DRC. Deste modo, foi

³ The United States Pharmacopeia, 232, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

possível obter resultados livres de interferências, concluindo-se que o método proposto é específico para a determinação de impurezas elementares em fármacos, independente da presença de interferentes.

Para avaliação da exatidão do método proposto utilizando MIC, foram decompostos comprimidos com 500 mg de LEVO utilizando 6 mL de HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora para posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V. Prévia adição das impurezas elementares foi realizada em 3 níveis de concentração (50, 100 e 150%) de acordo com o limite máximo permitido para cada elemento para produtos de uso parenteral.³ Por outro lado, 300 mg do fármaco LEVO foram misturados com 200 mg NH₄Cl para posterior confecção dos comprimidos. Em seguida estes comprimidos foram decompostos utilizando 6 mL de água régia como solução absorvedora. Previamente à decomposição, os analitos Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru foram adicionados e posteriormente determinados por ICP-MS.

Para todos os níveis de concentração estudados foram obtidas recuperações próximas a 100%, exceto para Os para o qual recuperações superiores a 302% foram observadas, conforme pode ser observado na Tabela 12.

Para o primeiro nível de concentração (equivalente a 50%, entre 0,075 e 12,5 µg g⁻¹) recuperações entre 94 e 107% para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V foram obtidos. Adicionalmente, para o segundo nível de concentração (equivalente a 100%, entre 0,15 e 25 µg g⁻¹), recuperações entre 93 e 108% foram obtidos para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V. Finalmente, para o terceiro nível de concentração (equivalente a 150%, entre 0,23 e 37,5 µg g⁻¹), recuperações entre 94 e 107% foram obtidas para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru e V.

³ The United States Pharmacopeia, 232, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

Tabela 12. Valores de recuperação para os três diferentes níveis de concentração estudados para decomposição por MIC (média e desvio padrão, n=3).

Analitos	Valores de recuperação		
	Concentração de 50%	Concentração de 100%	Concentração de 150%
⁷⁵ As	104 ± 4	106 ± 7	95 ± 6
¹¹¹ Cd	96 ± 5	105 ± 2	98 ± 3
⁵³ Cr	94 ± 8	99 ± 3	107 ± 8
⁶³ Cu	102 ± 14	104 ± 4	102 ± 4
²⁰² Hg	95 ± 5	101 ± 5	99 ± 4
¹⁹³ Ir	97 ± 5	96 ± 6	99 ± 2
⁵⁵ Mn	106 ± 7	95 ± 7	99 ± 4
⁹⁵ Mo	103 ± 4	98 ± 3	104 ± 5
⁶⁰ Ni	101 ± 20	108 ± 7	98 ± 3
¹⁸⁹ Os	340 ± 9	373 ± 13	302 ± 9
²⁰⁷ Pb	106 ± 6	93 ± 6	100 ± 3
¹⁰⁵ Pd	104 ± 3	100 ± 4	106 ± 5
¹⁹⁵ Pt	95 ± 3	104 ± 4	97 ± 6
¹⁰³ Rh	99 ± 5	94 ± 8	95 ± 4
¹⁰¹ Ru	96 ± 5	99 ± 4	96 ± 3
⁵¹ V	94 ± 3	100 ± 4	99 ± 3

A exatidão do método proposto empregando MIC também foi avaliada pela decomposição de CRMs de tecido de ostra e músculo de peixe para posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos após as determinações. Não se observaram diferenças significativas entre os valores certificados e os valores obtidos experimentalmente (teste *t-student*, nível de confiança de 95%).

Tabela 13. Concentração de elementos em CRMs de tecido de ostra e músculo de peixe determinados por ICP-MS após decomposição por MIC utilizando 6 mL de HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora (média e desvio padrão, n=3).

Analitos	NIST 1566a		DORM-2	
	Valor certificado	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado
⁷⁵ As	14,0 ± 1,2	13,2 ± 0,9	18 ± 1,1	16,9 ± 1,2
¹¹¹ Cd	4,15 ± 0,38	4,26 ± 0,31	0,043 ± 0,008	0,042 ± 0,002
⁵³ Cr	1,43 ± 0,46	1,45 ± 0,12	34,7 ± 5,5	32,7 ± 2,0
⁶³ Cu	66,3 ± 4,3	68,2 ± 3,0	2,34 ± 0,16	2,38 ± 0,17
²⁰² Hg	0,0642 ± 0,0067	0,065 ± 0,006	4,64 ± 0,26	4,55 ± 0,34
¹⁹³ Ir	-	-	-	-
⁵⁵ Mn	12,3 ± 1,5	12,0 ± 1,0	3,66 ± 0,34	3,45 ± 0,18
⁹⁵ Mo	-	-	-	-
⁶⁰ Ni	2,25 ± 0,44	2,38 ± 0,21	19,4 ± 3,1	19,2 ± 0,99
¹⁸⁹ Os	-	-	-	-
²⁰⁷ Pb	0,371 ± 0,014	0,35 ± 0,03	0,065 ± 0,007	0,064 ± 0,004
¹⁰⁵ Pd	-	-	-	-
¹⁹⁵ Pt	-	-	-	-
¹⁰³ Rh	-	-	-	-
¹⁰¹ Ru	-	-	-	-
⁵¹ V	4,68 ± 0,15	4,43 ± 0,38	-	-

As faixas de trabalho utilizadas para a determinação das impurezas elementares de interesse foram: 0,025 a 10 µg L⁻¹ para Rh; 0,050 a 10 µg L⁻¹ para Cd, Ir, Mo, Pd, Pt e Ru; 0,100 a 10 µg L⁻¹ para As, Ni e Pb; 0,250 a 10 µg L⁻¹ para Cu, Cr, Hg, Mn e V. Da mesma forma, como mencionado anteriormente, as curvas de calibração foram consideradas lineares com coeficientes de correlação superiores a 0,999, variância equivalente dos padrões utilizados na calibração (dados homocedásticos) e resíduos distribuídos aleatoriamente.

A repetitividade foi avaliada através da decomposição de seis replicatas do fármaco LEVO contendo concentração de 100% do valor máximo permitido para produtos de uso parenteral. O método de decomposição de fármacos por MIC e determinação de impurezas elementares por ICP-MS apresentou valores de RSD entre 3,8 e 8,1% para todos os elementos, exceto para Os (RSD superior a 15%).

A precisão intermediária e a robustez foram avaliadas conforme os testes para UltraWave[®] (dias e analistas diferentes). Os RSDs obtidos para as 36 replicatas foram menores que 14% e estão de acordo com os valores recomendados pelo capítulo 233 - "*Elemental Impurities-Procedures*", publicado pelo *Pharmacopeial Forum* da USP.²³

Os LDs obtidos, para a decomposição de fármacos por MIC e posterior determinação por ICP-MS, foram na faixa de 0,0004 a 0,0029 $\mu\text{g g}^{-1}$ para todas as impurezas elementares estudadas (com exceção para Os que não foi calculado). Os LQs obtidos estão apresentados na Tabela 14. Os LDs e LQs para As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V foram calculados levando-se em consideração 500 mg de amostra e volume final de solução de 25 mL (exceção para DIOL). Os LDs e LQs para Ir, Pd, Pt, Rh e Ru foram calculados levando-se em consideração 300 mg de amostra e volume final de solução de 25 mL (exceção para DIOL). É importante salientar que os resultados de V, Cr e Cu foram obtidos usando ICP-MS no modo DRC e os resultados de As e Hg foram obtidos usando FI-CVG-ICP-MS. É possível notar que os resultados foram considerados satisfatórios e atendem aos valores exigidos pelo *Pharmacopeial Forum* da USP.²³

²³ The United States Pharmacopeia, 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

Tabela 14. Limites de quantificação, expresso em massas de amostras ($\mu\text{g g}^{-1}$), obtidos por ICP-MS após decomposição por MIC.

Analitos	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Limite máximo para produtos parenterais ($\mu\text{g g}^{-1}$)
^{75}As	0,004	0,15
^{111}Cd	0,002	0,25
^{53}Cr	0,009	-
^{63}Cu	0,006	10
^{202}Hg	0,009	0,15
^{193}Ir	0,002	1,0
^{55}Mn	0,009	-
^{95}Mo	0,001	1,0
^{60}Ni	0,004	5,0
^{207}Pb	0,004	0,5
^{105}Pd	0,003	1,0
^{195}Pt	0,004	1,0
^{103}Rh	0,002	1,0
^{101}Ru	0,003	1,0
^{51}V	0,008	1,0

* Limite máximo permitido de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª Ed, 2010.

4.2.6 Determinação das impurezas elementares em fármacos

As melhores condições para os métodos de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®] e MIC foram aplicadas para a decomposição de diferentes fármacos e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS. Os fármacos como AZAT, ATEN, AMIT, CAPT, DICL, ENAL, HALO, IMIP, LEVO, NIFE, NIME, PRIM, PROP, SALB, SULF e ZIDO foram decompostos por ambos os métodos de decomposição.

Para determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V em fármacos as seguintes condições de preparo de amostra foram utilizadas:

- massas de 500 mg do fármaco (com exceção para AMI, DICL e IMIP em que massas de 200, 25 e 350 mg foram utilizadas, respectivamente) e 6 mL de HNO_3 concentrado para o método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®];

- massas de 500 mg do fármaco (com exceção para DICL, onde massas de 25 mg foram utilizadas) que e 6 mL da solução absorvedora de HNO_3 7 mol L^{-1} para MIC.

Para determinação de Ir, Pd, Pt, Rh e Ru as seguintes condições de preparo de amostra foram utilizadas:

- massas de 250 mg do fármaco (com exceção para AMI e DICL em que massas de 200 e 25 foram utilizadas, respectivamente) e 6 mL de água régia invertida para o método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®];
- massas de 300 mg do fármaco (com exceção para DICL, onde massas de 25 mg foram utilizadas) + 200 mg de NH_4Cl (mistura na forma de comprimidos) e 6 mL de solução absorvedora de água régia para MIC.

A maioria dos elementos, quantificados por ICP-MS, resultaram em concentrações inferiores aos permitidos pela USP e Farmacopeia Brasileira. Cabe destacar que os resultados mostrados nas Tabelas 15, 16 e 17 foram obtidos utilizando sistema UltraWave[®]. Todos os fármacos também foram decompostos por MIC e nenhuma diferença significativa dos resultados foi observada entre os métodos (teste *t-student*, nível de confiança de 95%).

Dentre os fármacos avaliados, elevadas concentrações de As foram observadas para CAPT e PRIM ($0,492 \pm 0,041$ e $2,65 \pm 0,10$ $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente), conforme pode ser observado nas Tabelas 15 e 17. Estes resultados são, aproximadamente, 3 vezes superiores, aos limites permitidos pelo *Pharmacopeial Forum* da USP para produtos de uso parenteral e oral. Concentrações de $2,84 \pm 0,27$ $\mu\text{g g}^{-1}$ de Hg foram encontradas no fármaco AZAT. Este valor é superior em, aproximadamente, 19 vezes o valor máximo permitido para Hg (Tabela 15) em produtos de uso parenteral e aproximadamente 1,9 vezes superior para produtos de uso oral.

Para o fármaco SALB, foram observadas concentrações elevadas de Pb, $0,779 \pm 0,050$ $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo este valor, aproximadamente, 1,5 vezes superior aos valores máximos permitidos para produtos utilizados por via parenteral e oral. Dentre os fármacos avaliados no presente trabalho, apenas o SALB é também produzido na forma farmacêutica para inalação. Assim os resultados obtidos para este fármaco foram avaliados também de acordo com os valores máximos permitidos para

produtos de uso inalatório e valores de, aproximadamente, 1,5 vezes superiores a estes limites foram encontrados. Concentrações elevadas de Ni também foram encontradas no SALB, tais como $41,8 \pm 2,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 17). Este valor representa, aproximadamente, 8 e 278 vezes superior aos valores máximos permitidos para produtos utilizados por via parenteral e inalatória, respectivamente. Caso o fármaco fosse utilizado como matéria-prima para produção de produtos utilizados por via oral estes valores estariam de acordo com os valores máximos permitidos.

Por fim, resultados elevados foram, também, observados para Cr nos fármacos CAPT, ENAL e LEVO ($3,41 \pm 0,20$; $8,90 \pm 1,24$ e $5,44 \pm 0,32 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente), conforme pode ser observado nas Tabelas 16 e 17. Contudo, para este elemento o *Pharmacopeial Forum* da USP não apresenta limites de concentrações máximas permitidas para produtos parenterais e orais. Dessa forma, no presente trabalho, optou-se em utilizar para Cr os valores máximos permitidos pela Farmacopeia Brasileira. Assim, aqueles valores são de, aproximadamente, 1,4; 3,6 e 2,2 vezes superiores, respectivamente, aos valores máximos permitidos para produtos de uso por via parenteral. Se os fármacos fossem destinados ao uso oral os valores encontrados seriam desprezíveis.

Tabela 15. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos após decomposição de AZAT, ATEN, AMIT, CAPT, ENAL e DICL por sistema UltraWave® e determinação de impurezas elementares por ICP-MS (média e desvio padrão, n=3).

Elementos	Fármacos					
	AZAT	ATEN	AMIT	CAPT	ENAL	DICL
⁷⁵ As	0,042 ± 0,002	< 0,002	< 0,002	0,492 ± 0,041	0,030 ± 0,003	< 0,027
¹¹¹ Cd	0,019 ± 0,027	0,191 ± 0,012	< 0,001	0,006 ± 0,001	< 0,001	< 0,006
⁵³ Cr*	0,362 ± 0,013	0,123 ± 0,011	0,357 ± 0,008	3,41 ± 0,20	8,90 ± 1,24	< 0,295
⁶³ Cu	1,382 ± 0,136	< 0,009	0,019 ± 0,002	< 0,009	0,019 ± 0,004	< 0,150
²⁰² Hg	2,84 ± 0,27	< 0,014	< 0,014	< 0,014	< 0,014	< 0,233
¹⁹³ Ir	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,024
⁵⁵ Mn	0,084 ± 0,013	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,097
⁹⁵ Mo	< 0,0011	< 0,001	< 0,001	0,143 ± 0,011	0,039 ± 0,004	< 0,018
⁶⁰ Ni	0,056 ± 0,007	< 0,005	< 0,005	< 0,005	4,29 ± 0,6017	< 0,092
²⁰⁷ Pb	0,009 ± 0,001	< 0,004	0,019 ± 0,003	0,165 ± 0,011	0,007 ± 0,001	< 0,060
¹⁰⁵ Pd	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	0,219 ± 0,001	< 0,039
¹⁹⁵ Pt	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,074
¹⁰³ Rh	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,024
¹⁰¹ Ru	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,033
⁵¹ V	0,097 ± 0,002	0,016 ± 0,001	0,086 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,086 ± 0,012	< 0,051

* Os LQs do fármaco DICL foi calculado levando-se em consideração 25 mg de amostra decomposta.

Tabela 16. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos após decomposição de HALO, IMIP, LEVO, NIFE e NIME por sistema UltraWave® e determinação de impurezas elementares por ICP-MS (média e desvio padrão, n=3).

Elementos	Fármacos				
	HALO	IMIP	LEVO	NIFE	NIME
⁷⁵ As	0,055 ± 0,005	0,058 ± 0,001	< 0,002	0,038 ± 0,005	0,039 ± 0,001
¹¹¹ Cd	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
⁵³ Cr*	0,532 ± 0,009	0,476 ± 0,0110	5,44 ± 0,32	0,519 ± 0,101	0,371 ± 0,013
⁶³ Cu	0,057 ± 0,003	< 0,009	< 0,009	0,069 ± 0,003	< 0,009
²⁰² Hg	0,055 ± 0,001	< 0,014	< 0,014	0,029 ± 0,004	< 0,014
¹⁹³ Ir	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003
⁵⁵ Mn	0,031 ± 0,003	< 0,005	0,041 ± 0,001	0,055 ± 0,009	0,047 ± 0,006
⁹⁵ Mo	0,109 ± 0,002	< 0,001	< 0,001	0,011 ± 0,001	0,013 ± 0,001
⁶⁰ Ni	0,067 ± 0,008	< 0,005	< 0,005	< 0,005	0,041 ± 0,001
²⁰⁷ Pb	< 0,004	< 0,004	< 0,004	0,021 ± 0,002	< 0,004
¹⁰⁵ Pd	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
¹⁹⁵ Pt	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009
¹⁰³ Rh	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003
¹⁰¹ Ru	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
⁵¹ V	0,106 ± 0,007	0,123 ± 0,000	0,169 ± 0,022	0,080 ± 0,008	0,085 ± 0,002

Tabela 17. Resultados, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos após decomposição de PRIM, PROP, SALB, SULF e ZIDO por sistema UltraWave[®] e determinação de impurezas elementares por ICP-MS (média e desvio padrão, n=3).

Elementos	Fármacos				
	PRIM	PROP	SALB	SULF	ZIDO
⁷⁵ As	2,65 ± 0,10	< 0,002	0,0341 ± 0,0019	< 0,002	0,062 ± 0,005
¹¹¹ Cd	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
⁵³ Cr*	0,783 ± 0,032	< 0,015	2,16 ± 0,05	< 0,015	0,644 ± 0,046
⁶³ Cu	< 0,0090	< 0,009	0,089 ± 0,001	< 0,009	< 0,009
²⁰² Hg	0,041 ± 0,002	< 0,014	< 0,014	< 0,014	< 0,014
¹⁹³ Ir	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003
⁵⁵ Mn	< 0,005	< 0,005	0,478 ± 0,0400	< 0,005	0,021 ± 0,001
⁹⁵ Mo	0,084 ± 0,002	< 0,001	0,149 ± 0,007	< 0,001	0,023 ± 0,002
⁶⁰ Ni	0,192 ± 0,011	< 0,005	41,8 ± 2,1	< 0,005	0,155 ± 0,001
²⁰⁷ Pb	0,007 ± 0,001	< 0,004	0,779 ± 0,050	0,512 ± 0,041	< 0,004
¹⁰⁵ Pd	< 0,005	< 0,005	0,057 ± 0,003	< 0,005	< 0,005
¹⁹⁵ Pt	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009
¹⁰³ Rh	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003
¹⁰¹ Ru	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004
⁵¹ V	0,029 ± 0,002	< 0,002	0,085 ± 0,006	< 0,002	< 0,002

4.3 Comparação dos métodos de decomposição

Neste trabalho 3 métodos de decomposição de fármacos, utilizando radiação micro-ondas, foram estudados para posterior determinação de impurezas elementares. Para cada método foram feitas otimizações buscando-se utilizar massas elevadas de amostras, soluções ideais para a completa solubilização de todos os elementos de interesse, digeridos com baixas concentrações de carbono e acidez residual, evitando assim interferências durante a etapa de determinação.

No decorrer das otimizações, foi observado que o método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema MultiWave[®], apesar de possibilitar a decomposição de muitos fármacos utilizando massas de 500 mg de amostra e 6 mL de HNO₃, não foi considerado como o mais adequado devido aos digeridos de alguns fármacos, com estruturas químicas mais refratárias, apresentarem valores de carbono residual superior a 250 mg L⁻¹.

Tendo em vista que os limites permitidos de impurezas elementares pelo capítulo 232 - “*Elemental Impurities-Limits*”, publicado pelo *Pharmacopeial Forum* da USP³ e pela Farmacopeia Brasileira⁴ são muito baixos, há a necessidade da utilização de métodos de decomposição que possibilitem a utilização de massas mais elevadas permitindo assim melhores LDs. A Tabela 18 mostra as diferentes características observadas para os métodos que utilizaram sistema UltraWave[®] e MIC.

Assim, destaca-se que o método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema UltraWave[®] possibilitou a decomposição de massas de amostras de até 500 mg com 6 mL de HNO₃ concentrado para a maioria dos fármacos (exceto para AMI e IMI, fármacos tricíclicos) e posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V. Massas de amostras de até 250 mg foram decompostas com 4,5 mL de HNO₃ e 1,5 mL HCl, com posterior determinação de Ir, Pd, Pt, Rh e Ru por ICP-MS. Quando MIC foi utilizado como método de preparo de amostra, 500 mg de amostra de todos os fármacos utilizados neste trabalho, puderam ser decompostas utilizando 6 mL de HNO₃ 7 mol L⁻¹ como solução absorvedora para posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V.

³ The United States Pharmacopeia, 232, *Pharmacopeial Forum* 37 (2011) 3.

⁴ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopeia Brasileira*, 5^a Ed., Brasil, 2010

Massas máximas de 300 mg de todos fármacos misturados com 200 mg de NH_4Cl foram decompostos utilizando como solução absorvedora 1,5 mL de HNO_3 e 4,5 mL de HCl , para posterior determinação de Ir, Pd, Pt, Rh e Ru. Os LQs de ambos os métodos de decomposição foram similares para a maioria dos analitos.

A acidez residual dos digeridos foi determinada após a decomposição das amostras pelos diferentes métodos. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que apesar da utilização de concentrações superiores de ácido HNO_3 para a decomposição de fármacos pelo sistema UltraWave[®], a acidez residual dos digeridos resultantes desse processo de decomposição foi inferior quando comparado com aqueles obtidos pelo método de decomposição MIC. Isto ocorreu devido ao consumo do HNO_3 para a decomposição da matéria orgânica, o que não ocorre com MIC, pois a matéria orgânica é consumida totalmente durante a combustão.

A eficiência de decomposição dos métodos propostos foi avaliada através da determinação de carbono residual por ICP OES. Os métodos utilizando sistema UltraWave[®] e MIC resultaram em valores de carbono residual inferiores a 250 mg L^{-1} . Deste modo, interferências poliatômicas e não espectrais causadas por excesso de C em solução não foram observadas.

Com respeito à frequência analítica foi possível observar maior processamento de amostras quando o sistema UltraWave[®] foi utilizado como método de preparo de amostras de fármacos. Cabe-se destacar que para efeito da avaliação da frequência analítica foi levado em consideração o tempo de manuseio das amostras (pesagem e confecção de comprimidos), etapa de decomposição e etapa de descontaminação. Assim é possível decompor até 45 amostras em um intervalo de 8 horas, sendo este método adequado para ser aplicado em análises de rotina.

Tabela 18. Comparação dos métodos de preparo de amostras investigados para decomposição de fármacos e posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS.

Parâmetros	Métodos de Preparo de Amostras	
	Sistema UltraWave®	MIC
Massa máxima (mg)		
As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V	500	500
Ir, Pd, Pt, Rh e Ru	250	300
Solução utilizada		
As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V	6 mL de HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹	6 mL de HNO ₃ 7 mol L ⁻¹
Ir, Pd, Pt, Rh e Ru	6 mL de água régia invertida	6 mL de água régia
Carbono residual, mg L⁻¹ de C	< 250	< 60
Teor de carbono residual, %	< 5%	< 1%
Tempo de decomposição, min		
As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V	50	25
Ir, Pd, Pt, Rh e Ru	50	50
Frequência analítica, 8 h*	45 amostras	24 amostras
Aplicabilidade para diferentes amostras	As condições variam com o tipo de amostra	Aplicável para todos os tipos de amostras

* Considerando o tempo total de decomposição, descontaminação e manipulação da amostra

5 CONCLUSÕES

De um modo geral, neste trabalho, procurou-se desenvolver métodos de decomposição de fármacos que possibilitassem posterior determinação de impurezas elementares por ICP-MS. Para tanto, 4 métodos de decomposição foram investigados: decomposição por via úmida em sistema MultiWave[®], decomposição por via úmida em sistema UltraWave[®], decomposição por combustão iniciada por micro-ondas e decomposição por via seca em forno tipo mufla. Além do mais, possíveis interferências durante etapa de determinação foram avaliados a fim de garantir resultados finais exatos e precisos.

Quando se avaliou as interferências produzidas por C sobre os isótopos ⁵²Cr, ⁵³Cr, ⁶⁰Ni e ⁷⁵As, em soluções de referências, foi observado que análises quantitativas para todos os analitos somente ocorreram quando soluções contendo concentrações de carbono inferiores a 250 mg L⁻¹ foram analisadas. Neste trabalho, os métodos de decomposição por sistema UltraWave[®] e MIC resultaram em digeridos, para todos os fármacos, com valores de carbono residual inferiores a 250 e 60 mg L⁻¹, respectivamente, evitando deste modo as interferências provocadas por digeridos com altas concentrações de C.

Interferências de Cl sobre os isótopos ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵³Cr e ⁷⁵As foram observadas quando soluções contendo concentrações iguais ou superiores 100 mg L⁻¹ de Cl foram analisadas. Ao decompor massas de 500 mg do fármaco PROP, concentração superior a 500 mg L⁻¹ de Cl resultaram nos digeridos finais. A fim de resolver as interferências causadas por esse excesso de Cl em solução, optou-se pela utilização de DRC para resolver as interferências sobre os isótopos ⁵¹V, ⁵²Cr e ⁵³Cr. Adicionalmente, foi utilizado FI-CVG-ICP-MS para a determinação de ⁷⁵As livre de interferências.

Quando soluções de referência contendo concentrações iguais ou superiores a 100 mg L⁻¹ de S foram analisadas por ICP-MS, foram observadas interferências para os isótopos ⁵²Cr e ⁶⁵Cu. Ao decompor massas de 500 mg de SULF digeridos com concentrações superiores a 100 mg L⁻¹ foram obtidos. Deste modo, para se evitar interferências poliatômicas e resultados superestimados para ⁵²Cr e ⁶⁵Cu, DRC-ICP-MS foi utilizado para a determinação destes elementos.

Quando soluções contendo concentrações crescentes de P foram analisadas por ICP-MS, interferências poliatômicas foram observadas sobre os isótopos ^{63}Cu e ^{65}Cu quando soluções com concentrações iguais ou superior a 500 mg L^{-1} de P foram analisadas por ICP-MS. Massas de 500 mg de PRIM foram decompostas resultando em digeridos com concentrações superiores a 500 mg L^{-1} de P. Para resolver estas interferências DRC-ICP-MS também foi utilizada para a determinação de ^{63}Cu e ^{65}Cu .

Por fim, ao avaliar as soluções contendo elevada concentração Na, foram observadas interferências espectrais e não espectrais causadas por este elemento. Interferências poliatômicas, sobre os isótopos ^{62}Ni e ^{63}Cu , foram observadas quando soluções de referências com concentrações igual ou superior a 100 mg L^{-1} de Na foram analisadas por ICP-MS. Com respeito às interferências não espectrais, causadas pelo excesso de Na em solução, foi possível observar valores de recuperação apropriados para soluções de referência contendo até 100 mg L^{-1} de Na em solução. Resultados semelhantes foram observados para os digeridos de DICL, quando massas de 25 mg foram decompostas. Em função da dificuldade de resolver esta interferência não espectral, sugere-se trabalhar com digeridos de até no máximo 60 mg L^{-1} de Na a fim de evitar a supressão do sinal analítico.

Após as otimizações dos métodos de decomposição pode-se concluir que:

- O método de decomposição por via úmida em sistema MultiWave[®] não foi adequado para a decomposição da maioria dos fármacos utilizados neste trabalho, uma vez que, limitou-se a decomposição de forma eficiente somente a fármacos com estrutura simples e menos estáveis. Ou seja, fármacos tricíclicos, por exemplo, resultaram em digeridos com elevada concentração de carbono residual ou resíduos insolúveis após a decomposição. Além do mais, quando misturas de HNO_3 e HCl foram utilizadas como reagentes de decomposição alguns fármacos não foram totalmente decompostos, mesmo utilizando massas de 50 mg.
- O método de decomposição por via úmida em sistema UltraWave[®] permitiu a decomposição de todos os fármacos utilizando massas de até 500 mg de amostras (com exceção para AMI, DICL e IMIP onde massas de 200, 25 e 350 mg foram utilizadas, respectivamente). Para as determinações de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V, os fármacos foram decompostos por sistema UltraWave[®] apenas com 6 mL de HNO_3 . Por outro lado, para a determinação de Ir, Pd, Pt, Rh e Ru, massas de 250 mg de amostras (com exceção para

AMI e DICL em que massas de 200 e 25 foram utilizadas, respectivamente) foram decompostas com 4,5 mL de HNO_3 e 1,5 mL de HCl . A acidez residual e a concentração de C residual nos digeridos resultantes foram inferiores a 25% e 250 mg L^{-1} , respectivamente. O método apresentou boa frequência analítica, ou seja, até 45 amostras podem ser processadas em 8 horas de trabalho.

- Por fim, o método de decomposição por MIC possibilitou a decomposição de todas as amostras utilizando massas de 500 mg de amostras, inclusive para os fármacos tricíclicos. Para as determinações de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb e V, comprimidos de 500 mg foram confeccionados (exceto para DICL, em que comprimidos de 25 mg foram necessários) para decomposição por MIC utilizando HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora. Já para a determinação de Ir, Pd, Pt, Rh e Ru, comprimidos de uma mistura de 300 mg do fármaco (exceto para diclofenaco, em que massas de 25 mg foram utilizadas) e 200 mg de NH_4Cl foram decompostos, utilizando como solução absorvedora 1,5 mL de HNO_3 e 4,5 mL de HCl . Os digeridos resultantes apresentaram concentração de carbono residual inferiores 60 mg L^{-1} . A frequência analítica observada para este método foi de 24 amostras processadas em um intervalo de tempo de 8 horas. Tendo em vista o elevado teor de Cl, resultante da utilização de NH_4Cl , houve a necessidade da utilização de calibração por adição de analito para determinação de Ir, Pd, Pt, Rh e Ru.

Por fim, ambos os métodos empregados (sistema UltraWave[®] e MIC) foram validados de acordo com parâmetros estabelecidos pelo ICH, ANVISA e INMETRO e assim, são considerados indicados como método de preparo de amostras de fármacos para posterior determinação de impurezas elementares na indústria farmacêutica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hardman, J. G., Limbird, L. E., Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica, 12^o edição, Ed. McGraw Hill, 2012.
2. Rao, R. N., Talluri, M., 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* 43 (2007) 1-13.
3. The United States Pharmacopeia, Elemental impurities - limits 232, *Pharmacopeial Forum* 37 (2013) 3.
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Farmacopeia Brasileira*, 5^a Ed., Cap. Métodos gerais - 5.3.2.3. Ensaio limite para metais pesados, Brasil, 2010
5. Silveira, J. N., Lara, P. C. P., Dias, M. B., Matos, J. M. G., da Silva, J. C. J., Nascentes, C. C., Ciminelli, V. S. T., da Silva, J. B. B., Determination of As, Bi, Cd, Co, Cr, Ga, In, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Te, Tl, and V in antihypertensive drugs by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Atomic Spectroscopy* 28 (2007) 1-7.
6. Van Hoecke, K., Catry, C., Vanhaecke, F., Optimization of sample preparation and a quadrupole ICP-MS measurement protocol for the determination of elemental impurities in pharmaceutical substances in compliance with USP guidelines, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1909-1919.
7. Grindlay, G., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M., Vanhaecke, F., A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 86 (2013) 42-49.
8. Vanhoe, H., Goossens, J., Moens, L., Dams, R., Spectral interferences encountered in the analysis of biological materials by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 177-185.
9. O'Connor, G., Evans, E. H., Fundamental Aspects of Inductively Coupled Plasma - Mass spectrometry (ICP-MS), S. J. Hill (Ed.) *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications* 2nd Edition, Backwell Publishing Ltd, Australia, 2007, pp. 134-159.
10. Lewen, N., Mathew, S., Schenkenberger, M., Raglione, T., A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 739-752.
11. Lira S., Brush, P., Senak, L., Chi-san Wu, Malawerc E., The Use of Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectroscopy in the Determination of Heavy Metals in Crospovidone and Povidone as a Replacement for the Concomitant Visual Comparison Test, *Pharmacopeial Forum* 34 (2008) 1613-1618

12. Ang, H. H., Lead contamination in *Eugenia dyeriana* herbal preparations from different commercial sources in Malaysia, *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 1969-1975.
13. Caldas, E. D., Machado, L. L., Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil, *Food and Chemical Toxicology* 42 (2004) 599-603.
14. Bubnic, Z., Urleb, U., Kreft, K., Veber, M., Determination of Nickel in Active Pharmaceutical Ingredients by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *Acta Chimica Slovenica* 57 (2010) 37-44.
15. Niemela, M., Kola, H., Eilola, K., Peramaki, P., Development of analytical methods for the determination of sub-ppm concentrations of palladium and iron in methotrexate, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 433-439.
16. Stoica, A. I., Peltea, M., Baiulescu, G. E., Ionica, M., Determination of cobalt in pharmaceutical products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004) 653-656.
17. Flores, E. M. M., Barin, J. S., Mesko, M. F., Knapp, G., Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — A brief overview and recent applications, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1051-1064.
18. Barin, J. S., Tischler, B., Picoloto, R. S., Antes, F. G., da 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* 29 (2014) 352-358.
19. Muller, A. L. H., Mello, P. A., Mesko, M. F., Duarte, F. A., Dressler, V. L., Muller, E. I., Flores, E. M. M., Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 1889-1894.
20. Nam, K. H., Isensee, R., Infantino, G., Putyera, K., Wang, X. W., Microwave-Induced Combustion for ICP-MS: A Generic Approach to Trace Elemental Analyses of Pharmaceutical Products, *Spectroscopy* 26 (2011) 36-41.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*, 2003.
22. International Conference on Harmonisation, *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, 2005, Acessado em: 25/04/2014
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
23. The United States Pharmacopeia, Elemental impurities - limits 233, *Pharmacopeial Forum* 37 (2013) 3.
24. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Conceitos Técnicos, Acessado em: 20/04/2014
<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#3.25>, 2014.
25. International Conference on Harmonisation, *Guideline for Elemental Impurities Q3D* 2013. Acessado em: 25/04/2014
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.

26. The United States Pharmacopeial Convention, USP, 35 th ch. 231-Heavy metals, USP, Rockville, Maryland, 2012.
27. Walter, P. J., Chalk, S., Kingston, H. M. S., Microwave-enhanced chemistry. Fundamentals, sample preapration and applications, Washington, 1997.
28. Nobrega, J. A., Pirola, C., Fialho, L. L., Rota, G., Jordao, C. E. K. M. A. D., Pollo, F., Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become?, *Talanta* 98 (2012) 272-276.
29. Pavlović, D. M., Babić, S., Horvat, A. J. M., Kaštelan-Macan, M., Sample preparation in analysis of pharmaceuticals, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 1062-1075.
30. Matusiewicz, H., Wet digestion methods, Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.) Sample Preparation for Trace Element Analysis, Amsterdam, 2003, pp. 193-233.
31. Ajasa, A., Bello, M. O., Ibrahim, A. O., Ogunwande, I. A., Olawore, N. O., Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria, *Food Chemistry* 85 (2004) 67-71.
32. Barthwal, J., Nair, S., Kakkar, P., Heavy metal accumulation in medicinal plants collected from environmentally different sites, *Biomedical and Environmental Sciences* 21 (2008) 319-324.
33. Baye, H., Hymete, A., Lead and Cadmium Accumulation in Medicinal Plants Collected from Environmentally Different Sites, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84 (2010) 197-201.
34. Campos, M. M. A., Tonuci, H., Silva, S. M., Altoe, B. D., de Carvalho, D., Kronka, E. A. M., Pereira, A. M. S., Bertoni, B. W., Franca, S. D., Miranda, C. E. S., Determination of Lead Content in Medicinal Plants by Pre-concentration Flow Injection Analysis-Flame Atomic Absorption Spectrometry, *Phytochemical Analysis* 20 (2009) 445-449.
35. Chuang, I. C., Chen, K. S., Huang, Y. L., Lee, P. N., Lin, T. H., Determination of trace elements in some natural drugs by atomic absorption spectrometry, *Biological Trace Element Research* 76 (2000) 235-244.
36. Orisakwe, O. E., Nduka, J. K., Lead and cadmium levels of commonly administered pediatric syrups in Nigeria: A public health concern?, *Science of the Total Environment* 407 (2009) 5993-5996.
37. Razic, S., Onjia, A., Dogo, S., Slavkovic, L., Popovic, A., Determination of metal content in some herbal drugs - Empirical and chemometric approach, *Talanta* 67 (2005) 233-239.
38. Wu, X. H., Sun, D. H., Zhuang, Z. X., Wang, X. R., Gong, H. F., Hong, J. X., Lee, F. S. C., Analysis and leaching characteristics of mercury and arsenic in Chinese medicinal material, *Analytica Chimica Acta* 453 (2002) 311-323.
39. Chizzola, R., Michitsch, H., Franz, C., Monitoring of metallic micronutrients and heavy metals in herbs, spices and medicinal plants from Austria, *European Food Research and Technology* 216 (2003) 407-411.

40. Lasztity, A., Kelko-Levai, A., Zih-Perenyi, K., Varga, I., Flow-injection preconcentration and graphite furnace atomic absorption spectrometric determination of platinum, *Talanta* 59 (2003) 393-398.
41. Lesniewicz, A., Jaworska, K., Zyrnicki, W., Macro- and micro-nutrients and their bioavailability in Polish herbal medicaments, *Food Chemistry* 99 (2006) 670-679.
42. Murty, A., Kulshresta, U. C., Rao, T. N., Talluri, M., Determination of heavy metals in selected drug substances by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Indian Journal of Chemical Technology* 12 (2005) 229-231.
43. Nookabkaew, S., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 6939-6944.
44. Razic, S., Dogo, S., Slavkovic, L., Inorganic analysis of herbal drugs. Part II. Plant and soil analysis - diverse bioavailability and uptake of essential and toxic elements, *Journal of the Serbian Chemical Society* 71 (2006) 1095-1105.
45. Würfels, M., Jackwerth, E., Stoepler, M., Residues from Biological-Materials after Pressure Decomposition with Nitric-Acid 1. Carbon Conversion during Sample Decomposition, *Analytica Chimica Acta* 226 (1989) 1-16.
46. Barclay, D., Microwave Digestion. Moves to 21st century, *Today's Chemist at work*, (2004) 28-32.
47. Antes, F. G., Mesko, M. F., Barin, J. S., Moreira, C. M., Flores, E. M. M., Dressler, V. L., Development of multi-elemental method for quality control of parenteral component solutions using ICP-MS, *Microchemical Journal* 98 (2011) 144-149.
48. Larsen, E. H., Sturup, S., Carbon-Enhanced Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometric Detection of Arsenic and Selenium and Its Application to Arsenic Speciation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 1099-1105.
49. Muller, A. L. H., Bizzi, C. A., Pereira, J. S. F., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Flores, E. M. M., Muller, E. I., Bromine and Chlorine Determination in Cigarette Tobacco using Microwave-Induced Combustion and Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, *Journal Brazilian Chemical Society* 22 (2011) 1649-1655.
50. Stewart, I. I., Olesik, J. W., The effect of nitric acid concentration and nebulizer gas flow rates on aerosol properties and transport rates in inductively coupled plasma sample introduction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1249-1256.
51. Antes, F. G., Duarte, F. A., Mesko, M. F., Nunes, M. A. G., Pereira, V. A., Müller, E. I., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Determination of toxic elements in coal by ICP-MS after digestion using microwave-induced combustion, *Talanta* 83 (2010) 364-369.
52. Flores, E. M. M., Muller, E. I., Duarte, F. A., Grinberg, P., Sturgeon, R. E., Determination of Trace Elements in Fluoropolymers after Microwave-Induced Combustion, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 374-380.

53. Mello, P. D., Pereira, J. S. F., de Moraes, D. P., Dressler, V. L., Flores, E. M. D., Knapp, G., Nickel, vanadium and sulfur determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry in crude oil distillation residues after microwave-induced combustion, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 911-916.
54. Moraes, D. P., Pereira, J. S. F., Diehl, L. O., Mesko, M. F., Dressler, V. L., Paniz, J. N. G., Knapp, G., Flores, E. M. M., Evaluation of sample preparation methods for elastomer digestion for further halogens determination, *Analytical Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 563-570.
55. Mortari, S. R., Cocco, C. R., Bartz, F. R., Dressler, V. L., Flores, E. M. D., Fast Digestion Procedure for Determination of Catalyst Residues in La- and Ni-Based Carbon Nanotubes, *Analytical Chemistry* 82 (2010) 4298-4303.
56. Muller, A. L. H., Muller, C. C., Antes, F. G., Barin, J. S., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Muller, E. I., Determination of Bromide, Chloride, and Fluoride in Cigarette Tobacco by Ion Chromatography after Microwave-Induced Combustion, *Analytical Letters* 45 (2012) 1004-1015.
57. Pereira, J. S. F., Antes, F. G., Diehl, L. O., Knorr, C. L., Mortari, S. R., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Microwave-induced combustion of carbon nanotubes for further halogen determination, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (2010) 1268-1274.
58. Pereira, J. S. F., Knorr, C. L., Pereira, L. S. F., Moraes, D. P., Paniz, J. N. G., Flores, E. M. M., Knapp, G., Evaluation of sample preparation methods for polymer digestion and trace elements determination by ICPMS and ICPOES, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (2011) 1849-1857.
59. Stoving, C., Jensen, H., Gammelgaard, B., Sturup, S., Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 84 (2013) 209-214.
60. Venzago, C., Popp, M., Kovac, J., Kunkel, A., Pharmacopeial requirements for elemental impurities: a novel approach to the trace determination of osmium by oxidative pressure vessel sample digestion and measurement using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after complexation and stabilisation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28 (2013) 1125-1129.
61. Soltyk, K., Lozak, A., Ostapczuk, P., Fijalek, Z., Determination of chromium and selected elements in multimineral and multivitamin preparations and in pharmaceutical raw material, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32 (2003) 425-432.
62. de Leon, C. A. P., Bayon, M. M., Caruso, J. A., Trace element determination in vitamin E using ICP-MS, *Analytical Bioanalytical Chemistry* 374 (2002) 230-234.

63. Hoenig, M., deKersabiec, A. M., Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: Present status, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 51 (1996) 1297-1307.
64. Fecher, P., Ruhnke, G., Cross contamination of lead and cadmium during dry ashing of food samples, *Analytical Bioanalytical Chemistry* 373 (2002) 787-791.
65. Koh, S., Aoki, T., Katayama, Y., Takada, J., Losses of elements in plant samples under the dry ashing process, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 239 (1999) 591-594.
66. Moraes, D. P., Mesko, M. F., Mello, P. A., Paniz, J. N. G., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. M., Application of microwave induced combustion in closed vessels for carbon black-containing elastomers decomposition, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1065-1071.
67. Barin, J. S., Flores, E. M. M., Knapp, G., Trends in sample preparation using combustion techniques in: M. A. Z. Arruda, Trends in Sample Preparation, New York, 2006, 53-82.
68. Flores, E. M. D., Barin, J. S., Paniz, J. N. G., Medeiros, J. A., Knapp, G., Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.
69. Agatemor, C., Beauchemin, D., Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review, *Analytical Chimica Acta* 706 (2011) 66-83.
70. Rodushkin, I., Ruth, T., Klockare, D., Non-spectral interferences caused by a saline water matrix in quadrupole and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 159-166.
71. Olivares, J. A., Houk, R. S., Suppression of Analyte Signal by Various Concomitant Salts in Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry, *Analytical Chemistry* 58 (1986) 20-25.
72. Fraser, M. M., Beauchemin, D., Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma-mass spectroscopy. Part 1. Elemental ions, *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 1705-1731.
73. Reed, N. M., Cairns, R. O., Hutton, R. C., Takaku, Y., Characterization of Polyatomic Ion Interferences in Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometry Using a High-Resolution Mass-Spectrometer, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994) 881-896.
74. Guo, W., Hu, S. H., Zhang, J. Y., Hu, Z. C., Zhang, H. F., Wang, Y. X., Reduction of acid effects on trace element determination in food samples by CH₄ mixed plasma-DRC-MS, *Talanta* 91 (2012) 60-64.
75. Hu, Z. C., Gao, S., Hu, S. H., Yuan, H. L., Liua, X. M., Liu, Y. S., Suppression of interferences for direct determination of arsenic in geological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20 (2005) 1263-1269.

-
76. Stewart, I. I., W. Olesik, J., Steady state acid effects in ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 1313-1320.
 77. Evans, E. H., Giglio, J. J., Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry - a Review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 8 (1993) 1-18.
 78. Dittert, I. M., Maranhão, T. A., Borges, D. L. G., Vieira, M. A., Welz, B., Curtius, A. J., Determination of mercury in biological samples by cold vapor atomic absorption spectrometry following cloud point extraction with salt-induced phase separation, *Talanta* 72 (2007) 1786-1790.
 79. Dressler, V. L., Santos, C. M. M., Antes, F. G., Bentlin, F. R. S., Pozebon, D., Flores, E. M. M., Total Mercury, Inorganic Mercury and Methyl Mercury Determination in Red Wine, *Food Analytical Methods* 5 (2012) 505-511.
 80. Duarte, F. A., Pereira, J. S. F., Barin, J. S., Mesko, M. F., Dressler, V. L., Flores, E. M. d. M., Knapp, G., Seafood digestion by microwave-induced combustion for total arsenic determination by atomic spectrometry techniques with hydride generation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 224-227.
 81. Flores, E. M. D., da Silva, L. L. C., Barin, J. S., Saidelles, A. P. F., Zanella, R., Dressler, V. L., Paniz, J. N. G., Minimization of volatile nitrogen oxides interference in the determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56 (2001) 1883-1891.
 82. Instituto Nacional Metrologia, Qualidade e Tecnologia, *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos*, 2011. Acessado em: 30/03/2014 <https://www.inmetro.gov.br/>
 83. Muller, C. C., Muller, A. L. H., Pirola, C., Duarte, F. A., Flores, E. M. M., Muller, E. I., Feasibility of Nuts Digestion Using Single Reaction Chamber for Further Trace Elements Determination by ICP OES, *Microchemical Journal* 116 (2014) 255-260.
 84. Pereira, J. S. F., Moraes, D. P., Antes, F. G., Diehl, L. O., Santos, M. F. P., Guimaraes, R. C. L., Fonseca, T. C. O., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Determination of metals and metalloids in light and heavy crude oil by ICP-MS after digestion by microwave-induced combustion, *Microchemical Journal* 96 (2010) 4-11.
 85. White, R. T., Kettisch, P., Kainrath, P., The high pressure asher: A high-performance sample decomposition system as an alternative to microwave-assisted digestion, *Atomic Spectroscopy* 19 (1998) 187-192.
 86. Joint Committee for Guides in Metrology, *Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement*, Bureau International des Poids et Mesures 2008, pp. 120.
 87. Brenner, I. B., Segal, I., Mermert, M., Mermert, J. M., Study of the Depressive Effects of Nitric-Acid on the Line-Intensities of Rare-Earth Elements in Inductively-Coupled Plasma-Atomic Emission-Spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 50 (1995) 333-340.

88. Greenfield, S., Mcgeachin, H. M., Smith, P. B., Nebulization Effects with Acid Solutions in Icp Spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 84 (1976) 67-78.
89. Stewart, I. I., Olesik, J. W., Transient acid effects in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 843-854.
90. Todolí, J. L., Mermet, J.-M., Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 54 (1999) 895-929.
91. Farino, J., Miller, J. R., Smith, D. D., Browner, R. F., Influence of Solution Uptake Rate on Signals and Interferences in Inductively Coupled Plasma Optical-Emission Spectrometry, *Analytical Chemistry* 59 (1987) 2303-2309.
92. Chudinov, E. G., Ostroukhova, I. I., Varvanina, G. V., Acid Effects in Icp-Aes, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 335 (1989) 25-33.
93. Cai, Y., Georgiadis, M., Fourqurean, J. W., Determination of arsenic in seagrass using inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 1411-1422.
94. Hu, B., Zheng, F., He, M., Zhang, N., Capillary microextraction (CME) and its application to trace elements analysis and their speciation, *Analytica Chimica Acta* 650 (2009) 23-32.
95. Dubuisson, C., Poussel, E., Todoli, J. L., Mermet, J. M., Effect of sodium during the aerosol transport and filtering in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 53 (1998) 593-600.
96. Florian, D., Knapp, G., High-Temperature, Microwave-Assisted UV Digestion: A Promising Sample Preparation Technique for Trace Element Analysis, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 1515-1520.
97. Balcerzak, M., Sample digestion methods for the determination of traces of precious metals by spectrometric techniques, *Analytical Sciences* 18 (2002) 737-750.
98. Milestone Srl, UltraWAVE, Operator Manual, 2013.
99. Mesko, M. F., de Moraes, D. P., Barin, J. S., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. D., Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique, *Microchemical Journal* 82 (2006) 183-188.
100. Mesko, M. F., Mello, P. A., Bizzi, C. A., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. M., Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion, *Analytical Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 1125-1131.
101. Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Pereira, J. S. F., Mello, P. A., Barin, J. S., Knapp, G., Determination of Halogens in Coal after Digestion Using the Microwave-Induced Combustion Technique, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.

-
102. Pereira, J. S. F., Moreira, C. M., Albers, C. N., Jacobsen, O. S., Flores, E. M. M., Determination of total organic halogen (TOX) in humic acids after microwave-induced combustion, *Chemosphere* 83 (2011) 281-286.
 103. Mello, P. A., Giesbrecht, C. K., Alencar, M. S., Moreira, E. M., Paniz, J. N. G., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Determination of Sulfur in Petroleum Coke Combining Closed Vessel Microwave-Induced Combustion and Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry, *Analytical Letters* 41 (2008) 1623-1632.
 104. Pereira, J. S. F., Diehl, L. O., Duarte, F. A., Santos, M. F. P., Guimarães, R. C. L., Dressler, V. L., Flores, E. M. M., Chloride determination by ion chromatography in petroleum coke after digestion by microwave-induced combustion, *Journal of Chromatography A* 1213 (2008) 249-252.
 105. Pereira, J. S. F., Mello, P. A., Moraes, D. P., Duarte, F. A., Dressler, V. L., Knapp, G., Flores, E. M. M., Chlorine and sulfur determination in extra-heavy crude oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64 (2009) 554-558.